

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Diplomová práce**

**Faktory ovlivňující mrazitelnost ejakulátu býků**

**Autor práce: Bc. Barbora Šulcová**

**Vedoucí práce: doc. MVDr. Radko Rajmon, PhD.**

© 2019 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

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

V Praze dne

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala panu MVDr. Radko Rajmonovi, PhD., za odborné vedení a pomoc při zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala celému týmu z inseminační stanice v Zásrukách, panu MVDr. Michalu Karešovi a Šárce Málkové, za představení chodu stanice, vysvětlení postupů a technologií a zejména za vlídný přístup, který provázal celou naši spolupráci.

## Souhrn

Býčí ejakulát je ovlivňován mnoha faktory. Pro produkci kvalitního ejakulátu je potřeba funkční pohlavní soustava s normálním hormonálním profilem a spermatogenezí. Nicméně ejakulát je ovlivňován nejen individualitou býka ale také dalšími faktory. Mezi vnitřní faktory jsou řazeny neurohumorální činnost, věk, plemeno a zdravotní stav zvířete. Mezi vnější faktory je řazena výživa, frekvence odběru, samotný odběr a následné zpracování ejakulátu, životní a klimatické podmínky.

Cílem práce bylo ověřit hypotézu, že kvalitativní parametry čerstvého ejakulátu a jeho mrazitelnost (objem, motilita, koncentrace, aktivita po rozmrazení) jsou významně ovlivňovány individualitou býka, termínem odběru, ročním obdobím, a hypotézu, že aktivita spermií po rozmrazení koreluje s kvalitativními parametry původního čerstvého ejakulátu (objem, koncentrace, motilita). K testování bylo využito výsledků hodnocení ejakulátu 59 býků z inseminační stanice v Zásnukách. Byl hodnocen nativní ejakulát a následně, minimálně 24 hodin po mrazení, byla hodnocena motilita ejakulátu po rozmrazení.

Z vnitřních faktorů byl v této práci testován vliv individuality býka, plemene a věku. Z vnějších faktorů byla práce zaměřena na období odběru, kdy bylo hodnoceno roční období a poté jednotlivé měsíce. Následně byla provedena analýza závislostí mezi jednotlivými kvalitativními vlastnostmi ejakulátu (objem, denzita, motilita, celkový počet spermií).

Výsledky prokázaly významný ( $p < 0,05$ ) vliv individuality býka na objem, denzitu a celkový počet spermií. Plemeno ovlivňovalo významně ( $p < 0,05$ ) všechny hodnocené parametry ejakulátu. Věk býka byl významný ( $p < 0,05$ ) pro objem, denzitu a celkový počet spermií. Při hodnocení vlivu období odběru byly prokázány významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) pro roční období a objem, respektive motilitu ejakulátu. Měsíc měl významný ( $p < 0,05$ ) vliv na objem, celkový počet spermií, motilitu nativního ejakulátu. Nejvíce se vliv měsíce prokázal u motility ejakulátu po mrazení. Analýza závislostí prokázala různě silné závislosti mezi jednotlivými parametry ejakulátu.

Parametry býčího ejakulátu byly významně ovlivňovány býkem, jeho věkem a plemennou příslušností. Vliv na kvalitu ejakulátu mělo i období odběru.

**Klíčová slova:** býčí ejakulát, kryokonzervace, reprodukce, motilita spermií, přežitelnost, mrazitelnost

## Summary

The ejaculate of bulls is influenced by many factors. For the production of quality ejaculate is needed the functional reproduction system with optimal hormonal profile and spermatogenesis. However, ejaculate is influenced not only by the bull's individuality but also by other factors. These factors are divided into internal and external. The internal factors include neurohumoral activity, age, breed, and animal health. The external factors include nutrition, sampling rate, collection and subsequent processing of ejaculate, living and climatic conditions.

The aim of the work was to verify the hypothesis that the qualitative parameters of fresh ejaculate and its freezability (volume, motility, concentration, activity after thawing) are significantly influenced by the individuality of the bull, the time of collection, the season, and the hypothesis that sperm activity after thawing correlates with qualitative parameters of the original fresh ejaculate (volume, concentration, motility). The results of the evaluation of the ejaculate of 59 bulls from the insemination center in Zásmyky were used for testing. The native ejaculate was evaluated and then, ejaculate motility after thawing was evaluated at least 24 hours after freezing

In this study was tested influence of bull's individuality, breed and age. Out of the external factors, the work was focused on the sampling period, when the seasons were evaluated and then the months. Subsequently, the analysis of dependencies between individual qualitative semen traits (volume, density, motility, total sperm count) was performed.

The results showed a significant effect ( $p < 0,05$ ) of bull individuality on volume, density and total sperm count. The breed significantly affected ( $p < 0,05$ ) all semen traits which were evaluated. The age of the bull was significant ( $p < 0,05$ ) for volume, density and total sperm count. Significant differences have been proved ( $p < 0,05$ ) for the seasons and volume and / or motility of the ejaculate in the evaluation of the sampling period. The month had a significant effect ( $p < 0,05$ ) on volume, total sperm count, native ejaculate motility. The most significant influence of the month was on motility of the ejaculate after freezing. Dependency analysis showed different strengths of dependency between the semen traits.

The parameters of the bull ejaculate were significantly influenced by the bull, its age and breed. The period of collection also had an impact on the quality of the ejaculate.

**Keywords:** ejaculate of bulls, cryopreservation, reproduction, sperm motility, survivability, freezability

# 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 Reprodukční soustava býků .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>3.2 Spermatogeneze.....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>3.3 Spermie býka .....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>3.4 Býčí ejakulát .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>3.5 Faktory ovlivňující produkci a kvalitu býčího ejakulátu.....</b>            | <b>11</b> |
| 3.5.1 Endogenní faktory působící na kvalitu ejakulátu býků .....                   | 12        |
| 3.5.2 Exogenní faktory působící na kvalitu ejakulátu býků .....                    | 17        |
| <b>4 Metodika .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>5 Výsledky .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>5.1 Vliv býka .....</b>   | <b>24</b> |
| <b>5.2 Vliv plemene .....</b>  | <b>25</b> |
| <b>5.3 Vliv období odběru.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>5.4 Vliv věku .....</b>   | <b>36</b> |
| <b>5.5 Vztah mezi kvalitativními parametry ejakulátu a motilitou po rozmrazení</b> | <b>39</b> |
| <b>6 Diskuze .....</b>   | <b>41</b> |
| <b>7 Závěr.....</b>  | <b>46</b> |
| <b>8 Zdroje.....</b>   | <b>47</b> |

# 1 Úvod

Předpokladem pro úspěch asistované reprodukce je získání kvalitního ejakulátu od kvalitního býka, jehož vlastnosti se budou předávat dál. Kvalitu býka udávají nejen jeho užitkové vlastnosti. Pro plemenného býka je ukazatelem kvality také jeho sexuální aktivita a kvalita jeho ejakulátu (Rehman et al. 2016). Kvalita ejakulátu je ovlivňována mnoha faktory. Mezi ty nejvýznamnější vnitřní faktory patří plemeno, věk, genetické předpoklady a libido (Ahmad et al. 2003; Beran et al. 2011). Kvalitativní ukazatele ejakulátu ale nejsou ovlivňovány pouze býkem samotným. Jedná se o soubor vnitřních a vnějších faktorů. Mezi ty vnější jsou řazeny zejména klimatické podmínky, životní pohoda zvířat a úroveň výživy. Je pravděpodobné, že reprodukční výkonnost ovlivňuje i období, ve kterém je sperma odebírané (Louda 2001; Snoj et al. 2013). Rizikovým faktorem je manipulace s ejakulátem během odběru a následně během jeho zpracování (Saragusty et al. 2009).

Dnes je vysoká poptávka po hluboce zmrazených inseminačních dávkách, které usnadňují chovatelům udržení chovu a umožňují využívat ejakulát od vysoce kvalitních býků, což by bez možnosti mražené inseminační dávky mnohdy nebylo proveditelné. Vysoké požadavky si žádají stále lepší metody zmrazování spermatu s co nejnižší ztrátou kvality ejakulátu, protože během zmrazování dochází ve spermiích k některým nevratným změnám, které snižují jejich životaschopnost a zhoršují tak schopnost oplození (Saragusty et al. 2009).

Pokud chceme získat kvalitní inseminační dávku, je potřeba získat kvalitní nativní ejakulát. Proto je vhodné vědět, které faktory mohou kvalitu ejakulátu snížit. Tato práce se zabývá základními vnitřními faktory, což je plemeno a věk býka. Z vnějších faktorů se zaměřuje na období odběru a jeho efekt na parametry ejakulátu. Hodnoceny jsou také závislosti jednotlivých kvalitativních ukazatelů mezi sebou.

## **2 Cíl práce**

Cílem práce je na datech z inseminační stanice ověřit hypotézu, že aktivita spermií po rozmrazení koreluje s kvalitativními parametry původního čerstvého ejakulátu (objem, koncentrace, motilita).

Dalším cílem je na stejných datech ověřit hypotézu, že kvalitativní parametry čerstvého ejakulátu a jeho mrazitelnost (objem, motilita, koncentrace, aktivita po rozmrazení) jsou významně ovlivňovány individualitou býka, termínem odběru, ročním obdobím.



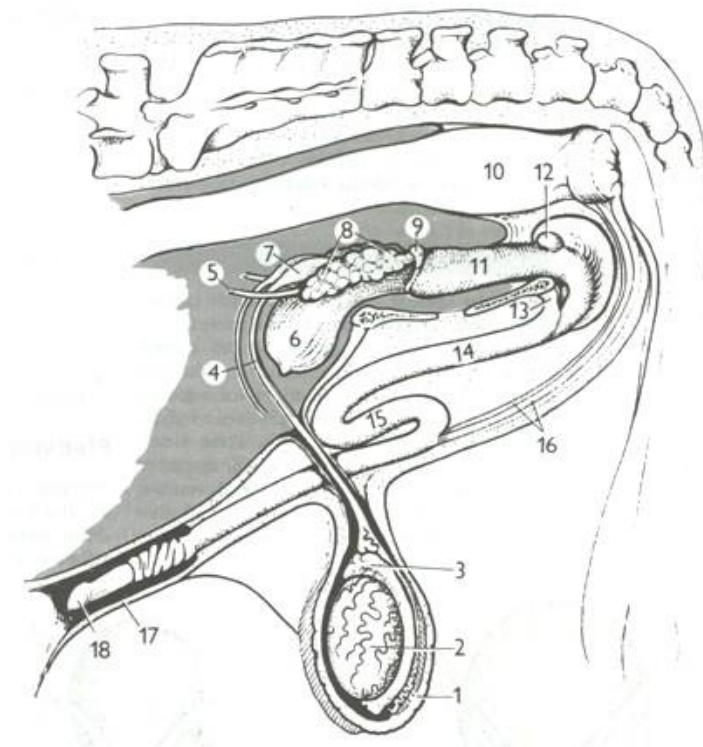
## 3 Literární přehled

### 3.1 Reprodukční soustava býků

Býci hrají významnou roli v reprodukci skotu, ať už se jedná o přirozenou plemenitbu nebo asistovanou reprodukci. Pro docílení požadovaných hodnot fertility je potřeba správného fungování reprodukční soustavy a produkce kvalitního, oplození schopného ejakulátu (Hafez et al. 2000).

Funkcí pohlavního aparátu není pouze produkce oplození schopných pohlavních buněk, spermií. Ke správnému fungování pohlavních funkcí je potřeba také produkce pohlavních hormonů (varlata), neméně důležitou roli hrají v reprodukci výměšky přídatných pohlavních žláz a libido samce. Všechny tyto části jsou nepostradatelné pro uskutečnění pohlavního styku. Reprodukční soustava býků (Obrázek 1) je tvořena pohlavními žlázami (varlata), vývodnými pohlavními cestami (chámovod, nadvarle), přídatnými pohlavními žlázami (semenné vāčky, Cowperovy žlázy a prostata), kopulačním orgánem (pyj) a šourkem (Jelínek et al. 2003).

**Obrázek 1 Pohlavní soustava býka (Marvan 2011)**



#### Uložení pohlavních orgánů býka

- 1 – šourek
- 2 – varle
- 3 – hlava nadvarlete
- 4 – chámovod
- 5 – močovod
- 6 – močový měchýř
- 7 – ampule chámovodu
- 8 – měchýřkovitá žláza
- 9 – tělo předstojné žlázy
- 10 – konečníková ampule
- 11 – močová trubice
- 12 – bulbouretrální žláza
- 13 – rameno pyje
- 14 – tělo pyje
- 15 – esovité ohbí pyje
- 16 – zatahovač pyje
- 17 – předkožka
- 18 – žalud pyje

- Varlata a šourek

Varlata jsou párová samčí pohlavní žláza uložena mimo tělní dutinu v kožním vaku, šourku, kam sestupují prenatalně z břišní dutiny zhruba v 5. měsíci vývoje plodu. Šourek má významnou funkci v termoregulaci varlat. Udržuje teplotu o 3–4 °C níže než je teplota těla, což je důležitý faktor při spermatogenezi. Varlata jsou vejčitého tvaru, ze stran zploštělé, o hmotnosti zhruba 250-300 g. Na povrchu varlete je tenká serózní blanka, tunica vaginalis. V semenotvorných kanálcích varlat jsou produkovány spermie. Dále jsou varlata místem tvorby samčího pohlavního hormonu – testosteronu (Marvan 2011; Sláma et al. 2015). Parenchym varlat je dělen ve zhruba 250 testikulárních lalůček, z nichž každý obsahuje 1–4 stočené semenotvorné kanálky, které jsou tvořeny zárodečným (spermatogenním) epitelem. Probíhají v nich jednotlivé fáze spermatogeneze. Mezi semenotvornými kanálky se nachází řídké vazivo intersticiium, v němž jsou vmezeřeny velké intersticiální buňky (Leydigovy) bohaté na agranulární endoplazmatické retikulum, ve kterém je produkován testosteron (Jelínek et al. 2003; Sláma et al. 2015).

Druhým typem buněk, které tvoří zárodečný epitel, jsou buňky podpůrné (Sertoliho). Tyto buňky nasedají na bazální membránu a jejich tělo je vybaveno výběžky, kterými jsou ohraničeny dutinky se spermatogenními buňkami. Ve varleti se při bazální membráně nachází primitivní zárodečné buňky, spermatogonie, s vysokou mitotickou aktivitou. Ve střední vrstvě zárodečného epitelu se nachází spermatocyty I. a II. řádu s meiotickou aktivitou. Při lumen semenotvorného kanálku se vyskytují malé kulovité spermie, které se zanořují do podpůrných buněk, kde probíhá metamorfóza ve spermie (Neill et al. 2006; Sláma et al. 2015).

- Nadvarle a chámovod

Nadvarle a chámovod tvoří vývodné pohlavní cesty, které slouží k odvádění spermií a výměšků přídatných pohlavních žláz. Nadvarle nasedá na varle a je členěno na tři části: hlavu, tělo a ocas. Hlava je tvořena asi 15–20 lalůčky, složených z odvodných kanálků varlete, které se spojují na přechodu hlavy a těla nadvarlete a vytváří tak vývod nadvarlete (Jelínek et al. 2003). V nadvarleti jsou spermie shromažďovány a dozrávají zde. Z varlete přichází spermie neschopné oplození, v nadvarleti přichází do styku se sekrety bohatými na tuky a dalšími látkami, které zvyšují odolnost povrchových membrán spermií. Spermie jsou při ejakulaci z nadvarlete vypuzovány pohyby hladké svaloviny do chámovodu (Jelínek et al. 2003; Sláma et al. 2015).

Chámovod je párová trubice spojující ocas nadvarlete s močovou trubicí. Spermie jsou do něj vypuzovány při ejakulaci z ocasu nadvarlete. Chámovod spolu s varletní tepnou, žílou, nervem, lymfatickými cévami a svalem vnitřního zdvihače varlete vytváří semenný provazec (Jelínek et al. 2003; Reece 2011). Terminální část chámovodu se rozšiřuje v tzv. ampuli chámovodu. Jedná se o žláznatou část produkující hlenovitý sekret, který stimuluje metabolickou aktivitu spermií. Do močové trubice jsou spermie vypuzeny při ejakulaci peristaltickými stahy spolu se sekretem měchýřkovitých žláz (Sláma et al. 2003).

- Pyj

Pyj (penis) je kopulační orgán, u býka válcovitého tvaru, který může při ejakulaci dosahovat délky až 1 metru a jeho funkcí je dopravení semene do samičího pohlavního ústrojí. Je tvořen kořenem, který je připojen na kaudální plochu sedacích kostí, a tělem pyje. Kraniální část pyje tvoří žalud. V ochablém stavu je pyj uložen v předkožce a zhruba v polovině své délky tvoří esovité ohbí, které je při erekci narovnáno. Aby bylo možné zasunout penis do pochvy, je nutné pohlavní dráždění, které vede k erekci – napřímení a zvětšení objemu pyje. Pro tento účel má penis speciální stavbu. Je tvořen topořivým a houbovitým tělesem, močovou trubicí, pomocnými svaly, cévami a nervy (Sova 1990; Marvan 2011; Reece 2011).

- Přídavné pohlavní žlázy

Mezi přídavné pohlavní žlázy patří ampule chámovodu, měchýřkovité žlázy, bulbouretrální (Cowperovy) žlázy a žláza předstojná, prostata. Jedná se o žlázy produkující sekrety důležité pro vytvoření vhodného prostředí pro přežití spermií v samičím pohlavním traktu. Obsahuje elektrolyty, fruktózu, kyselinu askorbovou a další vitamíny. Semenná plazma je při ejakulaci smíchána se spermii a tekutinou nadvarlete a vytváří semeno (Reece 2011; Sláma 2015).

Měchýřkovité žlázy jsou párové, jejich sekret je vylučován ke konci ejakulace a obsahuje hlavně fruktózu, kyselinu askorbovou, citronovou, flaviny a další látky. Cukry jsou hlavním energetickým zdrojem pro spermie (Jelínek et al. 2003). Sekret prostaty je vylučován při ejakulaci těsně před spermii a poté i s nimi. Obsahuje volné aminokyseliny a anorganické soli, cukry ne. Bulbouretrální žlázy jsou také párovými žlázami, jejichž sekret je vylučován převážně na konci ejakulace (Jelínek et al. 2003; Reece 2011; Sláma 2015).

### 3.2 Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces, při kterém se kmenové buňky přeměňují na spermie. Základním dějem probíhajícím při spermatogenezi je namnožení prvopohlavních buněk (monocytů) v embryonálním základu gonád. Z těchto buněk pak vznikají spermatogonie. U býků začíná spermatogeneze v 7. – 9. měsíci věku a probíhá v pravidelných cyklech kontinuálně v průběhu celého reprodukčního období života. U býka je uváděno, že délka jednoho spermatogenního cyklu odpovídá zhruba 54 dnům (Jelínek et al. 2003). Dělí se na spermatocytogenezi a spermiogenezi. V procesu spermatogeneze probíhají dva typy dělení buněk, mitóza a meióza. Během mitotického dělení vznikají z mateřské buňky dvě dceřiné buňky s diploidním počtem chromozómů, zatímco během meiotického dělení vznikají buňky haploidní. Zralá spermie má haploidní počet chromozómů (Marvan 2011; Reece 2011).

Spermatocytogeneze může být rozdělena na několik období podle probíhajících procesů. Období rozmnožování nebo také období mitotického dělení je specifické opakovaným mitotickým dělením kmenových buněk, spermatogonií. Během mitotického dělení vzniká ze spermatogonie jedna buňka, která zůstává uložena na původním místě, a druhá buňka, spermatogonie typu A, která migruje do buněk blízko dutiny kanálku. A-spermatogonie podléhají dalšímu mitotickému dělení, ve kterém je mnohdy zahrnuto i několik generací buněk. Výsledkem je velké množství spermatogonií typu B. Z B-spermatogonií vznikají dalším mitotickým dělením spermatocyty I. řádu, nebo také primární spermatocyty s dvojnásobným počtem chromozómů –  $2n$  (Jelínek et al. 2003; Reece 2011).

Na období rozmnožování navazuje období růstu, během kterého spermatocyt I. řádu zvětšuje svůj objem a připravuje se na vstup do další fáze, kterou je období zracího dělení (Jelínek et al. 2003). Období zrání je charakterizováno dvěma po sobě jdoucími meiotickými děleními, do nichž vstupují spermatocyty I. řádu. Během prvního dělení vznikají dva spermatocyty II. řádu a v následujícím dělení vznikají čtyři spermatidy. Dochází k redukci počtu chromozómů na polovinu, diploidní se přeměňuje na haploidní. V každé spermatidě je obsažen jen jeden sexchromozom X-, nebo Y-. Také dochází k rekombinaci genetických vloh (Jelínek et al. 2003). U býka z jedné spermatogonie typu A vzniká 64 spermatid, které dozrávají blízko lumen kanálku (Reece 2011).

Kulovité spermatidy vstupují do poslední fáze spermatogeneze, kterou je období metamorfózy. V této fázi dochází k sérii jaderných a cytoplazmatických změn, při nichž se nepohyblivé spermatidy transformují do potenciálně pohyblivých buněk s bičíkem (Jelínek et al. 2003; Reece 2011).

Tyto nově vytvořené spermie jsou nepohyblivé a jsou dopravovány do nadvarlete. Reece (2011) uvádí, že zhruba 70 % celkové produkce spermií je shromažďováno v ocasu nadvarlete. Teprve při průchodu nadvarletem získávají spermie schopnost se pohybovat a schopnost oplození. Dochází ke změně jaderného chromatinu a ke změně povrchové struktury plazmatické membrány. Býčí pohlavní aparát za den vyprodukuje  $2,5 - 9,0 \cdot 10^9$  spermií. Jeden gram testikulární tkáně je schopen vyprodukovat  $5-10 \cdot 10^3$  spermií za 1 minutu, za den  $7-14 \cdot 10^6$  spermií (Jelínek et al. 2003). Denní produkce spermií se u býků s věkem zvyšuje. Maxima dosahuje ve věku okolo 7 let (Reece 2011).

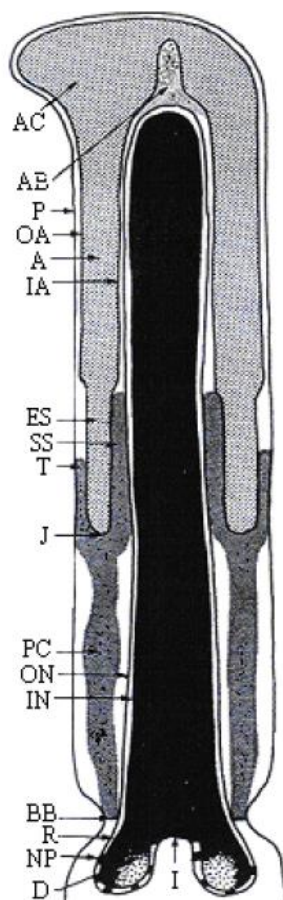
### 3.3 Spermie býka

Spermie jsou zralé pohlavní buňky schopné samostatného pohybu, jejichž cílem je vyhledání a oplození vajíčka. Jsou složeny z hlavičky a bičíku.

