

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra speciální zootechniky**



**Přídavek specifických látek do ředidla ejakulátu býků  
a změny jeho parametrů**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Adéla Polánská**

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

© 2013 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Přídavek specifických látek do ředidla ejakulátu býků a změny jeho parametrů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4.2013

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Luděkovi Stádníkovi, Ph.D. za pomoc při zpracovávání této práce, za vypůjčení odborné literatury a za užitečné rady. Dále děkuji kolektivu z laboratoře katedry veterinárních disciplín. Velké díky patří i rodičům za podporu během studia.

# **Přídavek specifických látek do ředidla ejakulátu býků a změny jeho parametrů**

---

## **Addition of specific substances into diluter of bulls ejaculate and changes of its parameters**

### **Souhrn**

Tato bakalářská práce je zaměřena na výrobu, technologii a zpracování inseminačních dávek. V úvodu je zmíněno, proč se k metodě umělého oplodnění samic přistupuje. V následující části se věnuje výběru plemeníků až po jejich testaci, hodnocení jejich pohlavní činnosti a ejakulátu. Přes výběr a popis různých ředidel se dostáváme do další části práce, ve které je popsáno, jak se inseminační dávky vyrábějí, ředí a zpracovávají tak, aby byla zachována jejich správná funkčnost. V experimentální části je popsán postup, podle kterého bylo vedeno testování přídavku LDL – cholesterolu do komerčních ředidel o různých koncentracích. Do ředidla Triladylu byl přidán LDL – cholesterol o 10, 9, 8, 7 a 6% koncentraci. V ředidlech Bioxcell a AndroMed byl obsažen 8, 6, 4 a 2% přídavek LDL. Byly sledovány změny pH a osmotického tlaku během skladování při 4°C. Hodnoty pH byly měřeny v intervalech 0, 2, 24, 48 a 72 hodin a hodnoty osmotického tlaku byly zaznamenávány v rozmezí 0, 24, 48 a 72 hodin. Vhodnost ředidel ke konzervaci býčího ejakulátu byla hodnocena podle stability hodnoty pH a osmotického tlaku v průběhu času. U obou ukazatelů byl zaznamenán celkový nárůst těchto hodnot. Poté bylo vyhodnoceno, které ředidlo je lepší ke krátkodobé a dlouhodobé konzervaci. Nejlepších výsledků dosáhlo ředidlo AndroMed s přídavkem 4 a 2% LDL, u kterých byla naměřena nejmenší změna hodnoty pH a také poměrně stabilní osmotický tlak. AndroMed se 4 a 2% LDL tak je nejspolehlivějším ředidlem, které může být použito jak ke krátkodobé, tak i dlouhodobé konzervaci. Oproti tomu ředidlo Triladylu s 8 a 7% LDL bylo vyhodnoceno jako ředidlo dobré ke krátkodobé, maximálně však 2 hodinové, konzervaci býčího semene. Ředidlo Bioxcell se 6 a 4% LDL by mohlo sloužit k dlouhodobé konzervaci, kdy postupem času dochází ke stabilizaci pH.

**Klíčová slova:** býk, ejakulát, ředidlo, inseminační dávka, kvantitativní a kvalitativní parametry ejakulátu

## **Summary**

This bachelor thesis is focused on the manufacturing, technology and processing of artificial insemination doses. In the introduction is mentioned why the artificial insemination of dams is used in the field of reproduction. The following section is devoted to the selection of sires to their testing, evaluation of their sexual activity and ejaculate. Through the selection and description of various diluents the thesis continues to the next section in which is described how the insemination doses are produced, processed and diluted to maintain their proper functionality. In the experimental part is described a procedure by which the test of the LDL – cholesterol addition in commercial diluents of different concentrations was led. The addition of 10, 9, 8, 7 and 6% LDL - cholesterol concentration was made into the Triladyl diluent. Bioxcell and AndroMed contained 8, 6, 4 and 2% addition of LDL. The changes in pH and osmotic pressure during storage at 4°C were observed. The pH values were measured at intervals of 0, 2, 24, 48 and 72 hours, osmotic pressure in the range of 0, 24, 48 and 72 hours then. Diluents suitability for preservation of bull semen was assessed by the stability of the pH and osmotic pressure over time. For both these factors an overall growth in these values was observed. After that the evaluation which diluent is better for short-term and long-term preservation was made. The best results were reached by diluent AndroMed with addition of 4 and 2% of LDL – the smallest changes in the pH value and osmotic pressure were achieved. Therefore, AndroMed containing 4 and 2% of LDL is the most reliable diluent for short-term and long-term preservation. In contrast, diluent Triladyl with 8 and 7% of LDL addition was evaluated as a good diluent for the short term bull semen preservation, but only up to 2 hours. Diluent Bioxcell with 6 and 4% of LDL addition could be used for long-term preservation, because the value of pH over time stabilizes.

**Keywords:** bull, ejaculate, diluent, insemination dose, qualitative and quantitative changes

# 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 Důvody inseminace.....</b>	<b>3</b>
<b>3.2 Testace plemenných býků.....</b>	<b>5</b>
3.2.1 Testace býků masných plemen .....	5
3.2.2 Testace plemenných býků kombinovaných plemen .....	6
3.2.3 Testace plemenných býků mléčných plemen .....	6
3.2.3.1 Otcové býků.....	7
3.2.3.2 Matky býků.....	7
<b>3.3 Anatomie a fyziologie samčího pohlavního ústrojí .....</b>	<b>8</b>
3.3.1 Varlata.....	8
3.3.2 Nadvarlata .....	9
3.3.3 Chámovod a semenná plazma.....	9
3.3.4 Pyj .....	9
3.3.5 Žalud .....	10
3.3.6 Předkožka.....	10
3.3.7 Spermatogeze.....	10
3.3.8 Hormonální řízení spermatogeneze .....	11
3.3.9 Spermie a mezidruhové rozdíly .....	12
<b>3.4 Kvalitativní a kvantitativní faktory ovlivňující vlastnosti ejakulátu .....</b>	<b>12</b>
3.4.1 Vývin pohlavních orgánů.....	13
3.4.2 Stáří.....	13
3.4.3 Výživa.....	13

3.4.4	Roční období.....	13
3.4.5	Management, ošetřovatel býka a člověk odebírající semeno .....	14
3.4.6	Frekvence odběrů a intervaly mezi odebráním ejakulátu .....	14
3.4.7	Genetické faktory.....	14
<b>3.5</b>	<b>Odběr spermatu a jeho uchovávání.....</b>	<b>14</b>
3.5.1	Hodnocení plodnosti býků .....	15
3.5.2	Ukazatele kvality spermatu.....	15
3.5.3	Hodnocení spermatu býků .....	15
3.5.4	Makroskopické posouzení spermatu.....	16
3.5.5	Mikroskopické a makroskopické posouzení spermatu .....	16
3.5.6	Zpracování inseminačních dávek.....	16
<b>3.6</b>	<b>Ředidla spermatu .....</b>	<b>17</b>
3.6.1	Typy ředidel.....	17
3.6.1.1	Žloutková ředidla.....	17
3.6.1.2	Bezžloutková ředidla .....	18
3.6.2	Zástupci žloutkových ředidel:.....	18
3.6.2.1	Low – density – lipoproteins (LDL).....	18
3.6.2.2	Triladyl <sup>®</sup> .....	18
3.6.2.3	TRIS .....	19
3.6.3	Zástupci bezžloutkových ředidel .....	19
3.6.3.1	AndroMed <sup>®</sup> .....	19
3.6.3.2	Bioxcell <sup>®</sup> .....	19
3.6.3.3	Biociphos–Plus <sup>®</sup> .....	20
3.6.4	Vlastnosti ovlivněné ředidly .....	20
<b>3.7</b>	<b>Výroba inseminačních dávek .....</b>	<b>20</b>
3.7.1	Ekvilibrace .....	21
3.7.2	Kryokonzervace .....	22

3.7.3	Uchovávání nakoupených inseminačních dávek .....	23
3.7.4	Rozmrazování inseminačních dávek .....	23
3.7.5	Tání inseminačních dávek .....	24
3.7.6	Kontrola inseminačních dávek.....	24
3.7.7	Budoucí trendy v konzervaci semene .....	24
<b>3.8</b>	<b>Oplozovací schopnost inseminačních dávek .....</b>	<b>25</b>
3.8.1	Ukazatelé kvality inseminačních dávek.....	25
3.8.2	Kvalitativní hodnocení inseminačních dávek .....	25
<b>4.</b>	<b>Materiál a metodika .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakteristika inseminační stanice .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>Charakteristika býků.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>26</b>
4.3.1	Charakteristika ředidel.....	26
4.3.2	Příprava ředidel.....	26
4.3.3	Materiál.....	27
4.3.4	Pomůcky .....	27
4.3.5	Pracovní postup.....	27
4.3.5.1	Měření pH.....	27
4.3.5.2	Měření osmotického tlaku .....	27
4.3.5.3	Koncentrace LDL – cholesterolu v ředidlech.....	28
4.3.5.4	Sledování a měření .....	28
<b>5.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1</b>	<b>Výsledky měření pH.....</b>	<b>29</b>
5.1.1	Výsledky měření pH u Triladylu .....	29
5.1.1.1	Triladyl s 10% LDL – cholesterolu .....	29
5.1.1.2	Triladyl s 9% přídavkem LDL – cholesterolu.....	29



5.1.1.3	Triladyl s 8% LDL – cholesterolu .....	29
5.1.1.4	Triladyl s 7% LDL – cholesterolu .....	29
5.1.1.5	Triladyl s 6% LDL – cholesterolu .....	30
5.1.1.6	K – kontrola – Triladyl .....	30
5.1.2	Výsledky měření pH u Bioxcellu.....	30
5.1.2.1	Bioxcell s 8% LDL – cholesterolu .....	30
5.1.2.2	Bioxcell s 6% LDL – cholesterolu .....	30
5.1.2.3	Bioxcell s 4% LDL – cholesterolu .....	30
5.1.2.4	Bioxcell s 2% LDL – cholesterolu .....	31
5.1.2.5	K – kontrola – Bioxcell .....	31
5.1.3	Výsledky měření pH u AndroMedu.....	31
5.1.3.1	AndroMed s 8% LDL – cholesterolu .....	31
5.1.3.2	AndroMed s 6% LDL – cholesterolu .....	31
5.1.3.3	AndroMed s 4% LDL – cholesterolu .....	31
5.1.3.4	AndroMed s 2% LDL – cholesterolu .....	31
5.1.3.5	K – kontrola – AndroMed .....	32
<b>5.2</b>	<b>Výsledky měření osmotického tlaku.....</b>	<b>32</b>
5.2.1	Výsledky měření osmotického tlaku u Triladylu.....	32
5.2.1.1	Triladyl s 10% LDL – cholesterolu .....	32
5.2.1.2	Triladyl s 9% LDL – cholesterolu .....	32
5.2.1.3	Triladyl s 8% LDL – cholesterolu .....	32
5.2.1.4	Triladyl s 7% LDL – cholesterolu .....	32
5.2.1.5	Triladyl s 6% LDL – cholesterolu .....	33
5.2.1.6	K – kontrola – Triladyl .....	33
5.2.2	Výsledky měření osmotického tlaku u Bioxcellu .....	33
5.2.2.1	Bioxcell s 8% LDL – cholesterolu .....	33
5.2.2.2	Bioxcell s 6% LDL – cholesterolu .....	33

5.2.2.3	Bioxcell s 4% LDL – cholesterolu .....	33
5.2.2.4	Bioxcell s 2% LDL – cholesterolu .....	34
5.2.2.5	K – kontrola – Bioxcell .....	34
5.2.3	Výsledky měření osmotického tlaku u AndroMedu .....	34
5.2.3.1	AndroMed s 8% LDL – cholesterolu .....	34
5.2.3.2	AndroMed 6% LDL – cholesterolu .....	34
5.2.3.3	AndroMed s 4% LDL – cholesterolu .....	34
5.2.3.4	AndroMed s 2% LDL – cholesterolu .....	35
5.2.3.5	K – kontrola – AndroMed .....	35
<b>5.3</b>	<b>Shrnutí celkový změn pH .....</b>	<b>35</b>
5.3.1	Triladyl.....	35
5.3.2	Bioxcell.....	35
5.3.3	AndroMed.....	36
<b>5.4</b>	<b>Shrnutí celkový změn osmotického tlaku .....</b>	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>37</b>
<b>7.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>40</b>
<b>Literatura</b>	<b>.....</b>	<b>41</b>

## 1. Úvod

Umělá inseminace již po více než 50 let zajišťuje chovatelům skotu bohatý výběr plemeníků, kterými mohou zapouštět své plemenice, a zlepšovat tak jejich reprodukční a produkční vlastnosti.

Inseminace je však až posledním krokem v životním cyklu dávky spermatu od vybraného plemeníka, kterému předchází mnoho dalších, neméně důležitých úkonů.

První a také nejvýznamnější částí je výběr plemeníka, který je testován v inseminačních stanicích, kde potvrzuje svou způsobilost pro zařazení do plemenitby ať už z genetického nebo užitkového směru. Pokud býček v tomto ohledu uspěje, začne se od něj odebírat ejakulát, který se dále testuje na různé parametry – například přítomnost deformovaných, živých a mrtvých spermií. Pokud jsou i tyto parametry splněny dle normy, ejakulát postupuje do dalšího zpracování inseminačních dávek.

Druhým krokem je výpočet objemu ředidla, jenž přijde do ejakulátu, aby se v dávce stále nacházelo minimální množství spermií, které dokáží oplodnit vajíčko. Na trhu je mnoho dostupných komerčně vyráběných ředidel. Existují však i taková, která se mohou snadno vyrobit i v laboratoři.

Po naředění se směs ředidla a ejakulátu plní do označených pejet, které po ekvilibraci, kryokonzervaci a hlubokém zmrazení v tekutém dusíku putují přímo k inseminačním technikům, kteří obsah inseminační dávky zapraví do rozmnožovacího ústrojí plemenice.

## **2. Cíl práce**

Cílem bakalářské práce je zpracovat podrobný přehled literatury se zaměřením na možnosti ředění ejakulátů býků, typy ředidel, základní účinné látky ovlivňující přežitelnost spermií a následnou oplozovací schopnost inseminačních dávek. Součástí práce je hodnocení vlivu přídatku LDL cholesterolu do komerčních ředidel na základní parametry ředidla (osmotický tlak, skladování, manipulace atd.)

### 3. Literární přehled

#### 3.1 Důvody inseminace

Reprodukce je jedním z nejdůležitějších faktorů, určující rentabilitu živočišné výroby. Krávy a jalovice jsou díky své poměrně dlouhé době březosti schopné vyprodukovat jedno tele za rok. Tím se chov skotu stává méně výnosný než chov jiných hospodářských zvířat, jako jsou například prasata a ovce. Kvůli délce celého reprodukčního cyklu se u skotu dosahuje i pomalejšího genetického pokroku. Díky tomu je tele bráno jako hlavní produkt a ukazatel výnosnosti stáda (BALL a PETERS, 2004).

V chovech skotu s masnou užitkovostí se využívá především přirozené plemenitby, kdy se ve stádě společně s plemenicemi chovají i plemenní býci. Přirozená plemenitba je na rozdíl od inseminace poměrně nenáročná, proto je inseminace až druhou nejvyužívanější reprodukční metodou, přičemž kombinace obou předchozích obsadila v tomto ohledu třetí místo (DUCHÁČEK a BERAN, 2010). Při přirozené plemenitbě, na rozdíl od mléčných plemen, se telení krav bez tržní produkce mléka uskutečňuje jen v určitých ročních obdobích – na jaře a na podzim (BALL a PETERS, 2004).

Při selekci mléčných plemen skotu se šlechtitelé a chovatelé vždy zaměřují hlavně na mléčnou užitkovost, čímž se sice dosáhne vysokých hodnot produkce, ale zároveň znatelně klesne schopnost reprodukce plemenic. Bez dobré produkce a reprodukce trpí ekonomika a chov se stává nevýnosným. Proto se řada vědeckých prací a studií zabývá genovou vazbou mezi těmito ukazateli užitkovosti (ŠTÍPKOVÁ a kol., 2012). JELÍNKOVÁ (2010) ve svém článku uvádí možnost, že vysokoprodukční dojnice se svým zrychleným metabolismem v játrech štěpí kromě živin potřebných pro udržení laktace na vysoké úrovni také hormony estrogen a progesteron. Tyto hormony jsou potřebné k projevu říje a k samotnému zabřeznutí, ale jejich štěpením vzniká v játrech deficit a plemenice tím pádem může mít sníženou reprodukční schopnost. Podle BALLA a PETERSE (2004) je neplodnost krav způsobena vrozenými problémy rozmnožovacího ústrojí, různými prodělanými infekční onemocněními, jimiž jsou například endometritida, pyometra, *Campylobacter*, *Trichomonas*, brucelóza, IBR a spousta dalších. Snížená plodnost je způsobena také špatnou výživou a stresem.

Reprodukci plemenic ovlivňuje několik faktorů, mezi které lze zařadit procento inseminovaných krav a procento březosti. Především druhý faktor je primární měřítkem reprodukce. Reprodukce je definována jako rychlost zabřezávání plemenic po inseminaci, nebo jako procento krav, zabřezlých po 21 dnech.

Plodnost u laktujících krav je ovlivněna efektivitou inseminace, načasováním inseminace a plodností býka a plemenice (JELÍNKOVÁ, 2010).

