

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Vliv vybraných druhů ředidel a plemenné příslušnosti
na funkční vlastnosti kryokonzervovaných psích
spermií**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Anežka Zelenková

Vedoucí práce: Ing. Jiří Šichtař, Ph.D.

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci „Vliv vybraných druhů ředidel a plemenné příslušnosti na funkční vlastnosti kryokonzervovaných psích spermií“ vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2015 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala v první řadě svému vedoucímu práce Ing. Jiřímu Šichtaři, Ph.D. za cenné rady, připomínky a čas, který mi věnoval. Dále pak Ing. Adéle Dokoupilové, Ph.D. a Elianě Pintus, Ph.D. za pomoc v laboratoři a všem, kteří umožnili hladký průběh mého studia.

Vliv vybraných druhů ředidel a plemenné příslušnosti na funkční vlastnosti kryokonzervovaných psích spermii

The influence of chosen extenders and breed on functional characteristics of cryopreserved dog's sperms

Souhrn

Cílem práce bylo ověřit na souboru hluboce mrazených inseminačních dávek psů hypotézu, že funkční vlastnosti spermie po rozmrazení závisí na typu použitého ředidla a plemenné příslušnosti psa. Při výrobě inseminačních dávek (ID) bylo použito komerčně vyráběné ředidlo CaniPlus Freeze (Minitübe, Německo) a norské ředidlo podle Martins – Bessa et al. (2006), a to buď s centrifugovaným, nebo necentrifugovaným vaječným žloutkem. Ejakulát byl odebrán digitální manipulací od 12 psů plemen sibiřský husky a německý ovčák. Psi byli odebráni jednou, nebo dvakrát v rozmezí 24 hodin. Celkem bylo zkoumáno 240 ID. Ejakulát byl uchováván v tekutém dusíku při $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ a rozmrazován byl po dobu 1 minuty ve $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jako funkční vlastnost spermii byla vybrána viabilita. Vzorky byly inkubovány s fluorescenčními barvivy CFDA a PI po 10 minut ve $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, k hodnocení byl použit fluorescenční mikroskop a hodnotilo se 200 spermii v každém vzorku. Mezi použitými druhy ředidel (CaniPlus Freeze a norské ředidlo) byl zjištěn statisticky významný rozdíl ve viabilitě spermii téměř ve všech případech, tj. pokud byl hodnocen vliv pořadí odběru, času inkubace, či plemene psa. Meziplenný rozdíl v použitých ředidlech byl patrný pouze u ředidla CaniPlus Freeze s necentrifugovaným žloutkem, kdy vyšší viability spermii v obou časech inkubace dosáhlo plemeno husky (T_0 43,8 % a T_{30} 36,0 %; $P < 0,05$). Viabilita se mezi odběry významně lišila také pouze při použití ředidla CaniPlus Freeze s necentrifugovaným žloutkem, přičemž v čase inkubace T_0 bylo průkazně více živých spermii v prvním odběru (41,2 %; $P < 0,05$) v porovnání s druhým. Při porovnání plemen v závislosti na pořadí odběru (bez rozdílu ředidel), mělo pořadí odběru významný vliv ($P < 0,05$) na viabilitu spermii pouze u německých ovčáků. Závěrem lze konstatovat, že tato práce pomohla osvětlit reakce spermii různých plemen psů na různá ředidla v průběhu kryokonzervace ejakulátu.

Klíčová slova: pes, reprodukce, spermie, kryokonzervace, živé/mrtvé spermie

Summary

The aim of this thesis was to verify on the file of deep frozen dog semen hypothesis that the functional properties of the sperm after thawing depends on the type of extender and breed. For producing ID has been used commercially produced extender CaniPlus Freeze (Minitübe, Germany) and the Norwegian extender by Martins – Bessa et al. (2006), either with centrifuging and non centrifuging egg yolk. Semen was collected by digital manipulation of 12 dogs of two breeds – Siberian Husky and German Shepherd. Dogs were collected once or twice in the range of 24 hours. A total of 240 ID were examined. Ejaculate was stored in liquid nitrogen at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ and was thawed for 1 minute at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. As a functional feature has been selected sperm viability. Samples were incubated with fluorescent stains CFDA and PI for 10 minutes at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, to evaluate was used fluorescence microscope and assessed 200 sperm in each sample. Statistically significant difference in viability of sperm was observed between two extenders (CaniPlus Freeze and The Norwegian) in almost all cases, in the effect of an order of collection, incubation times, or breed of dog. Difference between two breeds was evident only in CaniPlus Freeze with non centrifuging egg yolk, where a higher sperm viability in both incubation times achieved Siberian Husky (T0 43,8 % a T30 36,0 %; $P < 0,05$). Viability was also significantly differed between two collections only in CaniPlus Freeze with non centrifuging eff yolk, while the incubation time T0 was significantly more live sperm in a first collection (41,2 %; $P < 0,05$) compared to the second. When comparing breeds depending on the order of collection (irrespective of extenders) had the order of collection a significant effect ($P < 0,05$) on sperm viability only in German Shepherds. We can conclude that this work has helped to clarify the response of sperm of defferent breeds of dogs in various extenders during cryopreservation of ejaculate.

Summary

Key words: dog, reproduction, spermatozoa, cryopreservation, live/dead spermatozoa

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Samčí reprodukční soustava	3
3.1.1	Ontogeneze reprodukční soustavy	3
3.1.2	Varlata, nadvarlata, šourek	4
3.1.3	Chámovod, přídatné pohlavní žlázy	5
3.1.4	Pyj, předkožka	6
3.1.5	Spermatogeneze	7
3.1.6	Anatomie spermie	9
3.1.7	Fyziologie spermie	10
3.2	Neurohumorální řízení reprodukce.....	11
3.3	Reprodukční chování	13
3.3.1	Kopulace, ejakulace	14
3.4	Umělá inseminace (UI).....	15
3.5	Odběr ejakulátu.....	16
3.5.1	Vybavení.....	17
3.5.2	Příprava.....	17
3.5.3	Digitální manipulace.....	18
3.5.4	Alternativní metody odběru ejakulátu	19
3.6	Ejakulát.....	20
3.6.1	Složení ejakulátu	21
3.6.2	Hodnocení ejakulátu	21
3.7	Uchovávání ejakulátu	28
3.7.1	Chlazení	28

3.7.2	Kryokonzervace.....	29
4	Materiál a metody	34
4.1	Zvířata.....	34
4.2	Odběr	34
4.3	Ředidla.....	35
4.4	Mrazení.....	36
4.5	Hodnocení viability	36
4.6	Statistika	37
5	Výsledky.....	38
5.1	Vztah mezi plemenem a pořadím odběru	38
5.2	Vztah mezi plemenem a časem inkubace	39
5.3	Vztah mezi pořadím odběru a časem inkubace	40
5.4	Srovnání různých druhů ředidel v závislosti na času inkubace	41
5.5	Srovnání různých druhů ředidel v závislosti na pořadí odběru	41
5.6	Srovnání různých druhů ředidel v závislosti na plemenné příslušnosti	43
6	Diskuze.....	46
7	Závěr	52
8	Seznam literatury	53
9	Přílohy.....	65

1 Úvod

Různé psí dovednostní soutěže, výstavy a rozmanité psí sporty jsou čím dál více populární nejen ve světě, ale i u nás. To vytváří tlak na chovatele, aby do reprodukce zapojili jen své nejlepší svěřence. Stejně tak velká variabilita psích plemen tlačí na majitele, aby ještě více zlepšili vlastnosti svých psů, proto jsou veterinární lékaři často dotazováni, aby provedli před reprodukční vyšetření ejakulátu. Roste poptávka po mrazeném a chlazeném ejakulátu a různí autoři se tím pádem zabývají vypracováním kritérií standardního ejakulátu, která ale doposud neexistují.

Schopnost zvětšit, a předat tak dál kvalitní psí geny, ale vyžaduje dobré reprodukční vlastnosti jedinců obou pohlaví. Nezbytná je znalost fyziologie nejen celé reprodukční soustavy, ale i samotných spermií, které jsou velmi vnímavé ke změnám prostředí. Viabilita spermií po odebrání závisí na mnoha faktorech jako je technika a interval mezi odběry, použitá ředidla, koncentrace spermií, technika a rychlost zmrazování a následného rozmrazování, manipulace s ejakulátem a v neposlední řadě individualita jedinců, tzn. věk, plemenná příslušnost, psychický a zdravotní stav.

Nové poznatky ve výzkumu kryokonzervace spermií pomohou překonat bariéru geografické vzdálenosti a do budoucna se stane běžným standardem zasílat inseminační dávky napříč celým světem. Odpadnou tak problémy s převozem zvířat, karanténou, stresem z nového prostředí, nemluvě o stránce finanční. Na vývoji nových ředidel a postupů kryokonzervace se neustále pracuje, protože stále je co zlepšovat.

2 **Cíle práce**

Cílem práce je ověřit na souboru hluboce mrazených inseminačních dávek psů hypotézu, že funkční vlastnosti spermie po rozmrazení závisí na typu použitého ředidla a plemenné příslušnosti psa.

3 Literární rešerše

3.1 Samčí reprodukční soustava

Anatomie reprodukční soustavy zde bude představena jen stručně, protože práce se zabývá především funkčními vlastnostmi spermií.

Reprodukční soustava samců má tři hlavní úkoly: produkci pohlavních buněk, jejich dozrávání a transport, a nakonec deponaci do pohlavní soustavy samice. Dále zde dochází k produkci hormonů spojených s reprodukcí. K reprodukčním orgánům patří varlata, nadvarlata, chámovod, penis a prostata (Obr. 1; Červený, 1999).

3.1.1 Ontogeneze reprodukční soustavy

V prenatalním a postnatalním období má na vývoj sexuality jedince vliv i prostředí a vnitřní faktory (Kliment et al., 1989).

Pohlaví je primárně determinováno geneticky. Během fetálního vývoje migrují zárodečné buňky ze žloutkového vaku do pohlavního hrbolu v oblasti ledvin, kde se diferencují buď ve vaječníky, nebo varlata, v závislosti na přítomnosti genu X a Y (Parkinson, 2001).

Vývodné pohlavní cesty se formují ve 2.–3. měsíci fetálního vývoje a zevní pohlavní orgány ve 4.–7. měsíci (Hafez et Hafez, 2000). Hypothalamus se začíná diferencovat ve 4.–7. měsíci gravidity, funkčně se potom vyvíjí až do puberty (Rand et al., 2013).

V embryonálním vývoji se zakládají prvopohlavní buňky a podpůrné buňky (Holst, 2000). Za vývoj varlat jsou zodpovědné Sertoliho podpůrné buňky, které produkují také faktor inhibující vývoj Müllerových vývodů, ze kterých vznikají samičí pohlavní orgány (Parkinson, 2001). Leydigovy buňky, tvořící intersticiální tkáň, produkují testosteron stimulující sestup varlat, vývoj Wolfových vývodů a jejich přeformování do vývodných cest reprodukčního ústrojí. K větší diferenciaci buněk semenotvorných kanálků dochází až v prepubertálním období (Holst, 2000).