Hlavička spermie (Obrázek 2) je zploštělého oválného tvaru a její utváření se liší u jednotlivých živočišných druhů. Podstatou hlavičky je jádro obalené jadernou membránou. Přední strana hlavičky je kryta akrozómem, který je zakončen ekvatoriálním segmentem poloměsíčitého tvaru. Akrozóm obsahuje akrozómovou hmotu, ve které se nachází řada enzymů (hyaluronidáza, proakrozín, akrozín, aj.) podílejících se na průniku spermie do vajíčka (Neill et al. 2006). Gamčík et al. (1976) uvádí, že akrozóm býčí spermie není tak pevné konzistence jako zbytek spermie a je velmi náchylný na změny vnějšího prostředí. V jádře spermie se nachází pouze poloviční množství DNA. Hlavička spermie býka je asi 10  $\mu\text{m}$  dlouhá, 5  $\mu\text{m}$  široká a 1,5  $\mu\text{m}$  tlustá (Jelínek et al. 2003; Marvan 2011).

Bičík spermie je uzpůsoben pro pohyb a zprostředkovává transport spermie na místo oplození. Bičík se skládá z centriolového (krčku spermie), mitochondriálního (spojovacího), hlavního a koncového oddílu bičíku. Podklad celého bičíku tvoří osové vlákno. Středem osového vlákna vedou dva mikrotubuly obklopené vnitřním kruhem devíti dvojic filament. Na povrchu osového vlákna vedou téměř celým bičíkem hladké provazce, které mají podobu devíti silných podélných vláken. V proximálním úseku bičíku jsou segmentovaného charakteru. Nejsilnější částí bičíku je mitochondriální část, kde je osové vlákno obaleno mitochondriální pochvou, která vznikla seskupením mitochondrií do souvislé spirály. U býka se spojuje asi 90 mitochondrií do 65–70 závitů. Mitochondriální pochva je důležitá pro pohyb spermie, protože obsahuje ATP a enzymy nezbytné pro pohyb. Celý bičík je kryt cytoplazmatickou membránou. Spermie býka dosahuje délky 75–80  $\mu\text{m}$  (Jelínek et al. 2003; Marvan 2011).

**Obrázek 2 Řez hlavičkou bovinní spermie (Věžník et al. 2004)**



#### **Hlavička spermie**

- AC – apikální hřeben
- AB – apikální tělísko (vakuola)
- P – plazmatická membrána
- OA – vnější akrozomální membrána
- A – akrozom
- IA – vnitřní akrozomální membrána
- ES – ekvatoriální segment
- SS – subakrozomální prostor
- T – přechodná zóna
- J – postakrozomální pochva
- PC – postakrozomální kalíšek
- ON – jaderná membrána
- IN – povrch jaderné membrány
- BB – bazální lamina
- R – propustná část jaderné membrány
- NP – jaderné póry
- D – bazální granula
- I – implantační rýha

Celou spermii, tedy hlavičku a všechny oddíly bičíku, pokrývá dvouvrstevná cytoplazmatická membrána, která je acidorezistentní, vysoce permeabilní a citlivá na změny osmotického tlaku, vytvářející základní ochranu spermie. Permeabilita umožňuje látkovou výměnu a na základě prostupnosti některých látek byla vypracována metoda vitálně letálního barvení rozlišující živé a mrtvé spermie. K poškození permeability dochází například při dlouhodobé konzervaci spermií (mrazení), což má většinou za následek snížení oplozovací schopnosti spermie (Gamčík et al. 1976).

Obsah sušiny ve spermii je kolem 25 %. Základní části spermie se ve svém chemickém složení značně liší. Zatímco hlavička spermie je tvořena převážně kyselinou deoxyribonukleovou, spojovací část a bičík je charakteristický vysokou koncentrací lipidů a různých enzymů. Akrozom pokrývající hlavičku spermie tvoří mukopolysacharidy (Gamčík et al. 1984). Kyselina deoxyribonukleová v hlavičce spermie představuje hlavní genetický materiál všech buněk, a proto má její poškození zásadní vliv na oplozovací schopnost

spermie. Spojovací část a bičík spermie jsou tvořeny především fosfolipidy, které se vážou na bílkoviny. Hlavní složkou fosfolipidů v semeni je plasmogen, který v semeni býka dosahuje hodnot od 30–90 mg/100 ml. Cytoplazmatická membrána tvořená proteinem podobným keratinu je velice pružná. Minerální látky se ve spermii vyskytují především ve fosforečné formě, méně pak ve formě chloridové a síranové. V ejakulátu byla prokázána řada enzymů, které se vyskytují především ve spermích, ale některé jsou přítomny i v semenné plazmě (Gamčík et al. 1976).

### 3.4 Býčí ejakulát

Pokud dojde k dostatečnému zesílení sexuální stimulace, reflexní centrum v páteřní míše vyše podněty pro výron a ejakulaci semene. Spermie a tekutina z chámovodu a ampule chámovodu jsou vyprazdňovány do močové trubice společně s tekutinou z přídatných pohlavních žláz, semennou plazmou (Reece 2011).

U býka se při pohlavním vzrušení vylučují nejprve sekrety bulbouretrálních žláz, které upravují pH uretery. Po této fázi dochází k vylučování spermií a sekretů ostatních přídatných žláz. Po odstředění 5 ml hustého semene je možno získat cca 4,5 ml semenné plazmy. Z toho lze odvodit, že semenná plazma se na celkovém ejakulátu býka podílí zhruba z 90 %. Ejakulát býka je bohatý zejména na fruktózu, kyselinu citronovou a glycerylfosforylcholin. Fruktóza je hlavním zdrojem energie pro spermie. V ředěném ejakulátu býka, pokud nejsou přítomny jiné glykolysující látky, musí být v 1 ml cca 0,25 mg fruktózy, pro udržení pohyblivosti spermií. Tvorbu fruktózy ovlivňuje testosteron, její obsah v semeni je proto dobrým ukazatelem endokrinní funkce varlat a předního laloku hypofýzy (Gamčík et al. 1976).

Objem ejakulátu u plemenných zvířat závisí na pravidelných intervalech odběru, stavu endokrinní soustavy a na stupni erotizace v době odběru. Jelínek et al. (2003) a Věžník (2004) udává hodnotu objemu býčího ejakulátu kolem 4 ml. Při dvou odběrech bez většího časového intervalu mezi nimi je objem ejakulátu z druhého odběru větší než u prvního (Gamčík et al. 1976). Průměrná specifická váha semene činí  $1,036 \pm 0,008$ . Předpokládá se, že specifickou váhu semene býka ovlivňuje počet zralých (těžších) a nezralých (lehčích) spermií v ejakulátu. Objektivním ukazatelem aktivity spermiogenního epitelu je množství spermií v 1 ml ejakulátu a v celém objemu ejakulátu. Viskozita a specifická váha spermatu závisí hlavně na koncentraci spermií. (Gamčík et al. 1984). Marvan (2011) uvádí množství spermií u býků 1 milion na  $1 \text{ mm}^3$ . Kliment (1983) a Věžník (2004) udávají minimální koncentraci spermií v ejakulátu použitého na výrobu inseminačních dávek 700 000 na  $1 \text{ mm}^3$ .

Hodnoty osmotického tlaku prostředí musí odpovídat hodnotám osmotického tlaku spermií. Všechny změny a poruchy osmotických poměrů v ejakulátu nepříznivě ovlivňují životnost spermií (Gamčík et al. 1979).

Laboratorní kontrola spermatu umožňuje eliminaci nekvalitních ejakulátů a produkci kvalitních inseminačních dávek, a tak zajištění dobré plodnosti. Vyšetření se provádí zejména za účelem zjištění kvality každého ejakulátu a jeho vhodnosti k využití v umělé inseminaci. Kontrolou semene lze také určit plodnost plemenného býka a posoudit, zda je vhodný pro využití v umělé inseminaci. Kvalita a množství ejakulátu u býků kolísají a mohou se měnit dle podmínek krmení, ošetřování, režimu připouštění, zdravotního stavu, ročního období apod. (Máchal 2000; Gamčík et al. 2004; Věžník 2004).

Požadavky na kvalitu býčího spermatu, byly definovány ve Vyhlášce Ministerstva zemědělství č. 471 / 2000 Sb. (viz Tabulka 1), která již není závazná.

**Tabulka 1 Požadavky na kvalitu býčího spermatu (Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 471 / 2000 Sb.)**

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| <b>Čerstvé sperma</b>               | <p>a) neobsahuje původce nebezpečných nákaz a nemocí, v intervalu 6 měsíců je laboratorně vyšetřováno na přítomnost patogenních mikroorganismů (včetně patogenních plísní),</p> <p>b) neobsahuje přímíseniny ani shluky spermií,</p> <p>c) má bílou barvu s odstínem šedým až krémovým (dovoleno je žlutavé zabarvení) a ostatní charakteristické vlastnosti (pach a zrnitost),</p> <p>d) hustota nemá být nižší než 700 000 spermií v 1 mm<sup>3</sup>,</p> <p>e) aktivita spermií je nejméně 70 %,</p> <p>f) obsahuje nejméně 80 % morfologicky normálních spermií a nejvýše 10 % primárních změn.</p> |
| <b>krátkodobě uchovávané sperma</b> | <p>a) vyhovuje ustanovením pro čerstvé sperma a po zředění a konzervování</p> <p>b) neobsahuje patogenní mikroorganismy, včetně patogenních plísní,</p> <p>c) aktivita spermií před použitím je nejméně 50 %,</p> <p>d) v jedné inseminační dávce je nejméně 10 × 10<sup>6</sup> aktivních spermií; u býků zlepšovatelů je možno tento počet snížit za předpokladu dobrého zabřezávání</p>   |
| <b>dlouhodobě uchovávané sperma</b> | <p>a) po zředění a konzervování vyhovuje požadavkům podle 1.2. písm. a), b) a d),</p> <p>b) aktivita spermií po rozmražení je nejméně 30 %.</p>  |

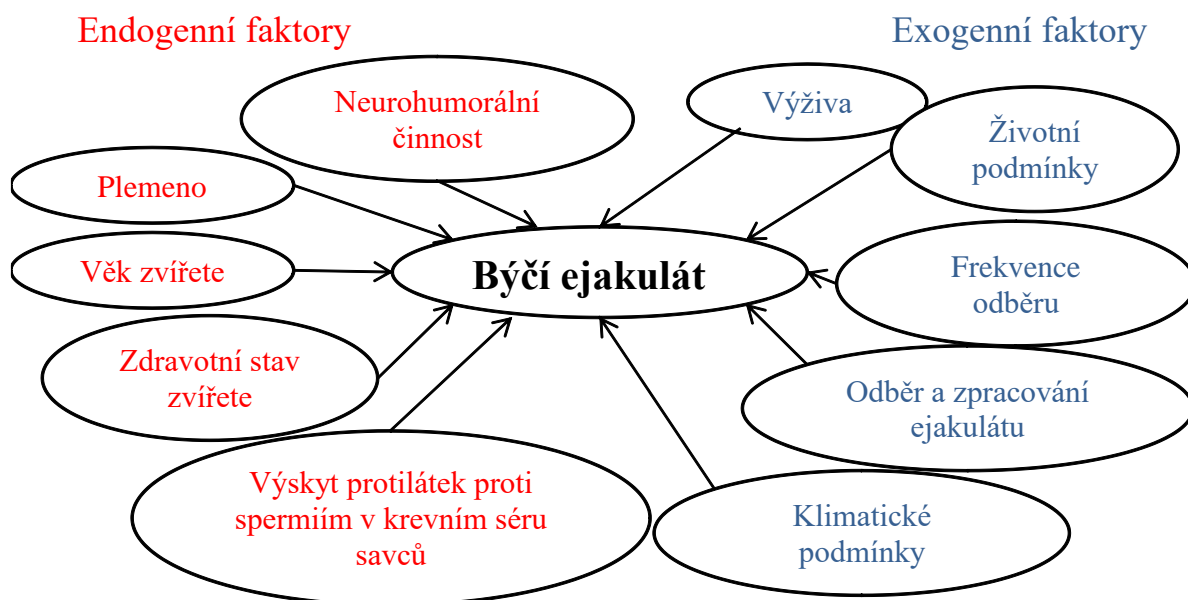


Vyšetření ejakulátu můžeme rozdělit na makroskopické a mikroskopické. Makroskopické hodnocení ve značné míře závisí na jednotlivci. Ejakulát se posuzuje smyslově ihned po odběru semene. Při vyšetření se hodnotí objem, hustota, barva, pach, pH, obsah hleny a cizích přímísenin (Gamčík et al. 1976). Při mikroskopickém vyšetření se hodnotí koncentrace spermií, jejich aktivita a popřípadě morfologie spermií (Věžník 2004).

### 3.5 Faktory ovlivňující produkci a kvalitu býčího ejakulátu

Faktory, které ovlivňují tvorbu a kvalitu ejakulátu u všech savců, můžou být rozděleny do dvou kategorií – endogenní a exogenní faktory (Schéma 1). Do endogenních, nebo také vnitřních, faktorů patří zejména neurohumorální činnost, dále věk, zdravotní stav zvířete, plemeno a výskyt protilátek proti spermiím v krevním séru samců. Mezi exogenní, neboli vnější, činitele řadíme hlavně výživu, pohyb, ustájení a zacházení se zvířetem, frekvence odběru a klimatické podmínky (Gamčík et al. 1984; Věžník 2004).

Schéma 1 Rozdělení faktorů působících na ejakulát býka



### 3.5.1 Endogenní faktory působící na kvalitu ejakulátu býků

- Plemeno

Plemeno býka má hlavní význam pro užitkovost, tudíž nelze opomíjet ani jeho plodnost. Nicméně samotné plemeno nemá na reprodukční vlastnosti významný vliv, protože heritabilita pro jednotlivé reprodukční vlastnosti nabývá velice nízkých hodnot (Hofírek et al. 2009).

Plemena skotu lze rozdělit podle mnoha různých hledisek, například podle fylogenetického původu, země původu a geologického rozšíření, užitkovosti a stupně prošlechtění (Sambraus 2006). U jednotlivých plemen lze pozorovat rozdíly v sexuální výkonnosti. Býci masných plemen dospívají obecně později než býci mléčných a prošlechtěných plemen, ale zároveň jsou odolnější vůči negativnímu působení vnějšího prostředí (Hofírek et al. 2009). Stejně tak je udáváno, že býci mléčných plemen dosahují vyšších hodnot objemu, než plemena žírná (Polák 1961). Přestože dědičnost reprodukčních vlastností je nízká, vliv plemene na parametry ejakulátů býků byl prokázán v mnoha studiích. Rozdíly lze u jednotlivých plemen pozorovat nejen v objemu, ale také v koncentraci spermií a motilitě (Lemma & Shemsu 2015; Rehman et al. 2016).

- Neurohumorální činnost

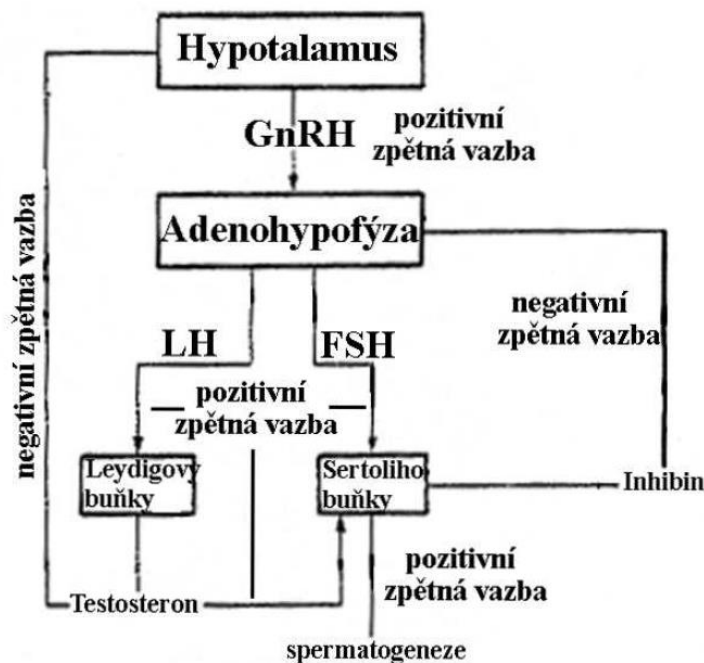
Pohlavní funkce všech druhů zvířat jsou řízeny nervovou a endokrinní soustavou. Neuroendokrinní regulace je řízena zejména geneticky a je zpravidla ovlivňována vnějším prostředím. Tyto faktory zodpovídají za reprodukční procesy s ohledem na druh a individualitu zvířete. Nervové a hormonální působení se navzájem velmi těsně ovlivňují a představují nedělitelnou jednotku, která vytváří vzájemnou rovnováhu (Gamčík et al. 1984).

Reprodukční procesy samců jsou řízeny centrální nervovou soustavou, z které jsou vysílány nervové a humorální signály. Mezi systémy reprodukčního funkčního okruhu patří hypotalamo-hypofyzární systém a testikulární systém. Kůra koncového mozku přijímá prostřednictvím smyslových orgánů (zrak, sluch, čich, hmat) impulzy z vnějšího prostředí a ty jsou skrze nervové buňky dopraveny do hypotalamu, kde vzniká řetězec pohlavních reflexů. Stejným způsobem může dojít i k tlumení nástupu pohlavních reflexů při působení negativních vlivů (Gamčík et al. 1984).

Druhotné samčí pohlavní znaky a temperament býka je dán koncentrací samčích pohlavních hormonů vylučovaných varlaty, kterými jsou androsteron a testosteron, spolu s produkty ostatních žláz s vnitřní sekrecí. Produkci hormonů ve varlatech ovlivňují hormony hypofýzy, FSH a LH (Schéma 2). Činnost varlat je ovlivněna také hormony štítné žlázy a kůry nadledvin (Louda et al. 2001).

Luteinizační hormon, někdy označovaný jako intersticiální buňky stimulující hormon (ICSH), řídí produkci testosteronu v Leydigových buňkách. Produkce testosteronu funguje na principu negativní zpětné vazby, což znamená, že pokud hladina testosteronu klesne, adenohypofýza zvýší produkci LH a to stimuluje Leydigovy buňky k produkci testosteronu. Zvýšená hladina testosteronu inhibuje další produkci LH a koncentrace testosteronu se stabilizuje. Pokud koncentrace testosteronu opět poklesne, celý cyklus se opakuje. Testosteron má významnou funkci pro spermatogenezi. Koncentraci testosteronu a dalších androgenů stabilizuje další hypofyzární hormon, folikulostimulační hormon. Zajišťuje tak jejich přiměřené množství potřebné pro správný průběh spermatogeneze. Testosteron má také významnou funkci při vzniku a udržení libida, pohlavního chťiče (Reece 2011).

**Schéma 2** Hormonální řízení reprodukčních funkcí samců (Louda et al. 2001)



Během spermatogeneze může, vlivem chyb při meiotickém dělení způsobených například vysokým věkem jedince, docházet ke vzniku chromozomálních abnormalit ve spermích. Ty mohou být rozděleny do dvou skupin, abnormality v počtu chromozomů,

jako je například aneuploidie, a abnormality ve struktuře chromozomů, kam se řadí translokace, inverze či duplikace chromozomů (Martin et al. 1987; Leutjens et al. 2002).

Pokud je narušena spermatogeneze, může se to odrážet na morfologii spermií. Abnormality spermií jsou spojovány se samčí neplodností. Struktura spermií může mít velký vliv při oplození (Chenoweth 2005). Zdravá spermie schopna oplození musí mít normální hlavičku, krček, spojovací, střední i koncovou část bičíku (Weiss et al. 2010). Pokud jsou v ejakulátu morfologicky abnormální spermie, může při oplození dojít k vytvoření defektní zygoty nebo celkově k zablokování fertilizační schopnosti spermií. Morfologicky změněné spermie jsou omezené pohybově i funkčně. V ejakulátu nesmí frekvence patologicky změněných spermií přesáhnout 15-20 %. Z celkového množství patologických spermií nesmí překročit hranici 5 % degenerativní změny, 5 % tvarové změny na hlavičce spermie a 10 % změny na akrozomu. Nezralé spermie, které se vyznačují zadrženu protoplazmatickou kapkou na krčku nebo na spojovacím oddíle, nesmí v ejakulátu přesáhnout 2 % (Gamčík et al. 1976).

- Zdravotní stav zvířete

Zdravotní stav býka má na kvalitu ejakulátu významný vliv. Onemocnění vzniká působením mnoha negativních faktorů, mezi které patří vlivy vnějšího prostředí, výživa, péče o zvíře, traumatizace, záření, poruchy krevní cirkulace, poruchy vnitřní sekrece a další. Jedná se o stav, kdy v látkové buněčné výměně převládají pochody způsobující poškození buněk, nad pochody tvorby buněk (Věžník 2004).

Může dojít ke změnám, které způsobují zastavení spermiogeneze v určitém stupni vývoje, což je doprovázeno spermioschezí různého stupně. V případě různých zánětů pohlavního ústrojí, které se vyznačují bolestivostí, dochází ke snížení libida samce a produkci nekvalitního ejakulátu, ve kterém se mohou objevovat nechtěné příměsi. Mezi onemocněními ovlivňující reprodukční funkce samců patří záněty předkožky a penisu a záněty varlat a nadvarlat. Původci těchto onemocnění jsou zejména bakterie. Dalšími abnormitami, které ovlivňují produkci a kvalitu ejakulátu, jsou různé vývojové defekty, degenerace buněk spermiogenetického epitelu, vymizení spermiogenetického epitelu, zástava zrání. Za nejvýznamnější dědičnou abnormitu ovlivňující plodnost samců všech hospodářských zvířat je považována hypoplazie varlat. Významný vliv mají i různá zranění, která reprodukční funkce ovlivňují nepřímo, například zranění končetin, kdy při skoku dochází k bolestivému podnětu a zvíře tak odmítá skočit (Věžník 2004).

- Protilátky proti spermiím

Negativně na spermie může působit i imunitní systém samce, který může ovlivňovat jak funkční procesy spermií, tak samotnou spermiogenezi (Věžník 2004). Ke zjištění, že spermie mohou být imunogenní, došlo již na počátku 20. století. Experimenty na zvířatech ukázaly, že po imunizaci spermiemi tělo produkuje protilátky. Další studie prokázaly, že u některých neplodných mužů se vyskytovaly protilátky proti spermiím a jejich neplodnost korelovala s hladinami protilátek (Sedláčková et al. 2010).

