

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra speciální zootechniky**



**Vliv opakovaného zchlazení inseminačních dávek býků na  
zastoupení živých spermií**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Adéla Kovalčíková**

**Vedoucí práce: Doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.**

© 2015 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv opakovaného zchlazení inseminačních dávek býků na zastoupení živých spermií" 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 10.4. 2015

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala panu doc. Ing. Luďkovi Stádníkovi, Ph. D. za pomoc a trpělivost při vedení práce, poskytnutí cenných rad při vypracování práce a možnost danou problematiku kdykoli konzultovat. Mé díky také patří panu Ing. Janu Beranovi, Ph.D. za pomoc při sestavování metodiky a experimentální části.

# Vliv opakovaného zchlazení inseminačních dávek býků na zastoupení živých spermií

## Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo zhodnocení relativního zastoupení živých spermií v inseminační dávce býků po opakovaném zchlazování.

V experimentální části je popsána charakteristika inseminační stanice i býků a metodika odběru ejakulátu včetně jeho obohacení 4%, 6% a 8% LDL – cholesterolem), před zamrazením a převozem do univerzitní laboratoře. Zde byly vzorky naředěny komerčními ředidly AndroMed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup>. Poté byly roztoky ředidel, LDL a ejakulátu podrobeny chladovému šoku po rozmrazení, dvouhodinovému tepelnému testu a druhému chladovému šoku. Posléze byly v roztocích mikroskopicky zjištěny podíly přeživších spermií pomocí eosin-nigrosinového barvení. Výsledky byly zhodnoceny pomocí statistického programu, díky němuž byly určeny významné efekty mající vliv na podíl živých spermií obsažených v dávce.

Ve výsledcích jsou popsány rozdíly mezi jednotlivými ředidly, přísady LDL – cholesterolu a býky. Tyto výsledky jsou v části diskuze porovnávány s již dříve provedenými pokusy.

V rámci hodnocení jednotlivých aspektů vychází z ředidel lépe AndroMed<sup>®</sup>, z přísad LDL se jako nejstabilnější z pohledu přežitelnosti spermií v průběhu experimentu 8% LDL, pro dvojitě zchlazení jej však doporučit nelze. Dobrých výsledků bylo také dosaženo přísadkou obsahující 4% LDL, díky které byla zachována vyšší přežitelnost spermií po druhém chladovém šoku. Dále byl prokázán statisticky významný efekt býka ( $P < 0,001$ ), jež lze pokládat za velmi významný faktor. Je však ještě nutné provést další výzkumy, jež zpřesní, jaká koncentrace přísadky LDL – cholesterolu je v rámci ochrany spermií před výkyvy teploty nejefektivnější. Bez uvážení přísadky LDL a typu ředidla nelze jednoznačně zaručit míru přežitelnosti spermií býků, jelikož je ta dána různými biologickými faktory.

**Klíčová slova:** konzervace, umělá inseminace, ředidlo, chladový a tepelný test, spermie

# **Effect of repeated cooling of bulls insemination doses on living sperm abundance**

## **Summary**

The aim of this thesis was to evaluate the relative abundance of living sperm in the bulls insemination dose after repeated chilling.

Experimental section describes the characteristics of AIC (artificial insemination center) and bulls and ejaculate sampling methodology including its enrichment of 4%, 6% and 8% LDL – cholesterol) before freezing and transporting to the university laboratories. Here, samples were diluted with commercial extenders AndroMed<sup>®</sup> and Bioxcell<sup>®</sup>. Then, the mixture of extenders, LDL – cholesterol and semen were subjected to cold shock after thawing, two-hours-lasting heat test and second cold shock. Afterthat, survival rates were determined in these solution by microscopical observation using eosine-nigrosine staining. The results were evaluated by the statistical program through which significant effects affecting the proportions of living sperm in the batch were determined.

Within results, differences between extenders, additives, LDL – cholesterol and bulls are described. These results are compared in discussion section with the previously made experiments.

Within individual aspects, it can be concluded that AndroMed<sup>®</sup> is in general better extender and the most stable in term of survivability of living sperm is 8% LDL – cholesterol addition, however, it cannot be recommended for double chilling. Good results were also achieved by the addition of 4% of LDL – cholesterol through which a higher sperm survivability after second cold shock was maintained. In addition, a statistically significant effect of the bull ( $P < 0,001$ ), which can be considered as a very important factor, was proved. However, it is still necessary to carry out further research to refine what concentration of LDL – cholesterol is the most effective for protecting sperm against temperature fluctuations. Without considering the addition of LDL and type of extender it cannot be guaranteed the survivability rate of bulls sperm bulls, because it is given by different biological factors.

**Keywords:** conservation, artificial insemination, extender, cooling and heat test, sperm

# Obsah

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Úvod .....</b>                                   | <b>1</b>  |
| <b>2 Cíl práce .....</b>                              | <b>2</b>  |
| <b>3 Literární přehled .....</b>                      | <b>3</b>  |
| <b>3.1 Inseminace skotu .....</b>                     | <b>3</b>  |
| <b>3.2 Výroba inseminačních dávek .....</b>           | <b>5</b>  |
| 3.2.1 Výběr býků .....                                | 5         |
| 3.2.2 Odběr ejakulátu .....                           | 5         |
| 3.2.3 Makroskopické hodnocení ejakulátu .....         | 6         |
| 3.2.4 Mikroskopické hodnocení ejakulátu .....         | 6         |
| <b>3.3 Zpracování inseminačních dávek .....</b>       | <b>7</b>  |
| 3.3.1 Ředění ejakulátu .....                          | 8         |
| 3.3.2 Typy ředidel .....                              | 9         |
| 3.3.2.1 Ředidla založena na mléčné bázi .....         | 9         |
| 3.3.2.2 Ředidla obsahující vaječný žloutek .....      | 9         |
| 3.3.2.3 Glycerol .....                                | 11        |
| 3.3.2.4 Ředidla ze sójového extraktu .....            | 11        |
| 3.3.2.5 Ředidlo z kokosového mléka .....              | 11        |
| 3.3.3 Přidávky obsažené v ředidlech ejakulátu .....   | 12        |
| 3.3.4 Kryoochrana a chlazení .....                    | 12        |
| 3.3.5 Ekvilibrace .....                               | 14        |
| 3.3.6 Plnění a skladování inseminačních dávek .....   | 14        |
| 3.3.7 Rozmrazování inseminačních dávek .....          | 15        |
| <b>3.4 Hodnocení inseminačních dávek .....</b>        | <b>15</b> |
| 3.4.1 Tepelný test – test přežitelnosti spermií ..... | 16        |
| 3.4.2 Chladový test .....                             | 16        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 3.4.3      | HOS test – hypoosmotic swelling test.....         | 17        |
| 3.4.4      | Test pohyblivosti – motility test .....           | 17        |
| <b>3.5</b> | <b>Budoucí trendy v konzervaci ejakulátu.....</b> | <b>18</b> |
| 3.5.1      | Lyofilizovaný ejakulát.....                       | 18        |
| 3.5.2      | Transplantace buněk varlete .....                 | 19        |
| <b>4</b>   | <b>Materiál a metodika.....</b>                   | <b>20</b> |
| 4.1        | Charakteristika inseminační stanice .....         | 20        |
| 4.2        | Charakteristika býků .....                        | 20        |
| 4.3        | Odběr ejakulátu .....                             | 21        |
| 4.4        | Hodnocení ejakulátu .....                         | 21        |
| 4.5        | Použitá ředidla.....                              | 22        |
| 4.5.1      | AndroMed® .....                                   | 22        |
| 4.5.2      | Bioxcell® .....                                   | 23        |
| 4.5.3      | LDL – cholesterol .....                           | 23        |
| 4.6        | Statistické vyhodnocení.....                      | 23        |
| <b>5</b>   | <b>Výsledky .....</b>                             | <b>25</b> |
| <b>6</b>   | <b>Diskuze .....</b>                              | <b>32</b> |
| <b>7</b>   | <b>Závěr .....</b>                                | <b>36</b> |
| <b>8</b>   | <b>Literatura.....</b>                            | <b>37</b> |
| <b>9</b>   | <b>Přílohy.....</b>                               | <b>42</b> |
| <b>10</b>  | <b>Seznam použitých symbolů a zkratk .....</b>    | <b>50</b> |

# 1 Úvod

Umělá inseminace v chovu skotu je používána za účelem zlepšení užitkovosti stáda, lepšího selekčního pokroku a ke zvýšení vlastního reprodukčního potenciálu plemeníků. Inseminace je nejčastěji využívanou biotechnologickou metodou v chovech nejen mléčného typu skotu, ale i v chovech masného typu skotu.

Při zpracovávání inseminačních dávek je nutné řídit se přesně danými postupy. Záleží však i na výběru a výživě plemeníka během jeho odchovu v plemenných odchovných býků, dále na způsobu odběru ejakulátu na inseminační stanici a především na jeho kontrole a zpracování v laboratoři. Ejakulát musí projít makroskopickým a mikroskopickým posouzením, dále již přímým zpracováním do dávek. Tento úkon zahrnuje ředění příslušným ředidlem spermatu, plnění do pejet či pelet, ekvilibraci a zmrazení. Na těchto krocích výroby inseminační dávky velmi záleží, jelikož zvolené ředidlo, doba plnění, zchlazování a zmrazování má zásadní vliv na přežitelnost spermií a jejich následnou oplozovací schopnost v pohlavním ústrojí plemenice.

Nejčastějším a zároveň nejstarším typem ředidel jsou používána ředidla žloutkového typu. Všeobecně však ve světě panuje snaha předcházet ředidlům založeným na živočišných složkách, protože u těchto typů ředidel může docházet k mikrobiální kontaminaci inseminační dávky, a tím k narušení oplozovací schopnosti spermií. Proto je v současnosti nahrazován vaječný žloutek LDL – cholesterolem, což je chemicky frakcionovaná látka, jež se přirozeně vyskytuje ve žloutku. Často tedy dochází také k přidávání této frakce i do ředidel bezžloutkového typu. LDL – cholesterol má mimo jiné též kryoprotektivní účinky chránící spermie před chladovým poškozením během ekvibrace a poškození mrazem během mrazení.

Dalšími typy náhrad žloutků a jiných živočišných složek u komerčně využívaných ředidel jsou například sójový lecitin extrakt ze sójových bobů, glycerol a fosfolipidy. Na rozdíl od složek živočišného původu tyto látky však obecně nedosahují tak dobrých výsledků. Zejména proto jsou tyto typy ředidel a jejich různá kombinace předmětem dalšího výzkumu.



## 2 Cíl práce

Cílem práce je zhodnotit relativní zastoupení živých spermií v inseminační dávce býků po opakovaném zchlazování.

### **Hypotéza:**

Hypotézou práce je předpoklad, že opakované zchlazení významně snižuje podíl živých spermií, čímž dochází k omezení oplozovací schopnosti dávky.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Inseminace skotu

V chovech mléčných plemen skotu je nutné brát reprodukci, po níž následuje produkce, jako hlavního ukazatele efektivity živočišné produkce. Vzhledem k tomu, že se kráva telí pouze jednou ročně, je i genetický pokrok u skotu poměrně pomalý v porovnání s ostatními druhy hospodářských zvířat. Díky tomuto faktu jsou mléčná plemena šlechtěna na co nejvyšší produkci mléka (Ball a Peters, 2004). Jelínková (2010) zmiňuje, že kvůli naplnění tohoto šlechtitelského cíle je ohrožena reprodukce, neboť s rostoucí mléčnou produkcí přímo úměrně klesají reprodukční ukazatelé. Také plodnost samic, ať už krav či jalovic, je velmi obtížně kontrolovatelná, jelikož je ovlivněna mnoha faktory. Těmi mohou být například špatná tělesná kondice krav, negativní energetická bilance, jež s kondicí úzce souvisí, tepelný stres nebo nedostatek různých minerálních látek. Zatím není jisté, jak k tomuto jevu dochází, a proto se neustále bádá po příčinách. V současné době se výzkum tohoto problému zaměřuje nejen na genetické aspekty, ale i na fyziologii, výživu a na řízení stáda (Walsh a kol., 2011). Bylo však také provedeno mnoho výzkumů potvrzující pozitivní vztah mezi vysokou produkcí mléka a výbornou plodností krav. Jak již bylo zmíněno výše, záleží však spíše na podmínkách chovu, ve kterém jsou zvířata chována, než na záporné korelaci těchto dvou vlastností (Lopéz-Gautius, 2012).

Umělá inseminace je ve světě využívána již přes dvě století, komerční výroba inseminačních dávek tak, jak ji známe v dnešní době, však vznikla teprve před pětasedmdesáti lety. Dnes inseminace představuje jednu z nejdůležitějších reprodukčních metod vůbec. Mezi hlavní tři výhody využití inseminace řadíme jednoduchost provedení, poměrně nízkou ekonomickou náročnost a úspěšnost této metody. To potvrzují i jiní autoři, například Lopéz-Gautius (2013), který jako velkou výhodu uvádí i kontrolu nad chorobami. Také Rodríguez-Martínez (1998) zmiňuje, že je velmi důležité kontrolovat sperma, jež se používá k výrobě inseminačních dávek. Jako hlavní důvod uvádí nutnost předcházet významným hospodářským ztrátám způsobeným šířením semene nezdravých a infekčních býků. Z tohoto důvodu jsou plemenní býci podrobeni velmi přísným zdravotním a andrologickým testacím.

Je-li inseminace kombinována s jinými reprodukčními technologiemi, lze všeobecně předpokládat dosažení lepších výsledků, například v podobě velkého počtu potomků od vhodného plemeníka (Vishwanath, 2003). Lopéz-Gautius (2012) dále doplňuje,

že inseminace má oproti přirozené plemenitbě za následek celosvětové zlepšení genů v populaci skotu. Ball a Peters (2004) konkrétněji zmiňují výhody umělé inseminace:

*Genetický zisk* – genetický zisk je největší výhodou této reprodukční metody. Chovatelé si mohou dovolit pořídit poměrně levně semeno vynikajícího býka, jež by pro ně bylo jinak nedosažitelné, zapustit si s ním plemence, a tím zlepšit celkovou genetickou hodnotu svého stáda. Rizikem je však zapouštění velkého počtu plemenic býkem, který přenáší genetickou vadu, jež se projeví až po narození jeho potomků. Díky testaci býků je ale tato hrozba poměrně úspěšně snižována na minimum.

*Cenová dostupnost* – při srovnání nákupu inseminačních dávek a nákupu plemeníka do stáda, vychází nákup dávek pro celé stádo jednoznačně výhodněji. Při koupi býka může chovatel až časem zjistit neplodnost či sníženou plodnost tohoto jedince, což má za následek i zvýšení výdajů a sníženou, nebo dokonce žádnou, porodnost.

*Kontrola nemocí* – díky této reprodukční metodě byla potlačena většina dříve velmi rozšířených pohlavních nemocí. Nedochozí totiž k přímému kontaktu býka s krávou nebo jalovicí, a nepředávají se tedy ani jiné pohlavně nepřenositelné nemoci – například brucelóza. Každý býk je v tomto ohledu podroben přísným kontrolám na testačních a inseminačních stanicích.

*Bezpečnost* – pro některé chovatele je bezpečnost práce hlavním důvodem využití umělé inseminace. Býci mléčných plemen bývají totiž často agresivnější než býci plemen masných. Toto tvrzení však nemusí být vždy pravidlem, neboť i z klidného býka se může stát zvíře agresivní a pro člověka nebezpečné.

*Možnost volby vlastností* – pokud má chovatel nevyrovnané stádo, může si díky inseminačním dávkám zvolit, jaké vlastnosti bude býk zlepšovat u konkrétních krav. Pokud má plemence nízký obsah tuku v mléce, může jí nechat zapustit býkem zvyšujícím u samičího potomstva tukovou složku v mléce. Stejně tak se může rozhodnout, že si pomocí býka zlepší exteriér svého stáda – například tvar a utváření končetin či mléčné žlázy.

*Řízení plodnosti* – díky záznamům, které se provádějí při inseminaci, zná chovatel datum úspěšné inseminace, a může díky tomu předvídat, kdy plemenci zasušit. Oproti připouštění z ruky je tento úkon celkově méně náročný na pracovní sílu.

Říha a kol., (2003) charakterizují inseminaci z praktického hlediska zejména jako týmovou práci, při níž je třeba sehnat nejen chovatele a dodavatele inseminačních dávek, ale i inseminační techniku a zvěrolékaře. Dále je základem reprodukčně

bezproblémové stádo, ve kterém bude docházet k pravidelnému zabřezávání a rození životaschopných mláďat.

Umělá inseminace skotu je často využívána z důvodu zlepšení a zefektivnění řízení chovu a živočišné výroby jako celku. Například v chovech mléčného skotu je hlavním cílem snížit cenu produkce mléka na minimální náklady. Toho můžeme dosáhnout i tím, že se dojnice budou zapouštět pomocí inseminačních dávek (Ball a Peters, 2004). Účinnost inseminace závisí na mnoha faktorech. Lopéz–Gautius (2012) konkrétně jmenuje koncentraci spermií v inseminační dávce, místo, kam je inseminační dávka deponována v reprodukčním ústrojí samice a vhodnou fází říjového cyklu, jejíž obtížná detekce je stále hlavní příčinou neúspěšnosti. Watson (2000) se zmiňuje o podmínkách, jež nastávají pro spermie během zpracování inseminačních dávek. Upozorňuje na skutečnost, že v inseminačních dávkách je přítomno větší množství spermií, než je nutně potřeba k zabřeznutí, a to i přes ztráty vzniklé zpracování během výroby inseminační dávky.