V kaudální části varlat se vyvíjí kormidlo varlete, které má na svědomí sestup varlat poševním kanálem do šourku. Postupem vývoje roste a prodlužuje se, až dosáhne tříselného kanálu a šourku (Parkinson, 2001). Intraabdominální oddíl je přitahován

k extraabdominálnímu skrz tříselný kanál a varlata přitom postupují s ním. Při narození mohou být varlata blízko u tříselného kanálu nebo těsně za ním. 3.–4. den po narození začíná sestup tříselným kanálem a je dokončen 35.–50. den života. Do dvou týdnů by měla být varlata sestouplá úplně a od šesti týdnů plně nahmatatelná. Po sestupu se z gubernacula stává pouze ligament. Vzdálenost, kterou musí varlata urazit, je vzhledem k velikosti štěňat malá (Holst, 2000), proto některá štěňata se mohou narodit s již sestouplými varlaty, ale produkce testosteronu začíná až od 12 týdnů věku (Dunbar, 1979).

Penis se formuje z pohlavního hrbolu. Při narození je penis po celé délce spojen s předkožkou a je vyplněn cévami, zásobujícími erektilní tkáň krví. V předpubertálním období se spojení uvolňuje a cévy se uzavírají. Jako poslední ze spojení zaniká uzdička, která je ale velmi důležitá, protože v ní často vedou velké cévy, avšak často může perzistovat do dospělosti (Parkinson, 2001).

Narušení některého procesu vývoje může způsobit různě závažné poruchy sexuality, které se naneštěstí projevují až postpubertálně, proto je těžké odhalit jejich příčiny. Čím dříve k narušení dojde, tím bývá porucha závažnější (Feldman et Nelson, 2007).

3.1.2 Varlata, nadvarlata, šourek

Varlata, společně s nadvarlaty, jsou uložena v šourku a jejich úkolem je produkovat a schraňovat vyvinuté spermie a produkce samčích pohlavních hormonů. Jsou párová a ze stran mají zploštělý tvar (Obr. 2). Jejich velikost záleží na plemeni psa. Průměrná velikost u středně velkého psa do 15 kg je $3,0 \times 2,0 \times 1,5$ (Woodall and Johnstone, 1988). Na kaudálním konci je přiloženo nadvarle (Kliment et al., 1989). Parenchym tvoří semenotvorné kanálky a intersticiální Leydigovy buňky.

Obal varlat tvoří poševní útrobní list a *tunica albuginea*, která je bohatě prokrvena a ze které vybíhají vazivové přepážky do středu, kde se spojují v ploché *mediastinum*. Vlivem těchto přepážek vznikají pyramidové komůrky, tvořené semenotvornými kanálky. Tyto kanálky se spojují v přímé kanálky, dále pak ve varletní síť, která vyústí ve vývodné cesty varlete. Prostor mezi kanálky je vyplněn řídkým vazivem (Parkinson, 2001).

Semenotvorné kanálky začínají slepě na bazální membráně. Jejich průměr je 100–300 μm , jsou silně zvlňené a anastomozují mezi sebou. Výstelku tvoří spermatogenní epitel (spermatogenní a podpůrné Sertoliho buňky). Bazální membrána je obklopena fibroblasty a myoidními buňkami. Krev do semenotvorných kanálků neproniká, takže jsou vyživovány difúzně (Kliment et al., 1989).

Sertoliho buňky, tzv. podpůrné, jsou nepravidelné, cylindrické a mají velké jádro uložené blízko bazální membrány. Další součástí varlat jsou spermatogenní buňky, což jsou různá vývojová stadia spermií. Přesun ještě nepohyblivých spermií zajišťují buňky s kinocíliemi. Metabolity, které vznikají při přeměně spermatid ve spermie, absorbují buňky s mikrokly. Výživu spermií zajišťují sekreční buňky (Kliment et al., 1989).

Nadvarlata jsou tvořena hlavou a ocasem, které jsou pevně spojeny s varletem, a tělem, které je připojeno volně. Ocas nadvarlete je orientován dorzokaudálně a slouží jako rezervoár spermií. V nadvarletí spermie dozrávají a získávají schopnost pohybu. Epiteliální buňky ocasu nadvarlete vyměšují do lumen sekret, který vyživuje spermie a zabraňuje jim v motilitě, aby si nevyčerpaly energetickou zásobu. Zároveň k tomu přispívá i nižší teplota a obsah kyslíku a vyšší hladina oxidu uhličitého. Oplozovací schopnost si spermie takto udrží 2–3 týdny. Epiteliální buňky mají také resorpční schopnost, fungují tedy i jako spermiofágové (Hafez et Hafez, 2000).

Šourek (*scrotum*), ve kterém jsou uložena varlata, je u psa posunut kaudálněji, a to až do oblasti hráze. Jedná se o vychlípeninu břišní stěny a je pokryt tenkou kůží s potními a mazovými žlázami. V mediální rovině se z něj tvoří svalová přepážka, která je citlivá na teplo. Má schopnost smrštění a ochabnutí a účastní se tak termoregulace. Na laterální straně se k podkoží upíná zdvihač varlete, který zvedá varle dorzálně (Parkinson, 2001).

3.1.3 Chámovod, přídatné pohlavní žlázy

Na ocas nadvarlete se napojuje **chámovod** (*ductus deferens*), který vede spermie z nadvarlate do močové trubice. Podél mediálního okraje varlete vstupuje do poševního kanálu, kde se připojuje k semennému provazci. Semenný provazec, který začíná u hlavy nadvarlete, tvoří chámovod, varleční tepna a žíla, mízní cévy a nervy. Je obalen řídkým vazivem a hladkou svalovinou, která je na povrchu kryta serózou. V břišní dutině cévy a nervy pokračují dorzálně, zatímco chámovod kaudálně (Parkinson, 2001).

Chámovod dále vstupuje do dutiny pánevní, dorzálně kopíruje močový měchýř a následně se stáčí kaudálně pod prostatou, směrem k močové trubici (Kliment et al., 1989). Ampule chámovodu jsou vytvořené, ale nejsou významné (Parkinson, 2001). Tvoří je ztlustělá sliznice chámovodu se sítí tubulóznic žláz (Kliment et al., 1989).

Jedinou přídatnou pohlavní žlázou psa je **předstojná žláza** (*prostate*). Tato žláza je nepárová, poměrně velká a leží na krčku močové trubice. Skládá se ze sekrečních tubulů a intersticiálního vaziva a její vývody ústí do močové trubice (Feldman et Nelson, 2007). Prostata je snadno nahmatatelná při rektálním vyšetření (Hafez et Hafez, 2000).

3.1.4 Pyj, předkožka

Pyj (*penis*), slouží k deponaci spermií do pohlavního ústrojí samice. Dosahuje velikosti 5–15 cm, v závislosti na velikosti psa (Feldman et Nelson, 2007). Skládá se z kořene – pevná část; a těla – volná část. Dvěma rameny topořivých těles je připojen k sedací kosti.

Je tvořen převážně kavernózní tkání, která se při erekci naplní krví ze spirálovitých tepen (větve hluboké tepny pyje). Tyto tepny se vyznačují polštářkovitým rozšířením, díky němuž jsou schopny regulovat přívod krve do penisu (Kliment et al., 1989). Dále je součástí penisu spongiózní tkáň, cévy, nervy, močová trubice a pyjová kost (Obr. 3; Feldman et Nelson, 2007). Spongiózní tkáň obklopuje močovou trubici a vyplňuje žalud (*glans penis*). Při erekci je naplněna žilnou krví. Žalud a penis jsou navzájem odděleny nevýrazným krčkem (Kliment et al., 1989).

U kořene penisu se nachází útvar nazývaný *bulbus glandis* a díky jeho zvětšení může dojít k tzv. svázání mezi fenou a psem. Samotný kořen je obklopen tzv. napřimovačem pyje. Na ventrální straně těla pyje odstupuje jeho antagonist, zatahovač pyje, který se upíná na ocasní obratle a po ejakulaci zatahuje ochablý penis do předkožky (Holst, 2000).

Podélně orientované hladké svaly v penisu jsou spojeny s kavernózní tkání a za normálních okolností jsou kontrahovány, avšak během erekce napětí v těchto svalech opadá, což má za následek vysunutí penisu z předkožky. Zároveň zvýšení napětí v cévách zapříčiní prodloužení a zvětšení objemu penisu psa. Zásobením krví je zajištěnou vnitřní a zevní stydkou tepnou a odvod zajišťují stejnojmenné žíly. Vazivový

obal penisu vysílá do kavernózní tkáně trámce, které tvoří přepážky a dutiny (Kliment et al., 1989).

U psovitéch šelem je vytvořena **penisová kost** (*os penis*), která je situována dorzálně od močové trubice a umožňuje průnik neerectovaného penisu do pochvy samice. Penisová kost zabraňuje uzavření močové trubice během erekce a následné rotace penisu při kopulaci (Kutzler, 2005).

Předkožka (*preputium*) je kožní kryt, v němž je uložena volná část pyje. Vnější list je ochlupený a u předkožkového otvoru se vchlipuje dovnitř, kde přechází ve vnitřní list, který má povahu sliznice. Dále postupně přechází v pyjový list a v pyj (Hafez et Hafez, 2000).

3.1.5 Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces tvorby samčích pohlavních buněk – spermií. U psa trvá 62 dní, začíná v pubertálním období a za normálních okolností probíhá kontinuálně celý život. Může být ovlivněna výživou, zdravotním a psychickým stavem, klimatickými podmínkami a pohlavním využitím samce (Holst, 2000). S postupujícím věkem spermatogeneze klesá a nedochází k úplnému dozrání spermií, semenotvorné kanálky degradují a množí se intersticiální vazivo (Berndtson, 2014).

Proces tvorby spermií probíhá ve 4 cyklech (množení, růst, meióza, metamorfóza), kdy každý nový cyklus je o $\frac{1}{4}$ opožděn za předchozím, takže tvorba je kontinuální (Kliment et al., 1989). Cyklus začíná mateřskými buňkami spermatogoniemi, které jsou uloženy při bazální membráně semenotvorných kanálků, mají sférický tvar, kulaté jádro a obsahují velké množství chromatinu, což značí vysokou mitotickou aktivitu (Hafez et Hafez, 2000). V další generaci se pouze z jedné spermatogonie stává spermatogonie typu A, což je buňka nejméně diferencovaná a slouží jako prekurzor pro tvorbu dalších buněk (Berndtson, 2014). Následujícím mitotickým dělením se jedna spermatogonie A diferencuje v intermediální spermatogonii, která se dále dělí na spermatogonii typu B. Z těch následně vznikají spermatocyty I. řádu. Jsou kulovité, mají velké jádro a obsahují velké množství rezervních látek v cytoplazmě, potřebných pro stadium růstu (Kliment et al., 1989).