Imunitní systém jedince vzniká již před narozením, zatímco spermie je buňka, která se začíná tvořit až v období puberty, tudíž dospělý imunitní systém nedokáže rozpoznat sobě vlastní antigeny, které jsou na spermiích a vyvolá tak proti spermiím imunitní odpověď. U spermií je vyvinuta aktivní ochrana, kterou je hematotestikulární bariéra složená ze Sertoliho buněk. V centrální části semenotvorných kanálků jsou Sertoliho buňky velmi těsně propojeny a vytváří zde prostředí, kam se nemohou dostat velké proteiny a buňky imunitního systému. K vytvoření těchto těsných spojů dochází až v období puberty a vznikem této vrstvy dochází k oddělení spermií a jejich prekurzorů od imunitního systému. U dospělých jedinců se ovšem větší množství spermií nachází v nadvarletí a chámovodu než v semenotvorných kanálcích a tyto části nemají kompletní anatomickou bariéru, proto zde může dojít k navození imunitní odpovědi. Aby bylo zabráněno vzniku imunitní reakce na spermie, existují imunosupresivní faktory. Předpokládá se, že výskyt určitých CD8 lymfocytů a CD8 aktivátorů ve spermatu zabraňuje destrukci spermií imunitním systémem (Sedláčková et al. 2010).

Obecně protilátky proti spermiím mohou vznikat při zvýšené imunitní reakci organismu, nebo při poškození hematotestikulární bariéry. K narušení této bariéry může dojít při testikulárním traumatu, kongenitální absenci chámovodu, při varikokéle (rozšíření žilní pleteně v oblasti varlat), při úraze páteře. V některých případech dochází k tvorbě protilátek z nezjištěných příčin (Věžník et al. 2004; Sedláčková et al. 2010).

Nelze říci, že všechny protilátky proti spermiím, které se vyskytují, způsobují neplodnost. Protilátky byly nalezeny i u jedinců, kteří neměli s plodností problém. Jsou známy jak monoklonální, tak polyklonální protilátky, které se vážou na spermie, ale nedochází k inhibici procesu fertilizace (Sedláčková et al. 2010).

- Věk zvířete

Pohlavní dospívání je dlouhým obdobím v životě jedince. Během něj se vyvíjí pohlavní funkce a začíná již v embryonálním období. Působením gonadotropních hormonů předního laloku hypofýzy začíná produkce androgenů a již během 2. nebo počátkem 3. měsíce embryonálního vývoje dochází k pohlavní diferenciaci a přeměně prvopohlavních buněk ve spermatogonie. K sestupu varlat dochází u skotu již v 5. měsíci vývoje plodu (Marvan 2011). Pohlavní dospívání je složité období. Schopnost realizace některých pohlavních reflexů, jako jsou například erekce a ejakulace, a produkce spermií neznamena plnou zralost samce pro využití v plemenitbě. Jde o pomalý proces, kdy mezi začátkem zvýšené neuroendokrinní činnosti pohlavních žláz a dosažením kvalitní spermiogeneze existuje určitý časový interval. Plemeníci se pro plemenitbu nevyužívají ihned po dosažení pohlavní dospělosti. Býci se začínají odebírat až kolem 8-10 měsíce, protože mladí býci se příliš lehce vyčerpají, čímž trpí i jejich pohlavní aktivita. Proto se plemeníci využívají po dosažení nejen pohlavní dospělosti, ale také tělesné dospělosti (chovatelská dospělost). Býci dosahují chovatelské dospělosti ve věku 12 měsíců. Ejakuláty odebrané plemeníkům před dosažením plné pohlavní zralosti, se vyznačují nízkou koncentrací spermií a vyšším procentem morfologicky změněných spermií. Býci dosahují plných hodnot spermiogramu až ve věku kolem 12 až 14 měsíce (Gamčík et al. 1984). Sajjad et al. (2007) udává, že nejlepší parametry má ejakulát od býků ve věku 3–4 let.

Padrik et al. (2012) prokázal ve své studii vztah mezi kvalitou ejakulátu a věkem plemeníka. Uvádí, že starší býci, zřejmě vlivem vyšších hladin testosteronu, produkují větší objemy ejakulátu s lepšími parametry. Podle Javeda et al. (2000) se objem ejakulátu zvyšuje s věkem až do stáří 12–15 let. Pozitivní korelaci mezi věkem plemeníka a objemem ejakulátu objevil také Mahmood et al. (2014). Zjistil také negativní korelaci mezi věkem a životaschopností spermií, morfologií spermií a integritou akrozómu. Bhakat et al. (2011) udává, že kvalita ejakulátu roste s věkem býka, ale v určitém věku opět klesá vlivem senilní atrofie. Petersen & Pakkenberg (2000) a Harman et al. (2001) ve svých studiích uvádí, že od určité hranice s rostoucím věkem klesá produkce Leydigových buněk a produkce testosteronu, stejně tak klesá i denní produkce spermií. Významný dopad pokročilého věku na spermie zahrnuje změny jednotlivých nukleotidů, které způsobují patologické mutace v jednotlivých genech (substituce, delece, atd.) Ve spermiích mohou tyto defekty pocházet z chyb vzniklých během replikace DNA (Kong et al. 2012).

### 3.5.2 Exogenní faktory působící na kvalitu ejakulátu býků

- Výživa

Významným faktorem působícím na kvalitu ejakulátu je výživa. Změny na spermiích mohou být ovlivněny obsahem vitamínů a minerálních prvků v krmné dávce. U plemenných zvířat je velmi důležité zajistit pravidelnou a plnohodnotnou výživu s dostatečným množstvím a kvalitou živin v krmné dávce. Sestavovaná krmná dávka musí zaručit zachování chovné kondice, aniž by zvíře ztučnělo. Plemenná zvířata mají vysoké nároky na kvalitu bílkoviny, složení a množství dodávaných vitamínů a minerálních látek. Z krmné dávky je třeba vyloučit krmiva s jednostranným obsahem energie a stejně tak krmiva, která svými specifickými vlastnostmi negativně ovlivňují pohlavní funkce plemeníků. Mezi taková krmiva patří například bílkovinná krmiva obsahující silice, saponiny, alkaloidy a jiné (Kopřiva et al. 2000; Zeman et al. 2006). Máchal (2000) uvádí, že u býků krmených objemnou pící je aktivita spermií vyšší (53,4 %) než u býků krmených vysoce energetickou krmnou dávkou s cereáliemi (44,5 %).

Bollwein et al. (2017) shrnul studie, zabývající se vlivem výživy na sexuální vývoj u býků. Správná výživa neovlivňuje býka pouze v dospělosti, ale i během vývoje pohlavních orgánů. Několik studií poukazuje na pozitivní efekt vysoké úrovně výživy během puberty na obvod šourku a váhu varlat. Snížená úroveň výživy může způsobit opožděný nástup spermiogeneze. Nicméně nebyl prokázán žádný vliv, ani negativní, na produkci spermií nebo kvalitu ejakulátu (Wolf et al. 1965; Secchiari et al. 1976; Amann et al. 1986). Coulter et al. (1997) ale tvrdí, že větší obvod šourku a vyšší hmotnost varlat způsobuje ukládání tuku okolo těchto orgánů, což způsobuje tepelný stres během spermatogeneze a tím zhoršenou produkci spermií. Barth et al. (2008) uvažuje také o negativním vlivu tuku kolem šourku a varlat. Studie, kterou byl prokázán negativní vliv vysokoenergetické výživy na kvalitu ejakulátu, však byla provedena na býcích ve věku 11,5 až 13,5 měsíce, kdy většina býků prodělává pubertu, tudíž není možné s jistotou říci, zda kvalita ejakulátu byla ovlivněna výživou nebo nevyzrálostí býka.

Kumar et al. (2017) provedl studii, kdy třem skupinám býků stejného věku zkrmoval směsí o rozdílných energetických hodnotách. První skupina byla kontrolní (skupina 1), druhá skupina měla energetický příjem navýšený o 10 % (skupina 2) a třetí skupina o 20 % (skupina 3) oproti kontrolní skupině. U skupiny 2 došlo ke zlepšení všech parametrů nativního ejakulátu oproti kontrolní skupině. Skupina 3 měla lepší hodnoty sledovaných parametrů nativního ejakulátu oproti kontrolní skupině 1, nicméně oproti skupině 2 byly hodnoty nižší.

Hodnoty ejakulátu sledované po mražení byly u skupiny 2 vyšší než u skupiny 1, u skupiny 3 byly hodnoty nejnižší (viz Tabulka 2).

**Tabulka 2 Vliv energetického příjmu na mražený ejakulát (převzato z Kumar et al. 2017)**

| Parametry                  | Skupina 1 (kontrola) | Skupina 2 (+10% E) | Skupina 3 (+20% E) |
|----------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| Motilita po rozmrazení (%) | 46.44±1.74           | 53.37±1.13         | 44.55±1.06         |
| Přežitelnost (%)           | 70.87±1.5            | 71.55±0.66         | 67.69±1.3          |
| Integrita akrosomu (%)     | 70.32±1.6            | 73.83±0.82         | 69.90±1.24         |

Pro dosažení optimálních hodnot je nutné udržet úroveň výživy ve vyrovnaném poměru nejen v dospělosti, ale také v mládí býka, zejména po odstavu. Krmivo s nízkým obsahem živin a energie může reprodukčním funkcím uškodit, stejně tak škodí i příliš vysoký příjem.

- Klimatické podmínky

Z klimatických faktorů se na produkci a kvalitě ejakulátu odráží zejména roční období, teplota a světlo. Všechny tyto vlivy mohou mít negativní účinek na pohlavní reflexy, libido i produkci spermatu.

Roční období, přihlížíme-li k délce dne, u samců pohlavní činnost neovlivňuje tak výrazně jako u samic. Varlata prakticky nepodléhají sezónním změnám. Změny mohou být pozorovány v aktivitě býka, v letních měsících se u býků projevuje snížené libido způsobené vysokými teplotami. Letní období má vliv i na kvalitu a kvantitu ejakulátu. Nejvyšší pohlavní aktivitu lze sledovat v jarních měsících (Gamčík et al. 1976). Bhakat et al. (2011) ve své studii u býků plemene Sahiwall prokázal významný vliv sezóny na objem ejakulátu a koncentraci spermií v ejakulátu. Hodnocení býci byli chováni v Indii, kde se dělí tři roční období – období horka, období dešťů a chladné období. Objem ejakulátu se zvyšoval v období dešťů a nejnižších hodnot nabýval v zimním období. Stejně tak se měnila i aktivita spermií, kdy opět nejvyšší byla v období dešťů a nejnižší během zimy. Šmerha (1980) udává, že na roční době závisí i obsah fruktózy v semenné plazmě, důležitým energetickým zdrojem spermií. U červenostrakatých býků se její obsah v plazmě v zimních měsících zvyšuje o 25 % oproti letním měsícům. Skutečnost, že se obsah fruktózy v semenné plazmě během letních měsíců snižuje, potvrzuje i Nichi et al. (2006) ve své studii.



Významným faktorem projevujícím se během ročních období, jak už bylo uvedeno výše, je teplota. Klazuba (2009) udává ve své publikaci optimální teplotu pro chov dospělého skotu 16 °C.

Při optimálních podmínkách prostředí je tělesná teplota organismu a teplota okolního prostředí v rovnováze a v organismu je umožněn fyziologický průběh vylučování metabolického tepla. Vychýlení teploty mimo optimum působí u zvířete jako stresor, což má vliv na činnost organismu. Obecně se skot vyrovnává lépe s nízkou teplotou prostředí než se zvýšenou (Voříšková et al. 2001).

V případě zvýšených teplot, kdy již není termoregulační mechanismus organismu schopen podpořit odvod tepla, dochází k tepelnému stresu. Zvýšení vnitřní tělesné teploty nad fyziologické limity způsobuje nevyváženou termoregulaci šourku, což může vyústit v degeneraci varlat (Kastelic et al. 2001). Pro normální funkci býčích varlat nesmí jejich teplota překročit 33–34,5 °C. Při zvýšení teploty nad tuto hranici dochází ke zrychlení metabolismu a zvýšení nároků na kyslík. Jednou z teorií, proč dochází k zhoršené kvalitě ejakulátu při vysokých teplotách, je, že při absenci zvýšeného průtoku krve se parenchym varlat stává hypoxickým, což pravděpodobně zvyšuje produkci reaktivních látek kyslíku (ROS), které způsobují vyšší index testikulárního oxidativního stresu, a může docházet k vyšší produkci defektních spermií. Tato teorie však nebyla potvrzena (Nichi et al. 2006). Zvýšená teplota okolí vede k zhoršené spermatogenezi a to již při působení vyšších teplot po dobu 12 hodin. Při vystavení varlat vysokým teplotám došlo k snížení počtu živých ejakulovaných spermií. Rhynes & Ewing (1975) pozorovali během prvních dvou týdnů působení tepelného stresu snížení hladin testosteronu až o 43 %. Minton et al. (1981) žádné změny v koncentracích testosteronu u býků vystavených tepelnému stresu nezjistil. Změny v testosteronu neprokázal ani Meyerhoeffer et al. (1985). V jeho studii nebyl prokázán ani vliv vysoké teploty na objem ejakulátu býků, nicméně došlo ke snížení počtu pohyblivých spermií téměř o 30 % v ejakulátu býků vystavených vysokým teplotám prostředí a ke zvýšení počtu morfologicky abnormálních spermií. Efekt ročního období a vyšších teplot se odráží na mrazitelnosti ejakulátu. Během zimních měsíců s nižšími teplotami bylo vyřazeno méně dávek než během letních měsíců s vyššími teplotami (Koivisto et al. 2009).

- Odběr a zpracování ejakulátu

Plemenní býci jsou chováni v inseminačních stanicích, kde jim je pravidelně odebírán ejakulát. Správný odběr je základem úspěšné inseminace. Nejčastěji probíhá odběr do umělé

vagíny. Dnes se využívají vagíny zkrácené na 30 cm s jednorázovým polyethylenovým sběračem (Parks 2006). Mezi další metody odběru spermatu patří například elektroejakulace, výjimečně se využívá metoda masáže měchýřkovitých žláz (Gamčík et al. 1976). Při dvou po sobě jdoucích odběrech bývá druhý ejakulát zpravidla kvalitnější než první. Nejvhodnější frekvence odběrů dospělých býků je dvakrát do týdne, 8–14 odběrů v měsíci. U mladých býků do 2 let je frekvence odběru nižší, zpravidla 1× týdně (Kovář & Sobek 1965).

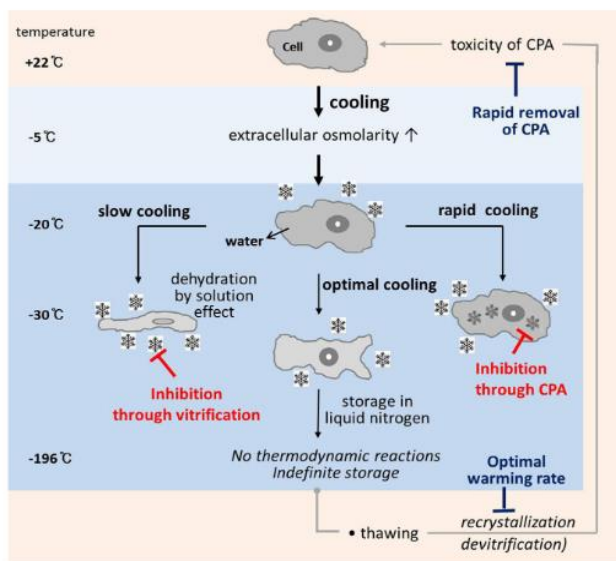
Od chvíle kdy je sperma ejakulováno začíná nezvratné stárnutí spermií. Proto je důležité nakládat s ním opatrně a rychle, aby byla životnost spermií co nejvíce prodloužena. To, že způsob zacházení s ejakulátem a postup zpracování ejakulátu má významný vliv na jeho kvalitu, popsal ve své studii Brito (2016), který porovnával životaschopnost spermií napříč několika laboratořemi a zjistil mezi nimi značné rozdíly. Nejen manipulací s ejakulátem, ale zejména samotným procesem zmrazování, dochází k zhoršování parametrů ejakulátu. Proces zmrazování je ale nezbytným procesem, pokud chceme ejakulát dlouhodobě uchovávat. Proto se stále pracuje na nových metodách a nových přísadách do ředidel, které zlepšují životnost spermií v zmrazovaném ejakulátu.

Samotnému mrazení předchází krátkodobé zchlazení, teplotní stabilizace. Naředitý ejakulát v pejetách je chlazen po dobu 5-10 minut při 6-8 °C. Poté následuje mrazení rychlostí 2 °C za minutu až do teploty -7 °C, kde dochází k indukci krystalizace (seeding). Poté pokračuje mrazení rychlostí 0,3 °C/min dokud není dosaženo teploty -35 °C. Po tomto bodě nastává řízené zmrazování 45 °C/min do teploty -80 °C. Následně jsou pejety s ejakulátem uloženy do tekutého dusíku a skladovány při teplotě -196 °C (Fasano 2013).

Proces zmrazování je riziková fáze zpracování spermatu. Změny motility a struktury spermií se projevují současně v různých fázích zmrazování a rozmrazování. Je uváděno, že spermie vystavené rychlému zchlazení podléhají chladovému šoku, který má pro buňky smrtelné následky. Proto se dnes využívá pomalé mrazení (Ferero-Gonzales et al. 2012). I při pomalém zmrazování ale dochází ke změnám na membráně vlivem změny teploty (Watson 2000). Kritickou hodnotou při mrazení ejakulátu je teplota mezi -5 °C a -50 °C, kdy dochází k tvorbě ledových krystalů. Během tohoto rozmezí je důležitá rovnováha mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím (Obrázek 3), proto je ejakulát ředěn roztokem s kryoprotektanty, které slouží k odvodnění vzorku a zabraňují tak vzniku ledových krystalů uvnitř buněk (Kumar et al. 2003). Doba, kdy je vzorek vystaven účinku kryoprotektantu, se označuje jako ekvilibrace. Během ekvilibrace penetruje kryoprotektant do spermatických buněk a nastoluje určitou rovnováhu mezi intracelulární a extracelulární koncentrací (Jang et al. 2017). Nejčastěji využívaným kryoprotektantem je glycerol, který snižuje mechanické poškození

spermie vlivem vzniku ledových krystalů uvnitř buňky během zmrazení (El-Harairy et al. 2011).

**Obrázek 3 Fyzikální změny v buňkách během mrazení (Jang et al. 2017)**



Během procesů zmrazování a rozmrazování vznikají reaktivní kyslíkové částice (ROS), které poškozují integritu membrány spermií, zhoršují pohyblivost spermií a tím i oplozovací schopnost (Hu et al. 2010; Büyükleblebici et al. 2014). Přestože býčí ejakulát má přirozený obranný systém proti ROS, při zmrazování je nedostatečný. Během zmrazování je důležité nejen zachovat pohyblivost spermií, ale také udržet jejich metabolismus. Vlivem zmrazování dochází k indukci předčasné akrozomální reakce, pozměnění funkce mitochondrií, snížení motility, narušení dekondenzace chromatinu a dalším změnám (Tabulka 3). Obecně proces mrazení a rozmrazení nepřežije 40 % - 50 % spermií a to i při optimálním mrazicím protokolu (Watson 2000).

**Tabulka 3 Stresory charakteristické pro kryokonzervaci (Baust et al. 2009)**

| Během chlazení                              | Během zmrazování            |
|---|-----------------------------|
| Metabolické změny                           | Formování ledových krystalů |
| Ztráta energie                              | Koncentrace ředidla         |
| Nerovnováha iontů                           | Hyperosmolarita             |
| Buněčná acidóza                             | Změny buněčných objemů      |
| Aktivace proteáz                            | Denaturace proteinů         |
| Fázové přechody na membránách               |                             |
| Produkce volných kyslíkových radikálů (ROS) |                             |
| Destabilizace cytoskeletu                   |                             |

## 4 Metodika

Odběry ejakulátu probíhaly na inseminační stanici býků v Zásnukách, která je pobočkou holandské společnosti CRV spol. s.r.o. Hlavní sídlo společnosti v České republice sídlí ve Vesci. Odběr a hodnocení ejakulátu probíhaly po celý rok stejným způsobem. K laboratornímu vyšetření spermatu bylo využíváno stejných metod hodnocení hustoty, aktivity a stejným způsobem probíhalo i následné chlazení a zmrazování.

Hodnocená data pocházejí z roku 2017, odběry probíhaly od ledna 2017 do prosince 2017. Do sledování byly zařazeny parametry ejakulátu u 59 býků tří různých plemen. Do studie bylo zařazeno 39 býků plemene české strakaté, 8 býků plemene česká červinka a 12 býků plemene holštýn. Hodnocen byl nativní ejakulát a mražené inseminační dávky (ID). Každý hodnocený vzorek odebraného ejakulátu byl hodnocen ihned po odběru v laboratoři inseminační stanice a vzorky vyrobených inseminačních dávek byly hodnoceny nejméně 24 hodin po zmrazení. Ejakulát byl odebírán ve speciálně uzpůsobené místnosti, připouštědle. K vydráždění býka byla využívána atrapa - klidný býk nebo fantom. Sběr spermatu probíhal pomocí umělé vagíny. Býci byli odebíráni v předem stanovenou dobu, během odběrového dne. Frekvence odběru závisela na individualitě býka, stáří, zdravotním stavu a kondici.

Bezprostředně po odběru ejakulátu bylo sperma smyslově posouzeno v prostorách laboratoře inseminační stanice. Hodnotila se barva, přítomnost přímísenin, zápach. Dále bylo stanoveno množství, hustota a motilita spermatu. Objem byl odečten ze stupnice kalibrovaného sběrače. Hustota byla měřena pomocí spektrofotometru značky Minitüb, Německo. Aktivita nativního ejakulátu byla hodnocena subjektivně, dle procentuálního zastoupení spermií vykazujících progresivní pohyb vpřed za hlavičkou, na mikroskopu Meopta, Česká republika, při zvětšení 200–300×.

Na základě výsledků laboratorních vyšetření bylo s ejakulátem dále nakládáno. Ejakulát bez přímísenin, mléčné barvy, bez zápachu a s motilitou minimálně 70 % se dále zpracovával. Naměřené hodnoty objemu a denzity byly zadány do počítače, kde bylo pomocí programu IDALabor zjištěno potřebné množství ředidla a přibližný počet inseminačních dávek. Ejakulát byl naředěn průmyslovým bezžloutkovým ředidlem OptiXcell 2 s přídavkem antibiotik. Naředěné sperma bylo naplněno do pejet o objemu 0,25 ml různé barvy. Barvy se rozdělují podle čísla na ušních známkách býka. Plnění a označování pejet bylo provedeno automatizovaně na přístroji značky Minitüb, Německo.