BALL a PETERS (2004) uvádějí, že umělá inseminace, na rozdíl od přirozené plemenitby, může nabídnout v chovech mléčných plemen skotu široké spektrum výhod.

Hlavními přednostmi jsou:

- Genetický zisk – Při přirozené plemenitbě může býk svoje geny, i když jsou chybné, přenášet na svoje potomstvo. Inseminace tomuto problému předchází tím, že se ejakulát býka zařazeného v inseminaci testuje a poté nastává i kontrola a testace jeho dcer. Dnes se provádějí testy na BLAD (Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency), který vede ke smrti homozygotně recesivních telat. Nevýhodou však je, že při neodhalení genetické vady může býk ohrozit mnohem větší populaci skotu, než býk zařazený do přirozené plemenitby.  
I přes všechna tato rizika genetické výhody převažují nad nevýhodami.
- Kontrola nemocí – Na inseminačních stanicích se kontroluje každý přijatý ejakulát na kampylobakteriózu, trichomoniázu a brucelózu, i když ta není přímo řazena mezi pohlavní nemoci, ale přenáší se dotykem ze zvířete na zvíře. Mnoho takovýchto nemocí se již podařilo dostat pod kontrolu. Rizika přenosu nemocí inseminačními dávkami jsou stále možná, ale je to jen jedno z mála negativ.
- Flexibilita – Chovatel si sám vybírá, jakého býka nechá připustit na jakou krávu. Plemenici s výbornou doživostí, ale s nízkým procentem mléčného tuku, tak může nechat zapustit býkem s výbornými výsledky týkajícími se procenta tuku, prověřeným u jeho dcer.
- Náklady – Pokud je býk ve stádě, náklady na jeho krmení, ošetřování a ustájení jsou vysoké. Postupem času, se také může ukázat, že býk má různé nemoci, nebo je neplodný, což se u prověřených býků na inseminační stanici nemůže stát. Díky inseminačním dávkám, se tak zbylé náklady, které by se investovaly do býka, mohou vložit do celého stáda a do nových technologií.
- Management – U každé plemenice se vede záznam, kdy a kým byla zapuštěna a zda byla inseminace úspěšná. Je to mnohem jednodušší než připařování z ruky.
- Bezpečnost – Býci mléčných plemen jsou všeobecně více temperamentní a agresivní, než býci masných plemen. Býk je tedy ve stádě hrozbou pro ošetřovatele, proto se mnozí chovatelé uchylují k nákupu ID kvůli bezpečnosti.

Jediný problém může nastat při špatné detekci říje.

### **3.2 Testace plemenných býků**

Testace plemenných býků probíhá v odchovných (OPB). Testuje se zde vlastní užitkovost býka již od raného věku – 120 dní (LOUDA a kol., 2007). Šlechtitelská práce na těchto stanicích zajišťuje výběr nejlepších jedinců. Býk je po čase vybrán do plemenitby, nebo je z odchovny plemenných býků odročen či vyřazen (MALÁT, 2012).

V odchovných se potenciální plemeník adaptuje na podmínky během 30 dnů, kde podstoupí nezbytná veterinární vyšetření před testováním vlastní užitkovosti.

Býci se rozdělují do skupin maximálně po 10 kusech, a to podle věku, podle toho, zdali mají, nebo nemají rohy, dále také podle plemenné příslušnosti a hmotnosti (ČSCHMS, 2006).

Pro bezpečnost práce dostávají býci nosní kroužek, aby jimi šlo lépe manipulovat. Z bezpečnostního hlediska je nepřijatelná přítomnost jalovic nebo krav ve stejné stáji s býky. Zkoušky vlastní užitkovosti trvají 120 dní u masných plemen, 365 u plemen kombinovaných, pokud není stanoveno jinak. Po skončení testu vlastní užitkovosti se býk připravuje na základní výběr, trvající minimálně 20 dní (LOUDA a kol., 2007).

#### **3.2.1 Testace býků masných plemen**

U plemenných býčků masných plemen se testuje vlastní užitkovost, spotřeba krmiv, prověřuje se také kvalita spermatu a také dobrý či vyrovnaný růst v období odstavu (MALÁT, 2012).

Výživa býků masných plemen je dána metodikou závaznou pro všechna testovací zařízení. Krmí se zde objemnými krmivy a jadrnou směsí podle normované potřeby živin. Výše denního přírůstku se plemeno od plemene liší. Například u plemen Hereford a Aberdeen Angus je normovaný denní přírůstek 1300g. U plemen Charolais, Limousin. Blond d' Aquitaine je to však již 1500g (LOUDA a kol., 2007).

Tělesné rozměry – výška a váha býčků – se zjišťují po naskladnění do OPB. Výška v kříži se zjišťuje při nástupu do OPB, poté až za 365 dní. Býk se váží na začátku přípravného období, během testu vlastní užitkovosti, jedenkrát za měsíc a dále při ukončení testu vlastní užitkovosti (LOUDA a kol., 2007). ČSCHMS (2006) doplňuje, že váha se musí zjišťovat s přesností na 1kg.

Zjišťování tělesných parametrů a hodnocení exteriéru provádí pracovník ČSCHMS – Českého svazu chovatelů masného skotu. Zaznamenávají se vady – například chůze a končetin. Dále se hodnotí schopnost býka nabírat na váze od narození do ukončení

testu, zdali odpovídá standardům plemene, relativní plemenná hodnota (RPH), hmotnost ve 365 dnech, výška v kříži a obvod šourku ve 365 dnech (MALÁT, 2012). Všechny tyto údaje slouží k vyhodnocení vlastní užitkovosti a pomocí matematicko-statistických údajů se určuje selekce a další šlechtitelská práce (LOUDA a kol., 2007).

### **3.2.2 Testace plemenných býků kombinovaných plemen**

Do odchovny se býčci dostávají ve věku 120 dní a vlastní kontrola užitkovosti začíná již následující den a končí 365. dnem věku,  $\pm 3$  dny. V OPB se býci ustájí vazně nebo ve skupinách maximálně po 15 kusech. Musí se ovšem rozdělit, pokud možno, podle stejného věku, aby se předešlo konfliktům ve skupinách. Býci se krmí jadrným krmivem s objemnými krmivými (LOUDA a kol., 2007).

Testovací přípařování se provádí za účelem získání informací o plemenných býcích dle výkonnosti jejich potomstva v souboru vlastností a znaků, splněním chovných cílů a standardu plemene. Nyní se testovací přípařování býků zaměřuje především na znaky mléčné užitkovosti, jež bývají vyjádřeny celkovou produkcí, a to včetně obsahu mléčných bílkovin a tuku. Dále pak znaky masné užitkovosti, která vychází z testu vlastní užitkovosti a užitkovosti potomstva, dojitelností dcer, zdraví vemene dcer závisující na počtu somatických buněk v mléce, snadností porodů a dlouhověkostí, na vlastní plodnost, plodnost dcer a na zdraví a jeho dědičnost hodnoceného Státní veterinární správou (KRÁL, 2008).

### **3.2.3 Testace plemenných býků mléčných plemen**

Plemenní býčci mléčných plemen podstupují základní výběr do plemenitby ve 420 dnech věku, jenž je prováděn výběrovou komisí. Dle údajů z roku 1995 bylo na OPB vybráno z 379 býků 169, z tohoto počtu se do inseminace dostalo 40,9% , což je 155 kusů dobytka. Přírůstky v testovacím období 111-420 dnů dosáhly úrovně 1 261g. U býků, kteří byli vybráni do plemenitby, činil přírůstek 1 318g, což je o 57g více. Dále se selektovalo na malou výšku v kohoutku (URBAN a kol., 1997). Pro rok 2001 již byly podmínky jiné. Do OPB již nastoupilo 182 býčků českého strakatého plemene společně s černostrakatým plemenem. Zkouška vlastní užitkovosti začínala 111. a byla ukončena 365. dnem. Tím, že se v roce 2000 zkrátilo testování býků o 55 dní oproti roku 1994, dosahoval denní přírůstek živé hmotnosti býků 1366g. V roce 1999 byl denní přírůstek býků 1289g při stejném metodickém postupu. Bohužel v poslední době převládá klesající trend v nákupu býčků do odchoven. Od roku 2000 nastupuje do OPB o několik desítek kusů dobytka méně, než se tomu dělo v předchozích



letech, kdy byly počty nakoupených zvířat poměrně stabilní (PYTLOUN a HŘEBEN, 2001).

Do inseminace se zařazují plemenní býci, kteří jsou zapsáni v oddílu A Plemenné knihy černostrakatého skotu. Býci se před testovacím přípařováním prověřují kontrolou dědičnosti podle jejich potomstva (ukazatelé mléčné užitkovosti a utváření exteriéru) a mladí býci se prověřují v testaci. U plemenných býků se dále odhaduje plemenná hodnota pro dojitelnost, vlastní plodnost, plodnost dcer a dlouhověkost (MOTYČKA a KOUDELOVÁ, 2008).

Testovací přípařování podléhá závazné metodice testace mladých plemeníků, která je schválena výborem svazu. Plemeníci musí splňovat předem stanovené parametry, a to věk do 24 měsíců a řádnou rodokmenovou hodnotu (URBAN a kol., 1997).

Toto přípařování slouží k odhadu plemenné hodnoty býka z údajů zjištěných z vlastností jeho dcer. Pro tento druh testace se doporučuje minimálně 800 inseminací, aby se mohlo z dostatečného počtu hodnocených dcer býka spolehlivě odhadnout jeho PH.

U plemeníků se zaznamenává doba, po kterou se jedinec testuje, počet provedených inseminací, průměrná užitkovost ve stáji a zapojení stáje v kontrole užitkovosti - KU (MOTYČKA a KOUDELOVÁ, 2008).

Po vyhodnocení výsledků se plemeníci zařazují do oficiální publikace kontroly dědičnosti (KD), která je prováděna dvakrát ročně. Publikovány jsou výsledky KD plemeníků, u kterých se dodržela metodika testace. Selektce plemeníků mléčných plemen se řídí doporučenými rozsahy (URBAN a kol., 1997).

#### 3.2.3.1 Otcové býků

Do této pozice se vybírají ti nejlepší plemeníci z celé populace býků mléčných plemen a ti, kteří splňují požadavky určitých plemenářských organizací. Jako základní ukazatel slouží plemenná hodnota používaného selekčního indexu, jež slouží k hodnocení mezinárodně srovnávaných býků. V ČR jsou tato data publikována Interbullem. Výběr plemeníka je dán smlouvou mezi chovatelem a zájemcem o nákup býčka.

Jen 1% nejlepších z hodnocené populace je vhodné k produkci mladých býčků (MOTYČKA a KOUDELOVÁ, 2008).

#### 3.2.3.2 Matky býků

Matkami býků se stávají čistokrevné plemenice, které jsou zapsány v hlavním oddíle plemenné knihy (MOTYČKA a KOUDELOVÁ, 2008).

Tato kategorie podléhá vysoké intenzitě selekce, jež má za úkol vybrat jen ty geneticky nejlepší jedince v porovnání s úrovní populace.

Od roku 1992 se výběr matek býků řídí požadavky komise pro šlechtění Svazu chovatelů černostrakatého skotu. Dříve se plemenice vybíraly dle svých užitkových vlastností, ale od roku 1993 se používá objektivnější metoda hodnocení plemenic. Do té patří vypočítaný selekční index zahrnující vlastní výkonnost plemenice, utváření exteriéru a rodokmenová hodnota (URBAN a kol., 2007).

Další změnou byl rok 2008 – od tohoto roku se při výběru matek používaly selekční indexy krávy (SIH-K), jež je doplněn o posouzení původu, zevnějšku, plodnosti, dojitelnosti a zdraví. Konkrétní výběr plemenice je náležitostí chovatele nebo plemenářské společnosti, kteří dohlížejí na nežádoucí geny nebo dědičné vady (MOTYČKA a KOUDELOVÁ, 2008).

### **3.3 Anatomie a fyziologie samčího pohlavního ústrojí**

Samčí pohlavní orgány se skládají z vnější a vnitřní části. Produkují samčí pohlavní buňky – spermie, přičemž jejich produkce spermií nastává při dosažení pohlavní dospělosti.

Pohlavní orgány se skládají ze šourku, párových varlat, nadvarlat, chámovodů, přídatných pohlavních žláz, vlastního pářícího orgánu pyje a předkožky. Nacházejí se ve spodině stydké (LOUDA a kol., 2007).

#### **3.3.1 Varlata**

Varlata jsou žláza vejčitého tvaru s vnějším a vnitřním vyměšováním, skládající se z lalůčků. Jsou řízena neurohumorálně, v kůře mozkové, míše bederní, křížové a v hypofýze – podvěsku mozkovém (POLÁK, 1956).

Mechanismus – stahování svalů v šourku při chladnu a naopak povolování při vyšší teplotě – udržuje teplotu šourku o 3 – 5°C nižší než je tělesná teplota a zajišťuje správnou tvorbu spermií ve varlatech. Uvnitř jsou stočené semenotvorné kanálky, které jsou rozděleny parenchymem. Meziprostory vyplňují Leydigovy buňky, které produkují samčí pohlavní hormon testosteron, a Sertolliho buňky produkující spermie procesem obecně známým jako spermiogeneze. Varlata sestupují z dutiny břišní již před narozením. Tento proces však mohou provázet vady, mezi něž lze zařadit například nesestoupení varlete – kryptorchismus. Zvíře s touto vadou nesmí být zařazeno do plemenitby (LOUDA a kol., 2007).

### 3.3.2 Nadvarlata

Na dorsální části varlat se nacházejí nadvarlata, která jsou s varlaty spojena semenotvornými kanálky. Nadvarlata se skládají z hlavy, těla a ocasu nadvarlete (REECE, 1998).

Hlava nadvarlete je složena z odvodných kanálků varlete, které zde tvoří husté kličky a lalůčky nadvarlete. Jsou spojena vazivem a vlákny z hladké svaloviny.

Tělo a ocas nadvarlete vznikly vazivovým spoutáním z vývodných vazivových kanálků, které se sbíhají v jeden klikatý kanálek nadvarlete (POLÁK, 1956).

Do nadvarlete se dostávají nedozrálé spermie ze semenotvorných kanálků a dokončují zde i svůj vývoj – dozrávají a získávají schopnost pohybu. V hlavě nadvarlete probíhá vstřebávání nadbytečné tekutiny doprovázející spermie ze semenotvorných kanálků cestou do nadvarlat (REECE, 1998).

### 3.3.3 Chámovod a semenná plazma

Chámovod se skládá z třívrstvé trubice. Po celé její délce je vystlána zřasenou sliznicí, podélnou a kruhovou svalovinou a serózou. Tato trubice je pokračováním ocasu nadvarlete vedoucí mezi dnem šourku a varletem (POLÁK, 1956).

Chámovod začíná u ocasu nadvarlete, odkud vede přes dutinu břišní, dutinu pánevní a dorsálně nad močovým měchýřem. Je obalen listem poševního obalu a společně s nervy a cévami tvoří semenný provazec. V jeho rozšíření v úrovni močového měchýře – ampulích chámovodu ústících do močové trubice – se spermie hromadí při pohlavním vzrušení.

Přidatné pohlavní žlázy, které tvoří semenné vázky, prostata, Cowperova žláza, zajišťují spermii výživu pomocí fruktózy a též úpravu pH či osmotického tlaku v močové trubici (LOUDA a kol., 2007).

Semenná plazma produkovaná přidatnými pohlavními žlázami má za úkol vytvářet vně samičího pohlavního ústrojí vhodný substrát pro přežití spermii, jež jsou mnohem více schopné oplození právě v tomto fyziologickém roztoku fruktózy a vitamínu C, než bez ní (REECE, 1998).

### 3.3.4 Pyj

Pyj (penis) je tvořen močovou trubicí, jíž prochází moč, ale i semeno, dále svalovinou a topořivými tělesy. Pyj býka má tvar esovitého zakřivení a je zavěšen dvěma vazy na pánevní spodině. Při naplnění topořivých těles krví dochází ke zvětšení objemu, narovnání

a zároveň k vysunutí pyje. Délka penisu se pohybuje v rozmezí 60 – 100 cm (LOUDA a kol., 2007).

Topořivá tělesa obaluje hladkosvalová vazivová blána. Do tělesa vnikají elastická vlákna, která v něm tvoří trámce. Tyto trámce se dále dělí, spojují a společně vytváří houbovitou síť, v níž jsou krypty topořivého tělesa. Do těch vedou tepny, z nichž se rozvětvují malé žíly. Tyto žíly jsou následně zodpovědné za zásobování krve do hluboké žíly pyje (POLÁK, 1956).

### **3.3.5 Žalud**

Na konci pyje se nachází žalud. Je zakončený citlivými nervovými senzory, reaguje na teplotu, tlak pochvy nebo umělé vagíny při výronu semene (LOUDA a kol., 2007).

### **3.3.6 Předkožka**

Žalud je v klidovém stavu chráněn předkožkou, která se nachází na břišní dutině. Předkožka, neboli také kožní řasa, je obrostlá chlupy – chvostíkem. Uvnitř je vystlaná epitelem produkujícím zapáchající tekutinu – smegma (LOUDA a kol., 2007).

Skládá se ze dvou předkožkových listů – vnitřního a vnějšího. Vnitřní předkožkový list je příčně zřasený s měnícím se odstínem šedé v určitých částech předkožkového otvoru (POLÁK, 1956).