I. meiotické dělení se vyznačuje dlouhou profází, která se skládá z leptotenního, zygotenního, pachytenního (dochází ke crossing overu), diplotenního stadia, z diakineze

a prometafáze. V pachytenní fázi jsou spermatogonie velmi citlivé ke škodlivým vlivům, jako je nevhodná teplota nebo neadekvátní hladina gonadotropních hormonů. Dále následuje metafáze a anafáze. Buňky se v jejich průběhu posouvají dále do lumen semenotvorného kanálku, kde vznikají spermatocyty II. řádu, které jsou již haploidní. II. meiotické dělení následuje hned po anafázi, aniž by se jádra obou buněk stačila obnovit. Při II. meiotickém dělení se od sebe chromatidy oddělí a vznikají spermatidy, teprve poté proběhne telofáze. Spermatidy jsou kulové buňky s kulatým jádrem a na konci meiózy jsou uloženy u lumen semenotvorného kanálku (Parkinson, 2001). Dochází v nich k významné syntéze RNA a kondenzaci chromatinu (Berndtson, 2014). Postupně se zanořují do cytoplazmatické membrány podpůrných Sertoliho buněk, kde podstupují metamorfózu, tedy změny ve fyziologii a morfologii. Tyto změny můžeme rozdělit na Golgiho stadium, stadium akrozomu, stadium kaudální manžety a stadium zrání. Buňka postupně získává podlouhlý tvar. V Golgiho stadiu se z Golgiho aparátu tvoří váček jako základ akrozomu, V dalším stadiu (akrozomálním) se váček zvětšuje a přikládá se apikálně na jádro. Z mikrofilament se tvoří základ bičíku. Mitochondrie se přesouvají do střední části spermie. V další fázi přechodně vzniká kaudální manžeta z postnukleární cytoplazmy a po vytvoření bičíku zaniká. Její přesná funkce není známa. V zadní části spermie se kolem osového vlákna hromadí cytoplazma, a podílí se tak na tvorbě krčku. Její další část pak vytváří cytoplazmatickou kapku, o kterou spermie přichází v nadvarleti. Část cytoplazmy je pohlcena Sertoliho buňkami a zbytek je vyloučen s cytoplazmatickou kapkou do lumen semenotvorných kanálků. Sertoliho buňky jednak zajišťují výživu, jednak fagocytují produkty rozpadu spermatogenních buněk (Parkinson, 2001).

Ze Sertoliho buněk se do lumen semenotvorného kanálku vynořují nepohyblivé spermie, jejichž část odchází s močí. Spermie jsou v nadvarleti částečně motilní, ale k úplnému získání schopnosti pohybu dojde až po kontaktu se semennou plazmou během ejakulace (Parkinson, 2001). Vlivem sekretu nadvarlete dojde ke změnám na plazmatické membráně, a to přidáním glykoproteinů, nebo jejich modifikací. To pomáhá udržet akrozom stabilní během průchodu samičím pohlavním traktem. Snižuje to také imunigenicitu spermií a zvyšuje schopnost navázat se na *zonu pellucidu* (Parkinson, 2001). Protoplazmatická kapka migruje distálně na konec střední části bičíku, až je posléze v ocasu nadvarlete odvržena (Kliment et al., 1989).

Spermie stráví v nadvarleti asi 15 dní. Rychlost průchodu hlavou a tělem nadvarlete je stálá, avšak pokud se zvýší frekvence ejakulace, průchod ocasem nadvarlete se zkrátí a dojde k produkci nedozrálých spermií (Parkinson, 2001).

Varlata obsahují zároveň i určitý počet nediferencovaných spermatogonií typu A₀, které jsou mitoticky aktivní a v případě potřeby nahrazují spermatogonie A₁ (Clermont, 1962).

3.1.6 Anatomie spermie

Velikost a morfologie spermií je druhově rozdílná.

Spermii lze rozdělit na tři části – hlavičku, střední část a bičík. Celá spermie je kryta cytoplazmatickou membránou, která je citlivá na osmotický tlak a snadno se poškodí. Membrána má rozdílné vlastnosti na hlavičce a na bičíku. Je složena z řady fosfolipidů, jako jsou fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, sfingomyelin, atanolamin – plazmalogen, fosfatidylserin, cholin – plazmalogen, fosfatidylinositol a kardiolipin. Obsah těchto látek určuje citlivost k chladovému šoku. Hlavní nasycenou kyselinou je kyselina palmitová. Glykolipidy slouží jako receptory. Z aminokyselin se nejvíce vyskytuje arginin, cystin a histidin (Kliment et al., 1989).

Hlavička je oválná, ze stran zploštělá. Z velké části ji vyplňuje jádro. Na jadernou membránu na apikálním konci nasedá vnitřní membrána akrozomu, vnější přiléhá k cytoplazmatické membráně (Kliment et al., 1989). V akrozómu je obsaženo mnoho polysacharidů a enzymů sloužících k průniku spermie do vajíčka. Hlavními dvěma jsou akrozin a hyaluronidasa. Jádro je vyplněno nukleoplazmou a obsahuje polovinu genetické informace samce. Chromozomy se zde nacházejí ve formě chromatinu (Parkinson, 2001). V ekvatoriální rovině hlavičky splývá membrána akrozomu s jadernou membránou v nukleární prstenec. Zbytek jádra pokrývá postakrozomová čepička kalíškovitého tvaru, která se skládá ze soustavy mikrotubulů a na bazální části hlavičky splývá s cytoplazmatickou a jadernou membránou (Hafez et Hafez, 2000).

Bičík je spojen s hlavičkou přes hlavici bičíku, která se vnořuje do implantační jamky hlavičky a vytváří se invaginace do jadrové membrány. Tento úsek se nazývá krček nebo centriolový oddíl a je tvořen proximálním centriolem. Dále pokračuje

spojovací část bičíku, na jejímž konci se nachází distální centriol vytvářející tzv. prstenec (Parkinson, 2001).

Na bičíku (Obr. 5) můžeme popsat spojovací, hlavní a koncovou část. Celým bičíkem prochází osově vlákno (axolema; Kliment et al., 1989). Uvnitř axolemy se nachází dvojice mikrotubulů, které jsou obklopeny devíti páry filament (jeden mikrotubulus a druhý vláknitý filament), tzv. dublet. Osově vlákno je kryto hladkými provazci, jež jsou tvořeny devíti silnými vlákny a v proximální části jsou segmentovány. Spojovací část bičíku má největší průměr, protože se zde do souvislé spirály soustřeďují mitochondrie, aby vytvořily kolem osového vlákna pochvu. Mitochondrie zajišťují energii ve formě ATP potřebnou pro pohyb spermie. V hlavní části bičíku se postupně vytrácejí hladká vlákna. Celý povrch je kryt fibrózní pochvou a v koncové části je bičík složena už jen z osového vlákna (Parkinson, 2001).

Celková délka spermie psa je 70 μm , hlavička měří 7 μm , spojovací část 14 μm a hlavní část bičíku 48 μm . Více jak polovina hmoty je soustřeďována v hlavičce (Obr. 4; England, 2010).

3.1.7 Fyziologie spermie

Živé spermie nepropouštějí přes membránu barviva. Pokud spermie umírá nebo pokud dojde k toxickému poškození membrány, začne barvivo pronikat dovnitř spermie. Toho se využívá např. při zjišťování procenta mrtvých a živých spermií (England et Allen, 1992). Cytoplazmatická membrána je také velmi citlivá na změny osmotického tlaku, zaznamená tedy i změny v biochemii genitálních sekretů. Snadno se poškodí, a tím dochází k vylití akrozomálních enzymů. Spermie tak ztrácí svoji oplozovací schopnost. Takto poškozené spermie mohou být stále aktivní, proto se aktivní spermie nerovnajím automaticky oplozeníšchopným spermiím. Nízký obsah DNA v jádře souvisí se sníženou plodností a embryonální mortalitou (Linde – Forsberg, 2007).

Akrozom spermií obsahuje enzymy hyaluronidázu, akrozin, proakrozin, esterázy, neuraminidázu, kyselou fosfatázu, fosfolipidázu A, arylsulfatázu, β -N-acetylglukozaminidázu, arylaminidázu, kyselou proteinázu a kolagenázu. Průkaz akrozinu v semenné plazmě poukazuje na množství poškozených spermií. Dále akrozom obsahuje fuktózu, galaktózu, manózu a hexoaminut. V bičíku bylo nalezeno

na 54 aminokyselin. Z prvků zde nalezneme Na, Ca, K, Mg, S, P, Fe, Cu (Kliment et al., 1989).

Spermie získávají energii pro pohyb a udržení iontového gradientu metabolizováním jednoduchých molekul, hlavně cukrů a jejich derivátů (fruktózy, galaktózy, manosy a pyruvátu). K tomu může docházet buď aerobně, nebo anaerobně. Spermie využívají jako zdroj energie i glycidy, kys. mléčnou a plazmalogen z dělohy samice. Pokud je prostředí dělohy nějak narušeno, doba přežitelnosti spermií v něm se výrazně snižuje. Bičík se pohybuje v důsledku sil vznikajících mezi přilehlými páry filament obklopujících dvojici mikrotubulů. Vzniká koordinované vlnění, vycházející z oblasti krčku, které se šíří po celé délce bičíku. Ve stadiu relaxace jsou dyneinová ramena dubletu navázána k sousednímu dubletu, a k pohybu dojde tak, že se toto spojení přeruší a dyneinová ramena se připojí na opačnou stranu sousedního dubletu. ATP se spotřebovává právě při fázi rozpojení. Tento proces je neustále opakován a dochází k postupnému navázání všech dvojic filament. Dvojice na jedné straně axolemy tedy pracuje v opozici k protilehlé dvojici. Po kapacitaci rychlost a amplituda tohoto vlnění prudce stoupá (Kliment et al., 1989).

3.2 Neurohumorální řízení reprodukce

Nervy řídí reprodukci krátkodobě a podle aktuální situace. Hormony působí naopak dlouhodobě a pomaleji, ale oba procesy jsou od sebe neoddělitelné, protože dohromady zajišťují tvorbu pohlavních buněk a jejich setkání (Kliment et al., 1989).

Centrální nervová soustava (CNS) reaguje na vlivy přijímané z vnějšího i vnitřního prostředí a podle toho vydává signály k řízení všech funkcí spojených s reprodukcí. Hlavní úlohu v řízení reprodukce má retikulární formace (RF), limbický systém (LS), centra vegetativních nervů a mozková kůra (Parkinson, 2001). RF začíná v míše a pokračuje do středního mozku a mezimozku. Je funkčně spojena s motorickými a senzorickými drahami, proto RF reaguje na měnící se fyziologický stav organismu. Sama je zpětně regulována mozkovou kůrou a inhibičně na ni působí signály z mozečku a prodloužené míchy. Je nadřizena celému endokrinnímu systému. Limbický systém je centrum kontroly autonomních funkcí, je v něm centrum sympatiku a parasympatiku (Kliment et al., 1989). Pomocí spouštěcích hormonů je ovlivňován mezimozek a následně pohlavní soustava. Hierarchie řízení se mění s patologickým

stavem organismu. Za normálních okolností má mozková kůra inhibiční vliv na RF a LS, ale pokud je z nějakého důvodu narušena vnitřní rovnováha v organismu, do čela řízení se dostávají starší úseky CNS (Hafez et Hafez, 2000).