## **3.2 Výroba inseminačních dávek**

### **3.2.1 Výběr býků**

Odběr ejakulátu býků mléčných plemen začíná poté, co se osvědčil ve výběrovém řízení na testačních stanicích. Ukončení této testace nastává zhruba v 6 letech věku býka. Pro komerční zpracování inseminačních dávek však začíná býk produkovat ejakulát již mezi druhým a třetím rokem života (Ball a Peters, 2004).

U kombinovaných plemen skotu je zahájena testace ve stodvacátém dni věku býků, vlastní zkouška užitkovosti je pak uskutečňována mezi 121. dnem věku a 365. dnem věku, kdy je ukončena.

Ve stádech masného skotu je inseminace prováděna též, zde je ale stále více uplatňována přirozená plemenitba. Býci masného skotu jsou nejčastěji nakupováni ve třech turnusech – letním, podzimním a jarním. Testování je u těchto plemen rozděleno do dvou metod – A a B. Aby býčci mohli nastoupit do metody A, musí pocházet z chovů zapojených do kontroly užitkovosti masných plemen. Tato testace trvá 120 dní (Louda a kol. 2007)

### **3.2.2 Odběr ejakulátu**

Semeno býků je odebíráno do umělé vagíny, simulující přirozené prostředí pochvy plemenice. Důležitým faktorem je dodržování teploty vody vyplňující prostor mezi stěnami

umělé vagíny na 45°C, jelikož jsou plemenci na tento parametr obzvláště citliví (Ball a Peters, 2004). Louda a kol. (2007) upřesňují, že umělá vagína, dnes nejčastěji využívaná zkrácená, měří na délku 30 cm a je vybavena jednorázovým sběračem ejakulátu, vyrobeným z polyethylenu. Vagína je dofukována vzduchem tak, aby tlak mezi jejími stěnami byl 530 kPa.

Celý proces přípravy umělé vagíny pro odběr je prováděn ve speciální, přímo k tomuto účelu sloužící, místnosti spojené podávacím okénkem s místností pro odběr. Vagína je před použitím vymazána pomocí skleněné tyče sterilní vazelínou, zkontrolována a opatřena jednorázovým sběračem. Po tomto úkonu je pochva předána technikovi, obsluhujícího býka, který provede samotný odběr. Po naplnění jednorázového sběrače je obal od vagíny odstráněn, předán do čisté laboratoře a označen registrem býka. V čisté laboratoři je ejakulát umístěn na vyhřívané destičce a podroben makroskopickému a mikroskopickému zhodnocení (Louda a kol., 2007).

### 3.2.3 Makroskopické hodnocení ejakulátu

Po odběru ejakulátu bývá jako první sensoricky hodnoceno zbarvení, až poté se hodnotí objem, konzistence, hmotnost, obsah buněčných shluků a pH (Kanchan a Matharoo, 2015; Dhurvey a kol., 2012). Ball a Peters (2004) dodávají, že v odebraném ejakulátu jsou vizuálně kontrolovány i příměsi chlupů, výkalů, moče a krve. Stejně tak se kontroluje i hustota semene a zastoupení buněčných shluků. Jejich koncentrace však bývá závislá na frekvenci odběru ejakulátu, neboť čím častěji je semeno odebíráno, tím je v něm nižší výskyt těchto buněčných formací.

Podle pokusu, provedeným Kanchanem a Matharooem (2015) může být barva býčího ejakulátu klíčovou vlastností pro předběžné vyhodnocení kvality semene před jeho zpracováním do inseminačních dávek. Autoři se však domnívají, že je ještě nutné provést několik dalších pokusů, aby bylo toto tvrzení prokázáno.

Dle Dhurveye a kol. (2012) je pH ejakulátu též významným faktorem kvality. Nejlepších výsledků při oplození dosahují zpravidla vzorky se slabě kyselou povahou, zatímco vzorky neutrálního či slabě bazického charakteru dosahují výsledků horších.

### 3.2.4 Mikroskopické hodnocení ejakulátu

Co nejdříve po odběru je malý vzorek ejakulátu umístěn na destičku, vyhřívanou na 30 – 37°C. Podrobným pozorováním pod mikroskopem při čtyřicetinásobném zvětšení se odhaduje podíl živých a mrtvých spermií, a to včetně morfologicky abnormálních spermií.

Podíl živých spermií, vyznačujících se normálním progresivním pohybem vpřed, by neměl klesnout pod 60%. Spermie, pohybující se stále dokola nebo zpětným pohybem mohou být poškozeny změnou osmotického tlaku nebo nízkou či vysokou teplotou. Po přidání kapky barviva nigrosinu do naředěného vzorku je odhadován počet morfologicky nenormálních spermií. Dhurveya kol. (2012) definují tři kategorie abnormalit – primární, sekundární a terciární. Primární abnormalita vzniká již během vývoje spermie ve varleti, sekundární pak během dozrávání v nadvarleti nebo při samotné ejakulaci a terciární při nešetrné manipulaci ať už při odběru, nebo při manipulaci se spermatem. Zastoupení takto postižených buněk může být v ejakulátu maximálně 20%. Hustota ejakulátu je měřena pomocí optické hustoty vzorku (Ball a Peters, 2004, Dhurvey a kol., 2012).

Mocé a Graham (2008) doplňují, že před každým zmrazením či přímým použitím spermatu, je kvůli ředění, nutné zjistit koncentraci spermií v ejakulátu, aby byl zachován konstantní počet spermií v sérii inseminačních dávek. Jednou z metod může být smíchání spermatu s transparentní látkou, jež spermie znehybňuje, při níž se následně hodnotí koncentrace spermií v ejakulátu hematocytometrem, neboli Bürknerovou komůrkou.

Toto vyhodnocení však přináší pouze orientační výstupy.

Další metodou je například spektrofotometrie využívající jak viditelné, tak fluorescenční záření, kde však velmi záleží na konkrétním druhu hospodářského zvířete, pro něhož je koncentrace stanovována. Základním principem této metody je totiž procento prošlého světla vztaheného na definovanou plochu, které je následně přepočítáno na procento živých spermií. (Dhurvey a kol., 2012).

### **3.3 Zpracování inseminačních dávek**

První látkou, která byla historicky poprvé použita k ochraně spermií před mrazem, byl glycerol. Jeho pozitivní účinky byly prokázány poprvé okolo roku 1950. To znamenalo značný pokrok v konzervaci ejakulátu, chovu a šlechtění zvířat (Holt, 2000). Během chlazení, zmrazování a rozmrazování dochází k obrovským teplotním změnám, při kterých se poškozují buněčné stěny spermií. Je to zejména kvůli výrazným chemickým a fyzikálním změnám prostředí, díky nimž ztrácí buňky svou oplozovací schopnost (Hinsch a kol., 1997). Thun a kol., (2002) doplňují, že během tohoto procesu se nejvíce ničí nejen buněčné stěny spermií, ale také membrány, pohybové ústrojí – bičík a neposledně dochází i k nevratnému poničení jádra spermie. Toto jsou části samčích pohlavních buněk, které jsou na podmínky nastávající během zpracování inseminačních dávek nejzranitelnější

a které je nutno co nejvíce chránit. Proto se začala používat kryoprotektiva chránící spermie. Nejčastěji jimi jsou glycerol, vaječný žloutek nebo mléko (Hinsch a kol., 1997, Thun a kol., 2002).

### 3.3.1 Ředění ejakulátu

V dřívějších časech byla inseminace prováděna pouze čerstvým zředěným spermatem. Používala se buď jednoduchá ředidla obsahující různé roztoky soli, nebo ředidla založená na složitých pufrovacích mechanismech. Kvůli složitější distribuci spermatu bylo nutné zachovat jeho oplozovací schopnost minimálně po dobu tří dnů. Přidáním vaječného žloutku, pufrovací složky obsahující fosfát nebo citrát a Trisu do čerstvého ejakulátu se této doby udržení životaschopnosti spermií dosáhlo (Verberckmoes a kol., 2004). Přidáním citrátové soli do ředidla obsahující vaječný žloutek bylo dosaženo lepší rozpustnosti bílkovinných frakcí obsažených ve žloutku. Citrátové soli mají, na rozdíl od předchozích uvedených přísad, výborné chelatační vlastnosti (Vishwanath a Shannon, 2000).

Snížením metabolické aktivity spermií zchlazením semene na teplotu 5–8°C, se opět prodloužila životaschopnost samčích pohlavních buněk, ale docházelo zároveň i k zabránění pomnožení mikroorganismů v ejakulátu (Verberckmoes a kol., 2004).

Dnes se již používají ředidla chránící buňky již po prvním zředění ejakulátu. Těmito ředidly mohou být různé živočišné složky jako například homogenizované, plnotučné kravské mléko, odstředěné mléko nebo vaječný žloutek, který spolu s glycerolem patří mezi nejstarší a také nejvíce probádaná ředidla. O účincích vaječného žloutku se však stále vedou spory.

Je přidáván do komerčních ředidel Optidyl® a Triladyl®, kde může pozměňovat jejich složení. Čerstvý žloutek je však nadále používán, jelikož byly prokázány vynikající kryoprotektivní účinky na spermie.

I přesto, že jsou živočišné složky stále oblíbenými ředidly spermatu, nesou řadu rizik a omezení. Ať už se jedná o zmiňovanou změnu složení po přidání do komerčních ředidel, nebo o možnou mikrobiální kontaminaci. U vaječného žloutku navíc bylo biochemickými a metabolickými testy prokázáno, že způsobuje buněčné dušení a snižuje pohyblivost spermií.

Z tohoto důvodu musela být vymyšlena alternativa, mající stejné, nebo podobné ochranné účinky na vlastnosti buněk, kdy se ale zároveň vyloučí možná rizika mající za následek jejich poničení. Touto alternativou se stal LDL – cholesterol, lipoprotein o nízké hustotě chemicky izolovaný z vaječného žloutku (Amirat a kol., 2005).

Dle Celeghiniho a kol. (2008) i dnešní, běžně používaná ředidla, způsobují nižší pohyblivost spermií skotu, zvyšují počet morfologicky abnormálních buněk a celkově negativně ovlivňují mitochondriální funkce. Zároveň dochází ke snížení celistvosti akrozomální a plazmové membrány díky již výše zmíněným jevům nastávajícím při zpracování inseminačních dávek – změny teploty a osmolarity. To má za následek morfologické změny v lipidové vrstvě a změnu složení membrány obalující spermii.

### 3.3.2 Typy ředidel

#### 3.3.2.1 Ředidla založena na mléčné bázi

Dříve používané autoklávané mléko jako rozpouštědlo, se využívalo především v Německu, a to v kombinaci s fosfátem vaječného žloutku. Nevýhodou mléčných ředidel byla nutnost inaktivovat bílkovinu laktenin, který je pro buňky toxický. Pokud byl do mléčného ředidla přidán glycerol, došlo k prodloužení přežitelnosti a oplozovací schopnosti spermií až na 4 dny. Ve srovnání se žloutkovými a citrátovými ředidly, dosahuje ředidlo založené na mléčné bázi, srovnatelných výsledků. Dnes se tento typ ředidla opět používá, jelikož u něj nenastává problém s inaktivací cytotoxické mléčné bílkoviny. Tu lze totiž inaktivovat převařením mléka.

Nejčastěji je do ejakulátu přidáváno odstředěné mléko, v němž je semeno skladováno při teplotě 5 – 8°C (Vishwanath a Shannon, 2000).

#### 3.3.2.2 Ředidla obsahující vaječný žloutek

Vaječný žloutek prodlužuje oplozovací schopnost spermií v ejakulátu. Díky této vlastnosti je široce využívanou látkou. Bylo prokázáno, že složky obsahující vaječný žloutek pomáhají spermiím odolávat chladovému šoku. Dalším bádáním, při němž byly objeveny kryoprotektivní účinky glycerolu, byl vaječný žloutek nahrazován právě glycerolem. Ten však nedokáže ochránit sperma dalších hospodářských zvířat, proto se úplně od používání vaječného žloutku neustoupilo (Pace a Graham, 1974).

Velkou výhodou žloutku je přirozený obsah lecitinu, tedy lipoproteinu s nízkou hustotou (LDL), který obaluje fosfolipidovou membránu spermie, a zabraňuje tím její úplné ztrátě, jež může nastat během zpracování. Tímto obalením membrány buňky dojde ke zvýšení odolnosti proti mrazu (Thun a kol., 2002). Vera-Munoz a kol. (2011) zmiňuje, že vaječný žloutek a jeho složka LDL, neprostupují buněčnou membránou.



Díky extracelulárnímu působení tedy mohou žloutek i LDL buď přímo chránit buněčnou membránu spermie jejím pouhým obalením, nebo se mohou volně vyskytovat rozpuštěné v roztoku, a snižovat tak teplotu mrazu, čímž dokáží zabránit tvorbě ledových krystalů. LDL, látka extrahovaná z vaječného žloutku, navíc téměř eliminuje riziko mikrobiální kontaminace, jež nastává právě přidáním celého vaječného žloutku.

LDL – cholesterol je z 12% složen z bílkoviny a z 87% z tuků. Vaječný žloutek obsahuje dva typy cholesterolu – HDL a LDL. LDL je zde obsažen v 68%, kdežto HDL (high density lipoprotein) pak pouze ve zhruba 16%. Zbývajících složkami vaječného žloutku jsou livetiny a fosfitiny. Všechny tyto složky mají schopnosti utvářet tenkou vrstvu na rozhraní olej – voda kolem membrán buněk.

Mikroskopicky je LDL tvořen kulovými částicemi obsahujícími jádro z triacylglyceridů, cholesterolem a cholesterylestery. Celé toto lipidové jádro je obaleno vrstvou apoproteinů a fosfolipidů. Právě tyto složky se zejména podílejí na vytvoření tenoučké vrstvičky na rozhraní fází olej – voda na povrchu buňky, jak již bylo zmíněno výše. Tím dochází ke snížení povrchového napětí absorpcí proteinů na tomto rozhraní a dále díky viskoelastickým vlastnostem proteinů také k vytvoření mechanické bariéry, jež chrání buňky před narušením. Apoproteiny a fosfolipidy mají též schopnost zabraňovat agregaci a vločkování. Děje se tak díky obsahu látek zapříčiňujících koloidní interakce mezi olejovými kapkami nacházejícími se na povrchu buňky (Anton a kol., 2003).

Moussa a kol. (2002) uvádějí, že právě složka LDL, nacházející se ve vaječném žloutku, je zodpovědná za tzv. gelovatění (z angl. gelation). T tomuto jevu dochází při teplotách nižších než  $-6^{\circ}\text{C}$ . V první fázi dochází k rozpadu struktury LDL díky dehydrataci mrazem, přičemž jsou následně omezeny interakce mezi tuky a bílkovinami, zatímco interakce mezi bílkovinami samotnými vzrůstá. Shluky utvořené LDL cholesterolem se skládají z tuků, zahrnutých v jeho struktuře. Ty jsou následně zmrazování a rozmrazování poničeny a jejich složky, jimiž jsou fosfolipidy a triglyceridy jsou uvolněny do roztoku, zatímco apoproteiny utvářejí ochranný gelový obal spermie.

Jian-Hong a kol. (2011) ve svém pokusu srovnávali ředidlo býčího ejakulátu a standardní žloutkové ředidlo. Tímto výzkumem potvrdil fakt, že LDL přidávaný do ředidla býčího ejakulátu zachovává po rozmrazení inseminační dávky vyšší pohyblivost spermií a lépe ochraňuje akrozom spermie a její plazmatickou membránu.

### 3.3.2.3 Glycerol

Glycerol byl jedním z prvních osvědčených kryoprotektantů spermií. Je známo, že je schopen prostoupit skrz membránovou strukturu buňky, ale není stále zcela jasné, jakým mechanismem dokáže buňku před mrazem chránit (Aires a kol., 2003). Glycerol má schopnost snížit teplotu tuhnutí/bod mrazu a dokáže snížit koncentraci elektrolytů v ještě nezamrzlé části ejakulátu. Dále dokáže ochraňovat buňky před tzv. solution effect, neboli zředovací efekt, který má za následek ničení buněk během zmrazování. Zároveň však byly prokázány jeho cytotoxické účinky na spermie (Holt, 2000).

### 3.3.2.4 Ředidla ze sójového extraktu

Tímto typem ředidla ejakulátu je často nahrazováno ředidlo obsahující živočišnou složku. Zabraňuje se tím možné mikrobiální kontaminaci. Nejčastěji používaným komerčním výrobkem obsahující sójový extrakt je Biociphos Plus<sup>®</sup>. V experimentu zkoumajícím ochranu samčích pohlavních buněk však dosahovalo v porovnání s Trisem, obsahující vaječný žloutek, horších výsledků (van Wagtendong-de Leeuw a kol., 2000). Dle Airese a kol. (2003) však další výzkumy porovnávající tyto dva typy ředidel nepotvrdily předchozí pokusy prokazující horší výsledky ředidel obsahující sójový extrakt či sójový lecitin.