### **3.3.7 Spermatogeze**

Tento proces zahrnuje dva typy dělení, a to mitózu, kdy má nová buňka diploidní sadu chromozomů (2n) a meiózu, při níž dochází k redukci chromozomů na haploidní sadu chromozomů (n). Tímto dělením se dosahuje toho, že každá zralá samčí pohlavní buňka má jednu sadu chromozomů (REECE, 1998). Spermatogeneze u býka začíná již v 7 – 9 měsících věku. Spermatogenezi dělíme na spermatocytogenezi, kdy se počet spermatogonií nemění a spermiogenezi, při níž se spermatidy přeměňují na spermie, které jsou již schopny oplodnit samičí pohlavní buňku – vajíčko (MARVAN, 1992).

Část vývoje pohlavních buněk se dělí do tří fází – fáze množení, růstu a zrání (MARVAN, 1992).

- Fáze množení – Při mitóze se ze spermatogonií vyvine totožná buňka, která nepřechází přes Sertolliho buněčnou bariéru (REECE, 1998). Toto dělení probíhá v bazální membráně semenotvorného kanálku (MARVAN, 1992). Druhá, jež přes ni přestupuje – spermatogonie typu A – se začne mitoticky dělit. Toto může trvat

i několik generací buněk a vytvoří se velké množství spermatogonií typu B (REECE, 1998).

- Fáze růst – spermatogonie typu B rostou a mění jádro, čímž vznikají primární spermatocyty. V tuto chvíli jsou tyto útvary největšími buňkami v semenotvorných kanálcích. Primární spermiocyty (spermiocyty I. řádu) jsou uloženy stejně, jako spermatogonie typu B. Jsou si podobné i vzhledově, proto je možné je navzájem zaměnit. Avšak na rozdíl od B-spermatogonií, primární spermiocyty postupují do vyšší epiteliární výstelky, kde dochází ke změně velikosti dle průběhu fází meiotického dělení (VĚŽNÍK a kol., 2004).
- Fáze zrání – je charakterizována právě meiózou a je rozdělena na první zrací dělení, které dává vzniku sekundárním spermatocytům a druhé zrací dělení, při němž vznikají spermatidy a haploidním počtem chromozomů (MARVAN, 1992).

V první počáteční fázi zracího dělení si chromozom z chromozomového páru vytvoří dvě navzájem spojené chromatidy, které nesou shodné geny. Během dalšího vývoje při prvním zracím dělení dochází k rozdělení primárního spermatocytu na dva sekundární spermatocyty obsahující jeden chromozóm. Během druhého mitotického zracího dělení ze sekundárního spermatocytu vznikají spermatidy a dochází k uvolnění dvou spojených chromatid a dále pak k vytvoření shodných genů, které přechází do jedné z nově vzniklých spermatid, díky čemuž má spermatida jen polovinu chromosomů než původní spermatogonie (REECE, 1998).

### 3.3.8 Hormonální řízení spermatogeneze

Testosteron v Leydigových buňkách je ovlivňován luteinizačním hormonem (LH). Jedná se o hypofyzární gonadotropin, který je stimulován sníženou nebo nízkou hladinou testosteronu. Zvýšení sekrece LH vede ke zvýšené produkci testosteronu, který negativní zpětnou vazbou sníží syntézu LH. Při destabilizaci hormonů se opět tato akce opakuje, dokud nedojde k opětovné rovnováze.

Testosteron, ovlivňující spermatogenezi, difunduje z intersticiální tkáně do semenotvorných kanálků je také důležitý k podpoře meiotického dělení.

Dalším hormonem podílejícím se na spermatogenezi je folikulostimulační hormon (FSH), jenž je produkován předním lalokem hypofýzy. FSH stimuluje protein, který v Sertolliho buňkách váže androgeny. Protein se dostává do lumen semenotvorných kanálků, kde vycytává androgeny, také podporuje sekreci estrogenu.

Tento hormon však není na rozdíl od LH po zahájení spermatogeneze v pubertě již nutný (REECE, 1998).

### 3.3.9 Spermie a mezidruhové rozdíly

Ne všichni savci mají spermie shodné. Rozdíly mezi těmito buňkami umožňující přenos genetické informace, jsou značné, ať už v rámci druhu, nebo mezi jednotlivými jedinci. Nicméně u každého samce se tvar hlavičky spermie více nemění. Je tomu tak nejspíš proto, že informace o tvaru je zabudována v jeho genech (VĚŽNÍK a kol., 2004).

Hlavička je složena z jádra nesoucího polovinu DNA, které je na pólu kryto čepičkovitým obalem nazývaným akrozom. U býka akrozom překrývá přední apikální polovinu jádra a ukončuje ji ekvatoriální segment. Vně akrozomu jsou v akrozomové hmotě uloženy enzymy, jež napomáhají pronikání spermií do vajíčka během oplození. Část hlavičky spermie na sobě nese prohloubeninu – implantační jamku. Do té se ukotvuje hlavice bičíku, která spojuje hlavičku a bičík v jednu buňku. Celou hlavičku a bičík, který slouží k pohybu spermie, obklopuje cytoplazmatická membrána. V místech zasunutí bičíku do implantační jamky je utvořen proximální a distální centriol zesílením bazální ploténky. Po stranách se nacházejí segmentové provazce – tato část se nazývá krček. Na konci krčku, při přechodu na hlavní část bičíku, je umístěn prstenec. Celý bičík je tvořen osovým vláknem, které prochází od spojovací a hlavní části do koncové části bičíku (MARVAN, 1992).

Tabulka č. 1 – Rozměry spermií různých druhů samců

ROZMĚRY SPERMÍÍ						
Hlavička spermie	kanec	býk	hřebec	králík	pes	muž
Délka (µm)	8,73	9,11	6,27	8,46	6,49-7,06*	4,0-5,0
Šířka (µm)	4,63	5,05	3,21	4,7	3,77-4,46*	2,5-3,5
Bičík spermie	kanec	býk	hřebec	králík	pes	muž
Spojovací část (µm)	10	14,8	8,6	8	11	5,0-6,5
Hlavní část (µm)	30	45-50	43,7	38	50	38,5-40
<b>Délka celé spermie</b>	48,15	68,9-73,9	57,55-59,70	54,2	67,5-68,1*	47,5-51,5

\* velikostní rozdíly dle plemen

(Věžník a kol., 2004)

### 3.4 Kvalitativní a kvantitativní faktory ovlivňující vlastnosti ejakulátu

Mezi tyto faktory zařazujeme činitele ovlivňující vlastnosti ejakulátu, a to například podle vývinu pohlavních orgánů, cizopasníků, bakterií a virů, stářím a výživou (POLÁK, 1956).

Dalšími faktory, které ovlivňují vlastnosti ejakulátu, jsou intervaly mezi odběry, počet odběrů

během dne, teplota během dne, roční období, ve kterém se ejakulát odebírá, genetické a individuální založení býka. Dále například management stáda, ošetřovatel, pracovník odebírající semeno, fáze spermatogeneze mají velký vliv na produkci a vlastnosti ejakulátu (FUERST-WALTL a kol., 2006)

#### **3.4.1 Vývin pohlavních orgánů**

Pokud jsou některé části rozmnožovacího ústrojí nedovyvinuté, dochází ke snižování tvorby ejakulátu a ke snížené spermiogenezi.

Mezi tyto vady můžeme řadit především infantilismus, což je hormonální, vývojová a endokrinologická porucha. Vzniká také ze špatné výživy, nízkého pohybu, ale i z onemocnění. Infantilismus se projevuje neplodností nebo sníženou spermiogenezí, nízkou koncentrací spermií v ejakulátu a jejich nízkou oplozovací schopností.

Dále to této kategorie řadíme kryptorchismus, který nastává nespustěním jednoho varlete do šourku během vývoje. Ejakulát je pak menšího objemu s nízkou oplozovací schopností. Z důvodu nespolehlivosti při odběru spermatu se toto zvíře vyřazuje z odebírání dávek sloužících k inseminačním účelům (POLÁK, 1956).

#### **3.4.2 Stáří**

U starých jedinců probíhá atrofie pohlavního aparátu. Tím se snižuje počet spermií, objem ejakulátu a dochází též ke zvýšení počtu patologických spermií. Neposledně býci nejsou schopni skoku, proto se vyřazují (POLÁK, 1956).

#### **3.4.3 Výživa**

Nesprávná nebo špatná výživa může ovlivňovat spermiogenezi, aniž by zvíře působilo nemocným dojmem. Proto je třeba se vyvarovat rychlých změn krmení, jednostranné nebo nedostatečné výživě. I při nedostatečném přísunu vitamínů spermiogeneze neprobíhá tak, jak by měla, proto dbáme na to, aby byly v krmivu nebo krmné směsi zastoupeny vitamíny A, C a E. Nesprávná výživa se projeví na kvalitě spermatu nízkým počtem spermií, jejich malou pohyblivostí a zvýšenou koncentrací patologických spermií (POLÁK, 1956).

#### **3.4.4 Roční období**

Bylo provedeno mnoho pokusů na vliv ročního období, ale nebylo prokázáno, jestli je lepší kvalita spermatu během jara, léta podzimu a zimy, protože nezáleží jen na teplotě vzduchu, ale i na obsahu vlhkosti a na délce slunečního svitu. Jako optimální teplota vzduchu

je obvykle uváděna v rozmezí 15–20°C (FUERST-WALTL a kol., 2006; MATHEVON a kol., 1998).

#### **3.4.5 Management, ošetřovatel býka a člověk odebírající semeno**

Všechny tyto osoby mohou ovlivnit produkci svou synchronizací práce tím, že připraví býka na odběr, aniž by nějak snížili nebo jinak negativně ovlivnili jeho sexuální libido. Jestliže je tým sehraný, odebere se většinou více mililitrů ejakulátu s vyšší koncentrací spermií (FUERST-WALTL a kol., 2006).

#### **3.4.6 Frekvence odběrů a intervaly mezi odebíráním ejakulátu**

První odběr je s ohledem na objem, ale i na koncentraci spermií nejvýznamnější. Celkově je dosahováno lepších výsledků s intervalem mezi odběry v rozmezí 5–9 dnů. Pokud dojde ke zkrácení intervalů odběru na méně než 4 dny, objem ejakulátu a koncentrace spermií se sníží (MATHEVON a kol., 1998).

#### **3.4.7 Genetické faktory**

Heritabilita (dědivost) koncentrace spermií v ejakulátu se liší podle stáří býka. U dospělých býků dosahuje tato vlastnost hodnoty jen 0,08, kdežto u mladých býků je tato 0,32. Dědivost celkového objemu ejakulátu je pak již diametrálně odlišná než koncentrace spermií. U dospělých býků nabývá hodnoty celkového objemu 0,49, a tudíž je vysoce dědivá. U mladých býčků je velmi nízká (MATHEVON a kol., 1998).

### **3.5 Odběr spermatu a jeho uchovávání**

Odběr spermatu se provádí do umělé vagíny pomocí skoku na umělou atrapu, nebo na živého býka, jenž má klidný temperament, je fixován v připouštědle, a nahrazuje tak říjící se plemenici. Býk musí mít vydesinfikovanou zád' při každém odběru a i před odběrem následujícím. Technik odběru mezitím připraví umělou pochvu, která je vybavena jednorázovým sběračem. Tato umělá vagína je dlouhá 30 cm, její mezistěna se plní vodou vyhřátou na 38 – 40°C a je vymazaná sterilní vazelínou.

K odběru nastupují býci s řádně umytou a osušenou předkožkou. Ošetřovatel musí býka vydráždit. Po zhodnocení stupně vydráždění dá technik znamení ke skoku a levou rukou navlečenou v rukavici uchopí předkožku býka a býčí pyj usměrní do umělé pochvy, kterou drží v pravé ruce a do které býk i ejakuluje.



Odběr se provádí minimálně 3 hodiny po krmení, optimálně 8 – 14 krát měsíčně. Záleží ovšem na věku – sperma mladších býků, například dvouletých, se odebírá jednou týdně (LOUDA a kol., 2007).

Pro uchovávání odebraného semene je v dnešní době vyvinuto široké spektrum metod, díky kterým je zachována oplozovací schopnost inseminační dávky. Mezi hlavní směry skladování býčího spermatu patří metoda uchovávání v tekutém (chlazeném) a tuhém (hluboce zamrazeném) stavu. Pro oba tyto hlavní směry jsou v praxi využívána různá ředidla uzpůsobená dané metodě (VISHWANATH a SHANNON, 2000).

### **3.5.1 Hodnocení plodnosti býků**

Plodnost je definována procentem inseminovaných samic, které plod nedonosily, u nichž byla po určitém čase diagnostikována březost, u nichž není nutná opakovaná inseminace po stanovené době od první inseminace a které porodily (MOCÉ a GRAHAM, 2008).

### **3.5.2 Ukazatele kvality spermatu**

Kvalitu spermatu stanovují laboratorní metody, mající pevnou platnost pro hodnocení ejakulátů plemenů hospodářských zvířat.

Býci, kteří podstupují odebírání spermatu pravidelně, mají větší objem a hustotu, než ti, kterým se sperma odebírá v nepravidelných intervalech. Záleží ovšem také na věku, jestli je býk na pastvě nebo inseminační stanici a na plemenné příslušnosti (LOUDA a kol., 2007).

### **3.5.3 Hodnocení spermatu býků**

Hodnocení a zpracování spermatu se provádí v příslušné laboratoři za velmi přísných podmínek, pokud možno co nejrychleji po odběru.

Vzhledem k obtížnosti stanovení oplozovací schopnosti spermií je nutné podrobit vzorek dalším dílčím zkouškám, které provádí vyškolený specialista. Ten posoudí, zdali je sperma vhodné k dalšímu využití a k inseminaci. Jsou zavedeny i stupně hodnocení spermatu (LOUDA a kol., 2007).

Laboratorní technik hodnotí zabarvení. To by mělo být standardně bílé až žlutavé, což může způsobovat zvýšené množství riboflavinu v ejakulátu. V žádném případě nesmí sperma zapáchat močí, obsahovat stopy krve a musí být prosté infekčních nemocí (MOCÉ a GRAHAM, 2008).

### **3.5.4 Makroskopické posouzení spermatu**

Dle POLÁKA (1956) je vhodné sperma o objemu 60 cm<sup>3</sup> s lehkou zrnitostí, mírným pohybem celého objemu ejakulátu, slabě žluté až smetanově bílé barvy, charakteristického zápachu po mléku, neznečištěné, bez cizorodých částic. LOUDA a kol. (2007) dodává, že se základní vyšetření musí provést nejdéle do deseti minut po získání ejakulátu, které se provádí ve specializovaném pracovišti – laboratoři sterilizované germicidní zářivkou a vyhřáté na teplotu 20 – 25°C.

Během makroskopického posuzování spermatu, které se provádí jako první zkouška, se zjišťují a zaznamenávají hodnoty, jako je objem odebraného ejakulátu, jeho hustota a zrnitost, senzorické posouzení barvy a pachu, čistotu a zda zkoumaný vzorek neobsahuje cizí přímíšeniny (například hnis, chlupy, vazelínu, nečistoty z nedostatečně očištěné předkožky a při odběru na písčitém povrchu se zde můžou nacházet i jeho zrna). Hodnotí se všechny odebrané ejakuláty.

Objem spermatu je ovlivňován výživou, ošetřováním a plemenem, kdy býci mléčných plemen dosahují vyšších odebraných objemů. Ohled se musí také brát na individuální založení daného jedince (POLÁK, 1956).

### **3.5.5 Mikroskopické a makroskopické posouzení spermatu**

POLÁK (1956) uvádí, že při mikroskopických vyšetřovacích metodách je potřeba mikroskop seřízený na příslušné zvětšení, přehřívací deska vyhřátá na teplotu 38-40°C, přehříváči řádně očištěná, mastnoty zbavená sklíčka, sterilní nahřáté kapačky a fyziologický roztok chloridu sodného nebo citranu sodného.

Makroskopicky se sleduje hustota a pohyb spermií, cizí přímíšeniny, rozměry spermií, pH, dále se stanoví odolnost spermií, výpočet patologických a nezralých spermií, koncentrace spermií, počet mrtvých a živých spermií a přežitelnost spermií.

### **3.5.6 Zpracování inseminačních dávek**

Krátce po odebrání spermatu býka se dávka pošle na zhodnocení do laboratoře, kde se zjistí objem zvážením, aktivita spermií mikroskopicky a pod spektrofotometrem koncentrace. Pokud sperma vyhovuje, pokračuje k dalšímu zpracování, pokud ne, dále se nepoužívá. Za pomoci výpočetních technologií se dále určuje počet inseminačních dávek ze zkoumaného množství spermatu a poměr ředidel ku objemu semene.

K ředění se používá směs, v níž jedno ředidlo obsahuje glycerol a druhé ne. Tato směs se připravuje při teplotě 5°C. Poté se nalije do popsanych pejet příslušného objemu a zmrazuje podle předdefinované mrazící křivky v tekutém dusíku (JEŽKOVÁ, 2012).

### **3.6 Ředidla spermatu**

Z důvodu krátké životnosti čerstvého ejakulátu se moderní inseminace neobejde bez ředících látek, které zachovávají oplozovací schopnost spermií po delší dobu – minimálně však po dobu tří dní. Těchto ředidel je dnes na trhu celá řada (VERBERCKMOES a kol., 2005).

Během zmrazovacích a rozmrazovacích postupů se vyskytuje celá řada faktorů, které ohrožují jak buňku, tak její oplozovací schopnost. Při prudkém poklesu nebo vzestupu teplot dochází k poničení či úplnému zničení buněčné stěny, pohybových vlastností buňky a jejího jádra. Z těchto důvodů se začala používat ředidla sloužící k ochraně buněk a udržení delší trvanlivosti ejakulátu (AMIRAT a kol., 2005).