Nervové řízení je autonomní. Inervaci zajišťuje kyčelněbřišní, kyčelnětříselný, pohlavněstehenní a stydký nerv. Šourek je inervován somatickými i viscerálními nervy. Varlata jsou řízena hrudním a bederním sympatikem. Všechny procesy spojené s reprodukcí jsou reflexní, a to buď podmíněně, nebo nepodmíněně. Postupem života, a tedy během získávání zkušeností, mohou podmíněné reflexy začít převažovat nad nepodmíněnými, avšak oba typy se navzájem doplňují (Parkinson, 2001).

Účinky hormonů jsou pohlavně rozdílné. Jejich hlavní vliv spočívá v regulaci látkového metabolismu, proto mají za následek vznik sexuálního dimorfismu. Ovlivňují růst kostí, svalů, ochlupení a v neposlední řadě chování (Dunbar, 1979). Hormonální řízení reprodukce samců i samic probíhá z hypothalamu, který odpovídá za sekreci hormonů z adenohipofýzy tím, že vylučuje gonadotropiny uvolňující hormon (GnRH). GnRH je produkován cyklickým a tonickým centrem v hypothalamu. Přenos hormonů mezi hypothalamem a adenohipofýzou probíhá přes hypofyzární portální oběh, mozkomíšni mok, intracelulární nebo mízní štěrby (Lindsay, 2000).

GnRH ovlivňuje sekreci luteinizačního hormonu (LH), ten má následně vliv na produkci testosteronu v Leydigových buňkách varlat. Pod vlivem GnRH je uvolňován také folikulostimulační hormon (FSH), který řídí spermatogenezi. Mezi testosteronem a LH funguje negativní zpětná vazba (Hafez et Hafez, 2000).

Testosteron z Leydigových buněk proniká do semenotvorných kanálků, kde podporuje meiotické dělení (Rand, 2013). Jeho další funkcí je udržování libida. Celkově má testosteron anabolický efekt, podporuje produkci sekretů z přídatných pohlavních žláz, ovlivňuje tvar těla a chování a během fetálního vývoje řídí sestup varlat (Dunbar, 1979). Za normální se považuje koncentrace testosteronu v krvi u dospělého psa $< 0,4$ ng/ml (Zambelli et Levy, 2010). Hormon FSH je důležitý pro udržení optimální koncentrace testosteronu, protože řídí protein, který váže androgeny v Sertoliho buňkách. Sertoliho buňky zase naopak produkují inhibitor FSH, protože FSH je potřebný pouze k započetí spermatogeneze a v dalším životě již není nutný. Sertoliho buňky jsou dále schopny produkovat estrogény a GnRH, proteiny, laktát, pyruvát a tubulární tekutinu. Hormonem, který ovlivňuje sekreci GnRH v hypothalamu

a sekreci testosteronu ve varlatech, je $\text{PGF2}\alpha$. U samců je produkován v semenných váčcích a nervové tkáni. Má schopnost zesilovat a zeslabovat účinky pohlavních hormonů snížením, nebo zvýšením koncentrace cyklického adenosin monofosfátu (cAMP; Rand, 2013).

Epifýza se také účastní řízení reprodukce. Reaguje totiž na světlo pomocí autonomních sympatických nervů a podle toho produkuje hormony ovlivňující pohlavní žlázy. Jsou to hormony melatonin a arginin vazotocin, řídí tedy diurnální a anuální reprodukční cykly a na vývoj reprodukčních orgánů mají negativní vliv (Hafez et Hafez, 2000).

3.3 Reprodukční chování

Pod reprodukčním chováním rozumíme všechno chování, které je spojené s procesem páření. Zahrnuje kompetici, selekci, námluvy, páření a dále ještě například stavění hnízda a rodičovskou péči (Mills, 2010).

Vlivem domestikace došlo u psů k časnějšímu dospívání, než je tomu u vlka, který má pubertu přibližně ve dvou letech. Puberta u psů začíná mezi 6. a 12. měsícem věku, ale záleží na velikosti, plemeni psa a vlivech prostředí (např. výživě). Menší psi dospívají dříve, než velká plemena (Lindsay, 2000). Nástup puberty je postupný a indikuje začátek produkce spermií (Kliment et al., 1989).

Prenatální androgenizace má zřejmě na svědomí typické samčí chování, jako je vzájemná agresivita samců a zvedání zadní nohy při močení (Lindsay, 2000). Reprodukční chování se skládá ze tří fází – vzněcující, kopulační a ejakulační. Při vzněcující fázi dochází vlivem přijímaných exogenních a endogenních signálů ke kaskádě reakcí v CNS. Hypothalamus odpovídá za apetenční a sociální chování, limbický systém zase za pohlavní pud (Dunbar, 1979).

Pokud se objeví sexuální partner, dojde k nervové a hormonální stimulaci, která má za následek sled pohlavního chování (Holst, 2000). Vznikem akčního potenciálu nedojde k podráždění pouze vegetativních nervů, ale i motorických somatických nervů v míše. Ty mají na svědomí kopulační mechanismy, jako například frikční pohyby samce. Z bederní části míchy vedou do žaludu senzory nervy řídící ejakulaci (Mills, 2010).

Psi jsou, na rozdíl od vlka, polygamní zvířata. Nemají diurnální aktivitu, ale jsou schopni se pářit po celý rok. Sexuální chování psů zahrnuje lízání a očichávání uší a genitálií, hrabání, naskakování na sebe, značkování či vnitrodruhovou agresi samců. Může se objevit nežádoucí chování, jako je defekace, submisivní močení, zvedání zadní nohy a anální průnik (Lindsay, 2001).

U psů kastrovaných ještě před pubertou dojde k potlačení projevů libida. Je-li kastrace provedena až po první kopulaci, může se erekce a kopulační reflex projevovat ještě dlouhou dobu poté (Parkinson, 2001). Efekt kastrace může být však rozdílný, což je zřejmě dáno mírou prenatální androgenizace, ke které dochází těsně před narozením. Po narození dojde k náhlému zvýšení hladiny testosteronu, což se projeví zvýšeným fyzickým i behaviorálním dimorfismem v dospělosti. K dalšímu vzestupu hladiny testosteronu dochází v 6 měsících a vlivem nepříznivých podmínek, zvláště během senzitivní periody, může být sexuální chování narušeno (Lindsay, 2000).

3.3.1 Kopulace, ejakulace

Psi se nejdříve prozkoumávají očicháváním čumáků, pak boků a nakonec genitálií a ocasu. Samec následně očichává a olizuje vulvu feny. Obvykle pak položí bradu na záda samice, zezadu ji obejmě předními nohama kolem boků a snaží se několika pohyby vpřed proniknout do vulvy (Obr. 6; Lindsay, 2000). Pokud se podaří intromise, zvětší se bulbus glandis a svěrače v pochvě feny se za ním stáhnou, dojde ke stažení předkožky a je dosaženo úplné erekce. Nastane tzv. svázání či kopulační zámek, pes má přitom obvykle stažený ocas. Nakonec provede sérii pánevních kmitů vpřed. Často je patrné přešlapování zadních nohou (Dunbar, 1979). Po chvíli pes uvolní fenu ze sevření předních končetin a spustí je na stranu. Chvíli tak setrvává, poté přehodí jednu zadní končetinu přes záda samice a otočí se zády k sobě (Mills, 2010). Kopulační zámek může trvat od 5 do 75 minut (Dunbar, 1979). Důvod vzniku této pozice je nejasný. Jedna teorie říká, že je to chování zděděné po předcích a vzniklo kvůli možnosti monitorovat během kopulace okolí ze všech stran, a mít tedy příležitost k obraně. Další možností je, že tato poloha je pro samce méně náročná (Lindsay, 2000).

Skutečnost, že penis je namířen mezi zadní nohy samce a otočen o 180°, může způsobovat zvýšení tlaku ejakulovaného semene (Kliment et al., 1989). Cévy vedoucí

do penisu se přitom uzavírají. Má se za to, že díky svázání nedochází k předčasné detumescenci penisu během zdlouhavé deponace prostatické frakce do pohlavního ústrojí samice (Holst, 2000). K erekci dochází až v pochvě proto, že je nemožné, aby plně ztopořený penis pronikl do vagíny (Mills, 2010).

Stimulací pro ejakulaci je tlak a hmat, které stimulují sympatické nervy penisu. Ejakulát je vyloučen pomocí peristaltických stahů svaloviny obklopující močovou trubici a částečně také stahů bulbokavernózní a ischiokavernózní tkáně (Kutzler, 2005). Nejdříve je rychle deponována prespermiová frakce a k ejakulaci spermiové frakce dojde asi po 80 sekundách spojení (Holst, 2000).

Ke druhé fázi svázání, kdy se pes otáčí zády k samici, nemusí dojít. Pokud penis vyklouzne z vagíny během kopulace, fena začne olizovat konec penisu. Vlivem toho se zmenší bulbus glandis a může dojít k nové penetraci (Dunbar, 1979).

3.4 Umělá inseminace (UI)

Shrnutí celého procesu umělé inseminace psů přesahuje rozsah této práce. Proto budou popsány jen poznatky, týkající se ejakulátu.

Faktory, které mluví pro použití UI, jsou poptávky po štěňatech, zapojení pouze nejlepších rodičů do reprodukce, možnost mezinárodní výměny dávek a také čím dál více se zdokonalující metody výzkumu, které napomáhají dosažení požadovaného cíle (Wright, 1991; Jeffcoate et Lindsay, 1989). Dalším faktem je, že estrus se u fen vyskytuje zpravidla dvakrát do roka s velkou individuální variabilitou. Také anatomická stavba reprodukčních orgánů je příčinou častých obtíží při určování správného načasování samotné inseminace, které ve výsledku mohou vést ke zpoždění následujícího pokusu o 5–7 měsíců (Feldman et Nelson, 2007; Wright, 1991).

U psů zapojených do inseminace by měl být znát rodokmen a jejich historie z důvodu vyloučení neplodných zvířat. Informace získané od majitelů mohou osvětlit mnoho příčin neplodnosti a problémů s reprodukcí vůbec (Parkinson, 2001).

Umělá inseminace se používá u fen, které ještě nebyly připuštěny, nebo z důvodu přítomnosti vaginálních abnormalit, jako jsou zúžení vagíny, vaginální septa a hyperplazie. Důvodem může být i temperament nebo nesnášenlivost mezi psem a fenou nebo geografická vzdálenost, kdy převoz semene je levnější variantou než stresující transport obou pohlaví (Kutzler, 2005). Samec by měl před odběrem projít

sérií testů, aby se potvrdil jeho zdravotní stav (Dunbar, 1979). Kvalita ejakulátu je přitom rozhodující pro efektivnost UI. Mezi psy existuje velká variabilita v mrazitelnosti ejakulátu (Kosiniak – Kamysz et al., 2007). UI, pokud je provedena správně, je rychlejší a pohodlnější metodou než přirozená plemenitba, protože odpadají také problémy s karanténou, předchází se přenosu chorob a jedna dávka semene může oplodnit mnohem více fen, než by byl jeden samec schopen oplodnit za celý život. Při správné konzervaci může být semeno používáno dlouhou dobu.