Dalším ředidlem, obsahující náhražku živočišných produktů je Bioxcell<sup>®</sup>, vyráběné ve Francii firmou IMV, L'Aigle, produkující zároveň Biociphos Plus<sup>®</sup> a Biociphos<sup>®</sup> (Gil a kol., 2003). AndroMed<sup>®</sup>, další komerčně vyráběné ředidlo obsahuje stejně jako výše uvedené, neživočišnou složku. Tyto typy ředidel jsou nejčastěji využívány k ochraně buněk před mrazem u býků, beranů a kozlů (Akhter a kol., 2010).

### 3.3.2.5 Ředidlo z kokosového mléka

Výzkumy potvrdily, že ředidla obsahující kokosové mléko a kokosový extrakt, mají srovnatelné účinky při ochraně spermií podobně jako ředidla z odstředěného mléka. Příprava ředidel tohoto typu je poměrně nenáročná, nicméně je nutné zpravidla přidat malý podíl vaječného žloutku, jenž chrání lipidovou membránu spermie. Takto připravené ředidlo je velice účinné. Například při konzervaci beraního semene tímto typem ředidla se významně prodloužila pohyblivost spermií na dobu delší než 48 hodin při teplotě okolo 31°C (Vishwanath a Shannon, 2000).

### 3.3.3 **Přidávky obsažené v ředidlech ejakulátu**

Kromě ředidla samotného musí inseminační dávka před zmrazením obsahovat zpravidla také další podpůrné látky, které mohou po rozmrazení přispět ke zlepšení pravděpodobnosti zabřeznutí plemence. Těmito látkami nejčastěji bývají jednoduché cukry (fruktóza, glukóza, laktóza), různé kombinace enzymů a antibiotik (penicilin, streptomycin a kataláza) pufrů pro stabilizaci povahy prostředí, konzervanty (citrát sodný, kyselina citronová hydrogen fosforečnan draselný nebo sodný, chlorid draselný a hydrogenuhličitan vápenatý, EDTA cheláty), někdy též čerstvý vaječný žloutek a mléko (Holt, 2000; Vishwanath a Shannon, 2000; Siddique a kol., 2006).

Cukry jsou přidávány do inseminačních dávek z důvodu dodání energie pro spermie. Po naředění totiž energie přirozeně obsažených složek v ejakulátu není dostačující pro výživu spermií během cesty reprodukčním ústrojím samice. (Ball a Peters, 2004)

Pufrů zabráňují výkyvům hodnot pH okolního prostředí, které může právě v důsledku prudkých změn poničit buněčné membrány spermie, a dojde tak ke znehodnocení inseminační dávky, nebo dokonce celé jejich vyrobené série. Tento výkyv je nejčastěji způsobován kyselinou mléčnou, jakožto běžným konečným metabolickým produktem spermií (Ball a Peters, 2004.)

Antibiotika mají především za úkol eliminovat bakteriální hrozby. Každý odebraný ejakulát totiž nikdy není zcela sterilní, protože jsou v něm vždy přítomny mikroorganismy. Kontaminace však může nastat i tím, že je do ejakulátu přidán infikovaná složka, nejčastěji živočišného původu. Z tohoto důvodu se během zpracovávání inseminačních dávek přidává do roztoku několik kmenů antibiotik potlačujících nepříznivé vlivy co možná nejširšího spektra bakterií (Thibier a Guerin, 2000).

### 3.3.4 **Kryo ochrana a chlazení**

Spermie mohou být během dalšího zpracování poškozeny mrazem, proto je velmi nutné znát termodynamické a strukturální vlastnosti plazmatické membrány obklopující buňku. Spermie jako takové nemají uzpůsobené membrány k tomu, aby čelily různým výkyvům teplot. Z tohoto důvodu jsou k nim tedy přidávána kryoprotektiva, mající za úkol chránit je před chladem a mrazem. Chladový šok poškozující buněčnou membránu nejčastěji nastává při příliš rychlém chlazení do teploty 0°C (Holt, 2000).

Glycerol je v rámci kryokonzervačních prostředků stále upřednostňován jako hlavní kryoprotektant při zpracování ejakulátu většiny hospodářských zvířat. Společně s ostatními

látkami, například s metanolem a etylenglykolem, prostupuje skrz membránu spermie (Awad, 2011). Awad (2011) společně s Garnerem a kol. (2009) potvrzují, že ve vyšších koncentracích má glycerol cytotoxické účinky. Zároveň glycerol pozměňuje i buněčné organely nacházející se ve spermích tím, že mění osmotické napětí mezi fluidní a lipidovou vrstvou. Glycerol, na rozdíl od jiných kryoprotektantů, má horší prostupnost skrz plasmatickou membránu, čímž dochází k lepší prostupnosti molekul vody, a tím tedy k úplnému poškození buňky během mrazení. Vera-Munoz a kol. (2009) upřesňují, že proces mrazení, jako takový, má za následek reorganizaci lipidové struktury buňky, čímž dochází ke změně chemického složení plazmatické membrány spermie.

Holt (2000) dodává, že během zmrazování jsou buňky vystaveny velkému namáhání způsobenému interakcemi mezi vodou a rozpuštěnými látkami v ní. Během tohoto procesu jsou v buňce tvořeny ledové krystaly, které jsou uvolňovány z nezamrzlé hyperosmotické části roztoku. Tento děj nastává zejména při snižování teploty, a to ve větší míře do  $-50^{\circ}\text{C}$ . Pomocí elektronického mikroskopu bylo dokázáno, že spermie, ke kterým bylo přidáno ředidlo, byly vyloučeny z prostoru, v němž se nacházely ledové krystaly. Je-li v dávce obsaženo ředidlo a tato dávka je navíc zmrazována příliš rychle, spermie jsou vystaveny anizosmotickému prostředí, čímž dochází ke ztrátě vnitrobuněčné tekutiny. Během rozmrazování inseminačních dávek dochází k obrácenému jevu – buňka do sebe okolní vodu naopak vstřebává, a dochází tak nejen k popraskání jejích membrán, ale i ke zničení celé buňky. Z tohoto důvodu musí být stanovena optimální rychlost zmrazování, aby došlo k minimalizaci škody způsobené ledovými krystaly a vysokou koncentrací solí. Watson (2000) doplňuje, že rychlost zmrazování musí být dostatečně pomalá, aby mohlo dojít k osmóze vody z buněk. Tím dojde k zabránění tvorby intracelulárního ledu, který je pro buňky rovněž letální.

Doležalová a kol. (2014) dodává, že po naředění se dávky postupně zchlazují až na  $4^{\circ}\text{C}$  a jsou po určitý čas uchovávány při konstantní teplotě. Shahverdi a kol. (2013) uvádějí, že existují i laboratorní mrazicí protokoly, podle nichž se běžně postupuje. Ty jsou založeny na pomalém chlazení dávek na teplotu  $4 - 5^{\circ}\text{C}$ , po kterém nastává různě dlouhá doba, kdy je dosaženo rovnovážného stavu mezi buněčným a mimobuněčným prostředím. Tento stav většinou nastává v rozmezí od 30 minut do 24 hodin a je prováděn před samotným procesem mrazení.

### 3.3.5 Ekvilibrace

Ekvilibrace je charakterizována jako doba, po kterou zůstávají spermie v roztoku před zmrazením společně s kryoprotektivem při určité teplotě. Nejčastěji využívaným kryoprotektivem je nejčastěji glycerol. Během této doby proniká glycerol do spermií, a dochází tak ke stabilizaci extracelulárního a intracelulárního prostředí (Shahverdi a kol., 2013). Glycerol má schopnost pronikat do buňky poměrně rychle. Jeho výhoda také spočívá v tom, že ho lze ke spermatu přidat kdykoli během chlazení (Leite a kol., 2010). Ekvilibrace však není vázána pouze glycerolem, ale i osmoticky aktivními složkami ředidla, tedy kryoprotektivy nebo přidanými pufrů (Shahverdi a kol., 2014). Účelem dosažení rovnovážného stavu během ekvilibrace je snížení výskytu ledových krystalků a jejich škodlivého účinku, který nenastává pouze během zmrazování, ale i během rozmrazování dávky (Vishwanath a Shannon, 2000).

Délka ekvilibrace je nezbytná k tomu, aby byla zachována nejen motilita spermií, ale zároveň celistvost její membrány. Ekvilibrace trvající přes 2 hodiny dosahuje v tomto ohledu nejlepších výsledků. Pokud je však ředidlo ponecháno ekvilibrovat déle než 4 hodiny, nevede toto prodloužení k lepší přežitelnosti spermií po rozmrazení (Shahverdi a kol., 2014). Toto tvrzení však popírá Leite a kol. (2010), který uvádí, že ekvilibrace trvající 4 hodiny má naopak za následek lepší přežitelnost, motilitu spermií a má též dobrý vliv i na zachování celistvosti plazmatické a akrozomální membrány. Všeobecně je zde snaha o co možná největší zkrácení doby ekvilibrace nebo dokonce její úplné vynechání, za předpokladu, že přitom stále bude uchována dobrá oplozovací schopnost spermií.

### 3.3.6 Plnění a skladování inseminačních dávek

Inseminační dávky jsou vyráběny ve dvou objemech – nejčastěji 0,25 cm<sup>3</sup> nebo méně často 0,5 cm<sup>3</sup> (Holt, 2000; Louda a kol., 2007). Aktivita spermií v inseminačních dávkách po rozmrazení se pohybuje v průměru kolem 40%. Po výrobě je nutné skladovat inseminační dávky ve formě pejet v kontejneru s tekutým dusíkem při teplotě -196°C (Louda a kol., 2007). Pelety (kuličky) jsou umístěny do mělkých důlků vytlačených v suchém ledu, zatímco pejety (tyčinky, či brčka) jsou skladovány v páře tekutého dusíku v kontejneru, nebo jsou umístěny v mrazícím přístroji (Holt, 2000). Sperma nemusí být skladováno pouze zmrazené, lze jej totiž také skladovat i zchlazené při teplotě 5°C, neboť už při této teplotě dochází ke snížení metabolické aktivity spermií (Vishwanath a Shannon, 2000).

Na rozdíl od jiných druhů zvířat je v pejetách určitý známý počet spermií. V každé inseminační dávce je tak garantováno 10 – 15 miliónů živých spermií, jimiž lze ihned po rozmrazení provádět inseminaci (Holt, 2000).

### 3.3.7 Rozmrazování inseminačních dávek

K prodeji a další distribuci se již používají inseminační dávky, které prošly kontrolou. Ta je zaměřena především na jejich oplozovací schopnost. Nejčastější vady a poškození inseminačních dávek nevznikají při zpracovávání, ale až při manipulaci během rozmrazování a inseminace. Rozmrazovací lázeň by měla být vytemperovaná na teplotu kolem 35 – 37°C a pejeta by se do ní měla vkládat zátkou nahoru. Existují také určitá pravidla, která udávají, jak správně inseminační dávku rozmrazovat. Je v nich například specifikováno, že dávka se rozmrazuje po dobu přesně 40 vteřin, neměly by se současně rozmrazovat více než 3 dávky, časová proluka mezi rozmrazením a inseminací nesmí být delší než 15 minut a již jednou rozmrazené inseminační dávky se nesmí znovu vracet do kontejneru s tekutým dusíkem (Louda a kol., 2008).

## 3.4 Hodnocení inseminačních dávek

Spermie je definována jako složitá struktura, jejíž všechny části jsou potřebné k úspěšnému oplození samičího vajíčka. Proto je nutné vyhodnotit různé vlastnosti spermií a zjistit, jestli jsou schopné tento úkol splnit. K tomu nám v dnešní době slouží automatické moderní přístroje, například CASA – Computer Assisted Sperm Analysis a průtokové cytometry. Tyto přístroje pomáhají zhodnotit pohyblivost (motilitu) spermií, jejich morfologické parametry a dokáží zobrazit stav prostor uvnitř spermií obsahující jádro, mitochondrie a plazmatické membrány. Stejně tak dokáží odhalit vady na akrozomu a skutečnost, zda je buňka vůbec schopna kapacitace. Hlavní nevýhodou těchto systémů je uváděna nutnost standardizace, optimalizace a validace programu ještě před tím, než se s ním začne pracovat (Dhurvey a kol., 2012).

Dle Awada (2011) a Grahama a Mocého (2005) má program CASA velké výhody v rozeznávání jemných rozdílů při porovnávání výsledků, jež jsou zobrazovány na monitoru nezkresleným způsobem ve vysoké přesnosti, a v opakovatelnosti záběrů. Také lze touto metodou stanovit rychlost, jíž se spermie pohybují.

Průtokové cytometry jsou využívány pro hodnocení buněk předem obarvených fluorescenčním barvivem. Princip toho přístroje je založen na průchodu spermií obsažených

v tekutině úzkým prostorem, jenž je prosvícen laserovými paprsky. Obarvené buňky jsou takto detekovány a vyhodnoceny. Tímto způsobem dokáže zařízení zkontrolovat až 50 tisíc buněk během jedné minuty. Také lze kombinovat různá barviva, běžně využívaná k barvení spermií, díky nimž lze hodnotit různé vlastnosti spermií současně (Graham a Mocé, 2005).

#### 3.4.1 Tepelný test – test přežitelnosti spermií

V pokusu Monterossa a kol. (1995), byl proveden test přežitelnosti spermií tak, že byly buňky vystaveny tepelnému šoku (při 42 a 43°C) během inkubace inseminační dávky, čímž byla významně snížena jejich životaschopnost. Spermie podrobené tomuto testu vykazovaly větší schopnost přežít, nežli spermie vyvíjející se ve varleti, vystavené vyšší teplotě (40°C). Toto zjištění vedlo k závěru, že schopnost spermií odolávat tepelnému šoku, je získávána během procesu zrání v nadvarleti a zároveň podporována semennou plazmou. Tepelný šok v rozpětí 41 – 42°C sice snižoval rychlost spermií, jejich pohyb však nebyl zcela zastaven. Pokud však byla zvednuta teplota až na 43°C, došlo již k celkové ztrátě pohyblivosti spermií. Z toho lze tedy vyvodit, že rozmezí teplot mezi 41 – 42°C je pro spermie snesitelné, neboť takovýchto hodnot nabývá pohlavní ústrojí plemence a zároveň tato teplota napomáhá jejich kapacitaci.

#### 3.4.2 Chladový test

Tento typ testu bývá používán ke sledování odolnosti jednotlivých spermií v různých vzorcích spermatu vůči chladovému šoku. Z provedených výzkumů vyplynulo, že pokud jsou spermie vůči chladu odolné, mají větší oplozovací schopnost, a dokáží tedy v reprodukčním ústrojí samice přežít delší dobu.

Chlad dokáže způsobit u pohlavních buněk rychlou ztrátu ATP, kterou spermie používají jako jeden ze zdrojů energie. To poté vede k jejich úhynu. Nedojde-li k okamžitému úhynu, dochází ke ztrátě v akrozomu obsažených enzymů, jimi jsou například alkalická proteináza, akrozínu sloužícího k rozrušení zóny pellucidy a dalších nepostradatelných enzymů, nezbytných k přežití spermie. Odolnost spermií vůči chladovému šoku závisí také na jedinci, neboť se u každého citlivost spermií na chladovou zátěž liší (Dhurvey a kol., 2012).

### 3.4.3 HOS test – hypoosmotic swelling test

Tímto testem lze posuzovat celistvost membrány spermií. Jedná se o způsob, kterým lze zjistit, jak je buňka schopna udržet rovnováhu mezi svým vnitřním a vnějším prostředím (Jothipriya a kol., 2014). Je založen na jevu nastalém v hypoosmotickém prostředí, kdy jsou živé spermie s nenarušenou membránou schopné přijímat vodu, ale již nejsou schopné jí vypouštět, čímž dojde k deformaci bičíku spermií (Věžník a kol., 2009). Živé spermie lze poté rozpoznat podle nabobtnalého bičíku a jeho charakteristicky zvlněných vláken. Neporušené spermie, které byly už před pokusem mrtvé, nejsou schopné v sobě tekutinu v hypoosmotickém prostředí držet, a tudíž jimi jen prochází. (Dhurvey a kol., 2012). K rozlišení živých a mrtvých buněk musí být použito barvivo buněčných membrán – eosin. Často bývá kombinován též s dalším barvivem nigrosinem. K vyhodnocování je používán mikroskop s fázovým kontrastem (Věžník a kol., 2009; Jothipriya a kol., 2014). Živé spermie nejsou zbarveny, kdežto mrtvé dosahují růžovo-fialového odstínu (Věžník a kol., 2009). Tento test je považován za účinný indikátor oplozovací schopnosti spermií.

Výhodou provedení HOS testu je jeho jednoduchost a to, že jej lze kdykoli zopakovat. Zároveň se řadí mezi nejsnadnější testy využívané k hodnocení spermií, díky čemuž je jedním z nejčastěji používaných (Jothipriya a kol., 2014).