Jedním z prvních ředidel byla směs z vaječných žloutků a pufracních složek, nejčastěji fosfátu a citrátu. Dále se jako ředidla osvědčila směs z homogenizovaného kravského mléka, kokosového mléka a glycerolu. Glycerol poskytuje ochranu buňky jak intracelulárně, tak i extracelulárně. Dalším způsobem jak uchovávat čerstvost spermatu, bylo snížení teploty na 5°C, čímž se snížila metabolická aktivita spermií, a zároveň se tak zamezilo vnější kontaminaci (THUN a kol., 2002).

Do ředidel se ke glycerolu používají látky, které mají za úkol udržovat osmolaritu, mají pufrovací schopnost a obsahují vysokomolekulární látky ochraňující buňku před chladovým šokem. Těmi jsou například vaječný žloutek, mléko nebo sójový lecitin. Dalšími komponenty v ředidlech jsou složky dodávající spermiím energii – fruktóza a glukóza a látky chránící buňky před mikrobiálním poškozením – antibiotika spolu s enzymy (AIRES a kol., 2003).

#### **3.6.1 Typy ředidel**

##### **3.6.1.1 Žloutková ředidla**

Vaječný žloutek je považován za spolehlivou ochranu buněk proti chladovému šoku, zabraňuje poškození membrány během chlazení a je zodpovědný za stabilní pohyblivost spermií po roztání dávky. Dnes je však snaha žloutek nahradit látkou, která má stejné kryoprotektivní vlastnosti, ale nehrozí u ní nebezpečí přenosu bakterií a jiných buňkám nebezpečným látek (HOLT, 2000).

Během zjišťování, proč žloutek chrání buňky před mrazem, došlo ke shodě, že tuto ochranu poskytuje lecitin. Jeho velkou nevýhodou je však fakt, že není rozpustný ve vodě a vytváří nestabilní roztok, který je cytotoxický. Další látkou, která má také ochranné vlastnosti, je lipoprotein o nízké hustotě ( low – density – lipoprotein; LDL). Patří mezi fosfolipidy, jež se váží na membránu spermie, čímž jí zajišťuje mnohem větší ochranu (VISHWANATH a SHANNON, 2000).

#### 3.6.1.2 Bezžloutková ředidla

Již několik let jsou na trhu k dispozici ředidla, kde byl vaječný žloutek nahrazen jinou, neživočišnou složkou – sójovým výtažkem (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW a kol., 2000).

Při pokusu, jenž byl prováděn BERANEM a kol., (2011) se potvrdilo domnění, že ředidla bezžloutkového charakteru mají horší ochranný účinek před mrazem, a celkově tak dosahují horších výsledků než ředidla obsahující žloutek. I přes možnou bakteriální kontaminaci dávek doporučují pro dlouhodobou konzervaci žloutkovými ředidly než těmi bezživočišné složky.

### 3.6.2 Zástupci žloutkových ředidel:

#### 3.6.2.1 Low – density – lipoproteins (LDL)

LDL je součástí vaječného žloutku a pro účely ředění semene je nutno jej z vaječného žloutku extrahovat. V závislosti na obsahu LDL v ředidle se odvíjí i ochrana buněčné stěny před podchlazením či zamrazením. Ředidlo totiž zabraňuje ztrátě fosfolipidové membrány, která chrání buňku před úplným promrznutím (BENCHARIF a kol., 2010).

Z výzkumu vyplývá, že LDL ředidlo je možné použít nejen jako kryoochranu semene, ale také jako krátkodobou ochranu čerstvého spermatu. Po rozmrazení přežívá více než polovina spermií (AMIRAT a kol., 2005).

#### 3.6.2.2 Triladyl<sup>®</sup>

Ředidlo se používá pro dlouhodobou konzervaci. V porovnání s LDL ředidlem je Triladyl méně spolehlivý, jelikož při zamrazování dochází k většímu výskytu tvorby vnitrobuněčného ledu v akrozomech spermií. Po rozmrazení dávek v ředidle Triladyl zůstává pouze jedna třetina spermií pohyblivých (AMIRAT a kol., 2005).

Do tohoto ředidla skládajícího se z vaječného žloutku, Tris, kyseliny citronové, fruktózy, glycerolu se vkládají antibiotika tylosin, gentamycin, spectinomycin a lincomycin (NÖHLING a kol., 2007).

Tento typ komerčně vyráběného ředidla založený na bázi vaječného žloutku má lepší výsledky z testu přežitelnosti po rozmrazení, prováděné BERANEM a kol. (2011), než ředidla bezžloutkového charakteru.

### 3.6.2.3 TRIS

Vaječná složka ředidla, obsahující komponenty lecitin, fosfoprotein a lipoprotein, může způsobovat rychlejší pohyblivost spermií díky viskozitě, kterou bezvaječná rozpouštědla postrádají. Díky obsahu vaječného žloutku dosahuje tento přípravek větší ochrany pohlavních buněk nežli Biophos-Plus<sup>®</sup> obsahující pouze sójový výtažek (THUN a kol., 2002).

## 3.6.3 Zástupci bezžloutkových ředidel

### 3.6.3.1 AndroMed<sup>®</sup>

AndroMed je komerčně vyráběné ředidlo obsahující fosfolipidy, kyselinu citronovou, puify, antioxidanty, glycerol a stejné kmeny antibiotik jako Triladyl (NÖHLING a kol., 2007).

Toto ředidlo je na trhu mezi ředidly poměrně nové. Jeho schopnost ochránit buňku před mrazem nespočívá v živočišných složkách, ale v sójovém lecitinu. Používáním tohoto ředidla se předchází mikrobiální kontaminaci, jež se může dostat do dávek z vaječného žloutku, na základě kterého jsou založena jiná ředidla (AIRES a kol., 2003).

### 3.6.3.2 Bioxcell<sup>®</sup>

Bioxcell obsahuje sójový lecitin a používá se hlavně k ředění býčího, kozlího a beraního spermatu právě proto, že zachovává vysokou kvalitu semene – nenarušuje propustnost plazmatické a akrozomální membrány a nesnižuje pohyblivost spermií (AKHTER a kol., 2010).

Tento typ komerčně vyráběného ředidla bez živočišných přísad, je dobrou alternativou tam, kde je žádoucí předejít kontaminaci dávky mikroorganismy nebo jinými patogenními faktory ze složek obsahující například vaječný žloutek nebo mléčnou směs (GIL a kol., 2003).

### 3.6.3.3 Biociphos–Plus®

V tomto ředidle je kvůli možnosti mikrobiální kontaminaci nahrazen podíl vaječného žloutku extraktem ze sójových bobů. Nahrazení žloutku sójovým extraktem je sice účinné v ohledu předcházení mikrobiálního znečištění, nicméně snižuje přežitelnost pohlavních buněk po rozmrazovacím procesu (THUN a kol., 2002).

Výhoda tohoto ředidla spočívá v tom, že je méně agresivní než Triladyl, avšak v porovnání s LDL se buněčná membrána v chladícím procesu rychleji měnila. Tenká vrstva, kterou ředidlo utvořilo kolem spermií, nestačila k ochraně většího množství buněk před ledovými krystaly, které se během poklesu teploty vytvořily. Pohyblivost však zůstala na úrovni LDL rozpouštědla (AMIRAT a kol., 2005).

### 3.6.4 Vlastnosti ovlivněné ředidly

Bez použití ředidel, která ochraňují buňky před chladem, mrazem a změnou osmotického tlaku, by došlo k nenávratnému zničení akrozomálních a plazmatických membrán a k poškození mitochondrií (CELEGHINI a kol., 2008). Právě tyto parametry, jako je morfologie spermie, koncentrace, životaschopnost, kapacitace, akrozomální celistvost, pohyblivost a odolnost proti osmotickému tlaku, slouží k hodnocení kvality spermatu v chlazené nebo zamrazené/rozmrazené dávce (KASIMANICKAM a kol., 2011).

## 3.7 Výroba inseminačních dávek

Jak již bylo zmíněno výše, jsou dva druhy způsobu konzervace semene. Jedná se o metodu mokrou (liquid – stored) a hluboce zmrazenou v pejetách ( frozen – thawed). Mokrý metoda má na rozdíl od metody zmrazovací výhodu spočívající v možnosti většího naředění semene, vysokou oplozovací schopností a nepoměrně levnějším skladováním. Nicméně doba přežití spermií je tímto způsobem limitována jen na pár dní.

Metoda hlubokého zmrazení má naopak téměř neomezenou dobu použitelnosti a skladovatelnosti. Nevýhody však spočívají ve velké koncentraci spermií v jedné dávce a velmi vysokých nákladech na skladování. Přesto je tento způsob uchovávání býčího ejakulátu využíván hojněji než předchozí způsob (VISHWANATH a SHANNON, 2000).

Inseminační dávka v jedné pejetě obsahuje několikanásobně více oplození schopných spermií, než je nutné k tomu, aby plemence zabřezla. Inseminační stanice vyrábějící inseminační dávky garantuje správnost a dodržování pevně daných postupů. Každý přijatý ejakulát se posuzuje laboratorními zkouškami samostatně a také se individuálně určuje stupeň

ředění. Semeno se plní do trubiček z polyvinylchloridu a uschovává se po několik hodin v chladničce při teplotě 4 °C (ŘÍHA a kol., 2003).

Sperma dodávané k výrobě inseminačních dávek musí splňovat pevně stanovené parametry. Semeno nesmí obsahovat žádné patogenní látky, jejichž přítomnost se vyšetřuje po dobu 6 měsíců, a infekční nemoci. Dále musí mít standardní odstín, nesmí obsahovat shluky spermií, sraženiny, nesmí být znečištěno a nestandardně zapáchat. Aktivita spermií by měla dosahovat minimálně 70% z odebraného objemu a z toho minimálně 80% nezdeformovaných, normálních spermií. Maximálně však může obsahovat 10% spermií vykazující primární změny stavby buňky (SIDDIQUE a kol., 2006).

Poté dochází k ředění spermatu, které se zamrazuje v označených pejetách při pohybové aktivitě okolo 30%. Sperma, které vyhovuje všem požadavkům, se uloží do zásobních kontejnerů, odkud se po uplynutí 30 denní čekací lhůty vyjme a poté se exportuje inseminačním technikům.

Pejety různého objemu – 0,25ml a dle ŘÍHY a kol. (2003) i o objemu 0,5 ml – musí být označeny kódy inseminační stanice, zvířete a datem odběru (JEDLIČKA, 2010). Každá zakoupená dávka musí mít v plánu zapsané údaje o plnění a odběru (ŘÍHA a kol., 2003).

### **3.7.1 Ekvilibrace**

Od doby ekvibrace se odvíjí stupeň poškození membrán spermií zachovávající jejich celistvost a také pohyblivost po rozmrazení. Již čtyřhodinová ekvibrace zajistí lepší ochranu buňky před mrazem a zachová celistvost plazmatické či akrozomální membrány a motility. Dále se na ochraně buňky také podílí doba, po kterou je přítomno ředidlo, což má za následek větší přežitelnost.

Pro zmrazování býčího semene jsou předepsány postupy, které určují rychlost chlazení. (LEITE a kol., 2010) Tímto se snižuje riziko poškození buněčného jádra spermie ledem během zmrazování a rozmrazování dávky (VISHWANATH a SHANNON, 2000).

Z důvodu přítomnosti vody uvnitř buňky – intracelulární tekutiny – je třeba mít na zřeteli její vliv na osmotický tlak v prostředí, v němž se buňka nachází. Procento zmrazené vody jde ruku v ruce s hodnotami osmotického tlaku, které dále závisí na teplotě. Čím nižší je teplota, tím větší část buňky je zmrazena a tím vyšší je i osmotický tlak prostředí. Bylo dokázáno, že vystavení buňky procesům zmrazování by mělo být takové, aby bylo dosaženo co největšího procenta přeživších spermií – tedy rychlé zmrazení, ideálně 15 – 60°C/min. Zároveň je však nutné nastavit parametry zmrazování natolik pomalé, aby intracelulární voda mohla díky osmóze opustit jádro buňky, čímž se zamezí jejímu vykrytalizování uvnitř,

což je pro spermii smrtelné. Z výše zmíněného vyplývá, že je třeba najít jistý kompromis mezi prudkým ochlazením a funkčním odvodem tekutiny. Tento kompromis se liší v závislosti na druhu zvířete, přesněji tedy na propustnosti jednotlivých membrán (WATSON, 2000).

Obvykle se začíná pomalým chlazením na teplotu 4 – 5°C, dále následuje ekvilibrace po dobu minimálně 30-ti minut, přičemž maximální doba pro tento úkon skýtá 24 hodin, při této teplotě před samotným zmrazováním. V průběhu ekvilibrace se nejčastěji do spermatu přidává glycerol, obzvlášť je-li přítomno žloutkovo-citrátové ředidlo. Přídavek glycerolu není časově závislý, a je tedy možno jej přidat v jakékoli fázi ekvilibrace. Všeobecně je zde snaha o zrušení, nebo alespoň podstatné zkrácení doby ekvilibrace, aniž by však byla porušena kvalita spermií po rozmrazení. Jelikož semenná plazma není schopna účinně chránit spermie při vyšších výkyvech teploty, musí se používat látky, které jim poskytnou dostatečnou ochranu před sníženou teplotou. Jako ředidla spermatu se nejčastěji používá glycerol s vaječným žloutkem. Právě kvůli vaječnému žloutku hrozí sekundární bakteriální kontaminace spermatu. Z tohoto důvodu se vyrobilo například sójovo – lecitinové ředidlo, u něhož nehrozí přenos patogenů (LEITE a kol., 2010).

### **3.7.2 Kryokonzervace**

Od roku 1949, kdy se zjistilo, že glycerol má kryoprotektivní účinky, se učinil velký pokrok v ochraně býčího spermatu. Ustoupilo se od uchovávání spermatu v ampulích a peletách. Zhruba před třiceti lety se právě díky glycerolu začalo sperma plnit do pejet. Od té doby, navzdory velkému rozšíření a používání zmrazeného spermatu, se neučinil nijak významný pokrok, co se týče oblasti rozpouštění spermatu. Během zmrazování, změnou teploty a osmolarity, se poškozuje mitochondriální, lipidová a akrozomální membrána, a to včetně celé mitochondrie (CELEGHINI a kol., 2008). VADNAIS a ALTHOUSE (2011) doplňují, že během snižování teploty dochází v lipidové fázi k fázové přeměně z fáze krystalické až kapalné do fáze gelu s následným zvýšením viskozity membrány po rozmrazení.

Díky kryoochraně se mohou během chlazení, mražení a tání projevit i negativní změny na jádře i když se nachází vně buňky na rozdíl od struktur chránící buňku (CELEGHINI a kol., 2008).

Ve svém pokusu CELEGHINI a kol. (2008) rozpustil ejakulát v ředidle Bioxellu<sup>®</sup> a Botu – Bovu<sup>®</sup>. Po tomto kroku nechal roztoky, dle návodu, ve vodě o teplotě 37°C po dobu 10-ti minut kvůli stabilizaci. Poté se naplnily pejetý daným vzorkem. Zapsalo se na ně číslo býka, šarže ejakulátu a ředidlo, ve kterém se semeno rozpouštělo.



Ke kryoconservaci se použil přenosný mrazák. Ochlazovací rychlost byla 0,25°C/min do teploty 5°C a zamrazovací rychlost byla – 15°C/min z 5°C do – 80°C a poté od – 10°C až do dosažení – 120°C. Následně se pejetý skladovaly v tekutém dusíku při teplotě – 196°C. Po rozmrazení probíhající v 37°C vodě po dobu 30-ti vteřin a po odstředění se hodnotila motilita a morfologie: celistvost plazmatické a akrozomové membrány, funkčnost mitochondrií a chromatinové struktury.

Během tohoto pokusu se zjistilo, že kryoconservant snižuje motilitu spermií, zvyšuje procento abnormálních spermií a negativně ovlivňuje mitochondrie a celistvost buněčných membrán. Zároveň, ale pomohlo chránit různé buněčné útvary během zchlazování a zmrazování. Botu – Bov<sup>®</sup> v tomto experimentu dosahoval lepších výsledků než Bioxell<sup>®</sup>.

### **3.7.3 Uchovávání nakoupených inseminačních dávek**

Inseminační dávky, které má k dispozici inseminační technik jsou uchovávány v označených gobletách, které se nacházejí na držácích zavěšených v kontejneru. Kontejner je naplněn tekutým dusíkem, který zachovává pod svou hladinou teplotu -196°C.

Je snaha minimalizovat otevírání kontejneru, neboť každá možná změna teploty může vést k rozmrazování inseminačních dávek, čímž se může ohrozit oplodňovací schopnost spermií, proto se při manipulaci vně kontejneru nesmí zvýšit teplota na -130°C.

V hrdle kontejneru se teploty pohybují kolem -160 až -140°C. V ústí hrdla by se teplota měla pohybovat od -25 do 10°C. Toto teplotní rozmezí je kritické, protože při dlouhé manipulaci s pejetou v tomto prostoru dochází k rekrystalizaci a vzniku velkých ledových krystalů místo malých, které neporušují strukturu buněčné stěny. (LOUDA a kol., 2008)

Pejeta poškozená rekrystalizací má poškozený nebo prasklý obal, je orosená, nebo dokonce obalená ledem. Pro další účely je v tomto stavu již nepoužitelná, neboť ztrácí svou oplozovací schopnost (ŘÍHA a kol., 2003).