K inseminaci je potřeba 5–6 ml semene obsahující $150\text{--}200 \times 10^6$ motilních spermií. Při intravaginální inseminaci je úspěšnost zabřeznutí 75 % (Kosiniak – Kamysz et al., 2007).

Při inseminaci čerstvým ejakulátem se doporučuje 200×10^6 motilních spermií, aby byl výsledek srovnatelný s přirozeným pářením, a pro rozmrazený ejakulát je norma $150\text{--}200 \times 10^6$ spermií (Farstad et Berg, 1989).

3.5 Odběr ejakulátu

Odběry ejakulátu jsou u psů prováděny z důvodu umělé inseminace, kryokonzervace nebo pro účely diagnostické. Nejčastěji se používá odběr „do ruky“, dále je možno použít elektroejakulaci, farmaka (Kutzler, 2005), či umělou vagínu, která je dvouplášťová a uvnitř je vyplněna teplou vodou.

Je běžnou praxí, že do reprodukce se zapojují psi od věku 7 měsíců do 12 let, s ohledem na plemeno. Samotný odběr se dá snadno naučit a provést ve vhodném prostředí (Freshman, 2002).

Před odběrem by měla být známa chovatelská historie psa a jeho anamnéza a medikace za posledních 6 měsíců. Je vhodné znát i rodokmen psa kvůli zjištění případného inbreedingu. Stejně tak by měla být známá doba uplynulá od posledního odběru či připouštění (Olson, 1992). Ideální je 4 až 5 dní před odběrem dodržet sexuální abstinenci. Při více jak deseti dnech abstinence může dojít k nárůstu morfologických abnormalit a poklesu motility. Jako nejlepší se ukazuje frekvence odběru každý 2. až 5. den (Johnston et al., 2001). Odběr je vždy prováděn před fyzickou námahou nebo před bolestivými lékařskými i jinými stresujícími zákroky (Johnston et al., 2001). Jedinci, kteří jsou nervově vyrovnaní, mají lepší kvalitu produkovaného ejakulátu a jsou

tedy plodnější. Při správném využití podmíněných reflexů lze ovlivnit kvalitu odebraného ejakulátu pro umělou inseminaci (Dunbar, 1979).

3.5.1 Vybavení

Velcí psi se odebírají na zemi na protiskluzové podložce, malé psy je pohodlnější odebrat na vyšetřovacím stole. Majitel může přinést hračky nebo doplňky, které má pes spojené s reprodukcí (Freshman, 2002).

Při odběru se používají umělé vagíny (dále jen UV) na jedno použití, ale jejich přilnavost ke ztopořenému penisu je horší. UV by měla být přizpůsobena velikosti psa, resp. penisu, který by se neměl dotýkat odběrového sáčku (Freshman, 2002). Všechno použité vybavení by mělo být předeštěno na tělesnou teplotu (Seager, 1986). Dále jsou potřeba dvě sterilní 15ml centrifugační zkumavky s připojenými jednorázovými kuželovými sáčky, které napomohou zachycení ejakulátu a odpadá tak problém s jejich čištěním. Připravena by měla být jedna sada zkumavek pro první a druhou frakci, další pak na třetí frakci (Kutzler, 2005). Dále jsou potřeba nahřívací destičky, mikropipety, podložní a krycí sklička, mikroskop, hematocytometr, barviva (eosin – nigrosin), centrifuga, zkumavky do centrifugy a systém na počítání krevních buněk (Johnston et al., 2001).

3.5.2 Příprava

Pes by se měl před odběrem vymočit a měl by být čistý (Purswell et al., 1992). Místnost určená pro odběr by měla být tichá a vyhřátá, bez přítomnosti nežádoucích osob. Osoba provádějící odběr by neměla být oblečena jako veterinární lékař, protože pohodlí psa je nezbytné pro provedení úspěšného odběru (Freshman, 2002). Strach a bolest obvykle vedou k neúspěšnému odběru (Kutzler, 2005). Někteří psi preferují přítomnost majitele, jiní naopak ne (Purswell et al., 1992).

Pro stimulaci psa může být přivedena klidná fena přiměřené velikosti, nejlépe v proestru nebo estru. Tomuto účelu stejně dobře poslouží zmrazený vaginální sekret říjné feny (Seager, 1986). Použít lze i umělé komerčně vyráběné feromony nebo methyl p-hydroxybenzoát aplikovaný na vulvu a ocas anestrické feny (Johnston et al., 2001) nebo na polštářek gázy (Kutzler, 2005). Feny s ovariohysterektomií jsou vhodné též

(Freshman, 2002). Pokud je to potřeba, může se použít lubrikant na bázi vody (Kutzler, 2005).

Kustritz (2007) zjišťovala změny ejakulátu po podání PGF2 α (0,1 mg/kg) a 0,9% roztoku NaCl (0,6 ml) 15 minut před odběrem. Po podání PGF2 α a za přítomnosti feny bylo pozorováno více spermií v ejakulátu než při podání roztoku NaCl v nepřítomnosti feny. Pokud byl PGF2 α podán v nepřítomnosti feny a naopak roztok NaCl v přítomnosti feny, počty spermií se nijak výrazně nelišily od sebe ani od předchozí skupiny. Závěr tedy je, že podání PGF2 α a zároveň přítomnost feny má pozitivní dopad na počet spermií v ejakulátu, a jedná se o užitečnou techniku spojenou s poměrně malými vedlejšími účinky.

Ve studii Traas et Kustritz (2004) zase tvrdí, že po podání oxytocinu (10 IU; 0,5 ml) a PGF2 α (2,5 mg) 10 minut před odběrem a za přítomnosti feny v říji nedošlo k žádnému výraznému posunu v hodnotách ejakulátu a nejeví se to tudíž jako vhodný způsob ke zvýšení počtu spermií v ejakulátu.

3.5.3 Digitální manipulace

Při digitální manipulaci je dosahováno větší kvality i kvantity ejakulátu, než při elektroejakulaci nebo odběru do umělé vagíny. Na ejakulát může mít totiž nepříznivý vliv latex, ze kterého je vyrobena umělá vagína (Parkinson, 2001). Technika odběru by měla být přizpůsobena každému psu zvlášť.

Osoba provádějící odběr klečí na levé straně psa (odebíratel je pravák) a pravou rukou rychle přetahuje předkožku přes penis. Levá ruka drží UV se sběrným sáčkem u předkožky (Freshman, 2001). Erekcce je vyvolána krouživými pohyby ruky za *bulbus glandis* (Parkinson, 2001). Když penis dosáhne 40–50 % erekce, předkožka je tlačena pomocí UV nebo ruky za *bulbus glandis*. Pokud se tak nestane, erekce a ejakulace může být bolestivá a odběr nekompletní (Freshman, 2001). V této fázi se mohou objevit i zrychlené pohyby pánví (Kutzler, 2005). Když je UV nasazena levá ruka může dál vyvíjet mírný tlak distálně od *bulbus glandis* jako simulaci „kopulačního zámku“, ale už není nutné s ní pohybovat (Freshman, 2001; Johnston et al., 2001; Seager, 1986; Kutzler, 2005). Pes se v tuto chvíli snaží překročit pravou ruku odebíratele, protože penis se otočí o 180° kaudálně. Proximální a distální strana přitom zůstává zachována. Rukou se stále vyvíjí tlak za *bulbus glandis* (Kutzler, 2005). Do 50 sekund je

vyprodukována první vodnatá prespermiová frakce o objemu 0,5–5 ml. Následuje krémová spermiová frakce obsahující 0,5–2 ml. V dalším 3–30 minutách je ejakulována vodnatá prostatická složka o objemu 30 ml (Parkinson, 2001).

První a druhá frakce jsou často odebrány společně během energických kopulačních pohybů nebo po nich (Feldman et Nelson, 2007). Pro účely chlazení nebo zmrazování a některých diagnostik by měly být frakce odděleny, protože kontakt spermií s první nebo třetí frakcí má vliv na pokles motility (England et Allen, 1992).

Po ejakulaci je uvolněn tlak na penis. UV může zůstat nasazena, dokud nedojde k detumescenci, protože pes může ještě nějaký čas uvolňovat prostatickou tekutinu. Někteří psi preferují po odběru pomalou chůzi, ale měli by být pod dohledem a neměli by se stýkat s jinými psy, dokud není penis zatažen v předkožce (Freshman, 2002). Než je penis zatažen do předkožky, samci si jej obvykle olizují (Kutzler, 2005).

England (1999) tvrdí, že samci mohou být odebráni znovu hned po prvním odběru, a to v intervalu 63 minut. V tomto případě měl druhý vzorek výrazně menší objem druhé frakce, stejně tak měl nižší koncentraci i celkový počet spermií. V motilitě ani morfologii nebyly změny pozorovány, to znamená, že nedošlo ke změnám v kvalitě ejakulátu. Tato technika tak může být užitečná při použití v umělé inseminaci nebo kryokonzervaci.

3.5.4 Alternativní metody odběru ejakulátu

K odběrům je také možné použít elektroejakulci nebo farmakologické prostředky. Elektroejakulace se provádí pouze v celkové anestezii, aby byla zaručena bezpečnost zúčastněných osob a zvířete (Kutzler, 2005). Ohl et al. (1994) zkoumali, zda za snížení kvality ejakulátu je přímo zodpovědná elektroejakulace a zjistil, že statisticky významný rozdíl je pouze v celkovém počtu spermií a v motilitě. V objemu a koncentraci byly změny nevýrazné. Přiklání se tedy k tomu, že elektroejakulace není přímo zodpovědná za změny v ejakulátu. Výhoda elektorejakulace spočívá v tom, že její úspěšné provedení je nezávislé na libidu, a není proto nutná přítomnost háravé feny nebo fantoma. Nevyžaduje ani trénink psa, který může být zdlouhavý a ne vždy zaručí dobré výsledky. Ejakulace je dosaženo použitím podlouhlých elektrod, které zaručují stimulaci pouze určité oblasti rekta a redukci nechtěných stimulů. Většina moderních systémů používá vlny impulsů o frekvenci 20–30 cyklů za sekundu o max. napětí 16 V

($I < 900$ mA). Stimulace trvají několik sekund a opakují se až do vyvolání ejakulace. Některé sondy dokonce umožňují předprogramování impulsů. Nejvíce diskutovanou otázkou u této metody je pohodlí a welfare zvířat. Odkdy je už elektroejakulace bolestivá, není jasné, provádí se však pouze u anestetizovaných zvířat a měl by jí vykonávat jen veterinární lékař. I přes zákazy v některých státech provádějí občas veterinární lékaři elektroejakulaci bez anestezie (Mills et al., 2010).