### 3.4.4 Test pohyblivosti – motility test

Odhad pohyblivosti spermií ve vzorku je dodnes prováděn vizuálně a zároveň patří mezi nejčastěji prováděné laboratorní analýzy spermatu. Tento test pohyblivosti spermií je zpravidla prováděn pomocí metody CASA, ale často se využívá i fotografií z digitálního fotoaparátu, jež jsou pořízeny s časovou prodlevou. Těmito přístroji je dosahováno snížení lidské chyby při zpracování výsledků a zároveň lze díky nim provést lepší hodnocení pohybu spermií a jeho parametrů (Graham a Mocé, 2005). Velmi významným ukazatelem je způsob pohybu spermie. Pokud lze pozorovat lineární, progresivní pohyb vpřed, lze z tohoto faktu vyvodit dobrou oplozovací schopnost spermie, a tedy i vysokou pravděpodobnost oplození samičího vajíčka. Také bývá posuzováno, jaký úhel svírá hlavička spermie s bičíkem. Tento faktor slouží jako indikátor síly, kterou je schopen bičík vyvinout. Čím je úhel menší, tedy hlavička a bičík jsou přibližně v rovině, tím je pohyb přímější, rychlejší spermie je silnější. Díky této síle, je spermie schopna proniknout děložním hlenem v reprodukčním ústrojí samice (Holt, 2000).



Zhang a kol., (2015) ve své studii došli k závěru, že při srovnání čerstvého a rozmrazeného ejakulátu v ohledu pohybujících se spermií progresivním způsobem vpřed, dosahují mnohem vyšších hodnot spermie nacházející v čerstvém ejakulátu. Podobných výsledků bylo dosaženo i při srovnání pohyblivosti spermií během ekvilibrace s rozmrazeným ejakulátem. Zároveň však nebyl nalezen významný rozdíl mezi pohyblivostí spermií v čerstvém a v ekvilibrovaném ejakulátu.

### **3.5 Budoucí trendy v konzervaci ejakulátu**

V současnosti používané metody mají i přes své frekventované využívání mnoho prostoru ke zlepšení (Vishwanath a Shannon, 2000). Nejčastějšími způsoby uchovávání semene používány dvě metody. Těmi jsou konzervace spermatu ve zchlazeném tekutém a v hluboce zmrazeném stavu (Yoshida, 2000).

Každá z těchto metod uchovávání má své výhody a nevýhody. Mezi jednoznačné výhody skladování semene v tekutém stavu patří relativně nízká koncentrace spermií v dávce, vyšší využití plemenika z důvodu možnosti vyššího naředění ejakulátu, snadné použití v polních podmínkách a především velmi nízká cena skladování. Velkou nevýhodou je však omezená doba skladovatelnosti. Naproti tomu výhodami uchovávání hluboce zmrazeného ejakulátu jsou dlouhá doba, po kterou lze dávku skladovat, a všestrannost použití dávky. Oproti skladování semene v tekutém stavu má uchovávání zmrazeného spermatu více nevýhod. Mezi ně patří díky nutnosti uchovávání při velmi nízké teplotě vysoká skladovací cena a vysoká koncentrace spermií v dávce, kvůli procentu poničených spermií mrazem a rozmrazováním (Vishwanath a Shannon, 2000).

Z těchto důvodů se stále provádí výzkumy nových alternativních metod konzervace a zachování delší oplozovací schopnosti. Neustále se zlepšující moderní technologie by mohly také v budoucnu přispět k realizaci již dříve provedených experimentů (Vishwanath a Shannon, 2000).

#### **3.5.1 Lyofilizovaný ejakulát**

Pokusy zahrnující lyofilizaci, neboli vysušení mrazem, křeččích a lidských spermií dokázaly, že tento typ konzervace ejakulátu je jednou z možností, která by mohla být v budoucnu využívána. Při tomto typu skladování semene jsou spermie uchovávány v alkoholu nebo v Carnoyově tekutině, kde jako fixační báze slouží směs alkoholu a chloroformu. Celý tento roztok s mrazem vysušenými spermiemi byl skladován po dobu 6

měsíců při 4°C. Podobně jako u těchto vzorků spermií, bylo prokázáno, že rovněž lyofilizace myších spermií zachovává jádro v oplození schopném stavu, kdy zůstane zachován běžný embryonální vývoj (Yoshida, 2000).

### 3.5.2 Transplantace buněk varlete

Yoshida (2000) uvádí také další postup, jakým lze uchovávat semeno po delší dobu. Je jím transplantace buněk varlete do neplodného jedince. V tomto pokusu posloužil plodný myší samec a neplodný myší samec. Kmenové buňky se spermatogoniemi musely být nejprve kultivovány po dobu tří měsíců, než byly implantovány do semenotvorných kanálků neplodného samce, který následně produkoval spermie nesoucí stejný genotyp jako dárce, tedy plodný samec. Společně s kryokonzervací je tento postup brán jako velmi užitečný, neboť jej lze využít k rozšíření cenných populací hospodářských zvířat. Stejně tak zde existuje naděje, že by tento biotechnologický postup bylo možné zavést i při léčbě neplodnosti mužů.

## 4 Materiál a metodika

V této kapitole bude zhodnocena inseminační stanice společně se vzorky ejakulátu býků, jeho odběru a hodnocení. Dále zde bude popsána metodika, průběh experimentů a použitá ředidla spolu s materiály souvisejícími s těmito pokusy.

### 4.1 Charakteristika inseminační stanice

Vzorky ejakulátu byly dodány v nativním stavu bez přidaných podpůrných látek z inseminační stanice firmy Natural, spol. s.r.o. v Hradištku pod Medníkem. Tato společnost je jednou ze součástí národního plemenářského programu plemen holštýnského, českého strakatého a i několika masných plemen skotu. Ve stanici je nyní ustájena přibližně stovka býků mléčných, kombinovaných a masných plemen skotu, díky čemuž je již plně obsazena ustájovací kapacita stanice. Býci jsou vazně ustájeni v boxech umístěných ve stájích nebo ve venkovních boxech o rozměrech 2 x 3 m. Plemenní býci belgického modrého skotu jsou ustájeni na hluboké podestýlce.

Výroba inseminačních dávek se pohybuje kolem 750 000 dávek za rok a většina z nich je prodávána do zahraničí.

Firma Natural, spol. s.r.o. zaměstnává přibližně 100 lidí nejen v sídle společnosti v Hradištku pod Medníkem, ale i ve střediscích po celé České republice.

Společnost dodává inseminační dávky do zemí EU, především do Maďarska, Německa, Nizozemska, Itálie a zemí s ní spřízněných, např. USA. Dále jsou zde dodržovány všechny české, evropské a hygienické normy. Vyrobené inseminační dávky prochází podrobnou veterinární prohlídkou a jejich identifikace je důkladně kontrolována.

Hlavními selekčními kritérii v této inseminační stanici jsou selekce na utváření končetin a vemene spolu se selekcí na produkci kilogramů bílkovin. Tato kritéria nejsou stálá, ale jsou přizpůsobována požadavkům chovatelů.

### 4.2 Charakteristika býků

K experimentu byly použity ejakuláty býků různého věku dvou plemen – holštýnského skotu a českého strakatého skotu (charakteristika viz **Tab. č. 1**). Ejakulát byl dále zpracováván v laboratoři inseminační stanice.

### 4.3 Odběr ejakulátu

Odběr ejakulátu byl uskutečněn dle metodiky inseminační stanice po dobu čtyř pokusných dní. Každý odebraný vzorek ejakulátu byl nejdříve makroskopicky zkontrolován. Do hodnocení byla zahrnuta přítomnost cizorodých přímísenin (chlupy, krev, moč atd.), zápach, hustota ejakulátu (fotometricky pomocí spektrofotometru Spekol II) a jeho hmotnost (vážením pomocí digitální automatické váhy Scout Pro). Dále byla subjektivně vyhodnocena výchozí aktivita spermií (pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem Meopta). K následné analýze byl použit pouze ejakulát s aktivitou vyšší než 70% a hustotou vyšší než  $0,7 \cdot 10^6 \text{ mm}^3$ .

Každý odběrový den byly získány dva ejakuláty od 2 plemenných býků. Po makroskopickém a mikroskopickém vyhodnocení byl ejakulát rovnoměrně rozdělen na 8 alikvótních objemů a do každého z nich byla přidána připravená ředidla s různou koncentrací LDL (0, 4, 6 a 8%) tak, aby po rozmrazení kontrolní dávka vzorku obsahovala minimálně 10 milionů aktivních spermií. Ředění bylo prováděno odkapem ředidla ze sterilní injekční stříkačky do odebraného alikvótního podílu ejakulátu umístěného ve zkumavce.

Po naředění byla zkumavka uzavřena sterilní zátkou.

Po uzavření byl obsah zkumavek promíchán na oscilačním stolku po dobu 10 minut. Po naplnění pejet o objemu  $0,25 \text{ cm}^3$  následovala jejich ekvilibrace při  $4^\circ\text{C}$  trvající 120 minut. Pejety byly zmrazeny v přístroji Mini-Digitcool standardní mrazicí křivkou pro býčí ejakulát. Průběh zmrazování ze  $4^\circ\text{C}$  na  $-140^\circ\text{C}$  byl počítačově řízen. Poté byly zpracované inseminační dávky uskladněny v kontejneru naplněným tekutým dusíkem při teplotě  $-196^\circ\text{C}$ .

### 4.4 Hodnocení ejakulátu

Výše zmíněným postupem zpracované inseminační dávky byly následně hodnoceny v laboratoři Katedry speciální zootechniky ČZU v Praze. Bylo hodnoceno procento přeživších spermií pomocí barvení eosinem spolu s nigrosinem po rozmrazení (zkr. Rozm.) a po 120 minutách krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií ( $37^\circ\text{C}$ ) (zkr. Tep.T).

Jelikož barvivo eosin má schopnost prostupovat buněčnými stěnami mrtvých spermií, barví tyto spermie do červena. Oslabené nebo jinak poškozené spermie barví částečně do červena, respektive do růžova. Živé spermie eosin nezbarvuje, proto zůstávají bílé. Takto byl stanoven procentuální podíl živých, a to včetně oslabených, a mrtvých spermií ve vzorcích.

Kapka spermatu (odměřeno mikropipetou) o objemu 20  $\mu\text{l}$  byla smíchána s 20  $\mu\text{l}$  eosinu na předehřátém hodinovém sklíčku. Obě složky byly následně smíseny za pomoci krouživých pohybů po dobu 30 s. Následně bylo připipetováno 40  $\mu\text{l}$  nigrosinu a 20  $\mu\text{l}$  vzniklé suspenze bylo nanášeno na předehřáté podložní sklíčko, na němž byl proveden roztěr. Po zaschnutí byly roztěry mikroskopicky zhodnoceny pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem při tisícinásobném zvětšení za použití olejové imerze. Z každého preparátu bylo napočítáno 200 spermií, z nichž byla procentuálně vyjádřena přežitelnost, tedy procento živých spermií.

Dále byla podrobena analýze odolnosti spermií vůči chladovému šoku (zkr. Šok1 a Šok2). Z každé rozmrazené inseminační dávky byly postupně naplněny 3 kapiláry o objemu 0,1  $\text{cm}^3$ , jež byly na jednom konci zaslepeny plastelínou. Poté byly tyto kapiláry vloženy na 10 minut do chlazené lázně (No Ice) o teplotě 0°C. Po uplynutí inkubační doby byl smíchán na předehřátém hodinovém sklíčku obsah kapiláry s 20  $\mu\text{l}$  eosinu, krouživými pohyby byla směs opatrně promíchána tak, aby nedošlo k poškození buněk, po dobu 30 s a hned na to bylo přidáno 40  $\mu\text{l}$  nigrosinu. 20  $\mu\text{l}$  vzniklé suspenze bylo nanášeno na předehřáté podložní sklíčko a byl opět proveden roztěr. Uvedený postup byl zopakován po 2 hodinách inkubace vzorků ve vodní lázni při 37°C (zkr. Tep.T.). Po zaschnutí byly roztěry podrobeny stejné proceduře jako v předchozím kroku.

## 4.5 Použitá ředidla

Pro experiment byla vybrána dvě komerčně vyráběná ředidla neobsahující žádné živočišné složky AndroMed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup>. V laboratoři byla provedena příprava obou ředidel dle návodu předepsaného výrobcem a následně byla obě ředidla obohacena přídatkem LDL cholesterolu. Dle standardních postupů ředění předcházelo zahřátí na teplotu, jíž dosahoval ejakulát, aby bylo zabráněno teplotnímu šoku, tedy  $38 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 4.5.1 AndroMed<sup>®</sup>

Toto ředidlo neobsahuje žádnou živočišnou složku, přesto je u něj však zaručena vysoká účinnost. Na trhu je k dostání v baleních po 100 a 200  $\text{cm}^3$ . Toto ředidlo je vyráběno firmou MiniTüb Germany, která dodává dvě varianty ředidla. Jednostupňová varianta o větším objemu je obohacena o antibiotika (použito k experimentu), dvoustupňová varianta o menším objemu je dodávána s antibiotiky zvlášť. Výrobce deklaruje možnost konzervace inseminačních dávek, ale také uchovávání čerstvého spermatu, minimální mikrobiální

kontaminaci, rychlou a snadnou přípravu, která je uvedena v návodu k použití. Ředidlo kromě antibiotik – Tylosinu, Gentamycinu, Spectinomycinu a Lincomycinu dále obsahuje rostlinné fosfolipidy, Tris, kyselinu citronovou, cukry, antioxidanty, pufrý a redestilovanou vodu.

#### 4.5.2 **Bioxcell®**

Toto ředidlo bylo vyrobeno firmou IMV Technologies nacházející se ve Francii a stejně jako předchozí ředidlo neobsahuje žádnou živočišnou složku. Je založeno na bázi rostlinných fosfolipidů a dále je v něm přidána směs antibiotik. Těmi jsou Lincomycin, Spectinomycin, Gentamycin a Tylosin.

#### 4.5.3 **LDL – cholesterol**

Byl používán čistý dialyzovaný LDL cholesterol z vaječného žloutku získaný dle metodiky Moussa et al. (2002). Frakcionovaná plasma z vaječného žloutku byla smíchána se 40% roztokem síranu amonného, za jehož pomoci byl během jedné hodiny z plasmy vysrážen protein livetin. Po tuto dobu byla udržována konstantní hodnota pH = 8,7 a konstantní teplota 4°C. Po tříčtvrtěhodinové centrifugaci byl odsát supernatant nacházející se nad usazenou vrstvou sedimentu. Supernatant byl pomocí dialýzy přečišťován po dobu 6 hodin destilovanou vodou, aby byl zcela odstraněn roztok síranu amonného. Po tomto procesu opět následovala centrifugace trvající 45 minut, po níž byly z hladiny sesbírány plovoucí zbytky plasmy bohaté na LDL. Tuto výrobu zajišťovala společnost. Hena, s. r. o. K ředidlům byl přidáván chlazený LDL cholesterol v koncentracích 4, 6 a 8%. Vždy byl ještě použit kontrolní vzorek bez přídavku LDL.

### 4.6 **Statistické vyhodnocení**

Statistické vyhodnocení experimentu bylo provedeno za pomoci počítačového programu SAS 9.3 (SAS/STAT® 9.3, 2011). Pro stanovení základních parametrů souborů byly využity procedury MEANS a UNIVARIATE. Vztahy mezi vybranými indikátory byly posuzovány pomocí korelačních koeficientů, jež byly vypočteny pomocí procedury CORR. Při výběru vhodného modelu hodnocení daných ukazatelů byla využita procedura REG a metoda STEPWISE. Pro hodnocení rozdílu mezi zvířaty a skupinami byla použita procedura GLM s následným detailním vyhodnocením pomocí Tukey-Kramerova testu.