Naplněné a řádně označené pejety byly uloženy do zásobníku a umístěny do chladicího boxu značky IMV technologies, Francie, kde dochází k tzv. ekvilibraci

při teplotě 4–8 °C po dobu 16–20 hodin. Po ukončení ekvilibrace byly zásobníky s pejetami vloženy do mrazicího boxu značky IMV technologies, Francie, temperovaného na 4 °C. Zmrazení probíhalo v parách tekutého dusíku. Proces mrazení byl řízen elektronickou řídicí jednotkou mrazicího boxu, doba zmrazování byla 7 minut, během nichž byly ID zchlazeny na -130 °C. ID byly po ukončení procesu mrazení přemístěny do kelímku (goblety) s tekutým dusíkem. Na gobletě jsou uvedeny údaje o jménu a popř. státním registru býka, datum odběru a počtu ID.

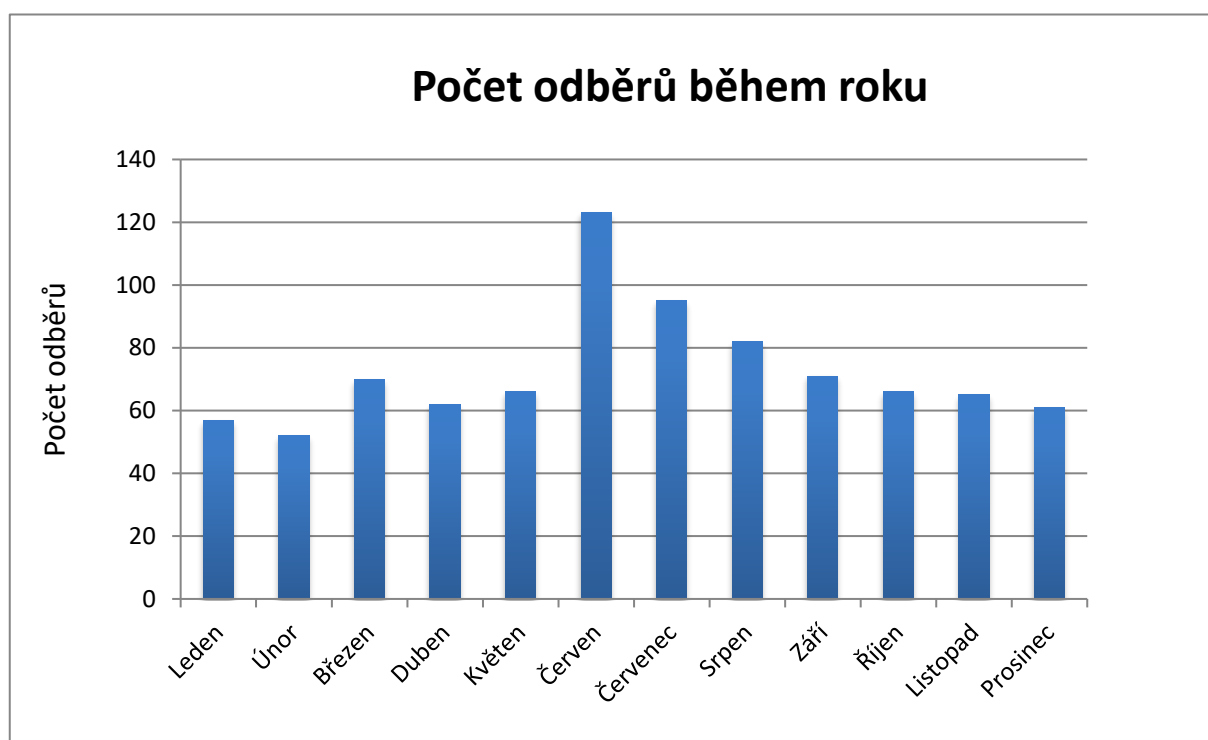
Pro posouzení motility po zmrazení byly minimálně 24 hodin po zmrazení rozmrazeny 3 dávky z každé šarže. Po vytažení z tekutého dusíku byly ID cca 10–15 sekund ponechány na vzduchu a poté na 15–20 sekund ponořeny do „suché“ lázně značky Minitüb, Německo, s vyhříváním pomocí kovových kuliček o teplotě 35–9 °C. Vzorek byl následně přenesen na vyhřáté čtyřkomůrkové podložní sklíčko Leja (Minitüb), s hloubkou komůrky 20 µm, a poté byl vzorek ejakulátu na sklíčku snímán systémem CASA, IVOS II, IMV technologies, Francie, který sestává z mikroskopu, kamery a počítačové jednotky. Tento systém vyhodnocuje motilitu spermií pomocí snímání trajektorií spermií.

Pro další analýzu byla získaná data utříděna do tabulky v programu Microsoft Office Excel a následně vyhodnocena pomocí vhodných statistických analýz v programu Statistica 12. Pro určení existence vztahu mezi kvalitativními parametry ejakulátu, jako je objem, denzita, motilita nativního ejakulátu a motilita ejakulátu po mrazení, byla zvolena korelační analýza. Jednotlivé efekty působící na kvalitativní parametry byly analyzovány jednofaktorovou a nebo dvoufaktorovou ANOVOU, a poté zhodnoceny post-hoc pomocí Schefféova testu. Výsledky byly hodnoceny na hladině významnosti  $p < 0,05$ .

## 5 Výsledky

Během roku 2017 bylo provedeno celkem 870 odběrů. Rozložení počtu provedených odběrů v průběhu roku uvádí Graf 1. Z grafu je zřejmé, že počet odběrů byl v průběhu roku vyvážený, kromě letních měsíců, kdy došlo k navýšení počtu odběrů. V červnu došlo k navýšení téměř na dvojnásobný počet odběrů.

Graf 1 Počet provedených odběrů během roku



### 5.1 Vliv býka

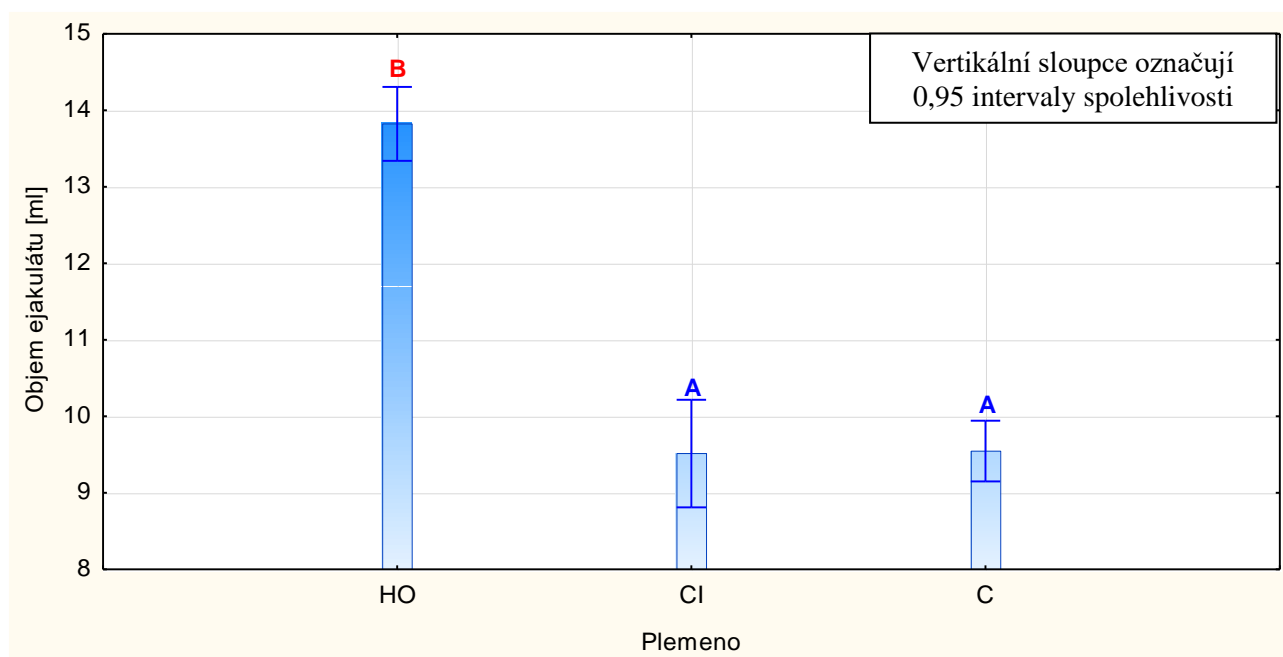
Efekt býka byl prokázán. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) byly zjištěny pouze u objemu a denzity ejakulátu a to v nižší míře. U motility ejakulátu nativního ani u ejakulátu po mražení nebyly prokázány žádné statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ). Nejvíce se efekt býka projevil pro parametr celkový počet spermií v ejakulátu.

## 5.2 Vliv plemene

Vliv plemene se ukázal být významným pro objem ejakulátu (Graf 2). Významné statistické rozdíly ( $p < 0,05$ ) byly prokázány mezi plemenem holštýn (HO) a českým strakatým (C), respektive holštýnem a českou červinkou (CI). Naopak mezi českým strakatým a českou červinkou nebyly prokázány významné rozdíly. Efekt plemene se projevil i u denzity, kdy byly statisticky významné rozdíly mezi plemenem česká červinka a holštýnem, respektive česká červinka a české strakaté (Graf 3). Hodnoty získané pro plemena holštýn a české strakaté se mezi sebou významně nelišila.

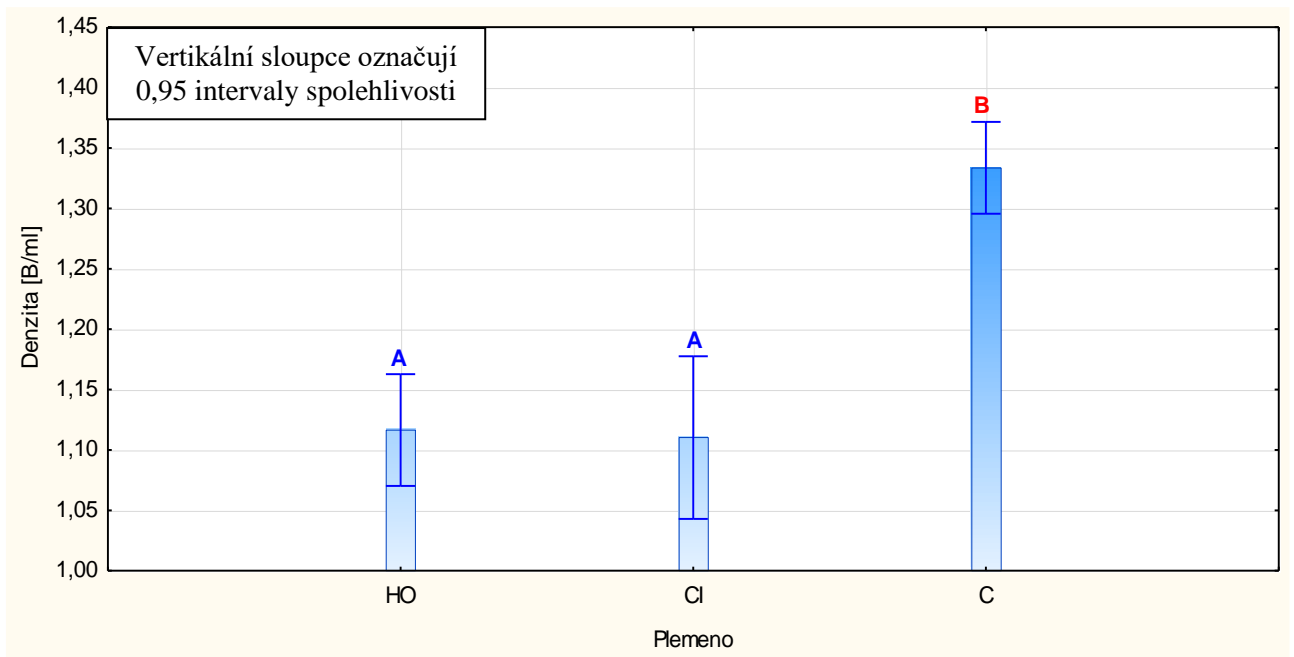
Analýza efektu plemene na motilitu nativního ejakulátu prokázala významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi plemeny holštýn a české strakaté a mezi plemeny holštýn a česká červinka (Graf 4). Mezi plemeny česká červinka a české strakaté nebyly žádné významné rozdíly prokázány. Vliv plemene byl prokázán u motility ejakulátu po rozmrazení, kdy byly vyhodnoceny statisticky významné rozdíly pro plemeno holštýn a české strakaté (Graf 5). U plemene česká červinka nebyly zjištěny významné rozdíly ani s holštýnským plemenem ani s českým strakatým. U parametru celkový počet spermií v ejakulátu byly prokázány statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi všemi testovanými plemeny (Graf 6).

**Graf 2 ANOVA vliv plemene na objem ejakulátu**



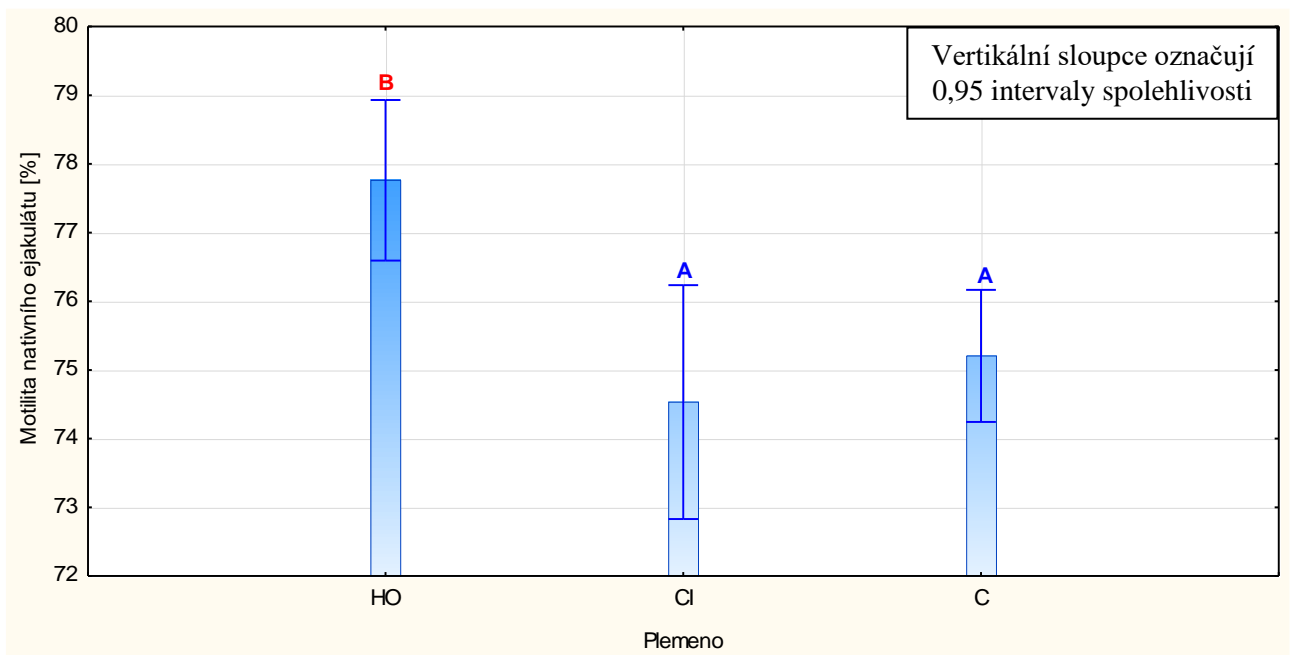
A,B - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

**Graf 3 ANOVA vliv plemene na denzitu ejakulátu**



A,B - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

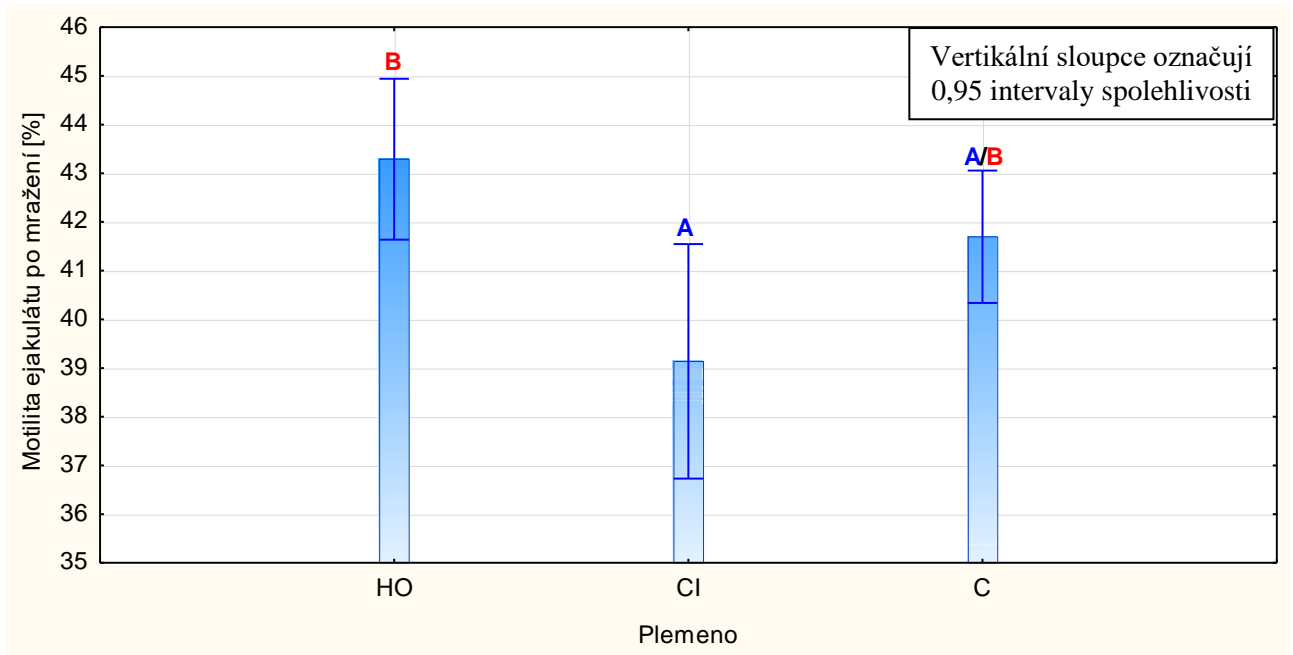
**Graf 4 ANOVA vliv plemene na motilitu nativního ejakulátu**



A,B - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

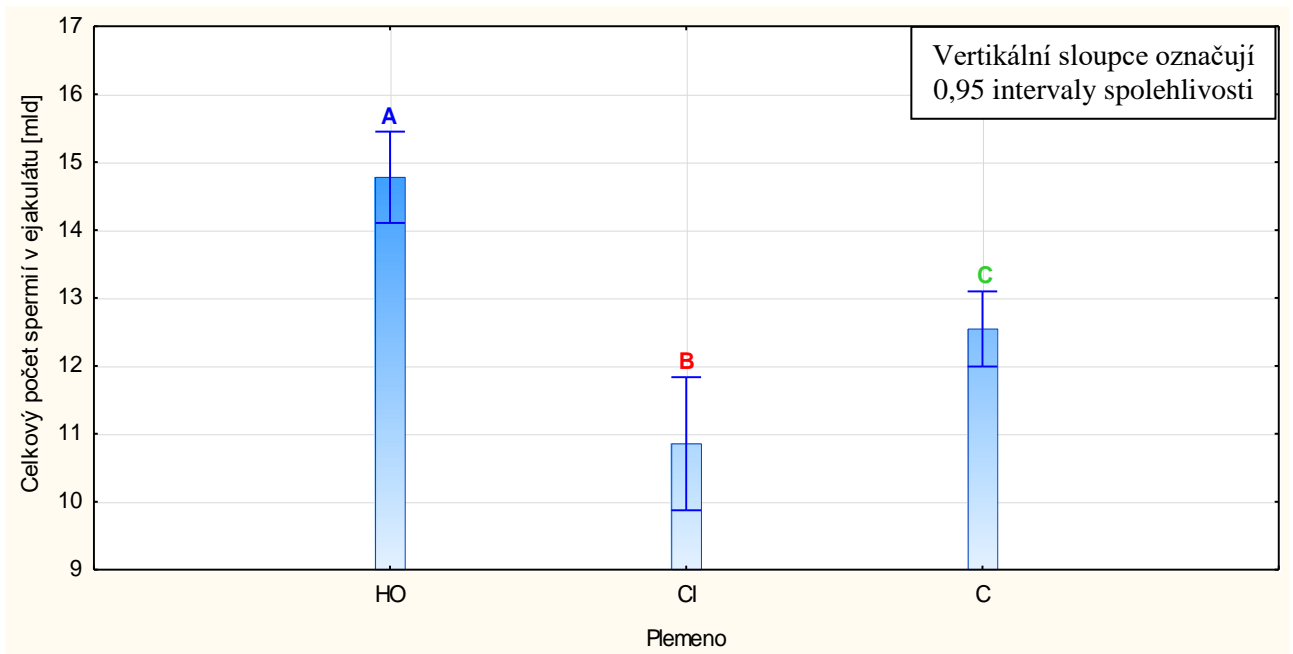


**Graf 5 ANOVA vliv plemene na motilitu ejakulátu po mražení**



A,B - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

**Graf 6 ANOVA vliv plemene na celkový počet spermií**



A,B,C - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

### 5.3 Vliv období odběru

Průměrná roční teplota v roce 2017 byla 10,6 °C, což je hodnoceno jako teplotně průměrný rok. Během roku nebyl jediný arktický den (den kdy maximální teplota nevystoupí nad -10 °C). Celkem bylo 26 ledových dní (maximální teplota nevystoupila nad bod mrazu), 107 mrazových dní (minimální teplota klesla pod bod mrazu). Jarních dní bylo v roce 2017 142 (maximální teplota vystoupila nad 20 °C), 91 bylo letních dní (maximální teplota vystoupila nad 25 °C), tropických dní bylo 39 (maximální teplota nad 30 °C) a tropické noci byly 4 (noci kdy minimální teplota neklesla pod 20 °C). Průměrné měsíční teploty během roku 2017 můžete vidět v tabulce 5.