### **3.7.4 Rozmrazování inseminačních dávek**

Pejetý v kanystru se přemístí asi 3 – 5 cm pod ústí hrdla a pinzetou se rychle vyjme. Poté se zkontrolují údaje natištěné na obalu a vloží se do nádoby s vodou o teplotě 35 – 37°C. Ohřev trvá přibližně 40 vteřin.(LOUDA a kol., 2008) Pak technik zatřesením trubičky se spermatem vyklepe zbytek dusíku, který může ulpět u vatové zátky, již následně odstraní. Pejetu umístí do předem připravené aparatury a provede inseminaci (ŘÍHA a kol., 2003).

### **3.7.5 Tání inseminačních dávek**

Je všeobecně známo, že z důvodu prevence znehodnocení buněčných stěn je nejlepší rychlý způsob ohřívání dávky. Je to především kvůli možnosti rekrystalizace vody a následnému potrhání buněk.

Pomalý způsob ohřívání způsobuje změnu osmotického tlaku vlivem změny objemu buněčných tekutin, což je mnohem nebezpečnější než při zmrazovacím procesu (VISHWANATH a SHANNON, 2000). Tání se obvykle provádí v rozmezí teplot od 4 do 37°C (SIDDIQUE a kol., 2006).

### **3.7.6 Kontrola inseminačních dávek**

Častěji dochází k poškození obalu spermií, nežli k narušení přímého pohybu vpřed. Vyrůstá tím ale i procento abnormálně tvarovaných buněk, porušených akrozómových membrán, které nejsou schopny projít zónou pellucidou, a oplodnit tak vajíčko (CELEGHINI a kol., 2008).

Z těchto důvodů se minimálně jednou měsíčně provádí kontrola rozmrazením vybrané inseminační dávky, kontroluje se aktivita spermií při teplotě 37°C, jejich možné vady způsobené ledem či případné deformace akrozómového obalu. Zhodnotí se procentuální zastoupení živých a mrtvých spermií na průtokovém cytometru, dále poškození DNA, bakteriální znečištění a koncentrace pohlavních buněk v inseminační dávce (JEŽKOVÁ, 2012).

Cesta, jak tomuto jevu předejít, je kombinace více druhů ředidel, které tak mohou ochraňovat více částí buňky (CELEGHINI a kol., 2008).

### **3.7.7 Budoucí trendy v konzervaci semene**

Hlavními přírůsky u tekuté metody by mohlo být zpomalení nebo úplné zastavení zhoršování oplozovacích schopností během skladování při pokojové teplotě. Zároveň je však nutno porozumět základním fyziologickým procesům. Snížení koncentrace pohlavních buněk v hluboce zamrazených dávkách je jedním z budoucích směrů, kterými se tato metoda může ubírat. Je tedy potřeba se především soustředit na složení ředidel, aby se zlepšila ochrana buněk během zamrazení.

Jako alternativy těmto dvěma metodám byly v minulosti zkoumány způsoby, jak uchovávat semeno v lyofilizovaném, sušeném a vitrifikovaném stavu. Ani jeden z těchto způsobů se však neosvědčil (VISHWANATH a SHANNON, 2000).

### **3.8 Oplozovací schopnost inseminačních dávek**

Oplozovací schopnost je dána podle plemenné hodnoty býka, konkrétně počtem spermií zajišťujících zdárné zabřeznutí plemence. Tato vlastnost inseminační dávky je dána aktivitou, která by se měla pohybovat v rozmezí mezi 30 – 50%, po rozmrazení (LOUDA a kol., 2008). Testování plodnosti mladých býků se nejčastěji provádí metodou in vitro (ve zkumavce). Je to především kvůli ekonomické efektivitě, úspoře času a možnosti prověření většího počtu býků (GILLAN a kol., 2008).

Díky pokroku informačních technologií lze za pomoci velkých databází porovnávat výsledky dosažené v různých laboratořích, v nichž se průzkum inseminačních dávek provádí. Existuje však mnoho faktorů, které mohou zapříčinit selhání poslání spermií – protože je složená z více funkčních jednotek, nelze ani pomocí podrobné laboratorní analýzy býčího ejakulátu jednoznačně předpovědět oplození vajíčka jednotlivými spermii (MOCÉ a kol., 2008).

#### **3.8.1 Ukazatelé kvality inseminačních dávek**

Hodnotí se především konzistence, heterogenita buněk a zastoupení oplození neschopných spermií ve vzorku. Vadné spermie jsou posléze pohlceny v rozmnožovací soustavě samice, a to jakmile dosáhnou vejcovodu (GILLAN a kol., 2008).

Po rozmrazení dávky se hodnotí progresivní pohyb spermií vpřed, kinetika pohybu, koncentrace živých a mrtvých buněk, zjišťuje se rozsah poškození způsobený změnou osmotického tlaku (VISHWANATH a SHANNON, 2000). Dále GILLAN a kol. (2008) doplňuje hodnocení deformací chromatinových a akrozomálních center zapříčiněných během změny teploty při zamrazování a tání.

#### **3.8.2 Kvalitativní hodnocení inseminačních dávek**

Celková kvalita spermatu záleží na mnoha faktorech – na vhodně zvoleném kryoprotektivu, rychlosti chlazení a mrazení a zároveň i na způsobu skladování semene (KALLUDI a kol., 2011).

## **4. Materiál a metodika**

### **4.1 Charakteristika inseminační stanice**

Vzorky byly přivezeny z inseminační stanice v Hradištku pod Medníkem. Vlastníkem stanice je firma Natural, spol. s.r.o. zabývající se národním plemenářským programem plemen holštýnského, českého strakatého skotu a několika plemen masných užitkových typů skotu. V současnosti je na stanici okolo stovky plemenných býků. Společnost produkuje kolem 750 000 inseminačních dávek a expeduje je do zemí Evropské unie i do jiných s unií asociovaných. Provoz stanice splňuje všechna česká, evropská a hygienická kritéria. Dávky jsou vyráběny pod veterinárním dohledem a identifikaci zajišťuje kontrolovaný systém práce.

### **4.2 Charakteristika býků**

Býčí semeno bylo dovezeno z inseminační stanice v Hradištku pod Medníkem. Plemeníci byli různě staří a různého užitkového směru – viz tabulka 9. K výzkumu byl použit nativní ejakulát odebraný od býků holštýnského plemene a od býků masných plemen – Aberdeen Angus a Galloway. Jejich ejakulát byl naředěn komerčně vyráběným ředidlem s přísávkem LDL – cholesterolu.

### **4.3 Metodika**

#### **4.3.1 Charakteristika ředidel**

K pokusu byla použita ředidla od firmy MiniTüb Germany – Triladyl a AndroMed a ředidlo Bioxcell od společnosti IMV France.

#### **4.3.2 Příprava ředidel**

Dle návodu výrobce bylo připraveno ředidlo Triladyl. Pro požadovaný objem – 2 ml ředidla bylo smícháno 1,5 ml vody společně s 0,5 g koncentrátu Triladyl.

Dle návodu výrobce bylo připraveno ředidlo Bioxcell . Pro požadovaný objem – 2 ml ředidla bylo smícháno 1,6 ml vody společně s 0,4 g koncentrátu Bioxcell. Ve stejném poměru jako Bioxcell byl připraven i AndroMed – 1,6 ml vody společně s 0,4 g AnroMed koncentrátu.

### 4.3.3 Materiál

Byl používán čistý dialyzovaný LDL z vaječného žloutku vyrobený profesorem Hodkem (UK). LDL byl přidán o různých koncentracích do komerčně vyráběných ředidel: Triladylu, Bioxcellu a AndroMed - vypočtené hodnoty viz tabulka 2. Deionizovaná voda byla používána k oplachování pomůcek.

### 4.3.4 Pomůcky

Osmometr, pH-metr, kalibrační a čistící roztoky, kalibrační roztoky, vodní lázeň, zkumavky typu eppendorf, sterilní zkumavky, automatické pipety, špičky, kádinky.

### 4.3.5 Pracovní postup

Nejprve byl dle návodu zkalibrován pH-metr a posléze i osmometr. Následně byla připravena ředidla dle pokynů od výrobce, přičemž ředidlo Triladyl bylo připraveno ve dvou variantách, a to s přídavkem vaječného žloutku a bez něj. Prázdné předem označené zkumavky byly vloženy do vodní lázně vyhřáté na teplotu 37°C a zkumavky typu eppendorf byly vloženy do sušárny také na teplotu 37°C. Po uplynutí přibližně 5 minut byly do zkumavek přidávány odměřené dávky ředidel dle tabulky, a to následujícím způsobem. Nejdříve byl napipetován objem daného ředidla, do něj byl poté přidán vypočtený příslušný objem LDL a tento roztok byl opět vložen do vodní lázně. Dále byl zaznamenán čas a pro změření osmotického tlaku byl odebrán objem 100  $\mu$ l, hodnoty pH byly naměřeny ve zkumavce. Podobný postup byl opakován u všech dalších vzorků.

#### 4.3.5.1 Měření pH

Do zkumavek se směsí daného ředidla a LDL byl postupně ponořen pH-metr a zaznamenán čas, kdy měření proběhlo. Po ustálení pH byla jeho hodnota zapsána. Po každém měření byl pH-metr opláchnut speciálním saponátem, destilovanou vodou, lihem a osušen buničinou. Celé měření probíhalo u každého vzorku po dobu 72 hodin, přičemž hodnoty pH byly zaznamenávány v časových úsecích 0, 2, 24 a 72 hodin.

#### 4.3.5.2 Měření osmotického tlaku

Na odebraném objemu 100  $\mu$ l byl změřen osmotický tlak. Měření byla opakována po 2 hodinách inkubace ve vodní lázni. Po změření posledního vzorku byly všechny vzorky na stojánku vloženy do chladničky, kde byly ponechány do dalších měření, která probíhala v intervalu 24 hodin po dobu 3 dní. Při těchto měřeních byl stojánek vždy vyňat z chladničky,

zkumavky byly opět vytemperovány na 37°C a následně byl změřen osmotický tlak spolu s pH na opětovně zkalibrovaných přístrojích. Jakmile tato měření proběhla, stojánek se zkumavkami byl znovu vložen do chladničky, kde byl zanechán do dalšího měření.

#### 4.3.5.3 Koncentrace LDL – cholesterolu v ředidlech

Do ředidla Triladyl bylo přidáno 10, 9, 8, 7 a 6% LDL – cholesterolu. Procentuální hodnoty přídatku byly vypočítány z celkového množství ředidla. AndroMed a Bioxcell byl smíchán s 8, 6, 4 a 2% LDL. Z těchto vzorků směsi ředidla a LDL se měřily změny pH a osmotického tlaku v závislosti na čase.

#### 4.3.5.4 Sledování a měření

Po namíchání roztoků byly ihned naměřeny hodnoty pH a osmotického tlaku, tedy v čase 0 hod. Dále měření pokračovalo po 2, 24, 48 a 72 hodinách. Vzorky byly uchovávány v chladničce a těsně před měřením se vložily do vyhřáté vodní lázně (37°C) dle pokynů v postupu práce.

## 5. Výsledky

### 5.1 Výsledky měření pH

#### 5.1.1 Výsledky měření pH u Triladylu

##### Komentáře k tabulce 3, grafické znázornění – Graf 1

###### 5.1.1.1 Triladyl s 10% LDL – cholesterolu

Během pozorování změn parametrů ředidla Triladyl s 10% přídatkem LDL – cholesterolu se hodnota po 2 hodinách sledování změnila oproti té prvotnímu, která nabývala 6,56, na hodnotu 6,6. Po 24 a 48 hodinách, kdy došlo k ustálení pH na 6,73 se hodnota začala zvyšovat. Po 72 hodinách již byla změřena hodnota 6,78.

###### 5.1.1.2 Triladyl s 9% přídatkem LDL – cholesterolu

První naměřená hodnota pH činila 6,56. Po 2 hodinách došlo ke zvyšování na 6,58. Po 24 hodinách od zahájení testu posléze pH metr naměřil hodnotu 6,72. Další 24 hodin v chladničce změnilo pH na 6,77 a za 72 hodin od prvního měření již dosahovala hodnota pH 6,8.

###### 5.1.1.3 Triladyl s 8% LDL – cholesterolu

Na začátku měření bylo pH stejné hodnoty jako u předchozích koncentrací – tedy 6,56. Na rozdíl od nich ale tato hodnota po 2 hodinách zůstala konstantní. Za jeden den od počátku měření se kontrola pH neprováděla. Byl zde totiž předpoklad, že nedojde k nijak závažnému snížení nebo zvýšení pH. Ve 48 a 72 hodin po zahájení pH testu se pH ustálilo na 6,78.

###### 5.1.1.4 Triladyl s 7% LDL – cholesterolu

Při zahájení měření dosahovalo pH hodnoty 6,55. Po 2 hodinách byla hodnota stejná jako na začátku. Po 24 hodinách se pH nebylo měřeno ze stejného důvodu, jako tomu bylo u Triladylu s 8% obsahem LDL. Po 48 hodinách bylo pH 6,78, dále byl pak po 72 hodinách zaznamenán mírný pokles pH na 6,77.

#### 5.1.1.5 Triladyl s 6% LDL – cholesterolu

U tohoto vzorku se začínalo na hodnotě pH 6,56. Při dalším měření, po 2 hodinách, byla zaznamenána hodnota 6,58. Po 24 hodinách od zahájení měření se opět nezjišťovalo, o kolik se pH změnilo. Ve 48. hodině od začátku testu byla naměřena hodnota pH 6,75. V 72. hodině testu se hodnota opět zvýšila na 6,77.

#### 5.1.1.6 K – kontrola – Triladyl

Současně s měřením ředidel s obsahem LDL o různé koncentraci se zjišťovala i změna hodnoty pH srovnávacího ředidla obsahující vaječný žloutek v závislosti na čase. Hodnoty byly zjišťovány ve shodném čase jako ředidla s LDL. Ředidla dosahovala shodných hodnot v časech 0 hodin a 2 hodiny po začátku měření – 6,58. V následujících měření nedocházelo k nijak výrazným změnám. Po 24 hodinách činila hodnoty 6,7, po 48 hodinách 6,72 a posledním měřením byla zjištěna hodnota 6,73.

### 5.1.2 Výsledky měření pH u Bioxcellu

#### Komentáře k tabulce 4, grafické znázornění – Graf 2

##### 5.1.2.1 Bioxcell s 8% LDL – cholesterolu

První měření dosahovalo hodnoty pH 6,7, po dvou hodinách nepatrně stoupl na 6,71. V měření za 24 a 48 hodin pH-metr naměřil shodně 6,74. Poslední hodnota naměřená 72 po zahájení testu byla 6,77.

##### 5.1.2.2 Bioxcell s 6% LDL – cholesterolu

První měření Bioxcellu s 6% LDL ukázalo hodnotu pH 6,74. Za dvě hodiny došlo k mírnému zvýšení pH na 6,75, avšak během dalšího měření po 24 hodinách došlo k poměrně výraznému nárůstu pH na hodnotu 6,81. Tato hodnota zůstala konstantní i do měření hodnoty ve 48. hodině po začátku měření. Hodnota pH po 72 hodinách se opět mírně zvýšila na 6,82.

##### 5.1.2.3 Bioxcell s 4% LDL – cholesterolu

Na počátku měření tohoto ředidla s LDL byla zaznamenána hodnota pH = 6,73. Po 2 hodinách se hodnota změnila na 6,74. Hodnocení za 24 hodin se neprovádělo, jelikož se nepředpokládala nijak závratná změna hodnot. Po 48 hodinách se hodnota vyšplhala na 6,81. Za 72 hodin od zahájení měření nabývala hodnota pH 6,82.



#### 5.1.2.4 Bioxcell s 2% LDL – cholesterolu

Hodnocení pH ředidla s nejmenší koncentrací LDL začínalo na hodnotě 6,71. Za 2 hodiny bylo naměřeno pH = 6,74. Za 24 hodin se měření neopakovalo. Měření probíhající za 48 a 72 hodin nabývalo stejných hodnot, a to 6,82.

#### 5.1.2.5 K – kontrola – Bioxcell

Čisté ředidlo nevykazovalo výrazný nárůst hodnot pH. Na začátku měření a po 2 hodinách dosahovalo pH hodnoty 6,75. Další měření zjišťovaná v intervalech 24, 48 a 72 hodin měla stejné hodnoty, a to 6,81.

### 5.1.3 Výsledky měření pH u AndroMedu

#### Komentáře k tabulce 5, grafické znázornění – Graf 3

##### 5.1.3.1 AndroMed s 8% LDL – cholesterolu

Ředidlo AndroMed s 8%LDL při prvním měření vykazovalo hodnotu pH 6,58. Za 2 hodiny od začátku měření však došlo k poklesu hodnoty pH na 6,54. Po 24 hodinách se ředidlo ustálilo na hodnotě 6,69 a v dalším měření se opět naměřila nižší hodnota – 6,67. V 72. hodině po zahájení měření se hodnota pH opět nepatrně zvýšila na 6,69.

##### 5.1.3.2 AndroMed s 6% LDL – cholesterolu

Na počátku měření dosáhlo pH hodnoty 6,61. Další hodnota po 2 hodinách se snížila na 6,58. Za 24 hodin došlo k poměrně výraznému nárůstu hodnoty pH na 6,73. Následující měření po 48 a 72 hodinách ukázalo shodné hodnoty pH, a to 6,7.