Ke statistickému vyhodnocení byla použita modelová rovnice (1):

$$y_{ijkl} = \mu + a_i + b_j + c_k + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + e_{ijkl} \quad (1)$$

, kde jednotlivé symboly znamenají následující:

$y_{ijkl}$  – hodnoty závisle proměnné (procentický podíl přeživších spermií na počátku testu a po dvou hodinách tepelné zátěži, rozdíl mezi těmito dvěma hodnotami)

$\mu$  – obecná hodnota závislé proměnné,

$a_i$  – fixní efekt ředidla ( $i = \text{AndroMed}$ ,  $n = 71$ ;  $i = \text{Bioxcell}$ ,  $n = 78$ );

$b_j$  – fixní efekt koncentrace LDL ( $j = 0$ ,  $n = 34$ ;  $j = 4$ ,  $n = 40$ ;  $j = 6$ ,  $n = 38$ ;  $j = 8$ ,  $n = 37$ );

$c_k$  – fixní efekt býka ( $k = 1$ ,  $n = 15$ ;  $k = 2$ ,  $n = 19$ ;  $k = 3$ ,  $n = 21$ ;  $k = 4$ ,  $n = 20$ ;  $k = 5$ ,  $n = 14$ ;  $k = 6$ ,  $n = 18$ ;  $k = 7$ ,  $n = 21$ ;  $k = 8$ ,  $n = 21$ );

$(AC)_{ik}$  – interakce mezi fixním efektem ředidla a býka ( $\text{AndroMed} \times \text{býk č. 1}$ ,  $n = 9$ ;  $\text{Bioxcell} \times \text{býk č. 1}$ ,  $n = 6$ ;  $\text{AndroMed} \times \text{býk č. 2}$ ,  $n = 8$ ;  $\text{Bioxcell} \times \text{býk č. 2}$ ,  $n = 11$ ;  $\text{AndroMed} \times \text{býk č. 3}$ ,  $n = 9$ ;  $\text{Bioxcell} \times \text{býk č. 3}$ ,  $n = 12$ ;  $\text{AndroMed} \times \text{býk č. 4}$ ,  $n = 10$ ;  $\text{Bioxcell} \times \text{býk č. 4}$ ,  $n = 10$ ;  $\text{AndroMed} \times \text{býk č. 5}$ ,  $n = 4$ ;  $\text{Bioxcell} \times \text{býk č. 5}$ ,  $n = 10$ ;  $\text{AndroMed} \times \text{býk č. 6}$ ,  $n = 9$ ;  $\text{Bioxcell} \times \text{býk č. 6}$ ,  $n = 9$ ;  $\text{AndroMed} \times \text{býk č. 7}$ ,  $n = 11$ ;  $\text{Bioxcell} \times \text{býk č. 7}$ ,  $n = 10$ ;  $\text{AndroMed} \times \text{býk č. 8}$ ,  $n = 11$ ;  $\text{Bioxcell} \times \text{býk č. 8}$ ,  $n = 10$ );

$(BC)_{jk}$  – interakce mezi fixním efektem koncentrace LDL a býka ( $0 \times \text{býk č. 1}$ ,  $n = 2$ ;  $0 \times \text{býk č. 2}$ ,  $n = 5$ ;  $0 \times \text{býk č. 3}$ ,  $n = 5$ ;  $0 \times \text{býk č. 4}$ ,  $n = 5$ ;  $0 \times \text{býk č. 5}$ ,  $n = 4$ ;  $0 \times \text{býk č. 6}$ ,  $n = 5$ ;  $0 \times \text{býk č. 7}$ ,  $n = 4$ ;  $0 \times \text{býk č. 8}$ ,  $n = 4$ ;  $4 \times \text{býk č. 1}$ ,  $n = 4$ ;  $4 \times \text{býk č. 2}$ ,  $n = 5$ ;  $4 \times \text{býk č. 3}$ ,  $n = 5$ ;  $4 \times \text{býk č. 4}$ ,  $n = 6$ ;  $4 \times \text{býk č. 5}$ ,  $n = 2$ ;  $4 \times \text{býk č. 6}$ ,  $n = 6$ ;  $4 \times \text{býk č. 7}$ ,  $n = 7$ ;  $4 \times \text{býk č. 8}$ ,  $n = 5$ ;  $6 \times \text{býk č. 1}$ ,  $n = 5$ ;  $6 \times \text{býk č. 2}$ ,  $n = 5$ ;  $6 \times \text{býk č. 3}$ ,  $n = 6$ ;  $6 \times \text{býk č. 4}$ ,  $n = 4$ ;  $6 \times \text{býk č. 5}$ ,  $n = 3$ ;  $6 \times \text{býk č. 6}$ ,  $n = 5$ ;  $6 \times \text{býk č. 7}$ ,  $n = 5$ ;  $6 \times \text{býk č. 8}$ ,  $n = 5$ ;  $8 \times \text{býk č. 1}$ ,  $n = 4$ ;  $8 \times \text{býk č. 2}$ ,  $n = 4$ ;  $8 \times \text{býk č. 3}$ ,  $n = 5$ ;  $8 \times \text{býk č. 4}$ ,  $n = 5$ ;  $8 \times \text{býk č. 5}$ ,  $n = 5$ ;  $8 \times \text{býk č. 6}$ ,  $n = 2$ ;  $8 \times \text{býk č. 7}$ ,  $n = 5$ ;  $8 \times \text{býk č. 8}$ ,  $n = 7$ );

$e_{ijkl}$  – náhodná reziduální chyba.

## 5 Výsledky

V následující kapitole budou uvedeny výsledky experimentálně naměřených hodnot, statistického vyhodnocení a jejich popis. Výsledky budou posuzovány z pohledu ředidel, býků a přídavek LDL do jednotlivých ředidel.

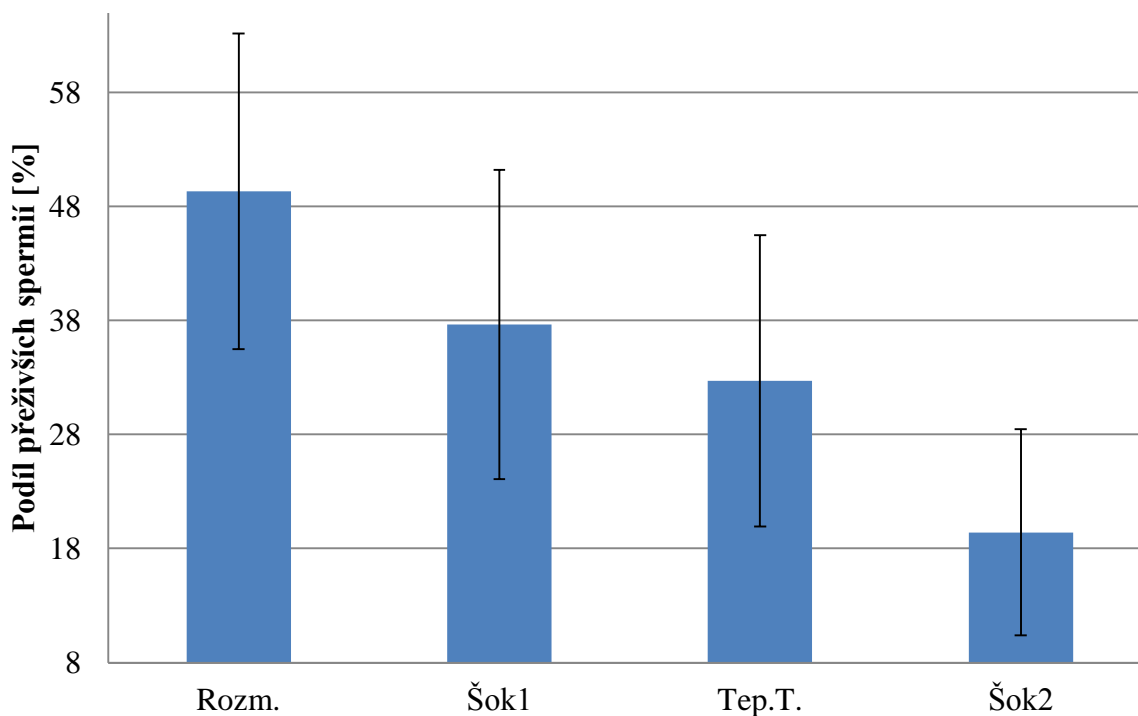
V rámci základní charakteristiky modelové rovnice vyšlo najevo, že koeficient opakovatelnosti celého modelu se pohyboval od  $r^2 = 0,57$  do  $r^2 = 0,86$  (viz **Tab. č. 9**). Efekt ředidla byl statisticky významný ( $P < 0,05$ ) pouze pro druhý chladový test. Efekt přídavku LDL byl statisticky významný ( $P < 0,001$ ) pouze pro tepelný test. Efekt býka byl pro všechny fáze experimentu statisticky významný ( $P < 0,001$ ). Interakce fixního efektu mezi ředidlem a býkem byla statisticky významná ( $P < 0,05$ ) pro všechny fáze experimentu, ale pouze pro fázi rozmrazení inseminační dávky byla tato interakce statisticky významnější a přesnější ( $P < 0,001$ ). Naproti tomu interakce fixního efektu býka a přídavku LDL do ředidla byla statisticky nevýznamná pouze pro druhý chladový test ( $P > 0,05$ ), ostatní fáze byly na statisticky významné hladině ( $P < 0,001$ ).

Na základě korelačního vztahu mezi jednotlivými testy (viz **Tab. č. 8**) lze říci, že všechny testy spolu statisticky významně korelují ( $P < 0,001$ ), přičemž Pearsonovy korelační koeficienty se pohybovaly v rozmezí  $r = 0,341$  až  $r = 0,806$ . Statisticky významná korelace ( $0,01 > P > 0,001$ ) mezi testy a přídávky LDL byla potvrzena pouze pro dvouhodinový tepelný test, kde Pearsonův korelační koeficient činil hodnotu  $r = 0,223$ .



**Graf č. 1** – Průměrný počet živých spermií během prováděných testů

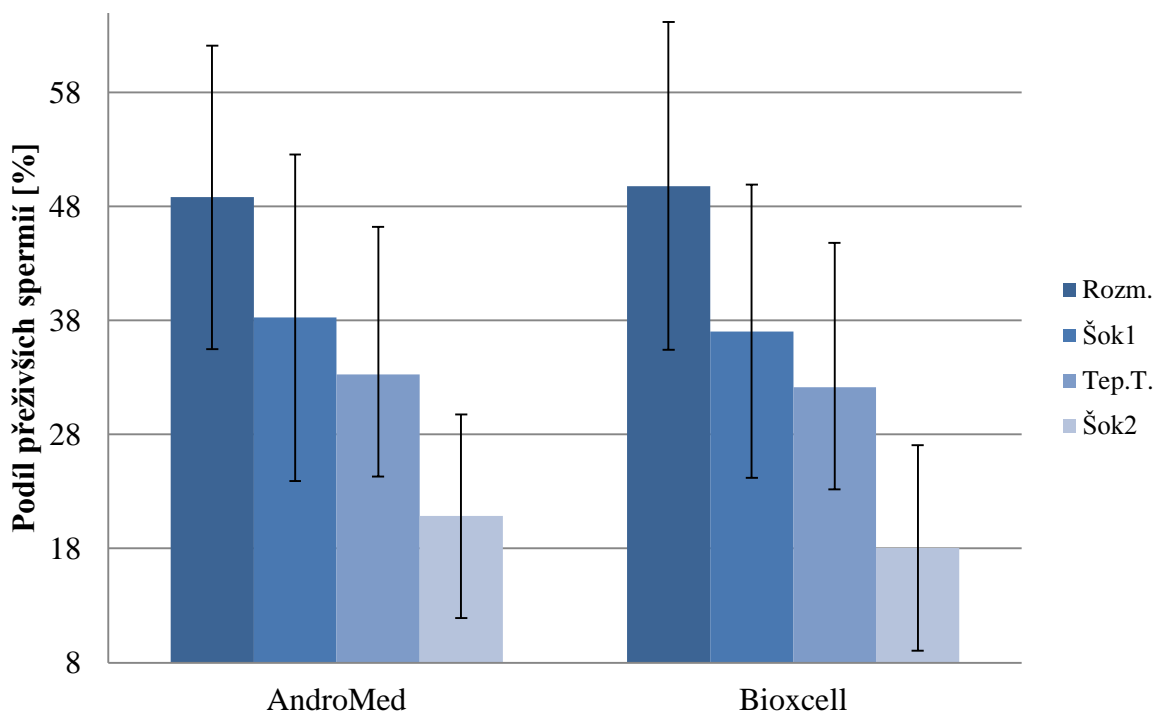
## Průměrný počet živých spermií během testů



Z **Grafu č. 1** vyplývá, že nezávisle na použitém ředidle, přísadce LDL a býkovi všeobecně dochází k poklesu přežitelnosti spermií. Největší úbytky v této charakteristice nastávají při přechodu z vyšších teplot do nižších (rozmrazení inseminační dávky – chladový šok, tepelný test – druhý chladový šok, viz **Tab. č. 2**). Podobný trend lze očekávat i u ostatních měřených efektů.

**Graf č. 2** – Porovnání ředidel AndroMed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup> během experimentu

## Porovnání ředidel AndroMed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup>

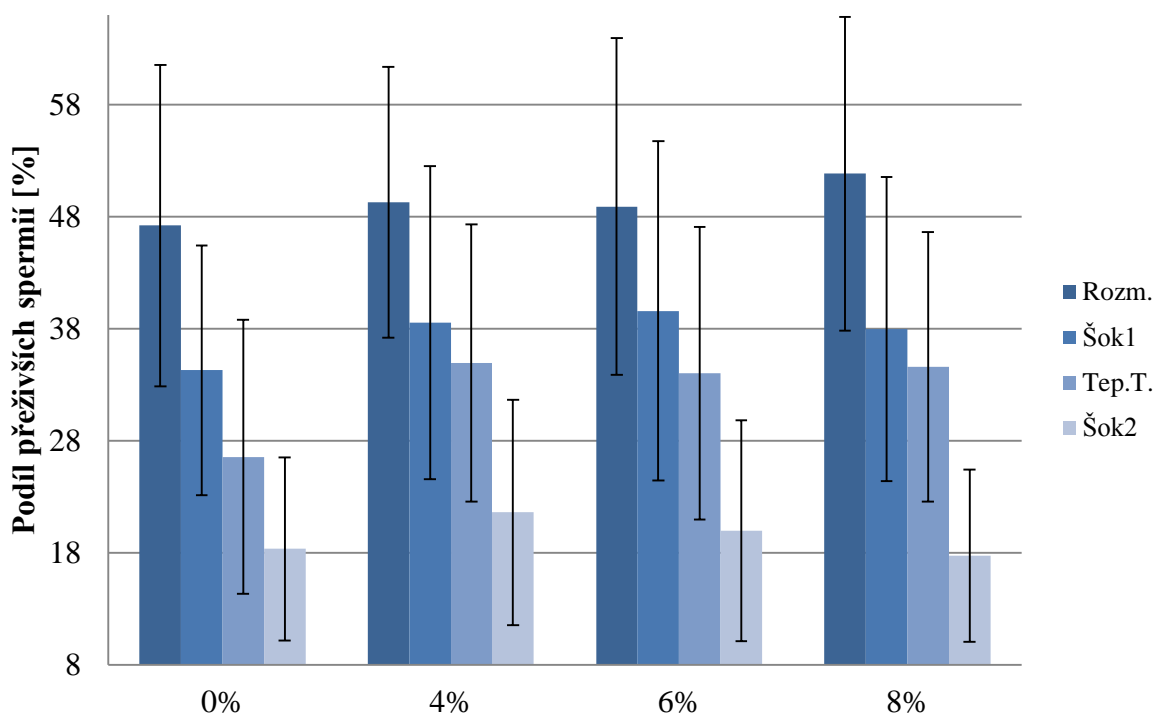


Při porovnání ředidel AndroMedu<sup>®</sup> a Bioxcellu<sup>®</sup> bez ohledu na přídavek LDL či býka (viz **Graf č. 2**) je zřejmé, že obě ředidla dosahují podobných výsledků, a to sestupné tendence podílu přeživších spermií ve vzorku po jednotlivých zákrocích v experimentu. Pouze po rozmrazení inseminační dávky byl zaznamenán u ředidla Bioxcellu<sup>®</sup> vyšší podíl živých spermií. U ostatních měření v pokusu však byl již podíl živých spermií vyšší u ředidla AndroMedu<sup>®</sup>.

Po srovnání směrodatných odchylek (přesněji viz **Tab. č. 3**) u obou ředidel, lze konstatovat, že i zde, u prvního měření, dosahoval AndroMed<sup>®</sup> stabilnějších hodnot, neboť směrodatná odchylka byla u tohoto měření menší. Ve stejném trendu se situace opakovala po měření hodnot po druhém chladovém šoku. Lepších výsledků v rozptylu hodnot než AndroMed<sup>®</sup> dosáhl Bioxcell<sup>®</sup> po prvním chladovém šoku a po dvouhodinovém tepelném testu.

**Graf č. 3** – Porovnání přidavků LDL během experimentu

## Porovnání přidavků LDL



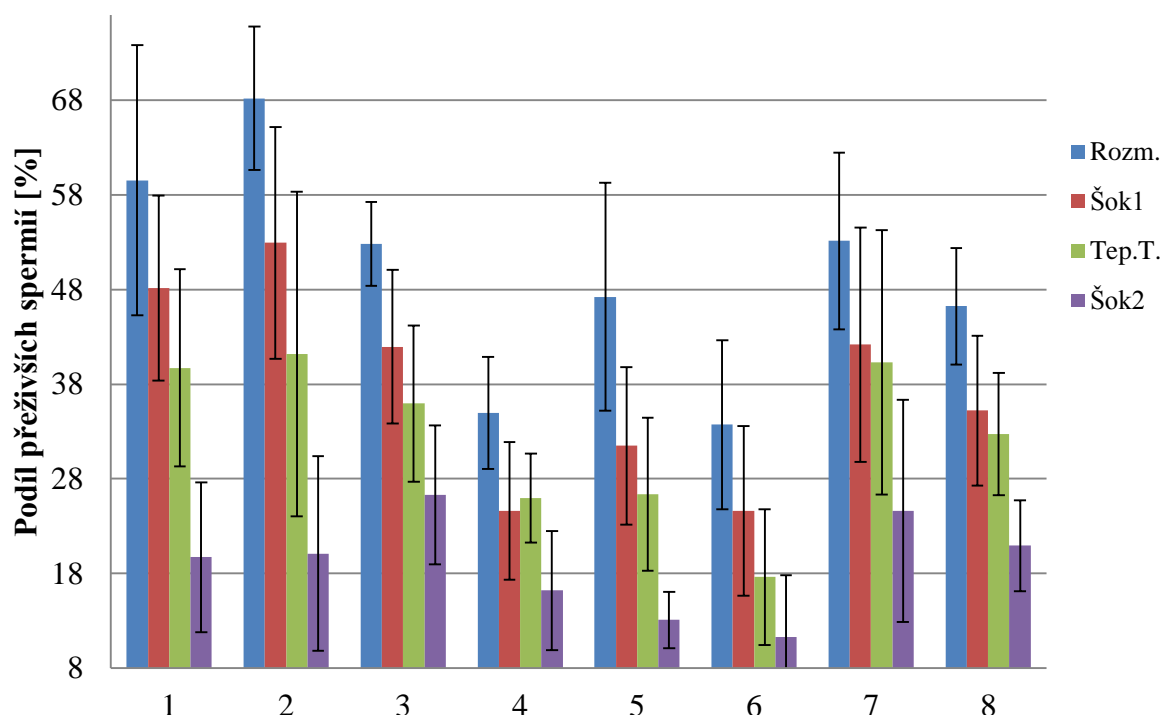
Z **Grafu č. 3** lze zřetelně rozpoznat, že procentuální podíl živých spermií se s přibývajícím časem a zatížením spermií při experimentu snižuje. Na rozdíl od kontrolního vzorku bez přidavku LDL nevykazují vzorky s přidavky LDL tak rovnoměrného poklesu živých spermií (podrobněji viz **Tab. č. 4**).