**Tabulka 4 Průměrné měsíční teploty v průběhu roku 2017 (Meteorologická stanice Brno)**

| Měsíc    | Minimum | Maximum | Průměr |
|----------|---------|---------|--------|
| Leden    | -17,1   | 5,1     | -5,8   |
| Únor     | -10     | 13,2    | 1,35   |
| Březen   | -3,6    | 21,9    | 8,17   |
| Duben    | -3,6    | 24,9    | 9,53   |
| Květen   | -0,6    | 34,3    | 16,71  |
| Červen   | 8,4     | 34,8    | 21,7   |
| Červenec | 9,7     | 34,8    | 21,58  |
| Srpen    | 8,1     | 36,8    | 22,07  |
| Září     | 5,2     | 26,2    | 14,17  |
| Říjen    | 0       | 21,9    | 10,76  |
| Listopad | -4,5    | 13,8    | 4,89   |
| Prosinec | -8,9    | 12      | 1,43   |

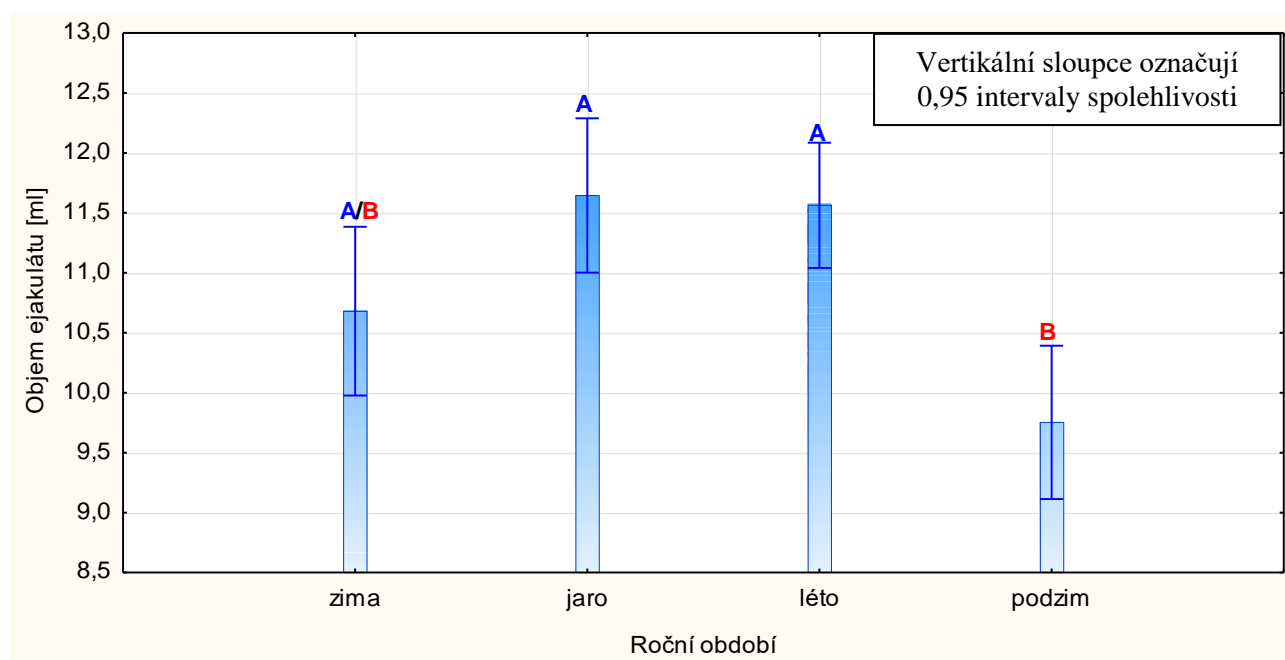
Roční období byla definována dle tradičního dělení. Do jarního období byly zařazeny měsíce březen, duben, květen, do letního období červen, červenec, srpen, do podzimu září, říjen a listopad a do zimního období byly zařazeny prosinec, leden a únor.

- Roční období

Vliv ročního období na parametry ejakulátu se prokázal. Významný byl pro objem ejakulátu a motilitu nativního ejakulátu i motilitu ejakulátu po rozmrazení. Pro objem ejakulátu byly zjištěny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi letním a podzimním

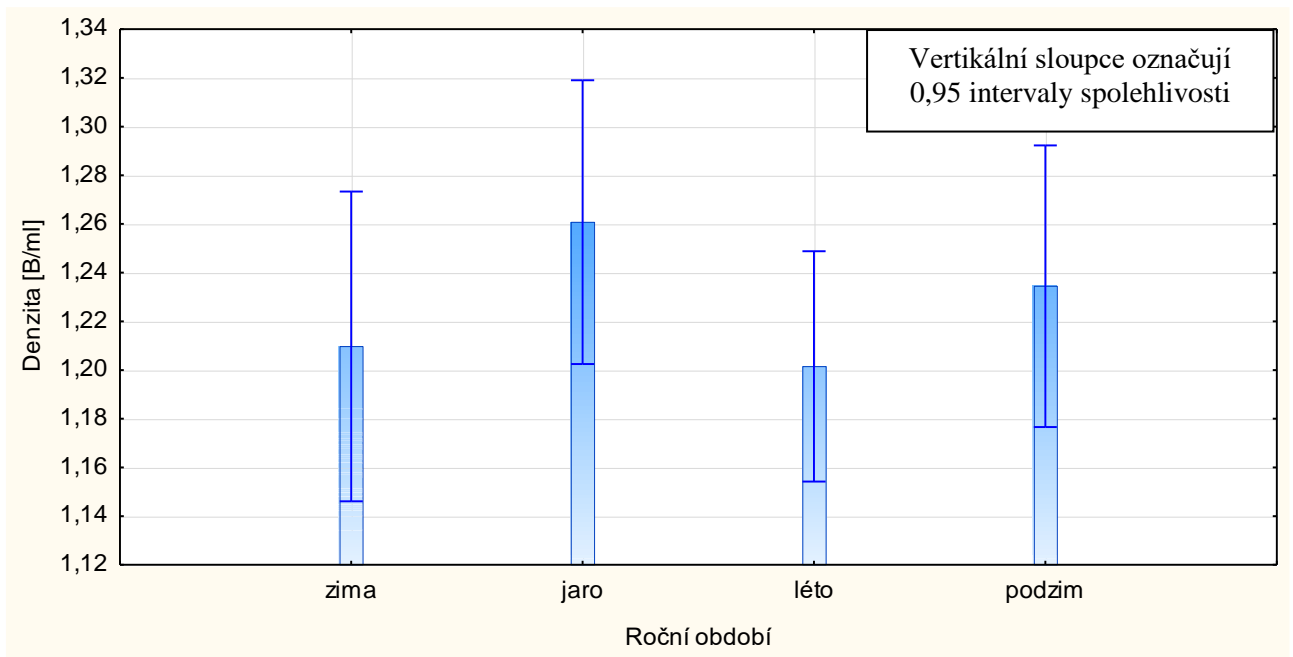
obdobím a mezi jarním a podzimním obdobím (Graf 7). Žádný významný rozdíl nebyl prokázán pro denzitu ejakulátu (Graf 8), přestože efekt ročního období analýza potvrdila. Vliv ročního období na motilitu ejakulátu se projevil. Statisticky významné rozdíly pro motilitu nativního ejakulátu byly prokázány mezi zimním a jarním, respektive letním obdobím (Graf 9). U vlivu ročního období na motilitu ejakulátu po rozmrazení se prokázaly statistické rozdíly mezi letním obdobím a podzimem (Graf 10). U celkového počtu spermií byly statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) prokázány mezi podzimem, respektive zimou, a jarem, respektive létem (Graf 11).

**Graf 7 ANOVA Vliv ročního období na objem ejakulátu**



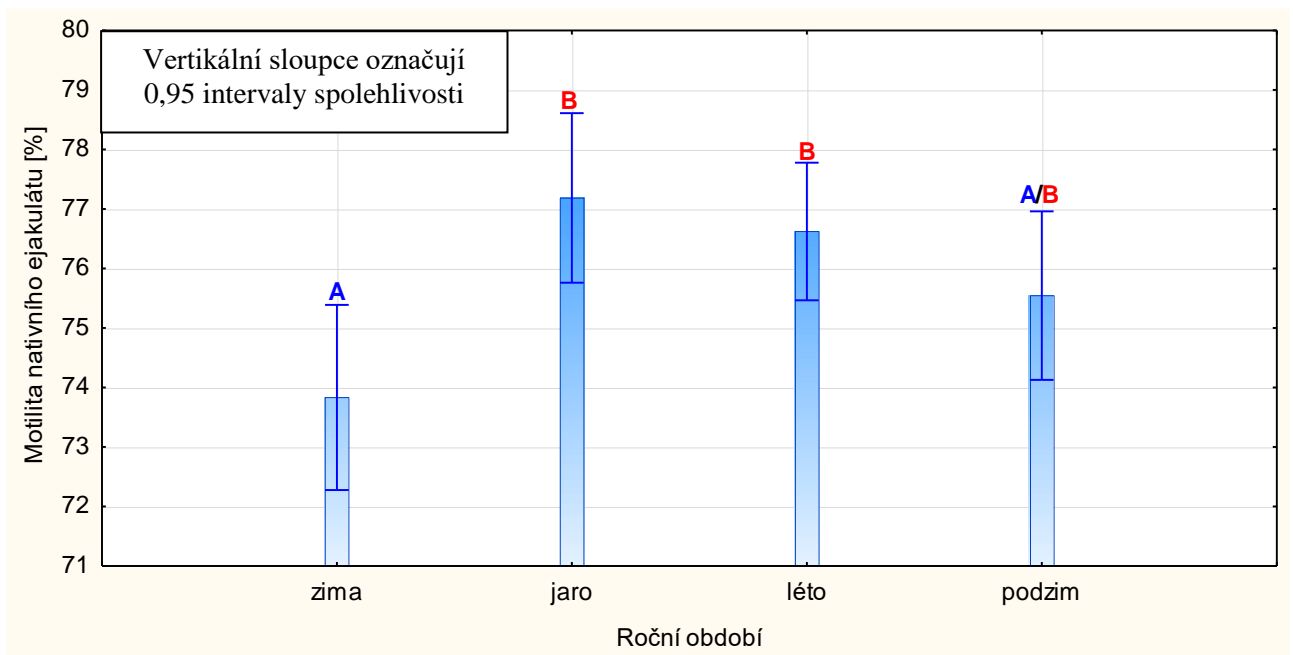
A,B - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

**Graf 8 ANOVA Vliv ročního období na denzitu ejakulátu**



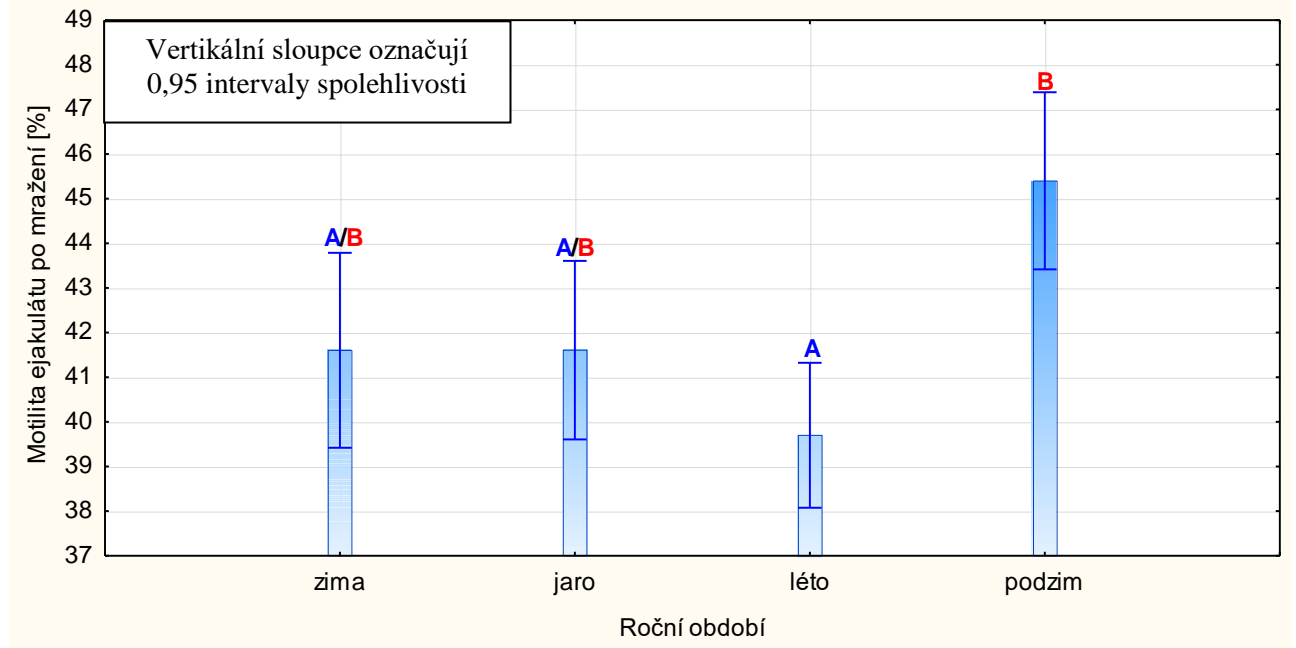
A,B - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

**Graf 9 ANOVA vliv ročního období na motilitu nativního ejakulátu**



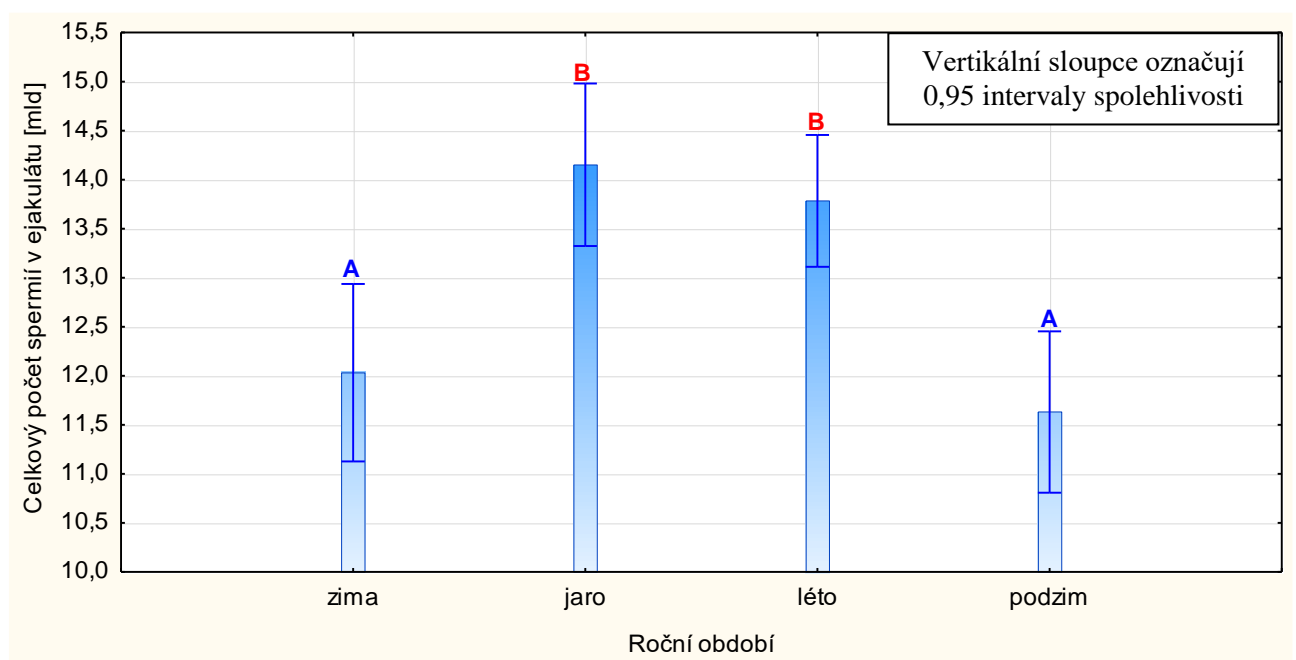
A,B - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

**Graf 10 ANOVA vliv ročního období na motilitu ejakulátu po mražení**



A,B - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

**Graf 11 ANOVA vliv ročního období na celkový počet spermií**



A,B - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

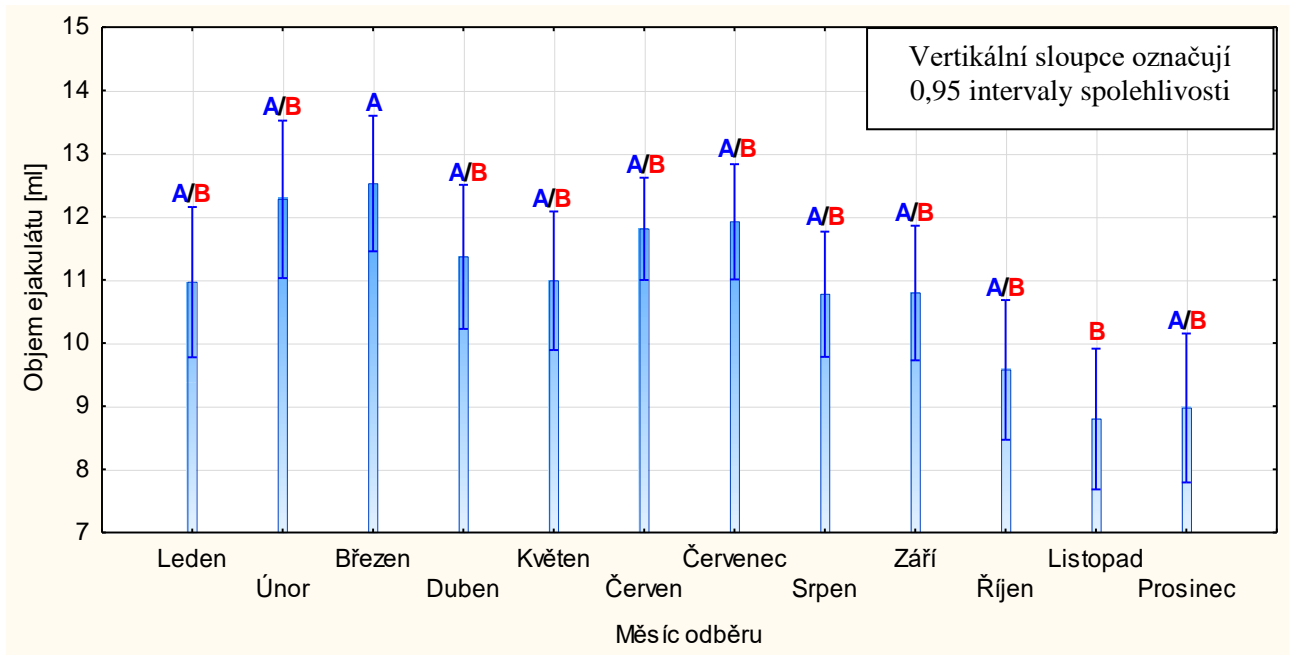
- Měsíc

Vliv měsíce nebyl výrazný u objemu ejakulátu, kde byly statisticky významné rozdíly zjištěny jen mezi březnovými a listopadovými odběry (Graf 12). Na denzitu měl měsíc odběru mírný vliv (Graf 13), nicméně žádné statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi jednotlivými měsíci nebyly prokázány. Na motilitě nativního ejakulátu se vliv měsíce příliš neprojevil. Významné rozdíly byly zjištěny pouze mezi lednovými a červnovými odběry (Graf 14).

Efekt měsíce, ve kterém byl proveden odběr, se projevil zejména u motility ejakulátu po mrazení, kde byly zjištěny významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi prosincovými odběry a odběry provedenými ve zbylých měsících, kromě května a listopadu. Statisticky významné rozdíly byly prokázány také mezi odběry v lednu a odběry během dubna, května, září, října, listopadu a prosince. Existence významných rozdílů byla prokázána i mezi únorovými, listopadovými, respektive prosincovými odběry a mezi březnovými, respektive květnovými odběry. Ostatní zjištěné statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými měsíci odběru jsou uvedeny v grafu 15. Graf 16 ukazuje hodnoty pro skupinu býků stálých (skupina STÁLÍ), skupinu býků, kteří odešli na jatka (skupina JATKA) a skupinu býků příchozích z jiné inseminační stanice (skupina NOVÍ). Rozdíl v hodnotách motility po rozmrazení mezi skupinou býků nových a skupinou býků, kteří odešli na jatka, udává výkyv hodnot na začátku roku a na konci roku.

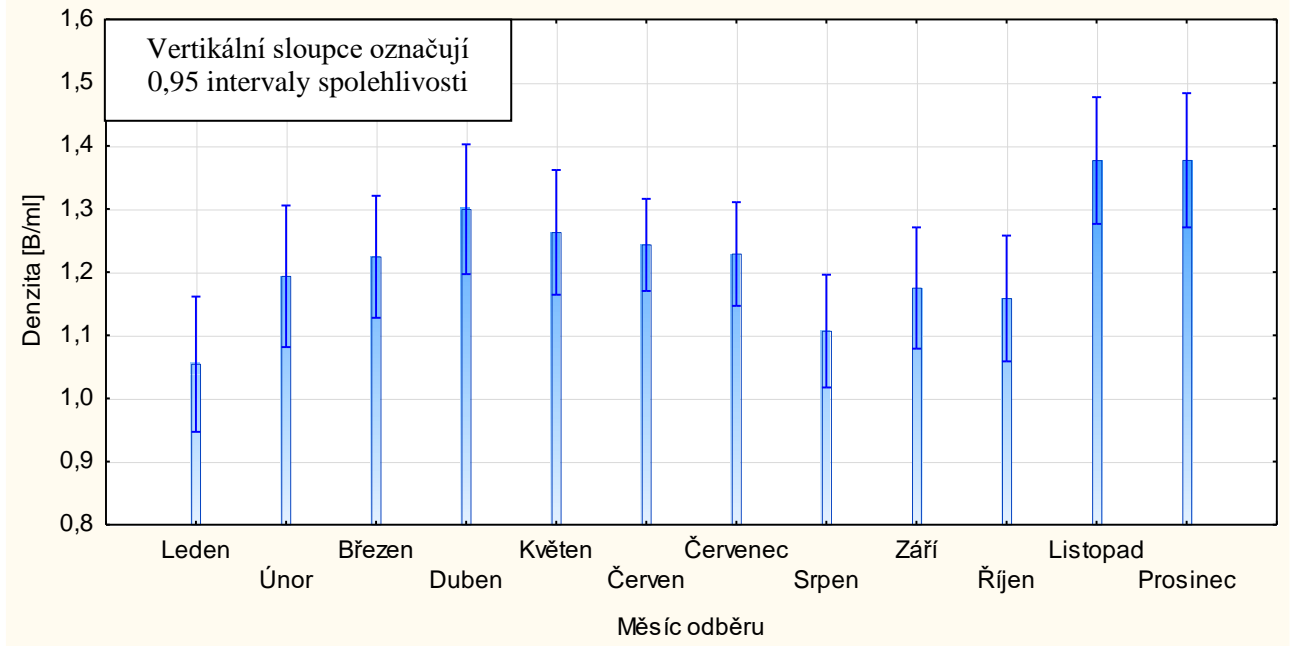
U celkového počtu spermií byly statistické rozdíly ( $p < 0,05$ ) prokázány u října s červnem, respektive červencem (Graf 17). Stejně jako u motility i zde jsou hodnoty ovlivněny změnou zastoupení býků. Býci nově příchozí dosahují nižších hodnot než býci, kteří odešli na jatka (Graf 18).