##### 5.1.3.3 AndroMed s 4% LDL – cholesterolu

První měření a měření po dvou hodinách ukázalo stejné hodnoty pH – 6,64. Po 24 hodinách se měření neopakovalo a zjišťovaly se hodnoty pH až za 48 hodin. Hodnota pH se za 48 hodin se ustálila na pH 6,7 a v kontrolním měření prováděné za 72 hodin po zahájení testu se hodnota pH zvýšila na 6,71.

##### 5.1.3.4 AndroMed s 2% LDL – cholesterolu

První a měření po dvou hodinách měření ukázalo shodné hodnoty pH – 6,63. Po 24 hodinách se měření opět neprovádělo, ale za 48 a 72 se prokázalo, že hodnoty nijak závratně nekolísají nebo nestoupají a jsou na shodné hodnotě pH, a to 6,7.

### 5.1.3.5 K – kontrola – AndroMed

Kontrola čistého ředidla byla prováděna ve shodných časech jako ředidla s přídavkem LDL. Na začátku měření a po 2 hodinách dosahovaly hodnoty pH 6,63. V dalších intervalech měření pH ředidlo opět dosahovalo shodné hodnoty a to 6,7.

## 5.2 Výsledky měření osmotického tlaku

### 5.2.1 Výsledky měření osmotického tlaku u Triladylu

#### Komentáře k tabulce 6, grafické znázornění – Graf 4

#### 5.2.1.1 Triladyl s 10% LDL – cholesterolu

Osmometr na začátku testu naměřil hodnotu osmotického tlaku 1320 mlOsm/kg. Měření po 24 hodinách ukázalo změnu osmotického tlaku na hodnotu 1316 mlOsm/kg. Dalším měřením se prokázalo mírné zvyšování hodnoty osmotického tlaku – po 48 hodinách dosahoval 1318 mlOsm/kg a po 72 hodinách bylo naměřeno 1333 mlOsm/kg.

#### 5.2.1.2 Triladyl s 9% LDL – cholesterolu

Osmotický tlak na začátku pokusu dosahoval u tohoto vzorku hodnoty 1328 mlOsm/kg. Za 24 hodin hodnota osmotického tlaku klesla na 1306 mlOsm/kg. Po dalším měření prováděném ve 48. hodině po zahájení testu dosahoval osmotický tlak hodnoty 1313 mlOsm/kg a v 72. hodině bylo naměřeno hodnoty 1328 mlOsm/kg.

#### 5.2.1.3 Triladyl s 8% LDL – cholesterolu

Počáteční hodnota osmotického tlaku ředidla s 8% LDL byla 1322 mlOsm/kg. Měření za 24 hodin po zahájení testu neproběhlo, jelikož se nepředpokládal výrazný zvrát ve výsledcích. Osmotický tlak naměřený za 48 hodin od úvodního měření byl 1314 mlOsm/kg a za 72 hodin od začátku měření dosahoval hodnoty 1330 mlOsm/kg.

#### 5.2.1.4 Triladyl s 7% LDL – cholesterolu

Na začátku testu osmometr naměřil hodnotu osmotického tlaku ve výši 1346 mlOsm/kg. Měření v následujícím intervalu se nekonalo. Hodnota osmotického tlaku zjištěná ve 48. hodině po zahájení měření byla 1352 mlOsm/kg a v 72 hodin byla 1340 mlOsm/kg.

#### 5.2.1.5 Triladyl s 6% LDL – cholesterolu

U tohoto vzorku byla naměřena nejvyšší počáteční hodnota ředidla Triladyl s přídavkem LDL – 1565 mlOsm/kg. Po 24 hodinách došlo k mírnému snížení na 1548 mlOsm/kg a po 48 hodinách až na 1518 mlOsm/kg. Za 72 hodin po zahájení testu byla naměřena hodnota osmotického tlaku 1523 mlOsm/kg.

#### 5.2.1.6 K – kontrola – Triladyl

Kontrola osmotického tlaku srovnávacího ředidla s vaječným žloutkem se uskutečnila jen na začátku měření a po 24 hodinách. První naměřená hodnota byla 1101 mlOsm/kg a hodnota po 24 hodinách 1109 mlOsm/kg.

### 5.2.2 Výsledky měření osmotického tlaku u Bioxcellu

#### Komentáře k tabulce 7, grafické znázornění – Graf 5

##### 5.2.2.1 Bioxcell s 8% LDL – cholesterolu

První měření osmotického tlaku tohoto ředidla s příslušnou koncentrací LDL ukázalo hodnotu 1364 mlOsm/kg. Za 24 hodin osmometr ukázal hodnotu osmotického tlaku nižší – 1334 mlOsm/kg. Po 48 hodinách od začátku měření se hodnota opět přiblížila té počáteční, osmotický tlak byl 1369 mlOsm/kg. 72 hodin po zahájení měření se osmotický tlak opět snížil na 1342 mlOsm/kg.

##### 5.2.2.2 Bioxcell s 6% LDL – cholesterolu

Počáteční hodnota osmotického tlaku tohoto vzorku byla 1516 mlOsm/kg. Po 24 hodinách byl zaznamenán pokles na 1483 mlOsm/kg. Při měření po 48 hodinách se osmotický tlak vrátil téměř na původní hodnotu – 1495 mlOsm/kg. Poslední měření prokázalo opětovný pokles osmotického tlaku na hodnotu 1508 mlOsm/kg.

##### 5.2.2.3 Bioxcell s 4% LDL – cholesterolu

Při prvním měření osmometr ukazoval hodnotu osmotického tlaku 1516 mlOsm/kg. Hodnota po 24 hodinách nebyla měřena, jelikož zde byl předpoklad, že nedojde k výrazné změně. Za dalších 24, tedy 48 hodin po začátku měření, byl osmotický tlak ve vzorku 1495 mlOsm/kg.

#### 5.2.2.4 Bioxcell s 2% LDL – cholesterolu

U ředidla Bioxcell s 2% LDL byla naměřena první hodnota osmotického tlaku – 1446 mlOsm/kg. Za 24 hodin se hodnota nezjišťovala, ze stejného důvodu jako u předchozího ředidla. Po 48 hodinách však byl zaznamenán pokles osmotického tlaku na hodnotu 1416 mlOsm/kg a po 72 hodinách od začátku testu byla změřena hodnota 1557 mlOsm/kg.

#### 5.2.2.5 K – kontrola – Bioxcell

Také s tímto ředidlem s přídavkem LDL – cholesterolu probíhalo souběžně kontrolní měření osmotického tlaku čistého ředidla. Prvním měřením byla naměřena hodnota osmotického tlaku 1580 mlOsm/kg. Za 24 hodin byl naměřen osmotický tlak o velikosti 1546 mlOsm/kg, který byl shodný s osmotický tlakem naměřeným po dalších 24 hodinách. Po třech dnech měření, tedy 72 hodinách, osmometr naměřil hodnotu 1557 mlOsm/kg.

### 5.2.3 Výsledky měření osmotického tlaku u AndroMedu

#### Komentáře k tabulce 8, grafické znázornění – Graf 6

##### 5.2.3.1 AndroMed s 8% LDL – cholesterolu

Prvním měřením osmotického tlaku tohoto ředidla byla zjištěna hodnota 1257 mlOsm/kg. Hodnota vzorku po 24 hodinách dosahovala 1268 mlOsm/kg. Další změřením velikosti osmotického tlaku ve vzorku, probíhajícím za 48 hodin po začátku, se prokázalo snížení hodnoty na 1259 mlOsm/kg. Poslední měření v 72 hodin od zahájení testu ukázalo klesající trend osmotického tlaku na hodnotu 1248 mlOsm/kg.

##### 5.2.3.2 AndroMed 6% LDL – cholesterolu

Osmometr po prvním měření prokázal hodnotu osmotického tlaku – 1411 mlOsm/kg. Vzorek po 24 hodinách vykazoval snížení osmotického tlaku na hodnotu 1373 mlOsm/kg. Po 48 hodinách od počátku měření začal osmotický tlak růst, zastavil se na hodnotě 1392 mlOsm/kg a zůstal konstantní do posledního měření.

##### 5.2.3.3 AndroMed s 4% LDL – cholesterolu

Při zahájení měření osmotický tlak dosahoval hodnoty 1417 mlOsm/kg. Měření po 24 hodinách se opět neprovádělo. Zaznamenán byl však údaj ze 48 hodin

od začátku měření. Hodnota osmotického tlaku v této době dosahovala 1420 mlOsm/kg. Za 72 hodin byla naměřena hodnota osmotického tlaku 1411 mlOsm/kg.

#### 5.2.3.4 AndroMed s 2% LDL – cholesterolu

První měření osmotického tlaku ukázalo hodnotu 1446 mlOsm/kg. Další měření za 24 hodin opět nebylo provedeno. Po 48 hodinách od zahájení testu došlo ke snížení hodnoty osmotického tlaku na 1416 mlOsm/kg. Po dalším měření byl zaznamenán mírný nárůst na hodnotu 1422 mlOsm/kg.

#### 5.2.3.5 K – kontrola – AndroMed

Kontrola osmotického tlaku čistého ředidla byla opět vedena souběžně s ředidly obsahující určitou koncentraci LDL – cholesterolu. Při prvním měření byla hodnota 1456 mlOsm/kg. Poté následoval mírný pokles osmotického tlaku na hodnotu 1429 mlOsm/kg. Za 48 hodin od začátku byl však již zaznamenán nárůst na hodnotu 1452 mlOsm/kg. Po 72 hodinách byla naměřena hodnota osmotického tlaku ve výši 1463 mlOsm/kg.

### 5.3 Shrnutí celkový změn pH

#### 5.3.1 Triladyl

Při srovnání Triladylu s příměsí určité koncentrace LDL – cholesterolu se srovnávacím ředidlem obsahujícím vaječný žloutek, bylo vyhodnoceno, jaká koncentrace LDL nejvíce odpovídá čistému ředidlu v ohledu hodnoty pH. Jako nejméně stabilní se ukázalo ředidlo s 9% LDL, jehož rozdíl hodnot pH mezi prvním a posledním měřením byl 0,24, kdežto u kontrolního čistého ředidla tento rozdíl činil 0,15. Naopak nejmenšího rozdílu mezi počáteční a konečnou hodnotou pH bylo dosaženo u ředidel s koncentracemi LDL 8, 7 a 6%. U Triladylu s 8 a 7% LDL činil rozdíl hodnoty pH shodně 0,22 a u ředidla s 6% LDL byl rozdíl 0,21, což je nejmenší naměřená odchylka pH od kontrolního čistého ředidla.

#### 5.3.2 Bioxcell

Ke srovnávacímu kontrolnímu ředidlu Bioxcellu se v tomto měření nejvíce přiblížilo ředidlo s 8% koncentrací LDL. Rozdíl ředidla s 8% LDL mezi prvním a posledním měřením pH dosáhl hodnoty 0,07. Srovnávací ředidlo mělo tuto hodnotu jen o jednu setinu nižší, tedy 0,06. S klesající koncentrací LDL se postupně zvyšoval rozdíl naměřených hodnot pH.

Bioxcell s 6% přídavkem LDL dosáhl změny hodnoty od prvního do posledního měření o 0,08 a ředidlo se 4% LDL pak 0,09. Nejhuře dopadl Bioxcell se 4%, jehož hodnota pH se od začátku měření zvýšila o 0,11.

### **5.3.3 AndroMed**

Na rozdíl od Bioxcellu u AndroMedu vycházely nižší změny hodnoty pH ředidlům s nejmenší koncentrací LDL. Nejmenší rozdíl hodnoty pH od srovnávacího čistého ředidla vyšla hodnota pH u vzorků s koncentrací 4 a 2% LDL. Ty dosahovaly stejné změny mezi prvním a posledním měřením jako kontrolní ředidlo, a to zvýšení hodnoty pH o 0,07. U AndroMedu s 6% LDL byl naměřen větší rozdíl, jeho hodnota byla 0,09. Nejhuře dopadla 8% koncentrace LDL. Rozdíl mezi mezními hodnotami činil 0,11, což je oproti čistému ředidlu nejvyšší odchylka.

## **5.4 Shrnutí celkových změn osmotického tlaku**

Osmotický tlak ve všech ředidlech s různými koncentracemi LDL – cholesterolu neprošel tak výraznými změnami ve srovnání s hodnotami pH. Počáteční hodnota osmotického tlaku se výrazně snížila u ředidel s nejvyšší koncentrací LDL oproti srovnávacímu čistému ředidlu. LDL – cholesterol sice způsobil pokles počáteční hodnoty osmotického tlaku, ale na výsledný rozdíl mezi prvním a posledním měřením neměl vliv.

## 6. Diskuze

Triladyl je jeden z typů ředidel založený na kryoprotektivních vlastnostech vaječného žloutku používaný při zpracování býčího ejakulátu. Dle ANTONA a kol. (2003) je známo, že žloutek má určité pozitivní vlastnosti při kryokonzervaci spermií, protože složky ve vaječném žloutku dokáží vytvořit absorbcí oleje a vody fázové rozhraní a zhotovit z kapiček oleje ochranný film. Jsou jimi stabilizace membrán nebo ochrana před chladovým šokem. Vaječný žloutek obsahuje fosfolipidy, v největším množství právě LDL – cholesterol, jež poskytují kryoochranu spermiím během zamrazování nebo tání tím, že zvyšují stabilitu plazmatických membrán (MOUSSA a kol., 2002).

Při výrobě se do Triladylu nepřidávají složky, které by více podpořily kryoochranu buněk, kromě glycerolu. Až těsně před použitím se toto ředidlo obohacuje o přefiltrovaný vaječný žloutek nebo právě o LDL – cholesterol. Například v ředidlech AndroMed a Bioxcell je ke glycerolu již při výrobě přidán sójový lecitin a fosfolipid rostlinného původu, který má stejně jako glycerol kryoprotektivní účinky. Dle HOLTA (2000), právě glycerol ochraňuje buňky tím, že vnikne dovnitř do buněčné cytoplazmy, čímž snižuje bod zmrznutí a koncentraci elektrolytů v nezmrazené části buňky. Oproti tomu, LDL obsažený ve vaječném žloutku ochraňuje buňku tak, že zabraňuje poškození membrány.

V České republice výrobci inseminačních dávek nepřidávají do ředidel LDL, ale jen čerstvý nebo ionizovaný vaječný žloutek, a to především kvůli obavám z bakteriální kontaminace (BERAN a kol., 2012).

Stejně jako MOUSSOVI a kol., (2002) se i v našem experimentu měnil osmotický tlak v závislosti na přidaném LDL. Čím větší koncentrace LDL – cholesterolu byla na počátku experimentu přidána do ředidla, tím nižší byl naměřený osmotický tlak, při dalších měřeních s postupem času je možné sledovat podobný trend, avšak již s drobnými odchylkami. MOUSSA a kol. (2002) ve svém článku uvádí, že tento jev může nastávat srážením fruktózy a solí obsažených v ředidle doplněným o LDL, nebo snížením osmotického tlaku způsobeném srážením LDL.

Po nahrazení vaječného žloutku LDL – cholesterolem v Triladylu byly hodnoty pH víceméně shodné. Ze statistického hodnocení zároveň vyplývá, že hodnota pH u tohoto ředidla vykazuje jistou nestálost, viz tabulka 10, ve srovnání s dalšími námi měřenými vzorky. MOUSSA a kol. (2002) ve svém článku doporučují koncentraci LDL v Triladylu mezi 5 – 10%, kdy je dosaženo nejvyššího procenta pohyblivých spermií, přičemž nejlepších

výsledků dosáhl přidavek 8% LDL do Triladylu. Toto tvrzení nelze dle našeho experimentu potvrdit, jelikož hodnota pH se po dvou hodinách začala poměrně rychle zvyšovat. Z toho je zřejmé, že Triladyl s 8% LDL lze použít pouze pro krátkodobou konzervaci, neboť při dlouhodobější konzervaci výraznější změna znamená zhoršené prostředí pro spermie ohrožující jejich přežitelnost a aktivitu.

Průměrné hodnoty osmotického tlaku se u Triladylu pohybovaly v rozmezí od 1322 do 1493 mOsm/kg. Nejmenší výkyvy byly zaznamenány u koncentrací 7 a 8% přídavku LDL. Dle pozorování MOUSSY a kol. (2002) osmotický tlak klesá se stoupajícím procentem přídavku LDL. V našem pokusu se toto tvrzení nepotvrdilo. Nejvyšší průměrnou hodnotu osmotického tlaku sice měl Triladyl s 6% LDL a se zvyšujícím se procentem přídavku LDL osmotický tlak skutečně klesal, poslední průměrná hodnota přídavku 10% LDL však oproti té s přídavkem 9% LDL opět stoupl. Lze tedy říci, že tendence osmotického tlaku s přídavkem LDL je skutečně klesající, nelze však jednoznačně hovořit o poklesu lineárního charakteru – viz tabulka 10.

U Bioxcellu s LDL přídavkem byly během měření v průběhu 72 hodin zaznamenány průměrné změny hodnoty pH v rozmezí od 6,73 – 6,79. Nejmenší výkyv byl změřen u 8% přídavku LDL – stálost, určená směrodatnou odchylkou, nabyla hodnoty 0,03 – viz tabulka 11. Ve srovnání s Triladylem jsou tyto hodnoty téměř o čtvrtinu nižší, tudíž by kombinace Bioxcellu a LDL – cholesterolu byla pro spermie mnohem příznivější. Nejnižší změna osmotického tlaku byla oproti očekávání zaznamenána u 4% přídavku LDL.

AndroMed jako jediné ředidlo dosáhlo nejnižších změn hodnot pH i osmotického tlaku ze všech měřených vzorků ředidel – konkrétně v 4% přídavku LDL – cholesterolu, jak lze pozorovat v tabulce 12.