Dále zde můžeme pozorovat vliv přidavků LDL při přechodu z chladového šoku na tepelný šok, nižším poklesem procentuálního podílu živých spermií než jak je tomu u kontrolního vzorku. Opačnou situaci pak lze vidět při přechodu z tepelného šoku do druhého chladového šoku, kdy je naopak pokles kontrolního vzorku méně výrazný, než je tomu u vzorku s přidavky LDL.

Z pohledu výkyvu hodnot a rozptylu hodnot stanovených směrodatnou odchylkou lze říci, že nejstabilnější výsledky vykazuje 8%-ní přidavek LDL-cholesterolu, naopak nejméně stabilní je pak ředidlo obsahující 6%-ní přidavek LDL-cholesterolu.

**Graf č. 4** – Porovnání býků během experimentu

## Porovnání býků



Z tohoto grafu (**Graf č. 4**) lze vyčíst porovnání jednotlivých býků a jejich spermatu z pohledu přežitelnosti jejich spermií.

Býk č. 1 a býk č. 2 mají na počátku pokusu i v jeho průběhu jedny z nejvyšších procentuálních podílů živých spermií. Tuto skutečnost si zachovávají až do tepelného testu. Poté u nich nastává poměrně hluboký pokles této charakteristiky vzhledem k ostatním býkům. Býk č. 1 měl v průměru menší rozptyl hodnot přežitelnosti, tudíž lze považovat tyto hodnoty za přesnější (viz **Tab. č. 5**).

Býci č. 3 a 7 mají velmi podobné procentuální podíly živých spermií v průběhu všech kroků experimentu. U obou dochází s postupem času k relativně mírnému poklesu živých buněk. Jediným rozdílem je fakt, že býk č. 7 je schopen si zachovat lepší přežitelnost po tepelném testu. V ohledu výkyvu hodnot lze jednoznačně určit, že býk č. 3 má spolehlivější přežitelnost (viz **Tab. č. 5**).

Býci č. 4 a 6 mají při zahájení testu i v jeho průběhu jedny z nejnižších hodnot podílu živých spermií. U býka č. 6 dochází během experimentu k pozvolnému poklesu, kdežto u býka č. 4 jsou hodnoty podílu živých spermií po chladovém testu srovnatelné

s těmi po tepelném testu. Podíl přeživších spermií je u býka č. 4 vzhledem k menším výkyvům směrodatné odchylky mnohem přesnější (viz **Tab. č. 5**).

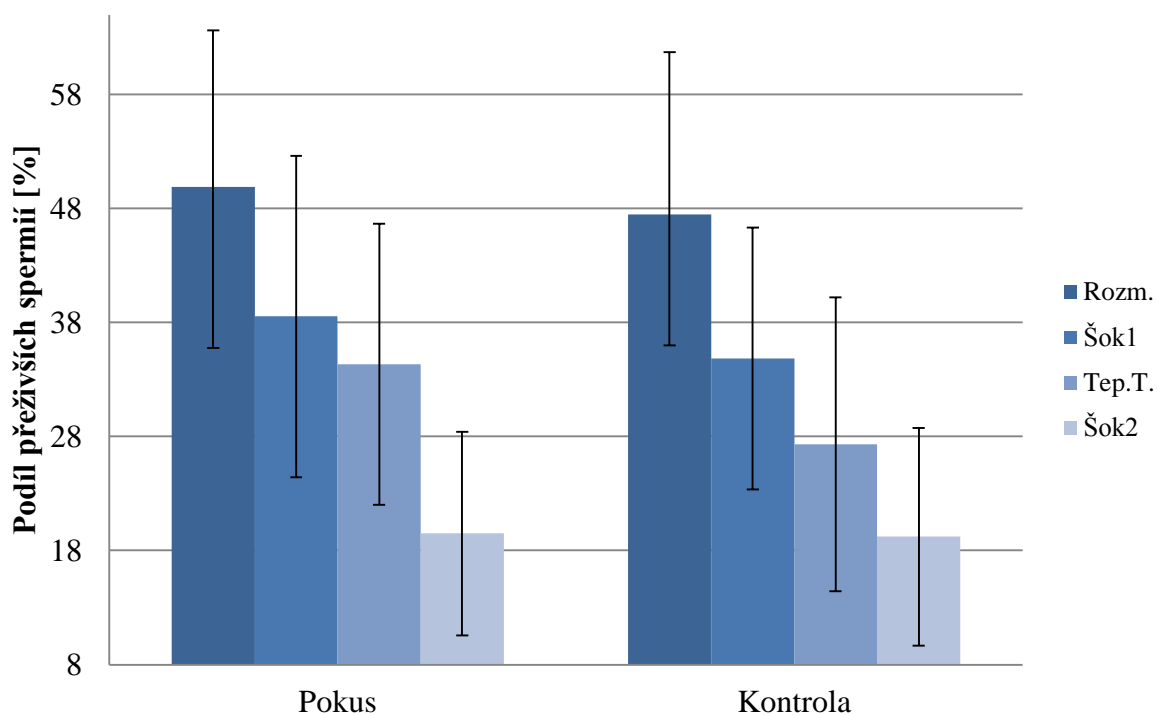
Býci č. 5 a 8 mají porovnatelné hodnoty živých spermií pouze po rozmrazení inseminační dávky. Postupem času se jejich charakteristiky rozcházejí, přičemž býk č. 8 je schopen si lépe zachovat podíl živých spermií. Také u tohoto býka lze konstatovat menší výkyv hodnot směrodatné odchylky (viz **Tab. č. 5**), a tedy přesnější hodnoty přežitelnosti.

Celkově lze určit z pohledu přežitelnosti nejlepšího býka pouze po jednotlivých testech. Záleží tedy velmi na konkrétních podmínkách testu.

Výše zmíněné výsledky jsou též podpořeny jinou statistickou metodou vyhodnocení – ANOVOU (viz **Tab. č. 10**). Udávané hodnoty se liší pouze v desetínách. Data jsou však vzhledem k principu výpočtu mnohem přesnější, což se promítne na velikosti hodnot směrodatných odchylek a střední chybě aritmetického průměru.

**Graf. č. 5** – Porovnání pokusů a kontrolního vzorku

## Porovnání pokusů a kontroly



Předchozí graf (**Graf č. 5**) znázorňuje porovnání souhrnných výsledků pokusů a kontrolních vzorků bez přídavku LDL. Je patrné, že pokusy mají obecně vyšší procentuální podíl živých spermií napříč všemi testy než je tomu u kontrolních vzorků. Kromě prvního testu vykazují kontrolní vzorky méně stabilní hodnoty díky větším výkyvům směrodatné odchylky (viz **Tab. č. 7**).

## 6 Diskuze

Hodnocením počtu živých spermií po jednotlivých testech bez ohledu na býky, přídavky LDL a použité ředidlo (viz **Graf č. 1**, resp. **Tab č. 2**) vyšlo najevo, že v průběhu testů dochází postupně k poklesu zastoupení živých spermií v dávce. V pokusu byly použity ejakuláty s aktivitou spermií ihned po odběru vyšší než 70%. Tato hodnota, jež je standardní pro aktivitu spermií, z nichž jsou vyráběny inseminační dávky v České republice, je potvrzena i Beranem a kol. (2013). Louda a kol. (2007) pro změnu udává aktivitu spermií ihned po odběru v rozmezí 45 – 75%. Při měření počtu živých spermií v co nejkratší době po rozmrazení se procento živých spermií v dávce pohybovalo v rozmezí 68,33 – 32,07%, což je nejspíše způsobeno teplotním šokem nastalým během zmrazování a tání dávky.

K výraznějším úbytkům živých spermií pak dochází především při poklesu teploty. Tento poznatek lze vyčíst též z pokusu Berana a kol. (2013), v němž během teplotní zátěže, jíž byly spermie vystaveny, pokleslo procento přeživších buněk. Tento jev může být pravděpodobně způsoben nedostatečnou a pomalou adaptací spermií na teplotní výkyvy, jelikož k nim buňky nejsou fyziologicky předurčeny. Nicméně, byla-li by spermie schopna rychlejší adaptace těmto podmínkám, pravděpodobně by během této doby rychleji spotřebovávala své zásoby ATP a jednoduchých cukrů obsažených v naředěné semenné plazmě. I přes zrychlenou adaptaci by tak mohla buňka uhynout vlivem vyčerpání energetických zdrojů, nebo otravou způsobenou vlastními metabolity. Toto tvrzení je podpořeno i Ballem a Petersem (2004), kteří udávají jako konečný zdroj metabolismu spermií kyselinu mléčnou, jež má za následek změny hodnot vnějšího prostředí, v němž se samčí pohlavní buňky nacházejí a které jsou pro spermie často smrtelné.

Moussa a kol. (2002) předpokládají, že LDL – cholesterol bude mít kryoprotektivní účinky, což ho předurčuje také k ochraně proti chladovému šoku. Dále se domnívají, že právě LDL – cholesterol je hlavní složkou zodpovědnou za tuto ochranu.

Přidáním složky LDL – cholesterolu do komerčních ředidel neobsahujících žádné živočišné složky dochází ke zlepšení jejich kryoprotektivních vlastností. Van Wagtendong-de Leeuw a kol. (2000) a Beran a kol. (2013) uvádějí, že ředidla založená na bázi sójového extraktu dosahují ve srovnání s ředidly obsahující vaječný žloutek zpravidla horších výsledků.

V experimentu prováděném v rámci této diplomové práce byly porovnávány podíly přeživších spermií po vystavení chladovému a tepelnému testu. Ejakulát byl naředěn komerčně využívanými ředidly AndroMed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup>, do nichž byly přidány 4%, 6% a 8%

LDL – cholesterolu, kontrolním vzorkem pak bylo ředidlo neobsahující žádný podíl LDL – cholesterolu (0% LDL). Obdobný pokus byl proveden také Moussou a kol. (2002) srovnávající však komerční ředidla Triladyl<sup>®</sup> a Biociphos<sup>®</sup>, z nichž však pouze prvně jmenovaný byl odlišně naředěn, a to 2,5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15% a 20% LDL – cholesterolem. Biociphos<sup>®</sup> tomuto naředění podroben nebyl. Autoři se však v tomto pokusu zabývají spíše motilitou po rozmrazení. I tak lze říci, že motilita přímo koresponduje s přežitelností spermií, výsledky je tedy možné porovnávat.

Beran a kol. (2013) se však již, kromě Triladylu<sup>®</sup>, soustředili i na ředidla AndroMed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup>. V tomto experimentu byly zvoleny 4%-ní, 6%-ní a 8%-ní přídavky LDL – cholesterolu pro AndroMed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup> a 6%-ní, 8%-ní a 10%-ní přídavky LDL – cholesterolu pro Triladyl<sup>®</sup>, kde vyšší koncentrace LDL – cholesterolu nahrazovaly běžně přidávaný vaječný žloutek, jež je jinak nezbytnou složkou pro toto ředidlo. V tomto pokusu byla srovnávána přežitelnost spermií po chladovém šoku, která byla zjišťována stejným způsobem jako u našeho experimentu – tedy pomocí barvení eosin-nigrosinovým barvivem. Jako kontrolní vzorek bylo použito ředidlo bez přídavku LDL – cholesterolu. Po spočítání živých spermií byl vyjádřen jejich procentuální podíl.

Při srovnání výsledků experimentu s Beranem a kol. (2013) bylo potvrzeno, že efekt býků byl statisticky významný ( $P < 0,01$ ). Při porovnání efektu ředidla se však již hodnoty u obou pokusů rozcházely. V tomto pokusu vyšel na statisticky významné hladině efekt ředidla pouze po druhém chladovém testu ( $P < 0,05$ ), kdežto Beranovi a kol., (2013) vyšel efekt ředidla statisticky významný ve dvou hodnocených bodech – u procenta přeživších spermií po 2 hodinách od zahájení testu a 2 hodinách tepelné inkubace. Efekt přídavku LDL – cholesterolu v pokusu vyšel jako průkazný a statisticky významný pouze po dvouhodinovém tepelném testu. Ve srovnávacím pokusu však ředidlo vyšlo ve všech bodech jako statisticky nevýznamné.

Dále byly vyhodnoceny sloučené faktory, tedy fixní efekty býka a použitého ředidla a přídavku LDL a býka (viz **Tab. č. 9**). První jmenovaný fixní efekt byl statisticky významný pouze pro první krok, tedy životaschopnost spermií po rozmrazení inseminační dávky ( $P < 0,001$ ). Z toho lze usuzovat o dalších možných faktorech ovlivňujících přežitelnost spermií (například přídavek LDL do komerčních ředidel či přirozenou odolnost spermií vůči výkyvům teplot) při dalších zkušebních krocích testu – chladovém a tepelném šoku. Druhý jmenovaný fixní efekt nevyšel jako statisticky významný ( $P > 0,001$ ) pouze pro druhý chladový šok. Zde lze předpokládat, že jsou spermie při druhém chladovém testu vystaveny



příliš velké zátěži i přes přídavky LDL s uvážením přirozené odolnosti spermií vůči teplotním šokům. V tomto ohledu je nutné podotknout, že tyto výsledky nelze prozatím s nikým porovnat.

Podobně jako u experimentu Berana a kol. (2013), byli i v tomto pokusu porovnávání všichni býci bez ohledu na použité ředidlo či množství přidaného LDL. Tyto výsledky korespondují s výsledky zmíněnými výše (viz **Graf č. 3**, resp. **Tab. č. 10**). Po rozmrazení inseminační dávky, po prvním chladovém testu a tepelném testu dosahoval nejlepších výsledků býk č. 2 ( $P < 0,001$ ), nicméně po druhém chladovém testu je v ohledu přežitelnosti živých spermií tento býk nahrazen býkem č. 3 ( $P < 0,001$ ). To jen potvrzuje fakt, že efekt býka je statisticky významným ukazatelem. Toto tvrzení sdílí i Thara a Suresh Nair (2007).

V rámci experimentu byly hodnoceny také přídavky LDL bez ohledu na býka a ředidlo (viz **Graf č. 3**, resp. **Tab. č. 4**). Po rozmrazení inseminační dávky dosahuje nejlepších výsledků přídavek 8% LDL, po prvním chladovém testu však již přídavek 6% LDL a po tepelném testu dokonce přídavek 4% LDL. Posledně zmíněný přídavek si udržel dosažené výsledky i po druhém chladovém testu, v němž dosáhl nejvyšší hodnoty podílu přeživších spermií. Z tohoto faktu lze vyvodit, že pro dosažení nejvyššího počtu živých spermií lze pro jednotlivé zátěžové testy doporučit různé přídavky LDL. Po rozmrazení inseminační dávky můžeme očekávat nejlepší ochranu buněk u nejvyššího přídavku LDL. Tento výsledek potvrzují i Moussa a kol. (2002), kdy pro ředidlo Triladyl<sup>®</sup> stanovil jako nejlepší vhodnou koncentraci, při níž byla zachována nejvyšší motilita, přídavek 8% LDL.

Po prvním chladovém testu vychází nejlépe přídavek 6% LDL, po dvouhodinovém tepelném testu pak přídavek 4% LDL, nicméně přídavek 8% LDL není nijak významně odlišný a v rámci střední chyby aritmetického průměru můžeme tyto přídavky považovat za totožné. Z tohoto důvodu můžeme všeobecně očekávat nejlepší výsledky od přídavku 8% LDL, dokud vzorek neprojde druhým chladovým testem. Tyto výsledky však mohou být pro jednotlivá ředidla a sperma býků lehce odlišné.

Při hodnocení ředidel (viz **Graf č. 2**, resp. **Tab. č. 3**) bez ohledu na přídavek LDL a býky lze považovat za lepší ředidlo AndroMed<sup>®</sup>, neboť si po větší část experimentu dokázal zachovat vyšší procentuální podíl přeživších spermií než ředidlo Bioxcell<sup>®</sup>.