**Graf 12 ANOVA vliv měsíce odběru na objem ejakulátu**



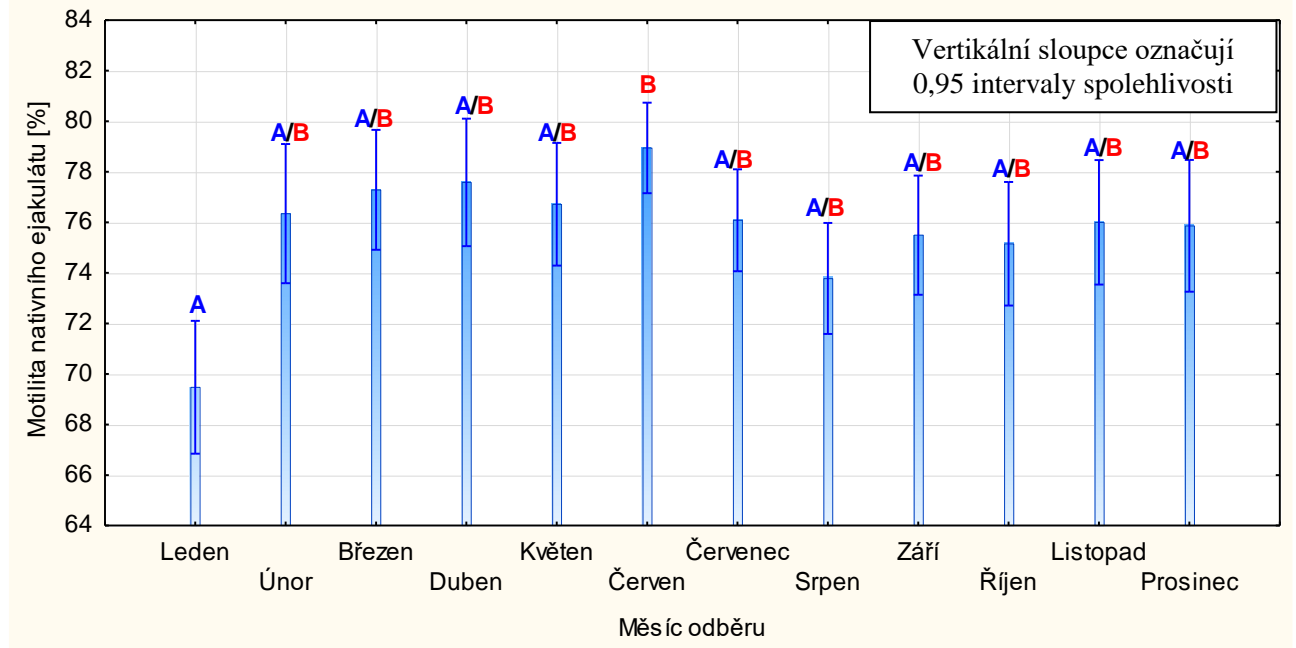
A,B - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

**Graf 13 ANOVA vliv měsíce odběru na denzitu ejakulátu**



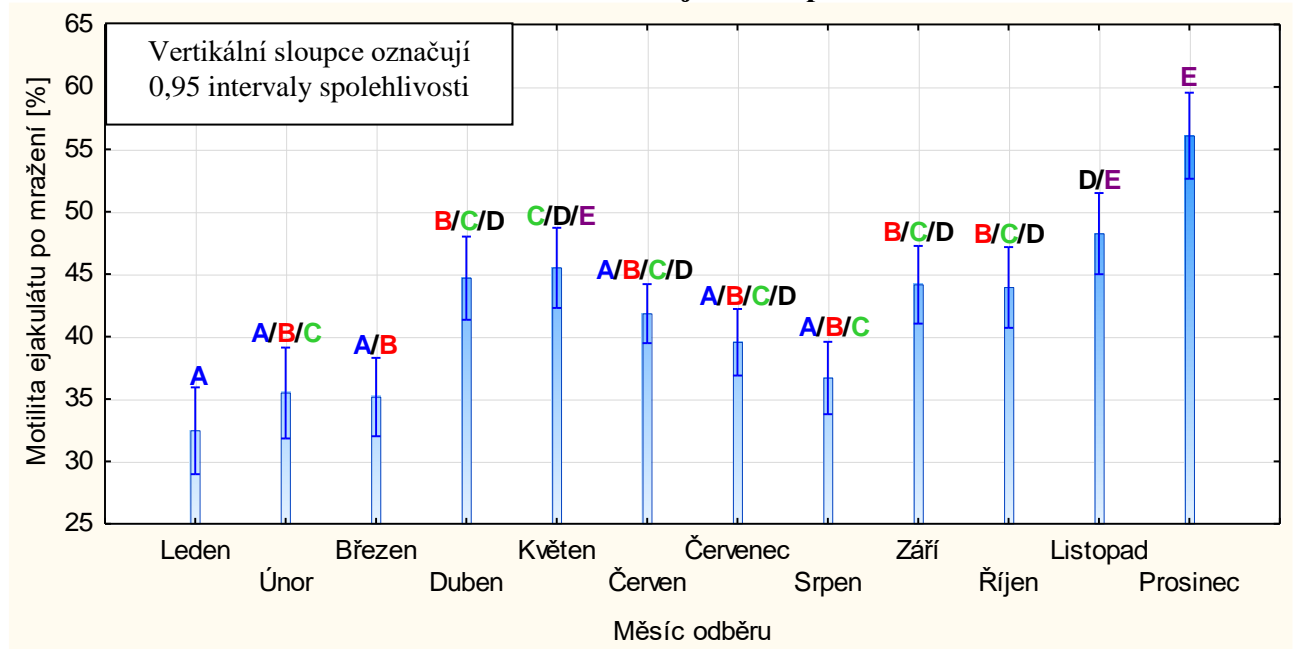
\* hodnoty pro měsíc odběru a denzitu ejakulátu se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

**Graf 14 ANOVA vliv měsíce odběru na motilitu nativního ejakulátu**



A,B - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

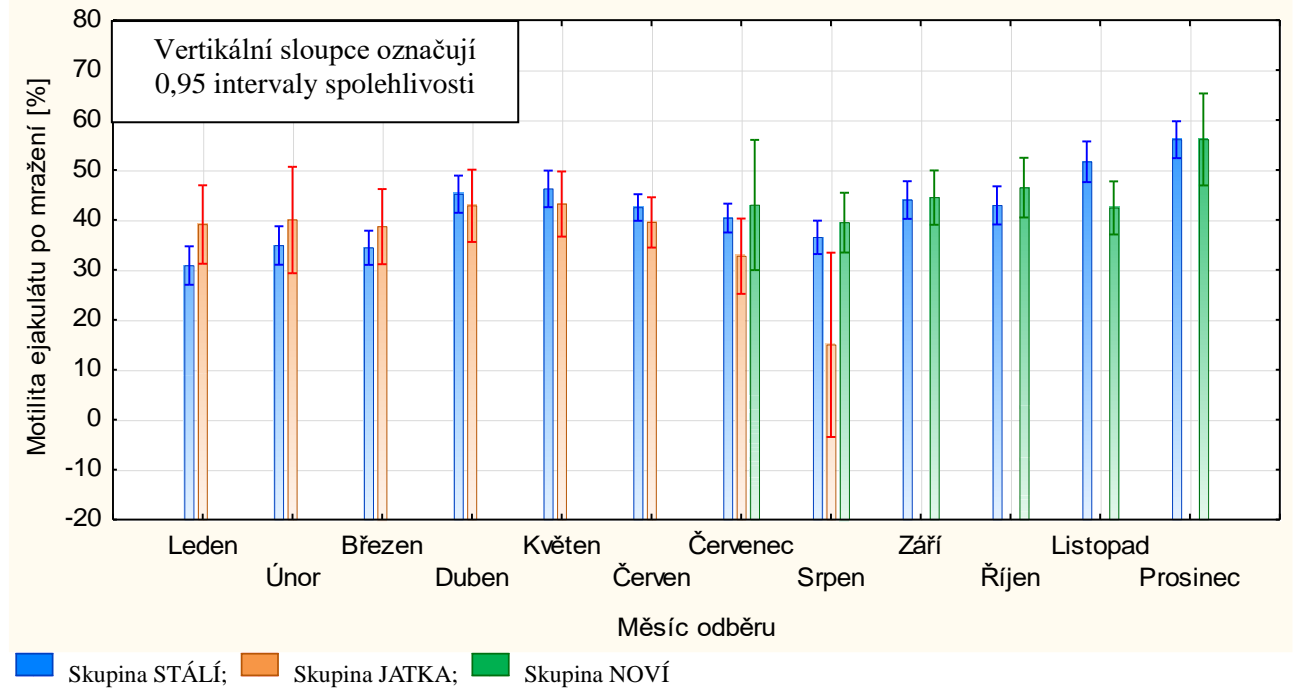
**Graf 15 ANOVA vliv měsíce odběru na motilitu ejakulátu po mražení**



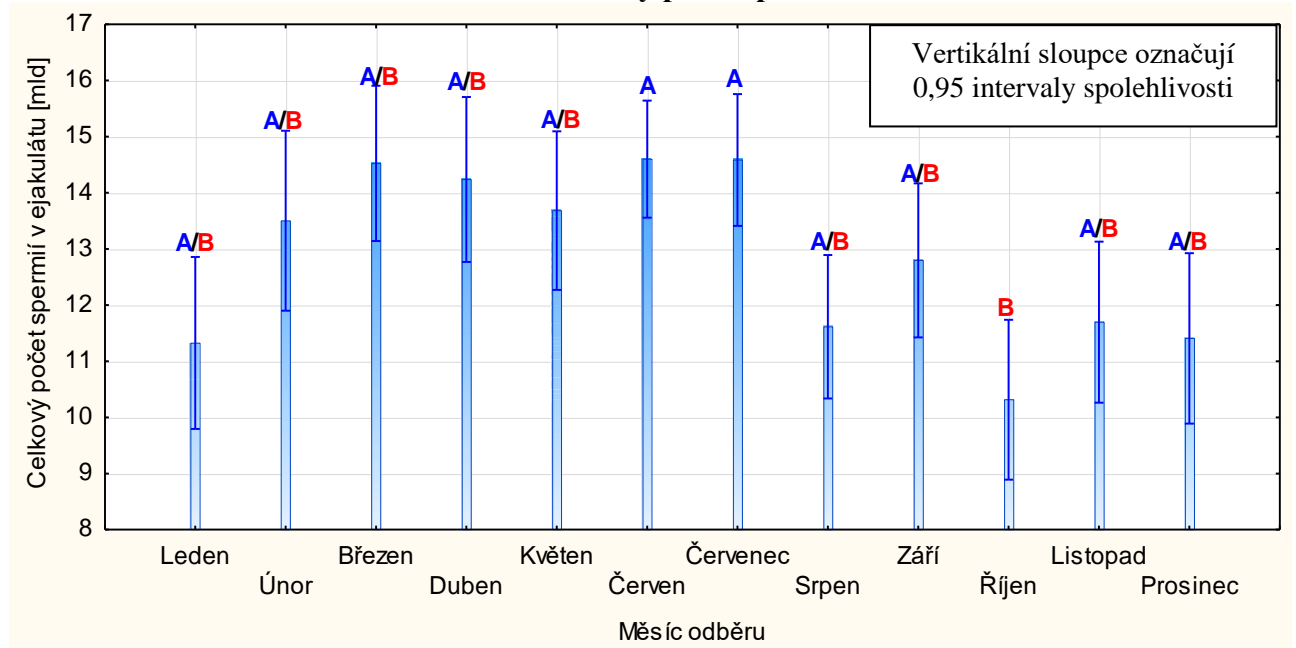
A,B,C,D,E - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$



**Graf 16 Hodnoty motility po mražení podle skupin býků**

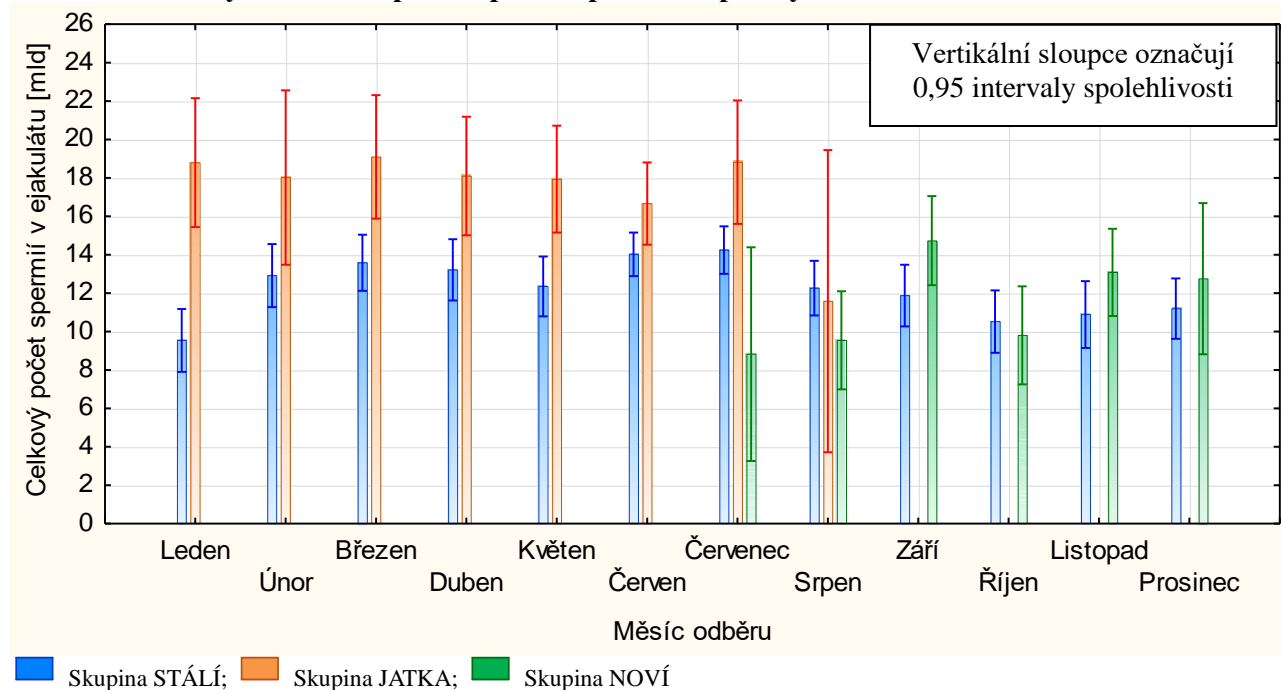


**Graf 17 ANOVA vliv měsíce odběru na celkový počet spermií**



A,B - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

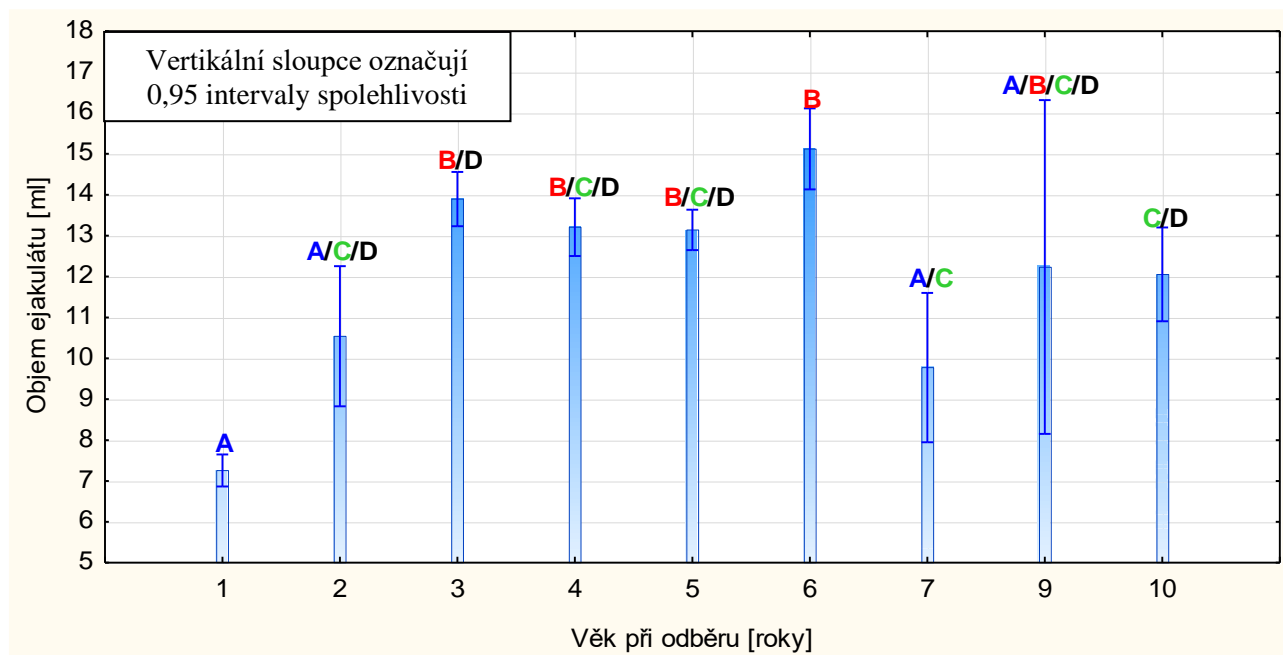
**Graf 18 Hodnoty celkového počtu spermií podle skupin býků**



#### 5.4 Vliv věku

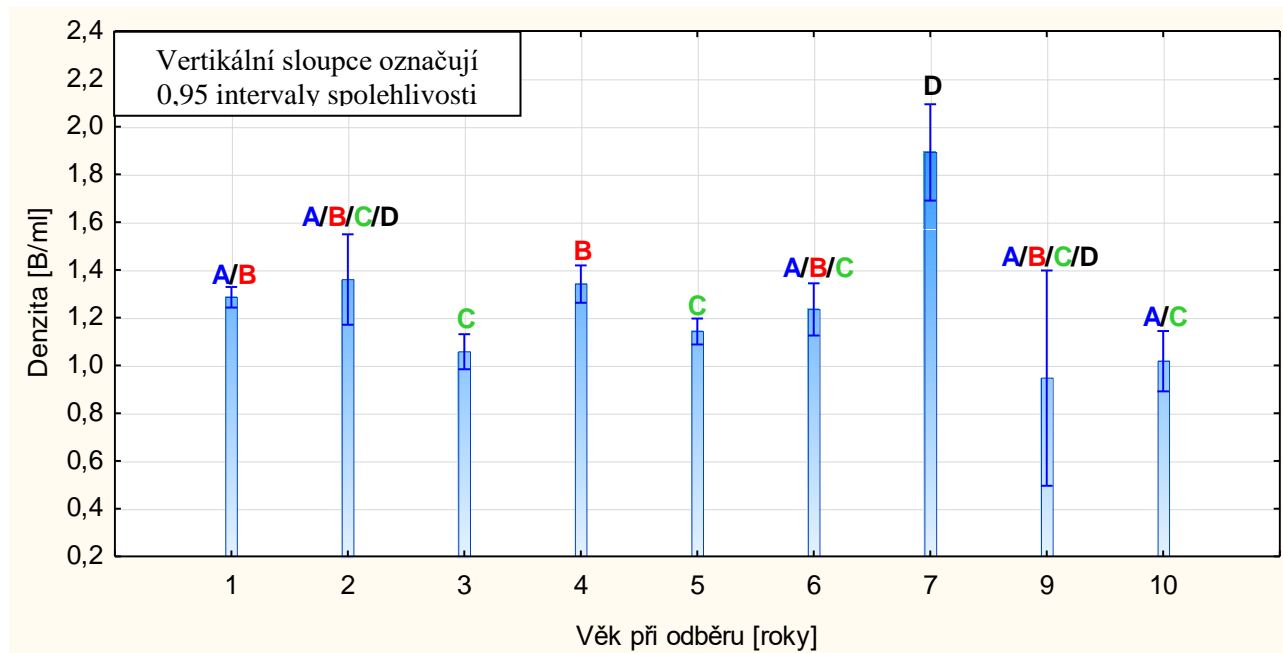
Z vyhodnocených dat vyplývá, že věk má vliv na objem ejakulátu (Graf 19). Od prvního roku života do třetího roku života býka lze sledovat zvyšování množství odebíraného ejakulátu. Vrcholu dosahují hodnoty objemu kolem šestého roku života býka. Od sedmého roku je patrná vyšší variabilita. Statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) byly prokázány i u vlivu věku na denzitu. Nejvyšších hodnot a nejvýznamnějších rozdílů dosahuje denzita během sedmého roku života býka (Graf 20). Rozdíly byly zjištěny i mezi jednoletými a tříletými, respektive pětiletými býky. U motility nativního ejakulátu ani u motility ejakulátu po rozmrazení nebyly prokázány žádné statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ), (Graf 21 a 22). U celkového počtu spermií byly prokázány statisticky významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi jednoletými a tříletými až sedmiletými býky. Další významné rozdíly jsou zobrazeny v grafu 23.