Pro vyvolání ejakulace je též možné použít pilokarpin. Při intravenózním podání 0,7 mg/kg hydrochlorid pilokarpinu, rozpuštěného ve 3 ml solného roztoku, byl zaznamenán výrazně menší objem ejakulátu v porovnání s manuálním odběrem (Juniewicz et al., 1989).

3.6 Ejakulát

Ejakulát je rozdělen do tří frakcí, ale pro účely umělé inseminace a kryokonzervace se odebírá pouze druhá frakce. Všechny tři frakce se hodnotí v případě, že pes skládá chovatelské zkoušky nebo kvůli zjištění dědičných poruch reprodukce (Kutzler, 2005). První tzv. prespermiová frakce pochází z prostaty. Je čirá nebo mírně zakalená a obsah je od 0,5 do 20 ml (Feldman et Nelson, 2007). Druhá frakce, mléčně bílá, je nejvíce bohatá na spermie a má objem 0,5 až 20 ml a podle Dunbar (1979) trvá 50–90 sekund. Pochází z ocasu nadvarlete, kde jsou spermie shromažďovány. Třetí frakce je čirá a nejobjemnější (Feldman et Nelson, 2007). England (2010) uvádí 5–35 ml a podle Dunbar (1979) zabere její uvolnění 5–35 minut. Tato prostatická tekutina má za úkol posunout spermie dál do pohlavního traktu samice a aktivovat spermie, proto se odebírá do zvláštní zkumavky (Kutzler, 2005).

U každého odebraného vzorku by nejdříve měly být určeny základní parametry, jako je motilita, celkový počet spermií, koncentrace spermií, morfologie a další. Primárně u psů starších 12 let nebo jedinců, kteří nebyli dlouho použiti pro reprodukci a provádí se také u psů, kteří absolvovali připouštění, ale bez následného zabřeznutí feny (Kutzler, 2005). Hodnocení ejakulátu také napomáhá odhadnout fertilizační schopnosti ejakulátu. Hodnocení čerstvého ejakulátu se zaměřuje spíše na správnou funkčnost varlat a nadvarlat, zatímco u rozmrazeného ejakulátu se posuzuje spíše poškození buňky vlivem kryokonzervace (Martinez, 2004).

3.6.1 Složení ejakulátu

Sekret ejakulátu je zásaditý, obsahuje velké množství chloridových iontů, naopak citrát sodný, inositol a fruktóza jsou zastoupeny málo (Huggins, 1945). Semennou plazmu tvoří také v malé míře výměšek varlete, nadvarlete, chámovodu a močové trubice. Prostatická složka ejakulátu se skládá z enzymů, cholesterolu a laktátu (Linde – Forsberg, 2007).

Sekret nadvarlat obsahuje větší množství draslíku a CO_2 . Sekret prostaty se skládá z kyselých fosfatázy, volných aminokyselin, mucinázy, transaminázy a fibrinogenu. Z hormonů jsou to adrenalin, prostaglandin a vazoglandin a z iontů Na, K, Ca, Zn. Semenná plazma je bohatá na cholin a kyselinu citronovou, ta má spolu s Na a K vliv na udržení osmotické rovnováhy ejakulátu. Hlavním zdrojem energie pro spermie je fruktóza. Při jejím štěpení vzniká kyselina mléčná, kyselina pyrohroznová a CO_2 . Bílkoviny v ejakulátu slouží k udržení pH a osmotického tlaku. Převážně se jedná o α – globuliny. Zvýšená koncentrace bílkovin poukazuje na zánět prostaty. Na vitalitu spermií nepříznivě působí také albumin obsažený v ředidlech, např. v nepasterizovaném mléce (Kliment et al., 1989).

3.6.2 Hodnocení ejakulátu

Ejakulát se hodnotí makroskopicky a mikroskopicky. Ihned po odběru je možné ho hodnotit za laboratorní teploty, pokud je ale rozmrazován při 37–38 °C, měl by být, po celou dobu manipulace s ním, udržován také v rozmezí 37–38 °C.

Je nutné upozornit, že všechny výsledky pokusů, zabývajících se hodnocením ejakulátu, do značné míry závisí na standardizaci podmínek, subjektivním hodnocení některých parametrů, nastavení automatizovaných systémů, správném vyložení výsledků bádání a použitých vzorcích, metodách a materiálech (Šichtař et al., 2014). Protože nejsou stanovené standardní hodnoty psiho ejakulátu, nejde na základě hodnocení jednotlivých parametrů předpovědět fertilitu samce (Karger et al., 2014).

3.6.2.1 Makroskopické hodnocení ejakulátu

3.6.2.1.1 Objem, barva, zápach

Do objemu ejakulátu se započítává první a druhá frakce, pokud jsou odebrány společně, nebo pouze druhá, pokud je odebrána samostatně, protože pro potřeby hodnocení se třetí frakce nepoužívá (Freshman, 2002). Objem druhé frakce se pohybuje v rozsahu od 1 do 30 ml podle velikosti plemene (Johnston, 1991). Fyziologický ejakulát by měl mít mléčně bílé zbarvení (Kustritz, 2010), pokud je vzorek čirý, obvykle neobsahuje žádné spermie (Barber, 2010). Žlutá nebo zelená barva ejakulátu může indikovat kontaminaci močí nebo hnisem, červená a hnědá barva zase ukazuje na kontaminaci krví (Johnston et al., 2001). Krev v ejakulátu naznačuje onemocnění prostaty nebo poškozené cévy v penisu, ale bylo zjištěno, že ani po šesti hodinách kontaktu se spermii nemá krev v ejakulátu vliv na motilitu spermií (England et Allen, 1992).

3.6.2.1.2 pH

pH se měří indikátorovým papírkem nebo pH – metrem s přesností 0,5. Hodnoty pH semenné plazmy se pohybují od 6,3 do 7,0 (Feldman et Nelson, 2007). Prostatická tekutina může mít pH v rozsahu 6,0–7,0 (Feldman et Nelson, 2007; Johnston et al., 2001). Hodnota pH může být určující při výběru antibiotik v případě infekce (Freshman, 2002). Ke změnám pH může dojít při onemocnění prostaty nebo při kontaminaci močí (Barber, 2010).

3.6.2.2 Mikroskopické hodnocení ejakulátu

3.6.2.2.1 Motilita

Motilita je charakterizována jako progresivní pohyb vpřed za hlavičkou (Feldman et Nelson, 2007). Je to projev strukturální a funkční kompetence spermií, úzce související s integritou membrány a normální morfologií (Kumi – Diaka, 1993), ovšem jako samotná má nízkou vypovídající hodnotu o fertilitě (Martinez – Pastor et al., 2005). Vyjadřuje se v procentech motilních spermií a u nativního ejakulátu by měla být alespoň 70%, nebo jak uvádí England (2010) v rozmezí 80–90 %. Po 5 dnech sexuální abstinence motilita spermií rychle klesá (Feldman et Nelson, 2007).

Kritickým faktorem pro motilitu je teplota, proto musí být kontrolována po celou dobu zacházení se spermatem. Psí sperma je rezistentní vůči chladovému šoku až do teploty 21 °C (Johnston et al., 2001). Purswell et al. (1992) uvádí, že chladový šok může mít vliv na snížení motility. Pokud chceme motilitu zachovat, je nejlepší používat nahřátá podložní skla (Freshman, 2002), i když podle Threlfall (2003) nejsou potřeba, pokud se vzorek vyhodnotí do 1–2 minut od odběru. Vždy se snažíme uchovat ejakulát v rozmezí 20–37 °C, lze s ním tedy pracovat i při laboratorní teplotě (Payan – Carreira, 2011).

Je důležité odlišit opravdu motilní spermie od těch, které jsou pouze pasivně přesouvány například vlivem proudění tekutiny. U kryokonzervovaného ejakulátu můžeme pozorovat výrazný pokles motility. Také klesá počet živých spermií a s tím související množství abnormálních spermií (Parkinson, 2001). Dalšími faktory ovlivňujícími motilitu jsou kontaminace vodou, močí, krví či použitým lubrikantem (Payan – Carreira et al., 2010), ale také například délka sexuální abstinence (Barber, 2010). Jsou známy studie, které informují o snížení motility spermií při styku s latexem po dobu 1 minuty. To by ale neměl být problém při použití správné techniky odběru. U vinylových rukavic byl dopad na motilitu minimální (Althouse et al., 1991). Motilita také klesá při styku s lubrikantem, detergenty, po přidání ředidla a se sníženou frekvencí odběrů (Meyers – Wallen, 1991).

Motilita se hodnotí ihned po odběru. Pokud je ejakulát příliš koncentrovaný, měl by být naředěn roztokem o příslušném pH (Rigau et al., 2001). Kapka ejakulátu je umístěna na nahřáté podložní sklo a přikryta krycím sklíčkem. Používá se zvětšení 200× a 400× (Feldman et Nelson, 2007; Johnston et al., 2001). U vysoce koncentrovaného ejakulátu se ředí v poměru 1 : 1 s fyziologickým roztokem (Zambelli et Levy, 2010). Vizuální hodnocení pomocí optického mikroskopu je nejjednodušší a nejlevnější metodou, je ale silně individuální, a proto není dobré pro predikci fertility. Přesnější je vyhodnocování pomocí počítače a systému CASA (Computer – assisted sperm analysis). U různých programů se však nastavení systému liší, a tak je těžké porovnat data pocházející z různých laboratoří (Verstegen et al., 2002). Nastavení je individuální pro různě získané a uchovávané vzorky, ale vždy by mělo být standardizované pro každou laboratoř (Rijsselaere et al., 2012). Většinou se hodnotí procento motilních spermií, průměrná rychlost na dráze (VAP), přímočará rychlost (VSL), křivočará

rychlost (VCL), to vše v $\mu\text{m s}^{-1}$. Dále se sleduje amplituda laterálního vybočení hlavičky spermie (ALH) v μm , frekvence křížení hlavičky spermie s průměrnou dráhou spermie (BCF) v Hz, přímota (STR), tj. poměr hodnot VSL/VAP v procentech, a linearita (LIN), tedy poměr VSL/VCL, také v procentech (Iguer – Ouada a Verstegen, 2001). V jednom ejakulátu totiž spermie vykazují různé charakteristiky pohybu (Quintero – Moreno et al., 2003).

V případě kryokonzervovaného ejakulátu se, zároveň s motilitou, může stanovit aglutinace spermií, tedy jejich shlukování dohromady (Olson, 1992). Shlukování kolem kusů žloutku nebo kolem nečistot a vzduchových bublin není na závadu, pouze to komplikuje vyhodnocování parametrů v CASA systému (Freshman, 2002).