Porovnáním přežitelnosti v průběhu pokusů a kontrolních vzorků (viz **Graf č. 5**, resp. **Tab. č. 7**) lze jednoznačně potvrdit, že LDL – cholesterol má vliv na ochranu spermií před výkyvy teplot. Toto tvrzení podporuje i Moussa a kol. (2002), který ve své publikaci

konkrétně zmiňuje, na jakém principu je tato ochrana založena. Pravděpodobně je též možné, že lipidy obsažené v LDL cholesterolu mají určité izolační vlastnosti, které jsou schopné tepelně izolovat od teplotních výkyvů vnějšího prostředí. Tím mohou zmírnit skokovou změnu vnějších podmínek, a umožnit tak buňce delší čas pro adaptaci.

Při hodnocení korelace mezi jednotlivými pokusy (**Tab. č. 7**) lze dojít k závěru, že na průkazné hladině ( $P < 0,001$ ) se pohybovala většina charakteristik. Příklad LDL cholesterolu neměl zcela průkazný vliv na procentuální podíl živých spermií po rozmrazení a po prvním a druhém chladovém šoku. K takovému výsledku došli i Beran a kol. (2013) ve svém pokusu, v němž se mu také přídavek LDL – cholesterolu projevil jako neprůkazný. Z tohoto zjištění lze usuzovat, že nelze jednoznačně určit konkrétní koncentraci přídatku LDL – cholesterolu pro jednotlivé testy, jelikož tyto proměnné s přídatky LDL – cholesterolu většinou nekorelují, a výsledky tudíž nejsou prozatím zcela jasně průkazné.

## 7 Závěr

Hypotéza stanovená v rámci cíle diplomové práce byla potvrzena – se vzrůstající zátěží skutečně dochází k procentuálnímu úbytku živých spermií.

Z hodnocení ředidel vyšlo lépe ředidlo AndroMed<sup>®</sup>, neboť si v průběhu experimentu zachovalo oproti ředidlu Bioxcell<sup>®</sup> vyšší počet živých spermií.

Z experimentu dále vyplynulo, že pro jednotlivé testy, tedy chladový a tepelný test, nelze zcela jednoznačně stanovit vyhovující procentuální přídavek LDL – cholesterolu. Jako nejstabilnější se však jeví 8% přídavek LDL – cholesterolu. To platí pro všechny zátěže – od rozmrazení inseminační dávky po tepelný test, výjimku ale tvoří druhý chladový test, při němž vyšel nejlépe přídavek 4% LDL – cholesterolu. Pro zátěž dvojitého zchlazování ejakulátu je však ještě nutné učinit další podrobnější výzkumy a analýzy, prováděné pomocí moderních technologií a postupů, zaměřené na další vlastnosti spermií, jimiž jsou například motilita, funkčnost akrozomu a jeho penetrační schopnost, s přídatkem LDL - cholesterolu v rozmezí 4 – 8%.

Jak u typu ředidla, tak u přídatku LDL – cholesterolu nelze všeobecně zaručit určitý podíl přeživších spermií, jelikož ta závisí v první řadě na spermiích konkrétního býka, které dokáží lépe odolávat chladu nebo změnám teploty. Tuto skutečnost lze řadit mezi individuální vlastnosti pohlavních buněk zvířete.

Pokud však v budoucnu dojde ke zpřesnění, který procentuální přídavek LDL – cholesterolu do ředidla ejakulátu je v ohledu ochrany spermií nejvhodnější, lze tento poznatek uvést do praxe a zajistit tím větší optimalizaci výroby inseminačních dávek.

## 8 Literatura

Akhter, S.; Ansari, M.; Rakha, B.; Andrabi, S.; Iqbal, S.; Ullah, N. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell® extender. *Theriogenology* **2010**, *74*, 951–955.

Anton, M.; Martinet, V.; Dalgalarondo, M.; Beaumal, V.; David-Briand, E.; Rabesona, H. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry* **2003**, *83*, 175–183.

Aires, V.; Hinsch, K.; Mueller-Schloesser, F.; Bogner, K.; Mueller-Schloesser, S.; Hinsch, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* **2003**, *60*, 269–279.

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

Ball, P.; Peters, A. *Reproduction in Cattle*, 3rd ed.; Blackwell Publishing: Oxford, UK, 2004, ISBN 1-4051-1545-9

Beran, J.; Šimoník, O.; Stádník, L.; Rajmon, R.; Ducháček, J.; Krejčířková, A.; Doležalová, M.; Šichtař, J. Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelinae Brunensis* **2013**, *61* (6), 1576–1581.

Celeghini, E.; de Arruda, R.; de Andrade, A.; Nascimento, A.; Raphael, C.; Rodrigues, P. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science* **2008**, *104*, 119–131.

Dhurvey, M.; Gupta, V.; Nema, S.; Patidar, A.; Shivhare, M.; Singht, N.; Shakya, V. Modern semen evaluation techniques in domestic animals: A review. *DHR International Journal Of Biomedical and Life Sciences* **2012**, *3* (1), 62–83.

Doležalová, M.; Stádník, L.; Vodička, J. Chlazení a ekvibrace při výrobě inseminačních dávek. *Náš chov* **2014**, *6*, 22–23.

Gil, J.; Rodriguez-Irazaqui, M.; Lundeheim, N.; Söderquist, L.; Rodríguez-Martínez, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology* **2003**, *59*, 1157–1170.

Graham, J.; Mocé, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* **2005**, *64*, 492–504.

Hinsch, E.; Hinsch, K.; Boehm, J.; Schill, W.; Mueller-Schloesser, F. Functional Parameters and Fertilization Success of Bovine Semen Cryopreserved in Egg-yolk Free and Egg-yolk Containing Extenders. *Reproduction in Domestic Animals* **1997**, *32*, 143–149.

Holt, W. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* **2000**, *62*, 3–22.

Jelínková, S. O reprodukci skotu. *Zemědělský týdeník* **2010**, *XIII* (17), 8, ISSN 1212-2246.

Jiang-Hong, H.; Zhong-Liang, J.; Rui-Kai, L.; Qing-Wang, L.; Shu-Shan, Z.; Lin-Sen, Z.; Yao-Kun, L.; Xin, L. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology* **2011**, *62*, 83–87.

Jothipriya, R.; Sasikumar, S.; Madhankumar, E. K.; Pranetha, A.; Kalaiselvi, S. A Study of Hypo Osmotic Swelling Test in Human Spermatozoa. *International Journal of Current Research and Academic Review* **2014**, *2* (12), 47–63.

Kanchan; Matharoo, J. S. Effect of semen colour on seminal characteristics in cattle bulls. *Indian Journal of Animal Research* **2015**, *49* (1), 146–147.

Leite, T. G.; Ribeiro do Vale Filho, V.; Paes de Arruda, R.; de Andrade, C. F.; Emerick, L. L.; Zaffalon, F. G.; Martins, J. A. M.; de Andrade, V. J.; Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science* **2010**, (120), 31–38.

Lopéz-Gatiús, F. Factors of a noninfectious nature affecting fertility after artificial insemination in lactating dairy cows. A review. *Theriogenology* **2012**, *77*, 1029–1041.

Louda, F.; Bjelka, M.; Ježková, A.; Stádník, L.; Pozdíšek, J. *Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby*, 1st ed.; Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o: Rapotín, 2007, ISBN: 978-80-87144-01-5.

Mocé, E.; Graham, J. K. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science* **2008**, *105*, 104–118.

Monterroso, V.; Drury, K.; Ealy, A.; Edwards, J.; Hansen, P. Effect of heat shock on function of frozen/thawed bull spermatozoa. *Theriogenology* **1995**, *44*, 947–961.

Moussa, M.; Martinet, V.; Trimeche, A.; Tainturier, D.; Anton, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* **2002**, (57), 1695–1706.

Pace, M.; Graham, E. Components in Egg Yolk which Protect Bovine Spermatozoa during Freezing. *J. Anim. Sci.* **1974**, *39*, 1144–1149.

Rodríguez-Martínez, H. Optimization of Sperm Quality in A1 Bulls. *Reproduction in Domestic Animals* **1998**, *33*, 233–237.

SAS Institute Inc. (2011): SAS/STAT® 9.3 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Shahverdi A.; Rastegarnia A.; Rezaei Topraggaleh T. Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin structure of buffalo bull (*bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell Journal* **2014**; *16* (3), 279-288.

Siddique, M.; Ali, R.; Raza, A. Effect of Buffers on Freezing of Buffalo Bull Semen. *Journal of agriculture & social sciences* **2006**, *2* (2), 117–119.

Thara, K. M.; Nair Suresh, S. P. Sire effect on in vitro fertilizability of matured cattle oocytes. *Indian Journal of Biotechnology* **2007**, *6*, 421–422.

Thibier, M.; Guerin, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* **2000**, *62*, 233–251.

Thun, R.; Hurtado, M.; Janett, F. Comparison of Biociphos Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* **2002**, *57*, 1087–1094.

van Wagtenonk-de Leeuw, A.; Haring, R.; Kaal-Lansbergen, L.; den Daas, J. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology* **2000**, *54*, 57–67.

Vera-Munoz, O.; Amirat-Briand, L.; Diaz, T.; Va'squez, L.; Shmitt, E.; Desherces, S.; Anton, M.; Bencharif, D.; Tainturier, D. 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 Triladyll® and Bioxcell®. *Theriogenology* **2009**, *71*, 895–900.

Vera-Munoz, O.; Amirat-Briand, L.; Bencharif, D.; Anton, M.; Desherces, S.; Shmitt, E.; Thorin, C.; Tainturier, D. Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4 °C. *Asian Journal of Andrology* **2011**, *13*, 281–286.

Verberckmoes, S.; Van Soom, A.; Dewulf, J.; de Kruif, A. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology* **2004**, *63*, 912–922.

Věžník, Z.; Přenosilová, P.; Zajícová, A. Stanovení membránové resistance spermií kance modifikovaným testem HOS. *Research In Pig Breeding* **2009**, *3* (2), 44–47.

Viswanath, R. Artificial insemination: the state of art. *Theriogenology* **2003**, *59*, 571–584.

Vishwanath, R.; Shannon, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science* **2000**, *62*, 23–53.

Walsh, S. W.; Williams, E. J.; Evans, A. C. O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science* **2011**, (123), 127–138.

Watson, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* **2000**, (61), 481–492.

Yoshida, M. Conservation of sperms: current status and new trends. *Animal Reproduction Science* **2000**, 60 (61), 349–355.

Zhang, X.; Hu, S.; Han, C.; Zhu, Q.; Yan, G.; Hu, J. Association of heat shock protein 90 with motility of post-thawed sperm in bulls. *Cryobiology* **2015**, 70, 164–169.



## 9 Přílohy

Tab. č. 1 – Charakteristika býků

| Číslo býka | Registr, jméno    | Plemeno             |
|------------|-------------------|---------------------|
| 1          | MOR 198 Manitogen | Český strakatý skot |
| 2          | MOR 170 Girold    | Český strakatý skot |
| 3          | NEA 672 Kolt      | Holstein            |
| 4          | NEO 283           | Holstein            |
| 5          | NXA 873 Fame      | Holstein            |
| 6          | Redstar           | Red Holstein        |
| 7          | NEO 197 Milano    | Holstein            |
| 8          | NEA 955 Northorn  | Holstein            |

Tab. č. 2 – Základní statistiky souboru

| Proměnná   | n   | $\bar{x}$ | s     | min.  | max.  | s.e. | V (%) |
|--|-----|-----------|-------|-------|-------|------|-------|
| Procento živých spermií po rozmrazení ID         | 149 | 49,34     | 13,83 | 18,84 | 80,17 | 1,13 | 28,04 |
| Procento živých spermií po chladovém šoku        | 139 | 37,64     | 13,57 | 10,71 | 75    | 1,15 | 36,05 |
| Procento živých spermií po 2 hod tepelného testu | 149 | 32,70     | 12,77 | 5,26  | 59,67 | 1,05 | 39,07 |
| Procento živých spermií po chladovém šoku 2      | 139 | 19,42     | 9,05  | 1,1   | 48,24 | 0,77 | 46,61 |

**Tab. č. 3** – Statistické vyhodnocení z pohledu ředidel

| <b>Ředidlo</b>  | <b>Proměnná</b>                                 | <b>n</b> | $\bar{x}$ | <b>s</b> | <b>min.</b> | <b>max.</b> | <b>s.e.</b> | <b>V (%)</b> |
|-----------------|---|----------|-----------|----------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>AndroMed</b> | procento živých spermií po rozmrazení ID        | 71       | 48,81     | 13,30    | 24,26       | 77,28       | 1,58        | 27,24        |
|                 | procento živých spermií po chladovém šoku       | 68       | 38,25     | 14,33    | 10,71       | 75          | 1,74        | 37,45        |
|                 | procento živých spermií po 2hod tepelného testu | 71       | 33,27     | 12,96    | 9,86        | 57,69       | 1,54        | 38,97        |
|                 | procento živých spermií po chladovém šoku 2     | 68       | 20,84     | 8,94     | 1,1         | 48,24       | 1,08        | 42,92        |
| <b>Bioxcell</b> | procento živých spermií po rozmrazení ID        | 78       | 49,81     | 14,37    | 18,84       | 80,17       | 1,63        | 28,85        |
|                 | procento živých spermií po chladovém šoku       | 71       | 37,06     | 12,88    | 11,8        | 69,37       | 1,53        | 34,76        |
|                 | procento živých spermií po 2hod tepelného testu | 78       | 32,18     | 12,66    | 5,26        | 59,67       | 1,43        | 39,34        |
|                 | procento živých spermií po chladovém šoku 2     | 71       | 18,07     | 9,01     | 3,8         | 39,83       | 1,07        | 49,87        |

**Tab č. 4** – Statistické vyhodnocení z pohledu přídaveků LDL do ředidel

| <b>Přídavek<br/>LDL</b> | <b>Proměnná</b>                                 | <b>n</b> | $\bar{x}$ | <b>s</b> | <b>min.</b> | <b>max.</b> | <b>s.e.</b> | <b>V (%)</b> |
|-------------------------|---|----------|-----------|----------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>0</b>                | procento živých spermií po rozmrazení ID        | 34       | 47,19     | 14,35    | 24,03       | 74,29       | 2,46        | 30,42        |
|                         | procento živých spermií po chladovém šoku       | 33       | 34,28     | 11,14    | 10,71       | 53,6        | 1,94        | 32,50        |
|                         | procento živých spermií po 2hod tepelného testu | 34       | 26,54     | 12,24    | 5,26        | 48,75       | 2,10        | 46,12        |
|                         | procento živých spermií po chladovém šoku 2     | 33       | 18,34     | 8,17     | 4,5         | 34,69       | 1,42        | 44,52        |
| <b>4</b>                | procento živých spermií po rozmrazení ID        | 40       | 49,29     | 12,09    | 32,29       | 74          | 1,91        | 24,53        |
|                         | procento živých spermií po chladovém šoku       | 37       | 38,54     | 13,98    | 10,71       | 69,37       | 2,30        | 36,26        |
|                         | procento živých spermií po 2hod tepelného testu | 40       | 34,93     | 12,38    | 9,86        | 57,69       | 1,96        | 35,45        |
|                         | procento živých spermií po chladovém šoku 2     | 36       | 21,58     | 10,07    | 1,1         | 39,83       | 1,68        | 46,65        |
| <b>6</b>                | procento živých spermií po rozmrazení ID        | 38       | 48,89     | 15,02    | 24,62       | 80,17       | 2,44        | 30,73        |
|                         | procento živých spermií po chladovém šoku       | 35       | 39,57     | 15,13    | 13,16       | 75          | 2,56        | 38,24        |
|                         | procento živých spermií po 2hod tepelného testu | 38       | 34,00     | 13,08    | 10,8        | 59,67       | 2,12        | 38,45        |
|                         | procento živých spermií po chladovém šoku 2     | 35       | 19,95     | 9,86     | 3,8         | 48,24       | 1,67        | 49,41        |
| <b>8</b>                | procento živých spermií po rozmrazení ID        | 37       | 51,82     | 14,01    | 18,84       | 72,82       | 2,30        | 27,05        |
|                         | procento živých spermií po chladovém šoku       | 34       | 37,94     | 13,59    | 11,8        | 64,83       | 2,33        | 35,81        |
|                         | procento živých spermií po 2hod tepelného testu | 37       | 34,60     | 12,03    | 12,6        | 57,3        | 1,98        | 34,78        |
|                         | procento živých spermií po chladovém šoku 2     | 35       | 17,70     | 7,68     | 6,5         | 36,66       | 1,30        | 43,40        |