Hodnoty Bioxcellu a AndroMedu nelze však s žádným předchozím pokusem srovnat, protože změny ukazatelů nebyly v žádné literatuře doposud hodnoceny.

AndroMed a Bioxcell, ředidla založená na jiné bázi než jsou ředidla žloutková, tedy na bázi sójového lecitinu, dosáhly lepších výsledků po přidání LDL – cholesterolu. Konkrétně ve stabilitě pH a osmotického tlaku oproti výše zmiňovanému Triladylu. V ředidlech AndroMed a Bioxcell, v nichž sójový lecitin tvoří ochrannou vrstvu kolem buňky, přídavek LDL představoval stabilizaci námi měřených hodnot, proto nedocházelo k takovým výkyvům jako u Triladylu.

Otázkou však zůstává, jak velká změna hodnoty pH ovlivní přežitelnost spermií v ředidle ať už s přídavkem LDL – cholesterolu nebo bez něj. Zatím se neví, o kolik je změna hodnoty pH, například v rozsahu 0,1, pro spermie zásadní. Hodnocení procentuální přežitelnosti



spermií o menší změně hodnoty pH v ředidle, může být do budoucna předmětem jiného experimentálního pokusu.

## 7. Závěr

Z pokusu vyplývá, že ředidlo Triladyly s LDL – cholesterolem příliš vhodné k dlouhodobé konzervaci spermatu, vzhledem kvůli vysoké změně hodnoty pH v čase. Ředidlo s přídatkem 8 a 7% LDL je z tohoto pohledu vhodné ke krátkodobé, maximálně však dvouhodinové, konzervaci býčího semene.

Hodnota osmotického tlaku v průběhu času byla u Triladyly s různou koncentrací LDL poměrně vyrovnaná a je tedy zřejmé, že hodnoty pH a osmotického tlaku jsou na sobě víceméně nezávislé.

Ředidlo Bioxcell v našem experimentu vyšlo se svými hodnotami pH jako nejlepší k dlouhodobému skladování semene, kdy se po třech dnech stabilizovala hodnota pH. Výjimkou jsou ředidla s 8 a 2 % LDL, kde docházelo k velkým výkyvům hodnoty pH. Bioxcell s 8 a 2% LDL jsou tak nejméně spolehlivými zástupci tohoto ředidla, a proto by bylo vhodné pro toto ředidlo zvolit spíše přídatky s 6% LDL nebo 4% LDL.

Největší změny osmotického tlaku byly naměřeny u ředidla Bioxcell s 8% LDL a zároveň, vcelku paradoxně, největší stability osmotického tlaku dosáhlo ředidlo s 2% LDL společně se 4% LDL. U ředidla se 6% LDL a kontrolního vzorku probíhaly změny hodnot osmotického tlaku shodně, ale v jiných rozmezích hodnot, přesto lze vzorek se 6% LDL zařadit mezi méně stabilní. Jako nejvhodnější koncentraci přídatku LDL do ředidla Bioxcell lze tedy doporučit 4%.

Celkově nejmenšími změnami hodnoty pH prošlo ředidlo AndroMed se 4 a 2% přídatku LDL – cholesterolu. Tyto koncentrace LDL zlepšily stabilitu hodnoty pH oproti čistému ředidlu. Proto byly vyhodnoceny jako nejvhodnější ke krátkodobé i dlouhodobé konzervaci býčího semene. Naopak 8 a 6% přídatek LDL úplně propadl. Velmi nestabilní hodnoty pH dokázaly, že tyto koncentrace by nebyly vhodné pro konzervaci.

Nejméně se měnící hodnoty osmotického tlaku byly naměřeny u AndroMedu s 8 a 4% LDL. Ostatní koncentrace LDL procházely změnami osmotického tlaku, ne zvláště významnými. Z hlediska obou sledovaných ukazatelů se tedy jako nejvhodnější jeví 4% přídatek LDL do ředidla AndroMed.

## Literatura

- Aires, V. A.; Hinsch, K. D.; 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.
- Akhter, S.; Ansari, M. S.; Rakha, B. A.; Andrabi, S. M. H.; Iqbal, S.; Ullah, N. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell® extender. *Theriogenology* **2010**, (74), 951–955.
- Amirat, L.; Anton, M.; Tainturier, D.; Chatagnon, G.; Battut, I.; Courtens, J. L. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction* **2005**, (129), 535–543.
- 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.
- Ball, P. J. H.; Peters, A. R. *Reproduction in cattle*, 3rd ed.; Blackwell Publishing: Oxford, UK, 2004, ISBN 1-4051-1545-9.
- Bencharif, R.; Amirat-Briand, M.; Garand, F.; Anton; Schmitt; Desherces; Delhomme; Langlois; Barrière; Destrumelle; Vera-Munoz Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (Low Density Lipoproteins). *Animal Reproduction Science* **2005**, (129), 535–543.
- Beran, J.; Stádník, L.; Ducháček, J. Vliv ředidla na aktivitu spermií. *Náš chov* **2011**, (1), 58–59, ISSN 0027-8068.
- Beran, J.; Stádník, L.; Bezdíček, J.; Louda, F.; Čítek, J.; Ducháček, J. Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and AI doses after thawing. *Archiv Tierzucht* **2012**, (3), 207–218, ISSN: 0003-9438.
- Celeghini, E. C. C.; Paes de Arruda, R.; Cesar de Andrade, A. F.; Nascimento, J.; Raphael, C. F.; Rodrigues, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different

extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science* **2008**, (104), 119–131.

Český svaz chovatelů masného skotu v Praze (ČSCHMS) IČO: 00536903, organizace oprávněná dle zákona č. 154/2000 Sb. [online]. Český svaz chovatelů masného skotu. Metodika OPB, leden 2006 [cit. 2012-06-04]. Dostupné z <[http://www.cschms.cz/DOC\\_LEGISLATIVA\\_svaz/137\\_Metodika\\_OPB.pdf](http://www.cschms.cz/DOC_LEGISLATIVA_svaz/137_Metodika_OPB.pdf)>

Ducháček, J.; Beran J. Zásady reprodukce u masného skotu. *Náš chov* [online] leden 2010 [cit. 2013-03-31]. Dostupné z <[http://www.agroweb.cz/Zasady-reprodukce-u-masneho-skotu\\_s524x40394.html](http://www.agroweb.cz/Zasady-reprodukce-u-masneho-skotu_s524x40394.html)>

Fuerst-Waltl, B.; Schwarzenbacher, H.; Perner, C.; Sölkner, J. Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *Animal Reproduction Science* **2006**, (95), 27–37.

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

Gillan, L.; Kroetsch, T.; Maxwell, W. M. Ch.; Evans, G. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science* **2008**, (103), 201–214.

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

Jedlička, M. Inseminace jelenů je již realitou [online]. *Náš chov*. Leden 2010 [cit. 2012-08-06] dostupné z <[http://www.naschov.cz/@AGRO/informacni-servis/Inseminace-jelenu-je-jiz-realitou\\_s485x35460.html](http://www.naschov.cz/@AGRO/informacni-servis/Inseminace-jelenu-je-jiz-realitou_s485x35460.html)>

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

Ježková, A. Inseminace je stále klíčovou metodou. *Náš chov* [online] březen 2012 [cit. 2012-06-06]. Dostupné z <[http://www.naschov.cz/@AGRO/informacni-servis/Inseminace-je-stale-klicovou-metodou\\_s485x59390.html](http://www.naschov.cz/@AGRO/informacni-servis/Inseminace-je-stale-klicovou-metodou_s485x59390.html)>

Kalludi, S.; Kalthur, G.; Benjamin, S.; Kumar, P.; Adiga, S. Controlled cooling versus rapid freezing of teratozoospermic semen samples: Impact on sperm chromatin integrity. *Journal of human reproductive sciences* **2011**, (4), 121–124

Kasimanickam, R.; Kasimanickam, V.; Tibary, A.; Pelzer, K. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4 °C. *Small Ruminant Research* **2011**, (99), 208–213.

Král, P. Testovací přípravování českého strakatého plemene. *Náš chov* **2008**, 4–6.

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.

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.

Louda, F.; Vaněk, D.; Ježková, A.; Stádník, L.; Bjelka, M.; Bezdiček, J.; Pozdíšek, J. *Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic*, 1st ed.; Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o: Rapotín, 2008, ISBN: 978-80-87144-05-3.

Malát, K. Testace plemenných býků masných plemen. *Náš chov* [online] duben 2012 [cit. 2012-06-03]. Dostupné z <[http://www.naschov.cz/@AGRO/informacni-servis/Testace-plemennych-byku-masnych-plemen\\_s485x59686.html](http://www.naschov.cz/@AGRO/informacni-servis/Testace-plemennych-byku-masnych-plemen_s485x59686.html)>

Mathevon, M.; Dekkers, J. C. M.; Buhr, M. M. Environmental, management and genetic factors affecting semen production in French Montbéliard bulls. *Livestock Production Science* **1998**, (55), 65–77.

Mocé, E.; Graham, J. K. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal reproduction science*, **2008**, (105), 104 – 118

Motyčka, J.; Koudelová, L. Výběr a prověřování mladých býků holštýnského plemene. *Náš chov* **2008**, 8–10.

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.

Nöhling, J. O.; Gerber, D.; Colenbrander, B.; Dijkstra, M.; Bakker, T.; De Cramer, K. The effect of homologous prostatic fluid on motility and morphology of dog epididymal spermatozoa extended and frozen in Biladyl with Equex STM paste or Andromed. *Theriogenology* **2007**, (67), 264–275.

Polák, L. *Inseminace skotu*, 1st ed.; Státní zemědělské nakladatelství: Praha, 1956.

Říha, J.; Petelíková, J.; Čerovský, J.; Bažant, J.; Bochenek, M.; Ptytloun, J. Plemenitba hospodářských zvířat. Asociace chovatelů masných plemen, Rapotín, Grafotyp Šumperk, 2003, ISBN 80-903143-4-1

Ptytloun, P.; Hřeben, F. Výběr býků do plemenitby a činnost ústředních odchoven plemenných býků. *Náš chov* [online] duben 2001 [cit. 2013-03-23]. Dostupné z [http://www.naschov.cz/@AGRO/informacni-servis/Vyber-byku-do-plemenitby-a-cinnost-ustrednich-odchoven-plemennyh-byku\\_s485x9574.html](http://www.naschov.cz/@AGRO/informacni-servis/Vyber-byku-do-plemenitby-a-cinnost-ustrednich-odchoven-plemennyh-byku_s485x9574.html)

Siddique, M.; Ali, R.; Raza, A. Effect of Buffers on Freezing of Buffalo Bull Semen. *Journal of Agriculture and Social Sciences* **2006**, 2 (2), 117–119.

Štípková, M.; Zavadilová, L.; Matějčková, J.; Bouška, J.; Krejčová, M. Vztahy mezi reprodukčními ukazateli holštýnských plemenic a jejich matek. *Náš chov* **2012**, 72 (4), 46–49, ISSN 0027-8068.

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.

Urban, F.; Bouška, J.; Čermák, V.; Doležal, O.; Fulka, J. (jr.); Fulka, J.; Futerová, J.; Homolka, P.; Jílek, F.; Kudrna, V.; Loučka, R.; Macháčová, E.; Marounek, M.; Mikšík, J.; Mudřík, Z.; Petr, J.; Poděbradský, Z.; Šereda, L.; Skřivanová, V.; Váchal, J.; Vetýška, J.; Žižlavský, J. *Chov dojeného skotu*; APROS: Hradec Králové, 1997, ISBN: 80-901100-7-X.

Vadnais, M. L.; Althouse, G. C. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology* **2011**, (76), 1508–1516.

van Wagtenonk-de Leeuw, A. M.; Haring, R. N.; Kaal-Lansbergen, L. M. T. E.; den Haas, J. H. G. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. *Theriogenology* **2000**, (54), 57–67.

Verberckmoes, S.; Van Soom, A.; Dewulf, J.; de Kruif, A. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen bulls. *Theriogenology* **2005**, (63), 912–922.

Věžník, Z.; Švecová, D.; Zajícová, A.; Přinosilová, P. *Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy*; Výzkumný ústav veterinárního lékařství: Brno, 2004, ISBN: 80-86895-01-7

Vishwanath, R.; Shannon, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal reproduction science*, **2000**, (62), 23 – 53

Watson, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* **2000**, (60-61), 481–492.

## Příloha

Tabulka 2 – Výpočet koncentrace LDL

<b>Triladyl</b> (V=1,5 ml)	ml LDL	<b>Bioxcell</b> (V=1,5 ml)	ml LDL	<b>AndroMed</b> (V=1,5 ml)	ml LDL
10%	0.15	8%	0.12	8%	0.12
9%	0.135	6%	0.09	6%	0.09
8%	0.12	4%	0.06	4%	0.06
7%	0.105	2%	0.03	2%	0.03
6%	0.09	-	-	-	-
-	Celkem 0.6	-	Celkem 0.3	-	Celkem 0.3

Tabulka 3 – Naměřené hodnoty pH Triladylu s LDL

<b>Triladyl</b>					
<b>Veličina</b>	<b>pH</b>				
<b>Čas testu (hod.)</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>
<b>+ 10% LDL</b>	6,56	6,6	6,73	6,73	6,78
<b>+ 9% LDL</b>	6,56	6,58	6,72	6,77	6,8
<b>+ 8% LDL</b>	6,56	6,56	-	6,78	6,78
<b>+ 7% LDL</b>	6,55	6,55	-	6,78	6,77
<b>+ 6% LDL</b>	6,56	6,58	-	6,75	6,77
<b>K - Kontrola</b>	6,58	6,58	6,7	6,72	6,73

Tabulka 4 – Naměřené hodnoty pH Bioxcellu s LDL

<b>Bioxcell</b>					
<b>Veličina</b>	<b>pH</b>				
<b>Čas testu (hod.)</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>
<b>+ 8% LDL</b>	6,7	6,71	6,74	6,74	6,77
<b>+ 6% LDL</b>	6,74	6,75	6,81	6,81	6,82
<b>+ 4% LDL</b>	6,73	6,74	-	6,81	6,82
<b>+ 2% LDL</b>	6,71	6,74	-	6,82	6,82
<b>K - Kontrola</b>	6,75	6,75	6,81	6,81	6,81



Tabulka 5 – Naměřené hodnoty pH AndroMedu s LDL

<b>AndroMed</b>					
<b>Veličina</b>	<b>pH</b>				
<b>Čas testu (hod.)</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>
<b>+ 8% LDL</b>	6,58	6,54	6,69	6,67	6,69
<b>+ 6% LDL</b>	6,61	6,58	6,73	6,7	6,7
<b>+ 4% LDL</b>	6,64	6,64	-	6,7	6,71
<b>+ 2% LDL</b>	6,63	6,63	-	6,7	6,7
<b>K - Kontrola</b>	6,63	6,63	6,7	6,7	6,7

Tabulka 6 – Naměřené hodnoty osmotického tlaku Triladyly s LDL

<b>Triladyl</b>				
<b>Veličina</b>	<b>Osmotický tlak [mOsm/kg]</b>			
<b>Čas testu (hod.)</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>
<b>+ 10% LDL</b>	1320	1316	1318	1333
<b>+ 9% LDL</b>	1328	1306	1313	1328
<b>+ 8% LDL</b>	1322	-	1314	1330
<b>+ 7% LDL</b>	1346	-	1352	1340
<b>+ 6% LDL</b>	1475	-	1501	1507
<b>K - Kontrola</b>	1565	1548	1518	1523

Tabulka 7 – Naměřené hodnoty osmotického tlaku Bioxcellu s LDL

<b>Bioxcell</b>				
<b>Veličina</b>	<b>Osmotický tlak [mOsm/kg]</b>			
<b>Čas testu (hod.)</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>
<b>+ 8% LDL</b>	1364	1334	1369	1342
<b>+ 6% LDL</b>	1516	1483	1495	1508
<b>+ 4% LDL</b>	1524	-	1515	1512
<b>+ 2% LDL</b>	1527	-	1521	1512
<b>K - Kontrola</b>	1580	1546	1546	1557

Tabulka 8 – Naměřené hodnoty pH Bioxcellu s LDL

<b>Triladyl</b>				
<b>Veličina</b>	<b>Osmotický tlak [mOsm/kg]</b>			
<b>Čas testu (hod.)</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>
<b>+ 8% LDL</b>	1257	1268	1259	1248
<b>+ 6% LDL</b>	1411	1373	1392	1392
<b>+ 4% LDL</b>	1417	-	1420	1411
<b>+ 2% LDL</b>	1446	-	1416	1422
<b>K - Kontrola</b>	1456	1429	1452	1463

Tabulka 9 – Údaje o býcích

<b>Datum odběru</b>	<b>Registr býka</b>	<b>Plemeno</b>	<b>Datum narození</b>	<b>Věk [měs.]</b>	<b>Dvojskok</b>	<b>Aktivita [%]</b>	<b>Hustota [10<sup>6</sup> / mm<sup>3</sup>]</b>	<b>Množství [g]</b>
30.10.2012	NEO 178	Holstein	3.9.2010	25	A	90	1,3	9,3
8.11.2012	NEO 141	Holstein	16.6.2010	30	A	85	1,3	11,1
13.11.2012	NEO 178	Holstein	3.9.2010	25	A	90	1,8	11,8
16.11.2012	ZAA 729	Aberdeen Angus	1.4.2008	55	A	85	1,3	8,5
20.11.2012	NEO 141	Holstein	16.6.2010	30	A	90	1,3	10,1
23.11.2012	ZGA 400	Galloway	6.3.2009	42	A	80	0,9	6,2
27.11.2012	NEO 141	Holstein	16.6.2010	30	A	90	0,9	10,8
30.11.2012	NEO 178	Holstein	3.9.2010	25	A	90	1,4	10,4