**Graf 19 ANOVA vliv věku na objem ejakulátu**



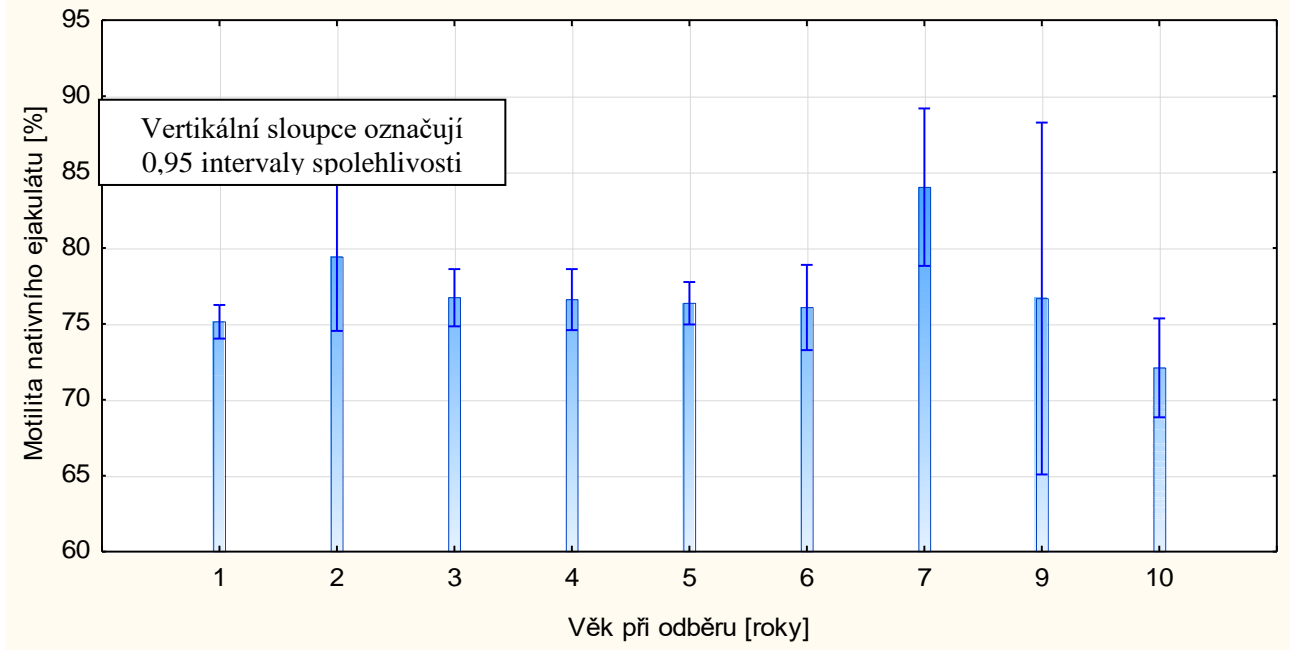
A,B,C,D - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

**Graf 20 ANOVA vliv věku na denzitu ejakulátu**



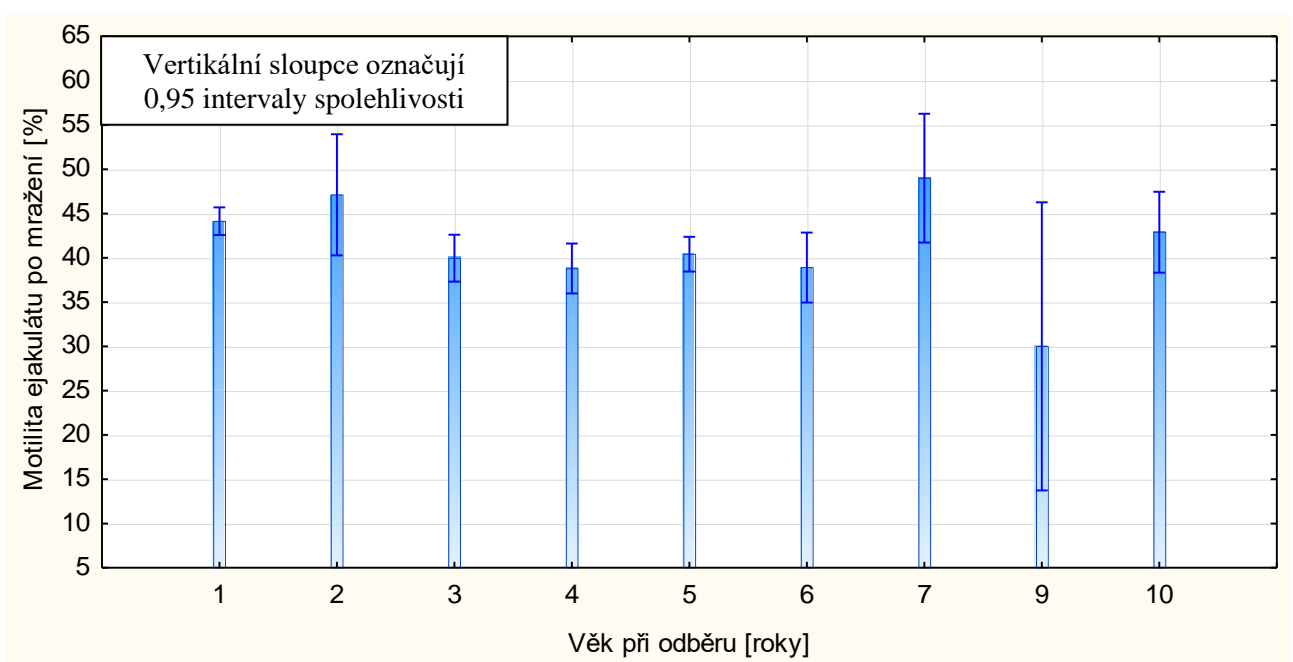
A,B,C,D - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

**Graf 21 ANOVA vliv věku na motilitu nativního ejakulátu**



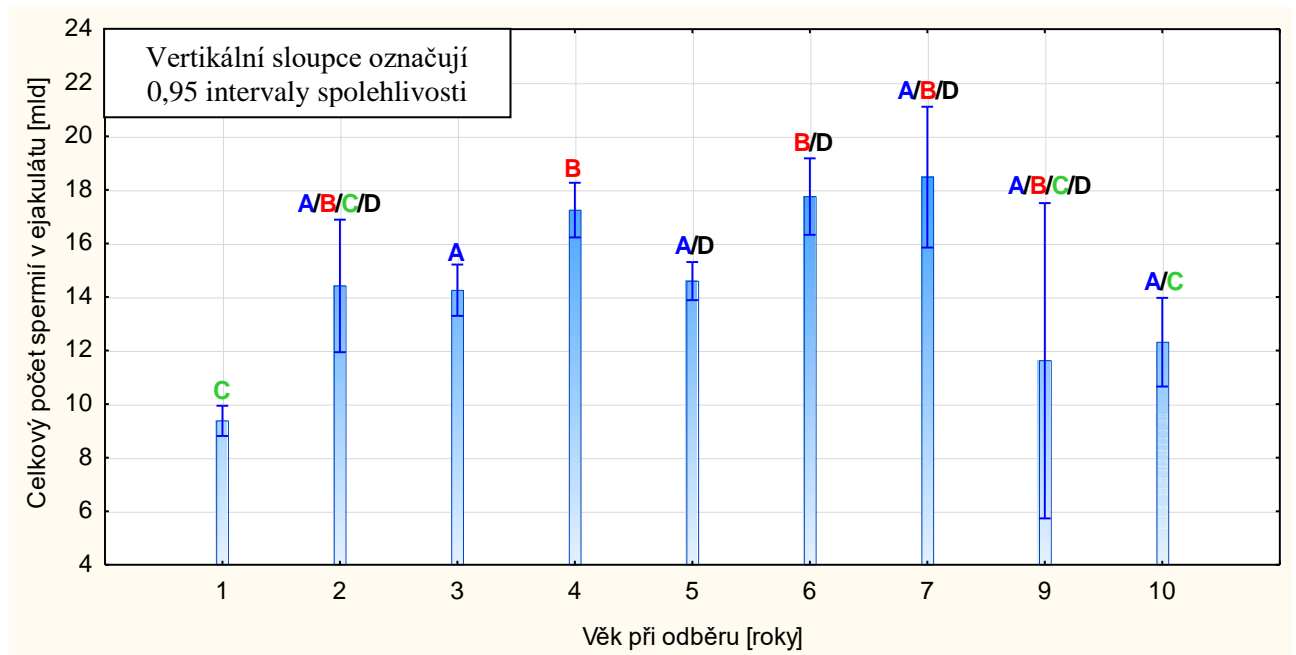
\* hodnoty pro věk a motilitu nativního ejakulátu se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

**Graf 22 ANOVA vliv věku na motilitu ejakulátu po mražení**



\* hodnoty pro věk a motilitu ejakulátu po mražení se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

**Graf 23 ANOVA vliv věku na celkový počet spermií**



A,B,C,D - hodnoty označené stejným indexem se neliší na hladině významnosti  $p < 0,05$

### 5.5 Vztah mezi kvalitativními parametry ejakulátu a motilitou po rozmrazení

U kvalitativních parametrů ejakulátu byla zjišťována závislost, mezi jednotlivými proměnnými. Korelace byla provedena pro objem, densitu, motilitu nativního ejakulátu, motilitu ejakulátu po rozmrazení a celkový počet spermií v ejakulátu současně. Korelační analýza prokázala mírnou, ale signifikantní, závislost motility ejakulátu po rozmrazení na densitě a motilitě nativního ejakulátu, zatímco motilita ejakulátu po mražení nekorelovala s objemem, jak je patrné v Tabulce 4. Byl prokázán vztah mezi objemem a motilitou nativního ejakulátu, i když jen slabý. Slabá nepřímá závislost ( $p < 0,05$ ) byla objevena mezi densitou a objemem ejakulátu. Celkový počet spermií koreluje se všemi zbylými parametry. Nízká závislost byla prokázána pro celkový počet spermií a objem ejakulátu, mírná závislost byla zjištěna pro densitu a celkový počet a střední závislost existuje mezi celkovým počtem spermií a motilitou nativního ejakulátu.

**Tabulka 5 Korelační závislosti kvalitativních parametrů ejakulátu**

| Proměnná                                | Korelační koeficient r |                |                                  |                                      |   |
|---|------------------------|----------------|----------------------------------|--------------------------------------|---|
|   | Objem ejakulátu [ml]   | Denzita [B/ml] | Motilita nativního ejakulátu [%] | Motilita ejakulátu po rozmrazení [%] | Celkový počet spermií v ejakulátu [mld] |
| Objem ejakulátu [ml]                    | 1                      | -0,217*        | 0,173*                           | -0,037                               | 0,288                                   |
| Denzita [B/ml]                          | -0,217*                | 1              | 0,366*                           | 0,254*                               | 0,488*                                  |
| Motilita nativního ejakulátu [%]        | 0,173*                 | 0,366*         | 1                                | 0,381*                               | 0,673*                                  |
| Motilita ejakulátu po rozmrazení [%]    | -0,037                 | 0,254*         | 0,381*                           | 1                                    | 0,090*                                  |
| Celkový počet spermií v ejakulátu [mld] | 0,288*                 | 0,488*         | 0,673*                           | 0,090*                               | 1                                       |

\* korelační závislost je statisticky významná na hladině významnosti  $p < 0,05$

\* pokud  $r < 0,3$  jde o nízký stupeň korelační závislosti

pokud  $0,3 \leq r < 0,5$  jedná se o mírný stupeň korelační závislosti

pokud  $0,5 < r < 0,7$  jedná se o střední stupeň korelační závislosti

## 6 Diskuze

Množství odebraného ejakulátu se pohyboval v rozmezí od 4,40 ml do 26,50 ml u plemene holštýn, od 2,90 ml do 19,70 ml u plemene česká červinka a od 2,60 ml do 27,40 ml u českého strakatého plemene, což koresponduje s hodnotami uváděnými jinými autory, například Louda (2001) udává objem ejakulátu u býků od 3 do 12 ml, Věžník (2004) považuje za kvalitní ejakulát s objemem vyšším než 4 ml. Nejvyššího průměru u objemu odebraného ejakulátu dosahovalo plemeno holštýn. Hodnoty byly výrazně vyšší než u plemen české strakaté a česká červinka. Z výsledků lze usoudit, že mléčná plemena, jako je holštýn, produkují více ejakulátu než plemena masná a kombinovaná. To je v souladu s literaturou, která udává, že dojná plemena skotu dosahují vyššího objemu než plemena žírná (Polák, 1961). Výsledky z této práce, které prokázaly vliv plemene na objem ejakulátu, se shodují s autory Fields et al. (1979) a Lemma & Shemsu (2015), kteří ve svých studiích vliv plemene na objem ejakulátu taktéž prokázaly. Beran et al. (2011) ve své studii, kde porovnával plemena holštýn a české strakaté, vliv plemene na objem ejakulátu neprokázal. Nicméně potvrdil, že plemeno má vliv na jiné parametry ejakulátu, jako je aktivita spermií a procento morfologicky změněných spermií v ejakulátu.

Přestože plemena česká červinka a české strakaté se v objemu nelišila, v denzitě je značný rozdíl. Věžník (2004) uvádí, že v nativním ejakulátu by měla být hustota buněk vyšší než 700 tisíc buněk v  $1 \text{ mm}^3$ , s čímž se shodují i údaje uváděné Loudou (2001), který udává koncentraci spermií v ejakulátu 0,8 až 2 miliony buněk v  $1 \text{ mm}^3$ . Námi naměřené hodnoty pro denzitu dosahovaly 0,351 až 2,248 milionů buněk v  $1 \text{ mm}^3$ . Nejmenší naměřené hodnoty se neshodují s literaturou, ale pro naše hodnocení není dosažení minimální hranice pro denzitu ejakulátu podstatné. Nejvyšší denzita byla naměřena u plemene české strakaté. Denzita zjištěná u ejakulátů býků plemene holštýn a česká červinka byla výrazně nižší než u českého strakatého plemene. Mezi českým strakatým a holštýnem, respektive českou červinkou, byly prokázány významné rozdíly, což značí, že plemeno ovlivňuje denzitu ejakulátu. Efekt plemene na denzitu uvádí i Rehman et al. (2016). To, že má plemenná příslušnost vliv na koncentraci spermií a celkový počet spermií v ejakulátu, prokázal Lemma & Shemsu (2015), s čímž se shodují i výsledky této práce, ve které byl prokázán vliv na denzitu včetně celkového počtu spermií. Morell et al. (2018) uvádí, že plemena masného skotu dosahují vyšší koncentrace spermií než plemena mléčná. Toto tvrzení nemůžeme potvrdit, protože v naší práci byli zahrnuti býci mléčného skotu a kombinovaného skotu. Dalo by se očekávat, že budou kombinovaná plemena dosahovat vyšších hodnot než plemena mléčná. To potvrzuje

denzita u plemene české strakaté, která mnohonásobně převyšuje denzitu u plemene holštýn, nicméně nízké hodnoty u plemene česká červinka, která je taktéž kombinované plemeno, jsou v rozporu s tímto předpokladem, tudíž nemůžeme tento předpoklad zobecnit na vyšší hodnoty denzity u kombinovaného skotu.

Motilita spermií byla plemenem taktéž ovlivněna. Nejvyšších hodnot dosahovalo plemeno holštýn a to jak pro motilitu nativního ejakulátu, tak pro motilitu ejakulátu po mražení. Že je plemeno holštýn odolnější vůči zmrazovacím technikám potvrzuje Biniová et al. (2018). Nejnížší hodnoty byly u plemene česká červinka. I v tomto případě, stejně jako u objemu ejakulátu, lze říci, že rozdíl byl způsobený užitkovým typem býka. Hodnoty motility nativního ejakulátu u mléčného skotu jsou významně vyšší než u kombinovaného skotu. Efekt plemenné příslušnosti na motilitu u všech plemen neprokázal Rehman et al. (2016). Nicméně ve své studii uznává, že vliv plemene na parametry ejakulátu je významný. Že je plemeno, společně s věkem, důležitým faktorem, který ovlivňuje kvalitativní parametry ejakulátu, potvrzuje i Lemma (2015). S tvrzením, že plemeno má signifikantní význam pro kvalitativní hodnoty ejakulátu se shoduje i tato práce.

Dalším faktorem, u kterého byl prokázán vliv na parametry ejakulátu býků, je doba odběru. Sezónní změny v kvalitě spermatu mohou být způsobeny vnějšími podmínkami, jako je teplota, vlhkost vzduchu, denní délka a kvalita krmiva.

V jarním a letním období dosahoval objem nevyšších hodnot, což se shoduje s výsledky studie autora Snój et al. (2013), který také pozoroval nejvyšší hodnoty objemu ejakulátu během jarních a letních měsíců. Uvádí také, že nejnižší hodnoty byly naměřeny během měsíců zimních. Vzhledem k tomu, že spermatogeneze u býka trvá zhruba 60 dní, je pravděpodobné, že nejvyšší produkce spermatu v letních měsících je důsledek postupného prodlužování dne během zimních a jarních měsíců. Nicméně v naší studii byly nejnižší hodnoty během podzimu a v zimních měsících opět pozvolna narůstaly, proto nemůžeme tvrdit, že množství objemu by souviselo s délkou dne. Že býčí ejakulát dosahuje nejvyššího objemu na jaře, popsal už Ruttel et al. v roce 1975. S tvrzením, že nejvyšších hodnot objemu je dosahováno během jara a léta se ztotožňuje i Hameed et al. (2017), přestože ve své studii neprokázal žádné významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi jednotlivými obdobími. Jeho studie ale byla situována v Pákistánu, kde nejsou roční období stejná jako v Evropě a i během zimních měsíců se teploty drží kolem 20 °C. V naší studii byly nejvyšší hodnoty pro objem ejakulátu naměřeny v březnu. Od dubna do července bylo patrné jen malé kolísání. Do konce roku se objem ejakulátu postupně snižoval. Nejnižších hodnot bylo dosaženo v listopadu.



Murphy et al. (2018) uvádí, že během jarních a zimních měsíců je nižší koncentrace ejakulátu a nižší počet spermií v ejakulátu než během letních a podzimních měsíců. Trochu odlišných výsledků dosáhl Ruttle et al. (1975). Nejvyšší hodnoty v jeho studii byly naměřeny během podzimu a nejnižší během léta. S těmito tvrzeními můžeme souhlasit jen z poloviny. V této práci denzita během roku jen mírně kolísala. Nejvyšších hodnot dosahovala během jara a podzimu, nejnižších během léta a zimy, ale bez významných statistických rozdílů ( $p < 0,05$ ). Malé rozdíly v denzitě zaznamenal i Snój et al. (2013), který, stejně jako v naší práci, pozoroval nejnižší celkový počet spermií v ejakulátu během zimy a nejvyšší během léta. Celkový počet spermií byl potom nejvyšší během jarních a letních měsíců. Přestože denzita není příliš ovlivňována sezónou, celkový počet spermií má sezónní charakter, což naznačuje, že objem je přizpůsobován v různých ročních obdobích tak, aby odpovídal produkci spermií ve varlatech.

Motilita nativního ejakulátu byla nejvyšší na jaře. Od jara až do zimy hodnoty klesaly. Během měsíců nebyly významné statistické rozdíly ( $p < 0,05$ ), signifikantní rozdíly byly pouze mezi lednovými a červnovými hodnotami, kdy v lednu byly hodnoty nejnižší a v červnu nejvyšší. Stejně jako motilita nativního ejakulátu byla obdobím odběru ovlivněna i motilita po mrazení. Nejvyšší hodnoty motility po mrazení byly na podzim, nejnižší během léta. Během zimy a jara se hodnoty téměř nelišily. Významné statistické rozdíly ( $p < 0,05$ ) byly prokázány pouze pro léto a podzim. Na podzim bylo vyřazeno méně insemináčnických dávek než během jiného období. To může být způsobeno změnou teplot, kdy po vysokých teplotách během letních měsíců dochází k poklesu teplot a zvýšení pohody zvířat. Bhakat et al. (2011) se s našimi výsledky shoduje nejvíc, protože ve své studii prováděné v Indii pozoroval nejvyšší hodnoty během období dešťů, kdy dochází k poklesu teplot a horko střídá déšť. Že během období s nízkými teplotami je vyřazováno méně dávek, než v období vysokých teplot, uvádí ve své studii Koivisto et al. (2009). Ve studii Murphyho et al. (2018) je také potvrzeno, že během zimy je aktivita spermií nejvyšší.

Během měsíců bylo patrné kolísání hodnot motility. Rozdíly byly zejména mezi hodnotami ze začátku roku a hodnotami z konce roku. Nejnižších hodnot motility po mrazení bylo dosaženo v lednu, zatímco nejvyšších v prosinci. To značí rozdíly způsobené spíše vlivem změny odebíraných býků než obdobím, vzhledem k tomu, že leden i prosinec spadají do stejného ročního období. Přesto to může souviset i s průměrnými teplotami, kdy leden byl jediný měsíc, jehož průměrná teplota klesla pod bod mrazu, což mohlo mít vliv na kvalitu ejakulátu. Příčinou by mohlo být i rozdílné zastoupení plemen býků. V průběhu roku 2017 došlo ke změně v obsazení býků. K této změně došlo v průběhu července a srpna, kdy byla

rušena jiná inseminační stanice, a býci z této stanice byli přesunuti na sledovanou stanici. Starší býci ze stanice byli během června až srpna více odebíráni, kvůli zajištění zásob jejich inseminačních dávek (viz zvýšení počtu odběrů během června a července - Graf 1) a následně byli odesláni na jatka, aby se uvolnilo místo pro nově příchozí býky. Tato změna způsobila rozdílné rozložení plemenné příslušnosti v průběhu roku. Do června převažovaly odběry od býků plemene holštýn, během letních měsíců se poměr změnil a do konce roku převažovalo plemeno české strakaté. Změna tohoto poměru měla vliv na některé analýzy. Změny byly výrazné právě u motility ejakulátu po zmrazení, kdy býci, kteří odcházeli na jatka, měli nižší motilitu než nově příchozí. Rozdíly ale nebyly signifikantní.

Věk má na ejakulát významný vliv, jak potvrdila tato studie. Objem pozitivně koreluje s věkem býka (Bhakat et al. 2011). To potvrdila i naše studie, kdy od prvního do třetího roku věku býka objem rovnoměrně narůstal. Malé objemy ejakulátu u mladých býků jsou pravděpodobně způsobeny růstem varlat i po dosažení puberty (Snoj et al. 2013). Vrcholných hodnot objemu dosahují býci po 4. roku života, v této práci byly nejvyšší hodnoty dosaženy v 6 letech. Starší býci dosahují lepších parametrů ejakulátu (Padrik et al. 2012) a to zhruba do 12 let věku, kdy objem postupně klesá (Javed et al. 2000). S tvrzením, že objem ejakulátu narůstá až do 12 let, nemůžeme souhlasit. Naše studie ukázala nárůst objemu do 3 roku, poté se hodnoty sice nesnižovaly, ale ani nenavyšovaly. Mezi třetím a šestým rokem života býka bylo pouze mírné kolísání v hodnotách objemu. Po 6. roce ale došlo k poklesu. Pokles po 7 roce života býka uvádí ve své studii i Snoj et al. (2013), který zaznamenal rozdílný věk, kdy dochází k poklesu množství ejakulátu, v závislosti na plemeni. Od sedmého roku je v naší studii patrná vyšší variabilita, která je zapříčiněna menším počtem vzorků. Držení starších býků na inseminačních stanicích závisí na poptávce po jejich genetickém materiálu. Nyní převažuje poptávka po 5 až 6 letých býcích, kteří jsou již prověřeni, zatímco mladí býci, tzv. čekatelé, teprve na svou příležitost čekají. Dá se ale předpokládat, že v blízké budoucnosti už na inseminačních stanicích budou převažovat mladší býci, kolem 3 až 4 let, vlivem nástupu genomických postupů v zjišťování plemenné hodnoty býků. Díky genomice nebude nutné čekat na užitkovost potomků a bude se mnohem dříve vědět, zda je býk zlepšovatel či nikoli.