**Tab. č. 5 – Statistické vyhodnocení z pohledu býků**

| <b>Býk</b> | <b>Proměnná</b>                                 | <b>n</b> | $\bar{x}$ | <b>s</b> | <b>min.</b> | <b>max.</b> | <b>s.e.</b> | <b>V (%)</b> |
|------------|---|----------|-----------|----------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>1</b>   | procento živých spermií po rozmrazení ID        | 15       | 59,53     | 14,26    | 38,75       | 80,17       | 3,68        | 23,95        |
|            | procento živých spermií po chladovém šoku       | 15       | 48,12     | 9,77     | 34,65       | 63,54       | 2,52        | 20,31        |
|            | procento živých spermií po 2hod tepelného testu | 15       | 39,72     | 10,40    | 20          | 57,3        | 2,69        | 26,18        |
|            | procento živých spermií po chladovém šoku 2     | 15       | 19,71     | 7,94     | 7,08        | 30,61       | 2,05        | 40,29        |
| <b>2</b>   | procento živých spermií po rozmrazení ID        | 19       | 68,18     | 7,57     | 56,96       | 77,28       | 1,74        | 11,10        |
|            | procento živých spermií po chladovém šoku       | 18       | 52,93     | 12,24    | 34,91       | 75          | 2,88        | 23,12        |
|            | procento živých spermií po 2hod tepelného testu | 19       | 41,17     | 17,13    | 12,4        | 59,67       | 3,93        | 41,59        |
|            | procento živých spermií po chladovém šoku 2     | 17       | 20,10     | 10,30    | 7,1         | 39,83       | 2,50        | 51,22        |
| <b>3</b>   | procento živých spermií po rozmrazení ID        | 21       | 52,80     | 4,44     | 43,1        | 56,99       | 0,97        | 8,40         |
|            | procento živých spermií po chladovém šoku       | 17       | 41,95     | 8,12     | 26,17       | 53,6        | 1,97        | 19,35        |
|            | procento živých spermií po 2hod tepelného testu | 21       | 35,96     | 8,26     | 27,34       | 55,21       | 1,80        | 22,97        |
|            | procento živých spermií po chladovém šoku 2     | 20       | 26,30     | 7,35     | 14,37       | 36,66       | 1,64        | 27,97        |
| <b>4</b>   | procento živých spermií po rozmrazení ID        | 20       | 34,97     | 5,90     | 24,26       | 42,5        | 1,32        | 16,86        |
|            | procento živých spermií po chladovém šoku       | 18       | 24,64     | 7,27     | 10,71       | 38,77       | 1,71        | 29,49        |
|            | procento živých spermií po 2hod tepelného testu | 20       | 25,96     | 4,67     | 18,4        | 31,82       | 1,04        | 17,99        |
|            | procento živých spermií po chladovém šoku 2     | 19       | 16,19     | 6,31     | 10,24       | 30,87       | 1,45        | 38,96        |
| <b>5</b>   | procento živých spermií po rozmrazení ID        | 14       | 47,23     | 12,04    | 34,18       | 65,41       | 3,22        | 25,50        |
|            | procento živých spermií po chladovém šoku       | 13       | 31,50     | 8,32     | 20,51       | 45,68       | 2,31        | 26,41        |
|            | procento živých spermií po 2hod tepelného testu | 14       | 26,35     | 8,08     | 16,51       | 36,24       | 2,16        | 30,68        |
|            | procento živých spermií po chladovém šoku 2     | 14       | 13,09     | 2,98     | 8,9         | 17,75       | 0,80        | 22,79        |
| <b>6</b>   | procento živých spermií po rozmrazení ID        | 18       | 33,71     | 8,93     | 18,84       | 43,4        | 2,10        | 26,49        |
|            | procento živých spermií po chladovém šoku       | 18       | 24,63     | 8,96     | 11,8        | 39,52       | 2,11        | 36,39        |
|            | procento živých spermií po 2hod tepelného testu | 18       | 17,61     | 7,17     | 5,26        | 26,36       | 1,69        | 40,71        |

|   |  |    |       |       |       |       |      |       |
|---|--|----|-------|-------|-------|-------|------|-------|
|   | procento živých spermií po<br>chlادovém šoku 2     | 16 | 11,27 | 6,55  | 3,8   | 25    | 1,64 | 58,11 |
| 7 | procento živých spermií po<br>rozmrazení ID        | 21 | 53,14 | 9,33  | 34,06 | 64,17 | 2,04 | 17,55 |
|   | procento živých spermií po<br>chlادovém šoku       | 20 | 42,18 | 12,38 | 10,71 | 59,22 | 2,77 | 29,35 |
|   | procento živých spermií po 2hod<br>tepelného testu | 21 | 40,32 | 13,98 | 9,86  | 53,68 | 3,05 | 34,66 |
|   | procento živých spermií po<br>chlادovém šoku 2     | 19 | 24,60 | 11,75 | 1,1   | 48,24 | 2,69 | 47,75 |
| 8 | procento živých spermií po<br>rozmrazení ID        | 21 | 46,23 | 6,15  | 36,54 | 59,88 | 1,34 | 13,30 |
|   | procento živých spermií po<br>chlادovém šoku       | 20 | 35,21 | 7,90  | 13,16 | 43,82 | 1,77 | 22,44 |
|   | procento živých spermií po 2hod<br>tepelného testu | 21 | 32,71 | 6,46  | 17,27 | 40,41 | 1,41 | 19,75 |
|   | procento živých spermií po<br>chlادovém šoku 2     | 19 | 20,95 | 4,80  | 15    | 31,08 | 1,10 | 22,90 |

**Tab. č. 6 –** Statistické porovnání pokusů a kontrol

| <b>Dělení</b>   | <b>Proměnná</b>                                 | <b>n</b> | $\bar{x}$ | <b>s</b> | <b>min.</b> | <b>max.</b> | <b>s.e.</b> | <b>V (%)</b> |
|-----------------|---|----------|-----------|----------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>Pokus</b>    | procento živých spermií po rozmrazení ID        | 114      | 49,90     | 13,72    | 18,84       | 80,17       | 1,28        | 27,48        |
|                 | procento živých spermií po chladovém šoku       | 105      | 38,54     | 14,11    | 10,71       | 75          | 1,38        | 36,62        |
|                 | procento živých spermií po 2hod tepelného testu | 114      | 34,35     | 12,33    | 9,86        | 59,67       | 1,15        | 35,88        |
|                 | procento živých spermií po chladovém šoku 2     | 105      | 19,49     | 8,94     | 1,1         | 48,12       | 0,87        | 45,86        |
| <b>Kontrola</b> | procento živých spermií po rozmrazení ID        | 35       | 47,49     | 14,25    | 24,03       | 74,29       | 2,41        | 30,00        |
|                 | procento živých spermií po chladovém šoku       | 34       | 34,86     | 11,49    | 10,71       | 54,12       | 1,97        | 32,95        |
|                 | procento živých spermií po 2hod tepelného testu | 35       | 27,32     | 12,90    | 5,26        | 53,68       | 2,18        | 47,23        |
|                 | procento živých spermií po chladovém šoku 2     | 34       | 19,22     | 9,54     | 4,5         | 48,24       | 1,64        | 49,62        |

**Tab. č. 7 –** Korelace mezi proměnnými

|  |   | <b>procento živých spermií po chladovém šoku</b> | <b>procento živých spermií po 2hod tepelného testu</b> | <b>procento živých spermií po chladovém šoku 2</b> | <b>LDL</b>   |
|--|---|--|--|--|--------------|
| <b>procento živých spermií po rozmrazení ID</b>        | r | <b>0,806</b>                                     | <b>0,568</b>   | <b>0,341</b>                                       | 0,106        |
|  | P | <b>&lt;0,001</b>                                 | <b>&lt;0,001</b>                                       | <b>&lt;0,001</b>                                   | 0,200        |
|  | n | <b>139</b>                                       | <b>149</b>   | <b>139</b>   | 149          |
| <b>procento živých spermií po chladovém šoku</b>       | r |  | <b>0,634</b>   | <b>0,509</b>                                       | 0,114        |
|  | P |  | <b>&lt;0,001</b>                                       | <b>&lt;0,001</b>                                   | 0,183        |
|  | n |  | <b>139</b>   | <b>129</b>   | 139          |
| <b>procento živých spermií po 2hod tepelného testu</b> | r |  |  | <b>0,656</b>                                       | <b>0,223</b> |
|  | P |  |  | <b>&lt;0,001</b>                                   | <b>0,006</b> |
|  | n |  |  | <b>139</b>   | <b>149</b>   |
| <b>procento živých spermií po chladovém šoku 2</b>     | r |  |  |  | -0,017       |
|  | P |  |  |  | 0,843        |
|  | n |  |  |  | 139          |

**Tab. č. 8** – Základní statistiky modelové rovnice, vlivy jednotlivých faktorů

| UKAZATEL  | MODEL          |        | ředidlo |       | LDL    |        | býk    |        | ředidlo * býk |        | LDL * býk |        |
|---|----------------|--------|---------|-------|--------|--------|--------|--------|---------------|--------|-----------|--------|
|   | r <sup>2</sup> | P      | F-test  | P     | F-test | P      | F-test | P      | F-test        | P      | F-test    | P      |
| procento živých spermií po rozmrazení ID        | 0,86           | <0,001 | 3,2     | 0,076 | 2,29   | 0,082  | 65,19  | <0,001 | 5,25          | <0,001 | 5,8       | <0,001 |
| procento živých spermií po chladovém šoku       | 0,74           | <0,001 | 0,75    | 0,389 | 1,7    | 0,172  | 25,22  | <0,001 | 2,83          | 0,01   | 2,65      | <0,001 |
| procento živých spermií po 2hod tepelného testu | 0,72           | <0,001 | 2,25    | 0,137 | 7,56   | <0,001 | 18,27  | <0,001 | 2,68          | 0,013  | 4,4       | <0,001 |
| procento živých spermií po chladovém šoku 2     | 0,57           | <0,001 | 5,43    | 0,022 | 2,17   | 0,096  | 8,7    | <0,001 | 2,73          | 0,012  | 1,65      | 0,053  |

Tab. č. 9 – Vyhodnocení přežitelnosti spermií pomocí procedury GLM (ANOVA)

| Efekt                  | Úroveň   | procento živých spermií<br>po rozmrazení ID | procento živých spermií<br>po chladovém šoku | procento živých spermií po<br>2hod tepelného testu | procento živých spermií po<br>chladovém šoku 2 |
|------------------------|----------|---|--|--|--|
|                        |          | LSM ± SE                                    | LSM ± SE                                     | LSM ± SE   | LSM ± SE                                       |
| Ředidlo                | Andromed | 47,54 ± 0,824                               | 37,96 ± 1,116                                | 33,01 ± 1,065                                      | 20,53 ± 0,958 <sup>a</sup>                     |
|                        | Bioxcell | 49,50 ± 0,728                               | 36,66 ± 1,008                                | 30,88 ± 0,941                                      | 17,53 ± 0,865 <sup>b</sup>                     |
| Přídavek<br>LDL<br>[%] | 0        | 47,45 ± 1,119                               | 34,41 ± 1,507                                | 26,03 ± 1,446 <sup>A</sup>                         | 17,44 ± 1,292                                  |
|                        | 4        | 48,59 ± 1,070                               | 38,15 ± 1,476                                | 34,18 ± 1,384 <sup>B</sup>                         | 21,47 ± 1,269                                  |
|                        | 6        | 47,21 ± 1,048                               | 38,68 ± 1,448                                | 33,80 ± 1,356 <sup>B</sup>                         | 19,53 ± 1,242                                  |
|                        | 8        | 50,81 ± 1,090                               | 37,89 ± 1,491                                | 33,78 ± 1,409 <sup>B</sup>                         | 17,69 ± 1,277                                  |
| Číslo<br>býka          | 1        | 58,31 ± 1,754 <sup>A</sup>                  | 45,36 ± 2,335 <sup>A,a</sup>                 | 36,01 ± 2,267 <sup>A,a</sup>                       | 18,01 ± 2,003 <sup>a</sup>                     |
|                        | 2        | 68,33 ± 1,427 <sup>B,C</sup>                | 53,24 ± 1,943 <sup>C</sup>                   | 41,51 ± 1,845 <sup>C,c</sup>                       | 19,64 ± 1,706                                  |
|                        | 3        | 52,96 ± 1,356 <sup>D,E,a</sup>              | 41,94 ± 1,989 <sup>D,E,c</sup>               | 36,48 ± 1,752 <sup>E,e</sup>                       | 26,78 ± 1,588 <sup>A,b</sup>                   |
|                        | 4        | 34,99 ± 1,383 <sup>B,D,F,G</sup>            | 24,88 ± 1,934 <sup>B,D,F,G</sup>             | 25,79 ± 1,788 <sup>D,F,G,b,g</sup>                 | 15,71 ± 1,630 <sup>B,C</sup>                   |
|                        | 5        | 42,69 ± 2,073 <sup>B,D,F,I</sup>            | 31,12 ± 2,760 <sup>B,D,d,e</sup>             | 26,07 ± 2,679 <sup>D,I,f</sup>                     | 13,99 ± 2,367 <sup>B,E</sup>                   |
|                        | 6        | 32,07 ± 1,598 <sup>B,D,F,J,K</sup>          | 24,39 ± 2,128 <sup>B,D,F,I</sup>             | 16,90 ± 2,066 <sup>B,D,F,K,h</sup>                 | 11,82 ± 1,934 <sup>B,G</sup>                   |
|                        | 7        | 52,74 ± 1,363 <sup>D,H,J,L,c</sup>          | 42,45 ± 1,874 <sup>D,H,J,f</sup>             | 40,32 ± 1,762 <sup>H,J,L,i</sup>                   | 25,14 ± 1,629 <sup>D,F,H</sup>                 |
|                        | 8        | 46,06 ± 1,363 <sup>B,D,H,L,b,d</sup>        | 35,07 ± 1,842 <sup>D,H,J,b</sup>             | 32,47 ± 1,762 <sup>L,d,j</sup>                     | 21,17 ± 1,662 <sup>H</sup>                     |

Vysvětlivky: A-B, C-D, E-F, G-H, I-J, K-L .... P < 0,01; a-b, c-d, e-f, g-h, i-j .... P < 0,05.



## 10 Seznam použitých symbolů a zkratek

|                            |  |
|----------------------------|--|
| $a_i$                      | Fixní efekt ředidla                                  |
| $(AC)_{ik}$                | Interakce mezi fixním efektem ředidla a býka         |
| $b_j$                      | Fixní efekt koncentrace LDL                          |
| $(BC)_{jk}$                | Interakce mezi fixním efektem koncentrace LDL a býka |
| $c_k$                      | Fixní efekt býka                                     |
| $^{\circ}\text{C}$         | Jednotka teploty                                     |
| cm                         | Jednotka délky                                       |
| $\text{cm}^3, \text{mm}^3$ | Jednotky objemu                                      |
| $e_{ijkl}$                 | Náhodná reziduální chyba                             |
| kPa                        | Jednotka tlaku                                       |
| n                          | Četnost měření                                       |
| max.                       | Maximální hodnota                                    |
| min.                       | Minimální hodnota                                    |
| P                          | Průkaznost   |
| $r, r^2$                   | Korelační koeficient, koeficient opakovatelnosti     |
| s                          | Jednotka času  |
| $s$                        | Směrodatná odchylka                                  |
| <i>s.e.</i>                | Střední chyba aritmetického průměru                  |
| V                          | Variační koeficient                                  |
| $\bar{x}$                  | Aritmetický průměr                                   |
| $y_{ijkl}$                 | Hodnoty závisle proměnné                             |
| $\mu$                      | Obecná hodnota závislé proměnné                      |
| AIC                        | Artificial insemination center (inseminační stanice) |
| ATP                        | Adenosintrifosfát                                    |
| CASA                       | Computer Assisted Sperm Analysis                     |

|                   |   |
|-------------------|---|
| EDTA              | Kyselina etylendiamintetraoctová                          |
| EU                | Evropská unie   |
| HDL               | High-density-lipoprotein (lipoprotein s vysokou hustotou) |
| HOS-test          | Hypoosmotic swelling test                                 |
| ID                | Inseminační dávka   |
| LDL – cholesterol | Low-density-lipoprotein (lipoprotein s nízkou hustotou)   |
| LSM               | Least Square Means (Metoda nejmenších čtverců)            |
| pH                | Vodíkový exponent, vyjadřující povahu roztoků             |
| Rozm.             | Rozmrazení vzorku/ inseminační dávky                      |
| Tep.T.            | Tepelný test  |
| Šok1              | Chladový šok 1  |
| Šok2              | Chladový šok 2  |
| zkr.              | Zkráceně, zkratka   |

## Seznam příloh

Graf. č. 1 – Průměrný počet živých spermií během prováděných testů

Graf č. 2 – Porovnání ředidel AndroMed<sup>®</sup> a Bioxcell<sup>®</sup> během experimentu

Graf č. 3 – Porovnání přísad LDL během experimentu

Graf č. 4 – Porovnání býků během experimentu

Tab. č. 1 – Charakteristika býků

Tab. č. 2 – Základní statistiky souboru

Tab. č. 3 – Statistické vyhodnocení z pohledu ředidel

Tab. č. 4 – Statistické vyhodnocení z pohledu přísad LDL do ředidel

Tab. č. 5 – Statistické vyhodnocení z pohledu býků

Tab. č. 6 – Statistické porovnání pokusů a kontrol

Tab. č. 7 – Korelace mezi proměnnými

Tab. č. 8 – Základní statistiky modelové rovnice, vlivy jednotlivých faktorů

Tab. č. 9 – Vyhodnocení přežitelnosti spermií pomocí procedury GLM (ANOVA)