3.6.2.2.2 Počet spermií a koncentrace

Pro určení počtu spermií v ejakulátu je nutné nejdříve znát jejich koncentraci, která se určuje hematocytometricky. Počet spermií se nestanovuje jen na základě jednoho vzorku, zvláště pokud je pes stresovaný a nervózní (Freshman, 2001; Johnston et al., 2001) a je závislý na velikosti psa a jeho varlat, na stáří, zdravotním stavu a koeficientu inbreedingu (Johnston et al., 2001). Počet spermií je také nižší v pozdním létě a na podzim, ale neklesá pod normální hodnoty (Feldman et Nelson, 2007). Větší psi mají vyšší počet spermií, například středně velký pes produkuje 250 až 300 milionů spermií v ejakulátu, ale může to být i mnohem více (Johnston et al., 2001; Seager, 1986). Johnston (1991) uvádí rozsah 300 mil. až 2 mld. a England (1990) uvádí, že produkce by měla být 10 milionů spermií na 0,454 kg hmotnosti zvířete. Pokud je nutné zjistit denní produkci spermií, odebírá se pes pravidelně po 7 až 10 dní, protože po této době se vyčerpají zásoby z nadvarlete (Amann, 1986; Johnston, 1997). Spermatogeneze trvá 62 dní, proto mohou být abnormality v počtu spermií pozorovány mnohem později, než se objevily příčiny, které je způsobily (Johnston, 1997). Normální hodnoty koncentrace spermií v ejakulátu neukazují vždy na dobrou fertilitu, protože není vyhodnocována správná funkčnost spermií a jejich oplozovací schopnost (Freshman, 2002). Počet spermií se dá také určit spektrofotometricky, kdy je odebraný materiál srovnán se slepým vzorkem (Salisbury et al., 1943). Dále je možno použít průtokový cytometr nebo počítačový modul CASA (Rijsselaere et al., 2005).

3.6.2.2.3 Morfologie

Jakékoliv narušení spermatogeneze má za následek produkci deformovaných spermií a jen velmi vzácně je známa příčina (Oettlé, 1993).

Morfologické abnormality se dělí na primární a sekundární. Primární vznikají už při procesu spermatogeneze, sekundární potom při průchodu nadvarletem, během odběru nebo při manipulaci s ejakulátem (Seager, 1986). Dělit se mohou i podle umístění, a to buď na hlavičku, akrozomu, střední části, nebo bičíku (Zambelli et Levy, 2010). Normální vzorek semene by měl mít do 10 % primárních abnormalit a do 20 % sekundárních (Feldman et Nelson, 2007; Freshman, 2001; Johnston et al., 2001; Purswell, 1992). Celkově se podíl normálních spermií pohybuje okolo 70 % (Johnston, 1991) a pokud je pod 60%, plodnost je už snížena (Oettlé, 1993). Za defekty související s neplodností se považuje proximální cytoplazmatická kapka, poškození střední části spermie a krčku. Ukazuje se, že sekundární poškození má méně škodlivý vliv na fertilitu, než primární (Martínez, 2004). Jako příčina produkce abnormálních spermií se uvádí například tepelný stres spojený s lokálním zánětem (Oettlé, 1993), hypertermie, infekce reprodukčních orgánů (Christiansen, 1984) a pokles hladiny LH a testosteronu (Kawakami et al., 1998). Jako další příčina abnormalit se uvádí sexuální abstinence a trauma varlat (Johnston et al., 2001). Ejakulát mladých psů také vykazuje velké procento abnormálních spermií (Linde – Forsberg, 2007).

Morfologie spermií se posuzuje na obarveném roztěru pomocí imerzního mikroskopu při zvětšení 1000× a hodnotí se 100 až 200 spermií. Z počtu a typu abnormálně utvářených spermií se určí procenta normálních spermií. Započítávají se pouze volné hlavičky, nikoliv samotné bičíky. Pokud spermie vykazuje víc než jednu morfologickou vadu, zapíše se ta nejzávažnější (Feldman et Nelson, 2007).

Používají se dvě techniky barvení. Při první se na jeden konec podložního skla nanese kapka eosin – nigrosinového barviva (Freshman, 2001; Johnston et al., 2001; Seager, 1986) a vedle se umístí kapka naředěného ejakulátu. Druhým podložním sklem se kapky smísí a udělá se roztěr, který se nechá schnout na vzduchu (Johnston et al., 2001). Při tomto způsobu barvení zde nejsou vidět defekty akrozomů, k tomu jsou určena speciální barviva a používá se fázový kontrast, kde jsou akrozomální defekty vidět (Parkinson, 2001). Při druhé technice se z kapky ejakulátu na podložním skle udělá roztěr hned a teprve poté se různými způsoby barví (Johnston et al., 2001).

Dostupné jsou i komerčně prodávané barvicí sady (Kustritz, 2007). Šetrnější metodou je hodnocení pomocí fázového kontrastního mikroskopu, kdy nedochází k sekundárním změnám na spermiích vlivem použitého barviva (Kustritz, 2007). K objektivnímu hodnocení lze využít i systém CASA, ale výsledky z různých laboratoří (Hu et al., 2013), a dokonce i od stejných psů, se liší (Nunez – Martinez et al., 2006). Může se použít i nezředěný, neobarvený roztěr, který nám poskytne první informace o defektech (Zambelli et Levy, 2010).

3.6.2.2.4 Cytologie

Cytologie spermatické a prostatické frakce by měla být posuzována zvlášť. Jedním ze způsobů vyšetření je centrifugovat 0,3 až 0,5 ml vzorku při 120 g po 7 minut a následně udělat roztěr (Johnston et al., 2001), nebo se roztěr udělá z celého vzorku, ale poté je k vidění méně buněk (Purswell, 1992). Běžný vzorek spermiové frakce obsahuje spermie, bílé krvinky, epitelové buňky, bakterie a červené krvinky. Vzrůst počtu bílých krvinek a intracelulárních bakterií indikuje infekci. Prostatická tekutina obsahuje též epiteliální buňky, bakterie a bílé krvinky (Johnston et al., 2001). Zvýšený počet červených krvinek naznačuje onemocnění prostaty, nebo krvácení z penisu či předkožky (Seager, 1986). Za normální se považuje 2 000 bílých krvinek na 1 μ l ejakulátu. Pro detekci prostatických buněk a bílých krvinek se používá barvení podle Wright – Giemsa (Zambelli et Levy, 2010).

3.6.2.2.5 Mikrobiologie

Ejakulát není sterilní, protože obsahuje široké spektrum mikroorganismů. Pokud chceme ejakulát kultivovat, je dobré ho odebrat tak, aby nedošlo ke kontaminaci bakteriální flórou z povrchu penisu a předkožky (Kutzler, 2005). Kultivace by měla být provedena do 24 hodin po odběru (Freshman, 2002). Více než 10 000 cfu (colony – forming unit) aerobních bakterií na ml ejakulátu ukazuje na infekci (Johnston, 1991). Anaerobní bakterie nejsou v psím ejakulátu běžné, ale pokud existuje podezření na jejich přítomnost, musí se část vzorku vzít do laboratoře na podrobnější vyšetření. V distální části reprodukčního traktu psa je běžný výskyt mykoplazmy. Pokud je však v nadbytku, může zapříčinit problémy (Feldman et Nelson, 2007).

3.6.2.2.6 Alkalická fosfatáza (ALP)

Alkalická fosfatáza je enzym podporující činnost buněk a je produkována nadvarletem. Má vliv na metabolismus fosfátových vazeb v molekulách a účastní se transportu anorganických látek přes membránu. Měření ALP u azoospermatických vzorků pomáhá zjistit, jestli se jedná o poruchu libida, selhání varlat nebo neprůchodnost duktuálního systému. Hodnoty ALP v běžném vzorku se pohybují v rozpětí 5 000 až 10 000 UI/l (Johnston, 1997). Pokud se naměří hodnoty nižší než 5 000 UI/l, může to ukazovat na nekompletní ejakulaci, neprůchodnost cest, nevyvinutí varlat, na druhou stranu hodnoty nad 5 000 UI/l indikují dysfunkci varlat.

3.6.2.2.7 Integrita membrány

Integrita membrány je jednou z funkčních vlastností spermií a její hodnocení je jedním ze způsobů jak posoudit kvalitu spermií. Nejvíce ovlivněnou strukturou spermie při kryokonzervaci, tedy krystalizaci vody a nastalé osmotické nerovnováze, je akrozom (Mazur, 1985; Outtlé, 1986), který pro proniknutí do vajíčka samice musí být neporušený. Pokud během kryokonzervace dojde k jeho poškození, spermie nikdy nemůže proniknout *zonou pellucidou* (Yanagimachi, 1981). S vysokou mírou poškození akrozomální membrány tedy klesá fertilita semene (Szász et al., 2000).

Ke zjištění funkčního stavu membrány se používá barvení (Kustritz et al., 2007) nebo inkubace v hypersmotickém nebo hypoosmotickém mediu (Hishinuma et Sekine, 2003). Testy integrity membrány jsou často označovány také jako testy viability spermií (Lorton, 2014).

Při HOS – testu se využívá toho, že v hypoosmotickém prostředí se bičíky spermií stáčíjí v důsledku pronikání vody přes membránu. Jedná se tedy o fyziologickou reakci značící, že spermie je neporušená. Byla pozorována silná závislost mezi procentem stočených spermií a počtem motilních spermií, protože motilita spermií částečně závisí na integritě membrány. Proto je HOS – test vhodný k analýze ejakulátu (Kumi – Diaka, 1993). Pro hodnocení vzorku je nutné ejakulát naředit, přičemž nejčastěji se používá ředění 1 : 10, tedy například 10 µl ejakulátu a 100 µl hypoosmotického roztoku sacharózy. Vzorek se následně 30 minut inkubuje ve vodní lázni o 37 °C, a pak se pod mikroskopem vyhodnotí 100 spermií při zvětšení 1000 × (Šichtař et al., 2014).

Další možností je spočítat poměr živých a mrtvých spermií pomocí barvení. Viabilita se poté hodnotí průtokovou cytometrií, nebo fluorescenční a světelnou mikroskopií (Lorton, 2014). Spermie mohou mít poškozenou integritu membrány, čemuž odpovídá i testování integrity membrány, a přesto se některé z těchto buněk jeví jako motilní a viabilní. To může znamenat, že tyto spermie s poškozenou membránou nepřežijí stejně dlouho, jako ostatní nepoškozené buňky (Lorton, 2014).

Jako další parametr, který ovlivňuje fertilitu, je vnitřní uspořádání chromatinu, kdy změny této struktury vysoce ovlivňují fertilitu a jsou nevratné (Lorton, 2014).