Tabulka 10 – Statistické vyhodnocení změn pH a osmotického tlaku v Triladylu

<b>TRILADYL</b>				
	<b>Průměrné pH</b>	<b>Směrodatná odchylka pH</b>	<b>Průměrný osmotický tlak</b>	<b>Směrodatná odchylka osmotického tlaku</b>
<b>+ 10% LDL</b>	6,68	0,095	1322	8
<b>+ 9% LDL</b>	6,69	0,110	1319	11
<b>+ 8% LDL</b>	6,67	0,110	1321	7
<b>+ 7% LDL</b>	6,66	0,113	1347	5
<b>+ 6% LDL</b>	6,67	0,096	1493	14
<b>K - kontrola</b>	6,66	0,076	1539	22

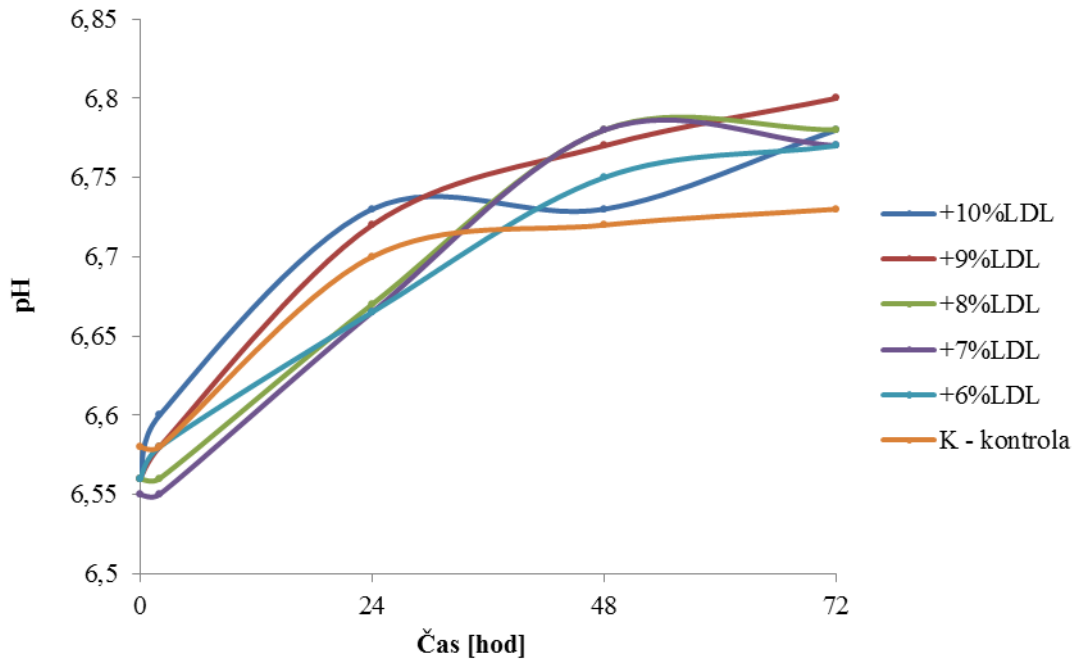
Tabulka 11 – Statistické vyhodnocení změn pH a osmotického tlaku v Bioxcellu

<b>BIOXCELL</b>				
	<b>Průměrné pH</b>	<b>Směrodatná odchylka pH</b>	<b>Průměrný osmotický tlak</b>	<b>Směrodatná odchylka osmotického tlaku</b>
<b>+ 8% LDL</b>	6,73	0,03	1352	17
<b>+ 6% LDL</b>	6,79	0,04	1501	15
<b>+ 4% LDL</b>	6,78	0,04	1518	5
<b>+ 2% LDL</b>	6,77	0,05	1521	6
<b>K - kontrola</b>	6,79	0,03	1557	16

Tabulka 12 – Statistické vyhodnocení změn pH a osmotického tlaku v Andromedu

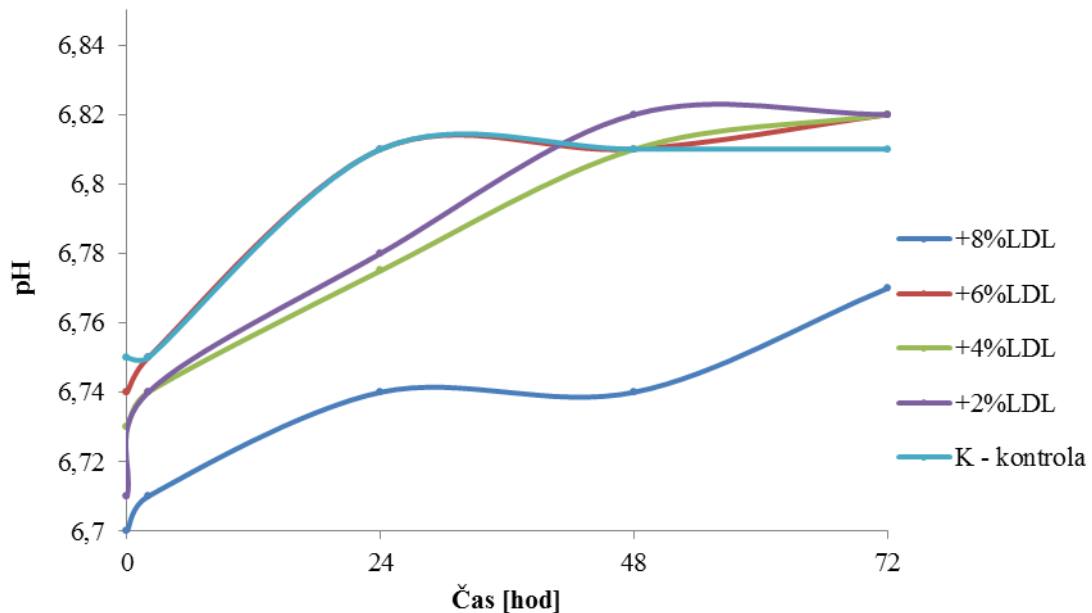
<b>ANDROMED</b>				
	<b>Průměrné pH</b>	<b>Směrodatná odchylka pH</b>	<b>Průměrný osmotický tlak</b>	<b>Směrodatná odchylka osmotického tlaku</b>
<b>+ 8% LDL</b>	6,63	0,07	1258	8
<b>+ 6% LDL</b>	6,66	0,07	1392	16
<b>+ 4% LDL</b>	6,67	0,03	1417	4
<b>+ 2% LDL</b>	6,67	0,04	1429	13
<b>K - kontrola</b>	6,67	0,04	1450	15

## Změna pH v závislosti na čase pro Triladyl



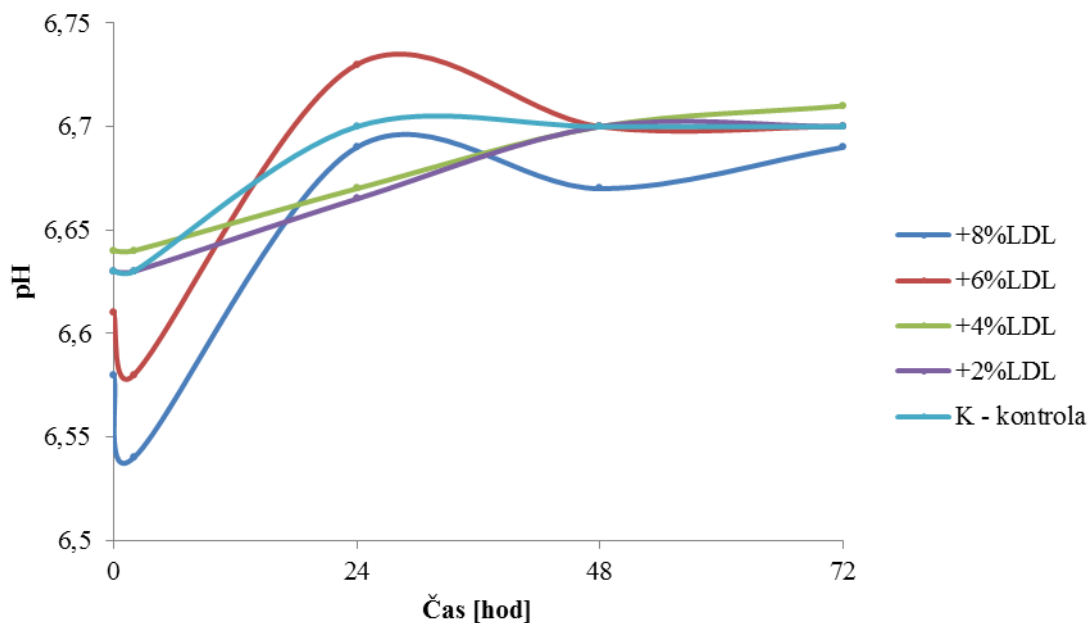
Graf 1 – Změna pH v závislosti na čase pro Triladyl.

## Změna pH v závislosti na čase pro Bioxcell



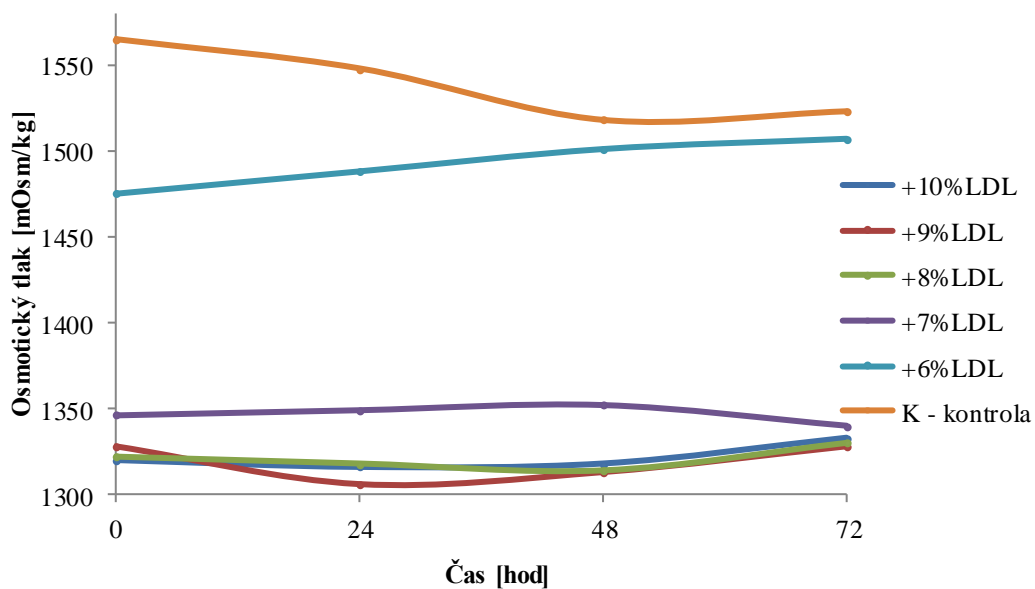
Graf 2 – Změna pH v závislosti na čase pro Bioxcell.

## Změna pH v závislosti na čase pro AndroMed



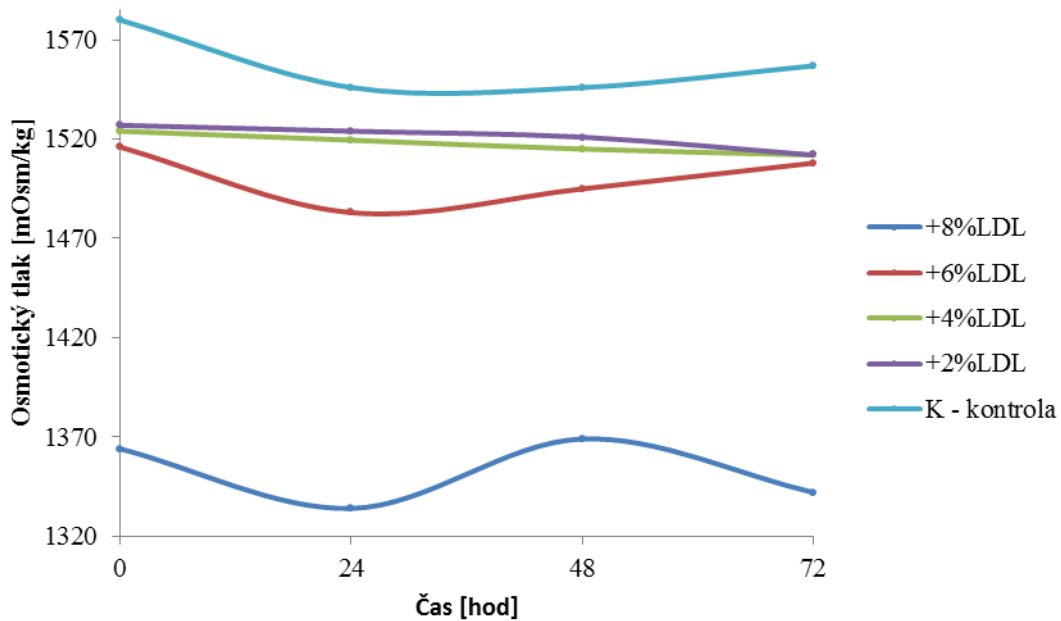
Graf 3 – Změna pH v závislosti na čase pro AndroMed.

## Změna osmotického tlaku v závislosti na čase pro Triladyl



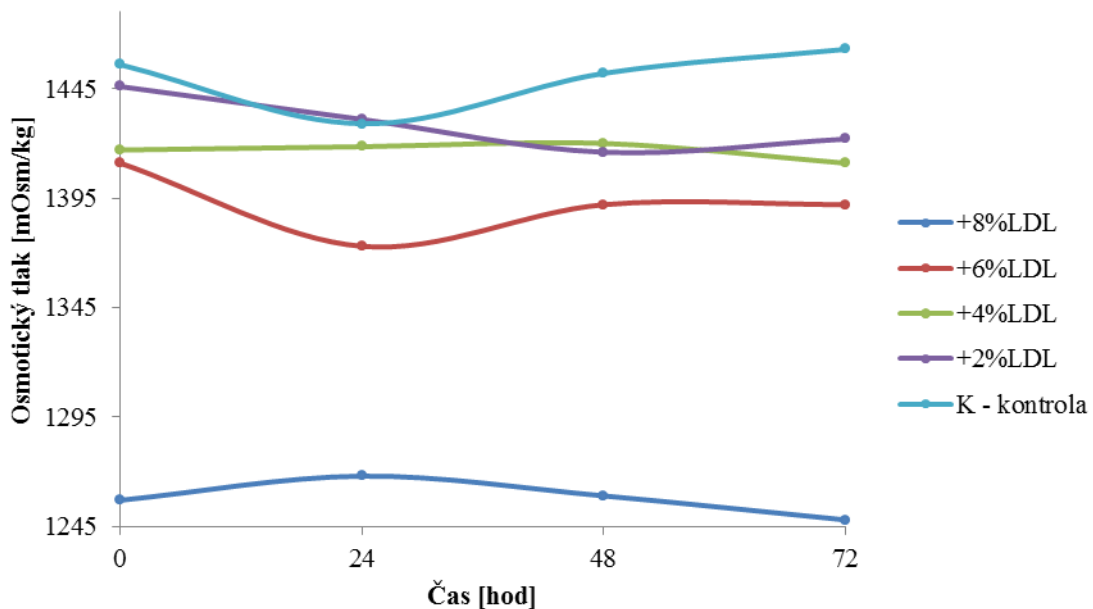
Graf 4 – Změna osmotického tlaku v závislosti na čase pro Triladyl.

## Změna osmotického tlaku v závislosti na čase pro Bioxcell



Graf 5 – Změna osmotického tlaku v závislosti na čase pro Bioxcell.

## Změna osmotického tlaku v závislosti na čase pro AndroMed



Graf 6 – Změna osmotického tlaku v závislosti na čase pro AndroMed.

## Seznam příloh

Tabulka 2 – Výpočet koncentrace LDL

Tabulka 3 – Naměřené hodnoty pH Triladyly s LDL

Tabulka 4 – Naměřené hodnoty pH Bioxcellu s LDL

Tabulka 5 – Naměřené hodnoty pH AndroMedu s LDL

Tabulka 6 – Naměřené hodnoty osmotického tlaku Triladyly s LDL

Tabulka 7 – Naměřené hodnoty osmotického tlaku Bioxcellu s LDL

Tabulka 8 – Naměřené hodnoty pH Bioxcellu s LDL

Tabulka 9 – Údaje o býcích

Tabulka 10 – Statistické vyhodnocení změn pH a osmotického tlaku v Triladyly

Tabulka 11 – Statistické vyhodnocení změn pH a osmotického tlaku v Bioxcellu

Tabulka 12 – Statistické vyhodnocení změn pH a osmotického tlaku v AndroMedu

Graf 1 – Změna pH v závislosti na čase pro Triladyly.

Graf 2 – Změna osmotického tlaku v závislosti na čase pro Triladyly.

Graf 3 – Změna pH v závislosti na čase pro Bioxcell.

Graf 4 – Změna osmotického tlaku v závislosti na čase pro Bioxcell.

Graf 5 – Změna pH v závislosti na čase pro AndroMed.

Graf 6 – Změna osmotického tlaku v závislosti na čase pro AndroMed.