Denzita dosahovala nejvyšších hodnot v 7. roce. U sedmiletých býků byly naměřeny nejvyšší hodnoty i pro zbylé parametry, kterými jsou celkový počet spermií v ejakulátu a motilita jak nativního ejakulátu tak po mrazení. Tyto výkyvy hodnot mohou být dány tím, že do 7 let jsou drženi pouze kvalitní býci s výbornými parametry ejakulátu, o které je stále zájem na trhu. Vysoká denzita byla zjištěna i u dvouletých býků, kdy byly hodnoty vyšší než

u tří a víceletých. To potvrzuje i Murphy et al. (2018), který nejvyšší koncentrace zjistil u býků mezi prvním a druhým rokem věku. Přestože denzita u takto mladých býků je vysoká, motilita se vychyluje na opačnou stranu a u býků v jednom roce dosahuje nižších hodnot než u býků starších. I tento výsledek souhlasí s výsledky studie Murphyho et al. (2018), ve které nejnižších hodnot motility nabývali taktéž býci do 1 roku věku. Nicméně v motilitě mezi věkovými skupinami býků nebyly zjištěny žádné statistické rozdíly ( $p < 0,05$ ). Snój et al. (2013) tvrdí, že celkový počet spermií roste s věkem. I s tímto tvrzením můžeme souhlasit. Zvyšování celkového počtu spermií s rostoucím věkem může být, stejně jako zvyšování objemu, důsledek zvětšování velikosti varlat, která narůstá až 5 let po dosažení puberty (Murugan et al. 2003). Do 7. roku byl patrný nárůst počtu spermií, po 7. roce došlo k poklesu. Bhakat et al. (2011) zjistil, že všechny parametry, kromě koncentrace spermií, jsou ovlivněny věkem býka. S tímto nelze na základě našich výsledků souhlasit. V naší studii byl prokázán vliv věku býka i na koncentraci spermií.

Zhodnoceny byly také závislosti mezi jednotlivými parametry ejakulátu. Byla prokázána negativní korelace objemu a denzity. Tuto závislost objevil i Fields et al. (1979). Zjistil také pozitivní korelaci mezi koncentrací spermií a motilitou ejakulátu, stejně jako Javed et al. (2000). I v tomto případě se naše výsledky shodují. Denzita pozitivně koreluje nejen s motilitou, ale také s celkovým počtem spermií, jak uvádí také Rehman et al. (2016). Kladná závislost byla prokázána i mezi objemem a motilitou. Celkový počet spermií pozitivně koreluje se všemi parametry ejakulátu.

## 7 Závěr

Výsledky analýzy potvrzují, že kvalitativní parametry ejakulátu jsou ovlivňovány individualitou býka, jeho věkem a plemennou příslušností. Významný vliv býka byl prokázán ( $p < 0,05$ ) pro objem, denzitu a celkový počet spermií v ejakulátu. Plemeno se prokázalo jako významné ( $p < 0,05$ ) pro všechny hodnocené parametry. Věk býka při odběru významně ovlivňoval ( $p < 0,05$ ) objem, denzitu a celkový počet spermií.

Doba odběru byla také prokázána jako významný faktor ( $p < 0,05$ ) ovlivňující parametry ejakulátu. Roční období mělo vliv na objem a motilitu nativního ejakulátu i ejakulátu po mrazení. Sezónní charakter měl i celkový počet spermií v ejakulátu. Významné rozdíly ( $p < 0,05$ ) byly prokázány pro měsíc odběru. Nejvíce se měsíc odběru projevil u motility ejakulátu po mrazení. Ale měsíc měl vliv i na hodnoty objemu, motility nativního ejakulátu a celkového počtu spermií.

Na základě výsledků tedy můžeme souhlasit s hypotézou, že kvalitativní parametry čerstvého ejakulátu a jeho mrazitelnost (objem, motilita, koncentrace, aktivita po rozmrazení) jsou významně ovlivňovány individualitou býka, termínem odběru, ročním obdobím.

Můžeme potvrdit hypotézu, že aktivita spermií po rozmrazení koreluje s koncentrací a motilitou původního čerstvého ejakulátu. Motilita ejakulátu po rozmrazení koreluje s denzitou, motilitou nativního ejakulátu a celkovým počtem spermií. Pro objem a motilitu po mrazení nebyla zjištěna statisticky významná závislost. Objem ejakulátu koreluje s motilitou nativního ejakulátu a celkovým počtem spermií v ejakulátu. Slabá negativní korelace byla prokázána pro objem a denzitu. Pro denzitu byla prokázána mírná závislost s motilitou nativního ejakulátu i ejakulátu po mrazení a středně silná závislost s celkovým počtem spermií v ejakulátu. Motilita nativního ejakulátu koreluje se všemi hodnocenými parametry.

Pokud chceme dosáhnout vysoké kvality ejakulátu, je potřeba mít přehled o individualitě býka. Jak bylo zjištěno, nejlepších parametrů dosahují býci od tří do zhruba sedmi let. Je třeba brát v potaz, že mladí býci, přestože již mají pubertu za sebou, nedosahují plných hodnot spermioqramu. Při zpracovávání ejakulátu je nutné uvažovat o plemenné příslušnosti, která má vliv na kvalitu ale také na zpracovatelnost a odolnost vůči chladovému šoku. Nejvhodnějším obdobím pro odebírání ejakulátu s nejlepšími parametry nativního ejakulátu se ukázalo jaro a léto. Nicméně pro dlouhodobé uchování ejakulátu se jeví nejvhodnější podzim, kdy byla motilita ejakulátu po mrazení nejvyšší, a v tomto období bylo také vyřazeno méně dávek než v jiném období.

## 8 Zdroje

- Ahmad M, Asmat MT, Najib-ur-Rehman, Khan MZ. 2003. Semen Characteristics of Sahiwal Bulls in Relation to Age and Season. *Pakistan Veterinary Journal* **23**: 202-206.
- Amann RP, Wise ME, Glass JD, Nett TM. 1986. Prepubertal Changes in the Hypothalamic-pituitary Axis of Holstein Bulls. *Biology of Reproduction* **34**: 71-80.
- Barth AD, Brito LF, Kastelic JP. 2008. The Effect of Nutrition on Sexual Development of Bulls. *Theriogenology* **70**: 485-494.
- Baust JG, Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. 2000. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. *Journal of Andrology* **21**: 1-7.
- Beran J, Stádník L, Ducháček J, Toušová R, Louda F, Štolc L. 2011. Effect of Bulls' Breed, Age and Body Condition Score on Quantitative and Qualitative Traits of Their Semen. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **59**: 37-44.
- Bhakat M, Mohanty TK, Raina VS, Gupta AK, Khan HM, Mahapatra RK, Sarkar M. 2011. Effect of Age and Season on Semen Quality Parameters in Sahiwal Bulls. *Tropical Animal Health and Production* **43**: 1161-1168.
- Biniová Z, Stádník L, Doležalová M, Ducháček J. 2018. Effect of Thawing Method on Bull Sperm Survival in Ejaculates Frozen in 4 ml and 8 ml Volumes. *Czech Journal of Animal Science* **63**: 399-407.
- Bollwein H, Janett F, Kaske M. 2017. Effects of Nutrition on Sexual Development of Bulls. *Animal Reproduction* **14**: 607-613.
- Brito LFC. 2016. A Multilaboratory Study on the Variability of Bovine Semen Analysis. *Theriogenology* **85**: 254-266.
- Büyükleblebici S, Tuncer PB, Bucak MN, Eken A, Sarıözkan S, Taşdemir U, Endirlik BÜ. 2014. Cryopreservation of Bull Sperm: Effects of Extender Supplemented with Different Cryoprotectants and Antioxidants on Sperm Motility, Antioxidant Capacity and Fertility Results. *Animal Reproduction Science* **150**: 77-83.
- Coulter GH, Cook RB, Kastelic JP. 1997. Effects of Dietary Energy on Scrotal Surface Temperature, Seminal Quality and Sperm Production in Young Beef Bulls. *Journal of Animal Science* **75**: 1048-1052.
- El-Harairy MA, Eid LN, Zeidan AEB, Abd El-Salaam AM, El-Kishk MAM. 2011. Quality and Fertility of the Frozen – Thawed Bull Semen as Affected by the Different Cryoprotectants and Glutathione Levels. *Journal of American Science* **7**: 791-801.
- Fasano G. 2013. Contribution of Vitrification to Human Assisted Reproduction. Université Libre de Bruxelles, Belgie.
- Fields MJ, Burns WC, Warnick AC. 1979. Age, Season and Breed Effects on Testicular Volume and Semen Traits in Young Beef Bulls. *Journal of Animal Science* **48**: 1299-1304.
- Forero-Gonzalez RA, Celeghini ECC, Raphael CF, Andrade AFC, Bressan FF, Arruda RP. 2012. Effects of Bovine Sperm Cryopreservation Using Different Freezing

Techniques and Cryoprotective Agents on Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes. *Andrologia* **44**: 154-159.

- Gamčík P, Kozumplík J, Schwarc F, Vlček Z, Zibrín M. 1976. Umělá inseminácia a andrológia hospodárskych zvierat. *Príroda*, Bratislava.
- Gamčík P, Kozumplík J. 1984. Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat. *Príroda*, Bratislava.
- Hafez B, Hafez ESE, (eds.). 2000. *Reproduction in Farm Animals*. Williams and Wilkins. Philadelphia, USA.
- Hameed S, Masood S, Zaneb H, Khan MS, Younis M, Habib-ur-Rehman, Avais M, Khan MUR. 2017. Semen Characteristics as Influenced by Seasonal and Climatic Variations in Nili-Ravi Buffalo Breeding Bulls. *The Journal of Animal & Plant Sciences* **27**: 1750-1757.
- Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR. 2001. Longitudinal Effects of Aging on Serum Total and Free Testosterone Levels in Healthy Men. *Baltimore Longitudinal Study of Aging. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86**: 724-731.
- Hofírek B, Dvořák R, Němeček L, Doležel R, Pospíšil Z, (eds.). 2009. *Nemoci skotu*. Česká buiatrická společnost, Noviko a.s., Brno.
- Hu JH, Zan LS, Zhao XL, Li QW, Jiang ZL, Li YK, Li X. 2010. Effects of Trehalose Supplementation on Semen Quality and Oxidative Stress Variables in Frozen – thawed Bovine Semen. *Journal of Animal Science* **88**: 1657–1662.
- Chenoweth PJ. 2005. Genetic Sperm Defects. *Therionology* **64**: 457-468.
- Jang TH, Park SCh, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, Choi ChW, Lee SR, Han J. 2017. Cryopreservation and Its Clinical Applications. *Integrative Medicine Research* **6**: 12-18.
- Javed MT, Khan A, Kausar R. 2000. Effect of Age and Season on Some Semen Parameters of Nili-Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bulls. *Veterinarski Arhiv* **70**: 83-94.
- Jelínek P, Koudela K, Doskočil J, Kotrbáček V, Kovářů F, Kroupová V, Kučera M, Kudláč E, Trávníček J, Valent M. 2003. *Fyziologie hospodárskych zvierat*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno.
- Kastelic JP, Cook RB, Pierson RA, Coulter GH. 2001. Relationships Among Scrotal and Testicular Characteristics, Sperm Production and Seminal Quality in 129 Beef Bulls. *Canadian Journal of Veterinary Research* **65**: 111-115.
- Klabzuba J, Kožnarová V. 2009. *Aplikovaná meteorologie a klimatologie, XI. Díl, Mikroklima stájí*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Kliment J. 1983. *Reprodukcia hospodárskych zvierat*. *Príroda*, Bratislava.
- Koivisto MB, Costa MTA, Perri SHV, Vicente WRR. 2009. The Effect of Season on Semen Characteristics and Freezability in *Bos indicus* and *Bos taurus* Bulls in the Southeastern Region of Brazil. *Reproduction in Domestic Animals* **44**: 587-592.

- Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, (eds.). 2012. Rate of De Novo Mutations and the Importance of Father's Age to Disease Risk. *Nature* **488**: 471-415.
- Kopřiva A. 2001. Technika krmení hospodářských zvířat. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno.
- Kovář V, Sobek B. 1965. Porodnictví a inseminace. Státní zemědělské vydavatelství, Praha.
- Kumar S, Millar JD, Watson PF. 2003. The Effect of Cooling Rate on the Survival of Cryopreserved Bull, Ram, and Boar Spermatozoa: a Comparison of Two Controlled-rate Cooling Machines. *Cryobiology* **46**: 246 – 253.
- Kumar A, Singh P, Bhakat M, Singh S, Nitharwal K, Gupta AK. 2017. Effect of Feed Energy Levels on Semen Quality and Freezability of Young Murrah Buffalo Bulls. *Buffalo Bulletin* **36**: 415-426.
- Lemma A, Shemsu T. 2015. Effect of Age and Breed on Semen Quality and Breeding Soundness Evaluation of Pre-Service Young Bulls. *Journal of Reproduction and Infertility* **6**: 35-40.
- Luetjens CM, Rolf C, Gassner P, Werny JE, Nieschlag E. 2002. Sperm Aneuploidy Rates in Younger and Older Men. *Human Reproduction* **17**: 1826–1832.
- Louda F. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. Česká zemědělská univerzita, Praha.
- Mahmood SA, Ijaz A, Ahmad N, Rehman H, Zaneb H, Farooq U. 2014. A Study on Relationships Among Age, Body Weight, Orchidometry and Semen Quality Parameters in Adult Cholistani Breeding Bulls. *The Journal of Animal & Plant Sciences* **24**: 380-384.
- Máchal L. 2000. Dynamika vztahu reprodukční výkonnosti krav a plemenných býků k vybraným biochemickým ukazatelům krevní plazmy. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno.
- Marvan F. 2011. Morfologie hospodářských zvířat. Nakladatelství Bázda, Praha.
- Martin RH, Rademaker AW. 1987. The Effect of Age on the Frequency of Sperm Chromosomal Abnormalities in Normal Men. *The American Journal of Human Genetics* **41**: 484-492.
- Meyerhoffer DC, Wettemann RP, Coleman SW, Wells ME. 1985. Reproductive Criteria of Beef Bulls During and After Exposure to Increased Ambient Temperature. *Journal of Animal Science* **60**: 352-357.
- Meteorologická stanice Brno-Židenice. [Meteo.jankovic. Meteorologická stanice Brno, Brno.](http://www.meteo.jankovic.cz/zaznamy/rok-2017/) Available from <http://www.meteo.jankovic.cz/zaznamy/rok-2017/> (accessed 02-2019).
- Minton JE, Wettemann RP, Meyerhoffer DC, Hintz RL, Turman EJ. 1981. Serum Luteinizing Hormone and Testosterone in Bulls During Exposure to Elevated Ambient Temperature. *Journal of Animal Science* **53**: 1551-1558.
- Morrell JM, Valeanu AS, Lundeheim N, Johannisson A. 2018. Sperm Quality in Frozen Beef and Dairy Bull Semen. *Acta Veterinaria Scandinavica* **60**: 41.

- Murugan RT, Raman KS. 2003. Influence of Age and Body Weight on Semen Production Traits in Murrah Bulls. *Indian Journal of Animal Science* **3**:767-768.
- Murphy EM, Kelly AK, O'Meara C, Eivers B, Lonergan P, Fair S. 2018. Influence of Bull Age, Ejaculate Number, and Season of Collection on Semen Production and Sperm Motility Parameters in Holstein Friesian Bulls in a Commercial Artificial Insemination Centre. *Journal of Animal Science* **96**: 2408-2418.
- Neill JD, (eds.). 2006. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Academic Press, Amsterdam.
- Nichi M, Bols PEJ, Zuge RM, Barnabe VH, Goovaerts IGF, Barnabe RC, Cortada CNM. 2006. Seasonal Variation in Semen Quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* Bulls Raised Under Tropical Conditions. *Theriogenology* **66**: 822-828.
- Padrik P, Hallap T, Kaart T, Bulitko T, Jaakma U. 2012. Relationships between the Results of Hypo-osmotic Swelling Tests, Sperm Motility and Fertility in Estonian Holstein Dairy Bulls. *Czech Journal of Animal Science* **57**: 490-497.
- Parks, J. E. 2006. Processing and Handling Bull Semen for Artificial Insemination. Researchgate. Cornell university: Department of Animal Science. Available from [https://www.researchgate.net/publication/267368939\\_Processing\\_and\\_Handling\\_Bull\\_Semen\\_for\\_Artificial\\_Insemination\\_-\\_Don%27t\\_Add\\_Insult\\_to\\_Injury](https://www.researchgate.net/publication/267368939_Processing_and_Handling_Bull_Semen_for_Artificial_Insemination_-_Don%27t_Add_Insult_to_Injury) (accessed 09-2018).
- Petersen PM, Pakkenberg B. 2000. Stereological Quantitation of Leydig and Sertoli Cells in the Testis from Young and Old Men. *Image Analysis and Stereology* **9**: 215-218.
- POLÁK L. 1961. *Inseminace skotu*. 2., přeprac. vyd. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Reece WO. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Grada Publishing, a. s., Praha.
- Rehman H, Alhidary IA, Khan RU, Qureshi MS, Sadique U, Khan H, Yaqoob SH. 2016. Relationship of Age, Breed and Libido with Semen Traits of Cattle Bulls. *Pakistan Journal of Zoology* **48**: 1793-1798.
- Rhynes WE, Ewing LL. 1973. Testicular Endocrine Function in Hereford Bulls Exposed to High Ambient Temperature. *Endocrinology* **92**: 509-515.
- Ruttle JL, Ezaz Z, Sceery EJ. 1975. Some Factors Influencing Semen Characteristics in Range Bulls. *Journal of Animal Science* **41**: 1069-1076.
- Sajjad M, Ali S, Ullah N, Anwar M, Akhter S, Andrabi SMH. 2007. Blood Serum Testosterone Level and its Relationship with Scrotal Circumference and Semen Characteristics in Nili-Ravi Buffalo Bulls. *Pakistan Veterinary Journal* **27**: 63-66.
- Sambraus HH. 2006. *Atlas plemen hospodářských zvířat*. Nakladatelství Brázda, Praha.
- Seccari P, Martorana F, Pellegrini S, Luisi M. 1976. Variation of Plasma Testosterone in Developing Friesian Bulls. *Journal of Animal Science* **42**: 405-409.
- Sedláčková T, Zídková J, Brázdová A, Melčová M, Škop V, Cibulka J, Ulčová-Gallová Z. 2010. Protilátky proti spermiím. *Chemické listy* **104**: 3-6.



- Sláma P, Pavlík A, Tančín V. 2015. Morfologie a fyziologie hospodářských zvířat. Mendelova univerzita v Brně, Brno.
- Snój T, Kóbal S, Majdic G. 2013. Effects of Season, Age, and Breed on Semen Characteristics in Different Bos taurus Breeds in a 31 - year, Retrospective Study. Theriogenology **79**: 847-852.
- Sova Z, (eds.). 1990. Fyziologie hospodářských zvířat. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Šmerha J. 1980. Reprodukce hospodářských zvířat I. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
- Věžník Z. 2004. Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy. Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně, Brno.
- Voříšková J. 2001. Etologie hospodářských zvířat. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Ministerstvo zemědělství. 2000. Vyhláška č. 471 ze dne 13. prosince 2000, kterou se provádějí některá ustanovení zákona č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat. Pages 2274-2289 in Sbírka zákonů České republiky, 2000, částka 49. Česká republika.
- Watson PF. 2000. The Causes of Reduced Fertility With Cryopreserved Semen. Animal Reproduction Science **60**: 481–492.
- Weiss P, (eds.). 2010. Sexuologie. Grada, Praha.
- Wolf FR, Almquist JO, Hale EB. 1965. Prepuberal Behavior and Puberal Characteristics of Beef Bulls on High Nutrient Allowance. Journal of Animal Science **24**: 761-765.
- Zeman L, Doležal P, Kopřiva A, Mrkvicová E, Procházková J, Ryant P, Skládanka J, Straková E, Suchý P, Veselý P, Zelenka J. 2006. Výživa a krmení hospodářských zvířat. ProfiPress, s.r.o., Praha.

## Seznam obrázků, grafů a tabulek

- Graf 24 Počet provedených odběrů během roku
- Graf 25 ANOVA vliv plemene na objem ejakulátu
- Graf 26 ANOVA vliv plemene na denzitu ejakulátu
- Graf 27 ANOVA vliv plemene na motilitu nativního ejakulátu
- Graf 28 ANOVA vliv plemene na motilitu ejakulátu po mražení
- Graf 29 ANOVA vliv plemene na celkový počet spermií
- Graf 30 ANOVA Vliv ročního období na objem ejakulátu
- Graf 31 ANOVA Vliv ročního období na denzitu ejakulátu
- Graf 32 ANOVA vliv ročního období na motilitu nativního ejakulátu
- Graf 33 ANOVA vliv ročního období na motilitu ejakulátu po mražení
- Graf 34 ANOVA vliv ročního období na celkový počet spermií
- Graf 35 ANOVA vliv měsíce odběru na objem ejakulátu
- Graf 36 ANOVA vliv měsíce odběru na denzitu ejakulátu
- Graf 37 ANOVA vliv měsíce odběru na motilitu nativního ejakulátu
- Graf 38 ANOVA vliv měsíce odběru na motilitu ejakulátu po mražení
- Graf 39 Hodnoty motility po mražení podle skupin býků
- Graf 40 ANOVA vliv měsíce odběru na celkový počet spermií
- Graf 41 Hodnoty celkového počtu spermií podle skupin býků
- Graf 42 ANOVA vliv věku na objem ejakulátu
- Graf 43 ANOVA vliv věku na denzitu ejakulátu
- Graf 44 ANOVA vliv věku na motilitu nativního ejakulátu
- Graf 45 ANOVA vliv věku na motilitu ejakulátu po mražení
- Graf 46 ANOVA vliv věku na celkový počet spermií
- Obrázek 4 Pohlavní soustava býka (Marvan 2011)
- Obrázek 5 Řez hlavičkou bovinní spermie (Věžník et al. 2004)
- Obrázek 6 Fyzikální změny v buňkách během mražení (Jang et al. 2017)
- Tabulka 6 Požadavky na kvalitu býčího spermatu (Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 471 / 2000 Sb.)
- Tabulka 7 Vliv energetického příjmu na mražený ejakulát (převzato z Kumar et al. 2017)
- Tabulka 8 Stresory charakteristické pro kryokonzervaci (Baust et al. 2009)
- Tabulka 9 Průměrné měsíční teploty v průběhu roku 2017 (Meteorologická stanice Brno)
- Tabulka 10 Korelační závislosti kvalitativních parametrů ejakulátu
- Schéma 2 Rozdělení faktorů působících na ejakulát býka
- Schéma 2 Hormonální řízení reprodukčních funkcí samců (Louda et al. 2001)

### **Seznam použitých zkratk**

FSH –folikulostimulační hormon)

LH – luteinizační hormon

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

ATP – adenosintrifosfát

ICSH – intersticiální buňky stimulující hormon

CD8 – diferenciační skupina 8

ROS –reaktivní formy kyslíku

ID – inseminační dávka