Při zjišťování zastoupení živých a mrtvých spermií se používá vitální barvení pomocí eosin – nigrosinu. Používá se i pro morfologii a je založeno na tom, že porušená membrána mrtvé spermie dovnitř propouští barvivo eosin (Kustritz et al., 2007). Živé spermie se potom jeví jako bílé, zatímco mrtvé spermie se barví růžově (Zambelli et Levy, 2010). Pro mrazené sperma se toto barvení nepoužívá, protože penetrace barviva do buňky vykazuje velké procento mrtvých spermií (Parkinson, 2001). Dnes se již přechází v různých modifikacích na fluorescenční barvení, například pomocí propidium iodid a CFDA (carboxyfluoresceindiacetat). Propidium iodid (PI) se váže na poškozenou membránu a mrtvé spermie se ve fluorescenčním mikroskopu jeví jako červeně zbarvené. CFDA barví živé spermie zeleně (Aboagla et Terada, 2004). Spermie, u kterých proběhla kompletní akrozomální reakce se barví odlišně v ekvatoriální rovině díky ztrátě vazebných míst (Szász et al. 2000). Dále lze použít například SYBR-14 (Molecular Probes, USA) v kombinaci s PI (Lorton, 2014).

3.7 Uchovávání ejakulátu

Ejakulát lze v případě potřeby uchovávat krátkodobě jako chlazený, nebo je možné jej konzervovat pro dlouhodobé účely, nejčastěji v tekutém dusíku při $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, kdy dochází k zastavení metabolismu spermií (Feldman et Nelson, 2007).

3.7.1 Chlazení

Pro krátkodobé uskladnění ejakulátu je lepší ho zchladit na teplotu cca $4\text{--}5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pokud není ejakulát zpracováván v laboratorní teplotě, umístí se nejdříve chladící medium v odběrných zkumavkách na 1 hodinu do vodní lázně o teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. U odebrané spermatické frakce se stanoví motilita a koncentrace. Ejakulát se následně

přidá k chladicímu mediu tak, aby výsledná koncentrace byla 100×10^6 sperm. ml⁻¹. Vše se ochladí na 4 °C. Po 90 minutách chlazení by se měl ejakulát vyšetřit a stanovit viabilita spermií. Takto ošetřený ejakulát lze uchovávat 3–4 dny (Feldman et Nelson, 2007). Po dvou dnech v 5 °C byly parametry ejakulátu lepší než u zmrazených vzorků. V průměru teprve po 5 dnech skladování při 5 °C se kvalita ejakulátu začala podobat kryokonzervovanému (England et Ponzio, 1995).

Bencharif et al. (2013) zjistili, že semeno je možno uchovávat beze změny kvality 4 dny při 4 °C naředěním 6% LDL (low density lipoproteins) s glutaminem nebo samotným 6% LDL. Ve srovnání s ejakulátem ředěným vaječným žloutkem byla integrita membrány zachována, nedošlo ke kapacitaci spermií a DNA byla neporušena. Po čtyřech dnech skladování bylo zjištěno v prvním případě 70,8 % a ve druhém případě 76,1 % živých spermií. Dlouhodobější skladování chlazeného ejakulátu tak umožňuje, zasílat inseminační dávky i na velké vzdálenosti.

Pokud je ejakulát do 2–3 hodin použit k inseminaci, není nutné ho ředit. Jestliže je prosto delší, musí se naředit ředidly a uchovávat při teplotě 5 °C. Dnes jsou k dostání komerčně vyráběná ředidla, která udrží 70 % motilních spermií po 10 dní při 5 °C (Farstad, 2010).

3.7.2 Kryokonzervace

Kryokonzervace je pro buňky velmi náročný proces, jenž způsobuje fyziologické, chemické a osmotické změny, které většina buněk nepřežije. Při kryokonzervaci membrána akrozomu nabobtná, rozředí se a obsah se vylíje do prostředí (Rodriguez – Martinez et al., 1993), funkčnost buněk se sníží minimálně o 50 %, což má vliv na dosaženou plodnost po inseminaci (Gordon, 2004; Forero – Gonzalez et al., 2012). Je to velmi komplexní proces, který je ovlivněn mnoha faktory, jako je rychlost ochlazování a zmrazování, vícenásobné ředění, centrifugace před zředěním nebo po naředění, složení ředidel, osmolalita, pH, délka skladování, teplota rozmrazování, ředění po rozmrazení, apod. (např. Tsuitsui, 1989; Snoeck et al., 2012; Forero – Gonzalez et al., 2012; Aboagla et Terada, 2004; Neves et al., 2009). Ovšem pokud pes není schopen připouštění nebo v případě jeho úmrtí lze díky kryokonzervaci zachovat jeho genetický materiál (Kutzler, 2005).

Při mrazení začnou vznikat krystalky vody, tím pádem dochází ke zvýšení koncentrace soli v ještě nezmrzlé části media, a tak vzniká osmotický tlak. Voda je z buňky vyloučena přes membránu, buňky tak při pomalém mrazení mají čas vodu vyloučit a zmenšit se. Při rychlém mrazení na to není čas a buňka v důsledku tvorby krystalů umírá. V části, kde je buňka nejvíce dehydrována, se zvedne koncentrace rozpuštěných látek, což může být pro buňku také zničující. Někdy, při nepatrné dehydrataci, když jsou krystaly vody příliš velké, dojde i k fyzikálnímu poškození vnitřní a vnější membrány (Kliment et al., 1989). Rozhodující pro způsob mrazení je i velikost buňky. Čím větší je, tím pomalejší musí být mrazicí proces, aby byl čas na dehydrataci buňky. Kryoprotektiva, tedy látky, které chrání buňky při procesu mrazení, mohou a nemusí vstupovat do buňky, ale v obou případech váží vodu, a proto ovlivní dostupnost vody buď pro dehydrataci, nebo pro tvoření krystalů. Látky vstupující do buněk, například glycerol a dimethyl sulfoxid, nejen snižují úroveň dehydratace, ale i redukují poškození vlivem změny koncentrace rozpuštěných látek. Proteiny a disacharidy do buněk neprostupují, mohou ale při velmi rychlém mrazení dehydrataci uspišit (England et Allen, 1992). Aby byl proces dehydratace umožněn, musí před zmrazením ejakulát podstoupit ekvilibraci (Hafez et Hafez, 2000).

Všechna kryoprotektiva použitá pro konzervaci musí být izotonická, protože v hypertonickém prostředí se spermie přestávají pohybovat, a naopak v hypotonickém prostředí spermie bobtnají. V ředící substancii by měla být obsažena, kromě jiných látek, hlavně kryoprotektiva (např. glycerol), chránící spermie před zhoubnými následky mrazení. Všechna ředidla lze rozdělit do dvou skupin. Ta, která pronikají do buňky, jako glycerol a dimethylsulfoxid a ta, která do buněk nepronikají, např. laktóza a theralóza. Obě skupiny mohou zapříčinit dehydrataci buněk, a to kvůli narušení osmotické rovnováhy a následnému úniku vody z buňky ven. Liší se však ve schopnosti vstupovat do buněk a začleňovat se do cytoplazmy a membrán (Hammerstedt et al, 1990).

Nejvyužívanějším kryoprotektivem je v současnosti glycerol, který má ale také své nevýhody, protože například na objemové změny spermií může mít vliv i to, zda je glycerol přidáván při teplotě 37 °C nebo 4 °C (Fiser et Fairfull, 1989). Je známo, že glycerol mění strukturu dvouvrstevné membrány, proto se přidáním tohoto kryoprotektiva mění distribuce vody a iontů přes membránu. Glycerol dále způsobuje

energetickou dysbalanci uvnitř buňky vlivem svého metabolismu. Dále dochází k větší potřebě ATP, protože jsou stimulovány iontové kanály, díky změně permeability membrány (Hammerstedt et al, 1990). U glycerolu je důležité dosáhnout kompromisu jeho toxického efektu na spermie a koncentrace, kdy slouží jako kryoprotektivum (England, 1993). K podobnému jevu jako u glycerolu dochází při použití 6C monosacharidů, jako je glukóza, manóza a galaktóza (Hammerstedt et Lardy, 1983).

K ředění ejakulátu se nejčastěji, jako složky ředidla, používá vaječný žloutek, glycerol a laktóza. Tyto látky pomáhají ochránit spermie proti mrazu (Dunbar, 1979), ale při použití vaječného žloutku vznikají rizika, jako například mikrobiální kontaminace (Viahwanath et Shannon, 2000). Některé složky vaječného žloutku také ovlivňují funkční vlastnosti spermií a centrifugace by mohla pomoci tento problém vyřešit (Wall et Foote, 1999). Při kryokonzervaci hřebčího ejakulátu byla použita dvě ředidla obsahující laktózu, vaječný žloutek a buď 3,5 % ethylen glykolu (EG), nebo 5 % acetamid. Před zmrazením byly vzorky centrifugovány, ale až po naředění ředidlem. Po rozmrazení byla procenta spermií s nepoškozenou membránou 35,1 % u ředidla s 3,5 % EG a 36,9 % u ředidla s acetamidem (Snoeck et al., 2012). Pokud byl psí ejakulát určený ke kryokonzervaci centrifugován ještě před zředěním, došlo ke zvýšení procent živých buněk, oproti necentrifugovanému ejakulátu (64,9 % a 51,4 %; Schäfer – Somi et al., 2006).

Také nebyl zaznamenán významný rozdíl v motilitě, viabilitě a integritě akrozomální membrány spermií, pokud bylo semeno zmrazeno ihned po odběru, centrifugaci a naředění (CaniPRO Freeze A) nebo až po 24 hodinách ve 4 °C (Hidalgo et al., 2014). Vědci též srovnávali rozmrazené centrifugované sperma s Androcoll-C (centrifugační médium) a necentrifugovaný rozmrazený ejakulát (Dorado et al., 2013) a zjistili, že vyšší kvality, tedy větší motility spermií, bylo dosaženo v prvním případě, kdy bylo zjištěno 38,5 % vysoce aktivních spermií. Urbano et al. (2013) také zjistili, že kryokonzervace nemá vliv na fragmentaci DNA a centrifugace s použitím Androcoll-C zlepšila životnost DNA u rozmrazených vzorků. Při porovnávání vlivu kondenzovaného mléka s glukózou a Tris – fruktózového ředidla bylo zjištěno, že obě ředidla mají porovnatelný vliv na funkční vlastnosti kryokonzervovaných psích spermií. U kondenzovaného mléka bylo dosaženo vyšší motility, menšího poškození akrozomů

a menšího počtu morfologických defektů, ale rozdíly nebyly průkazné (Baran et al., 2012).

Dále se zkoumaly například účinky sacharidů, použitých k ředění ejakulátu, na kvalitu spermií (Yildiz, 2000). Disacharidy, kromě laktózy, redukovaly po rozmrazení počet mrtvých spermií a procento poškozených akrozomů, zato na motilitu vliv neměly. Monosacharidy, zvláště fruktóza a xylóza, zlepšily motilitu, zvýšily viabilitu a počet nepoškozených akrozomů. Galaktóza, laktóza, theralóza, maltóza a sacharóza redukovaly poškození akrozomů v equilibrovaných vzorcích (EQ), ale nezvýšily motilitu a přežitelnost při EQ. Theralóza, xylóza a fruktóza výrazně zvýšily počet aktivních spermií po rozmrazení ve srovnání s ostatními sacharidy a kontrolní skupinou. Sacharidy tedy ovlivňují kvalitu spermií a jejich dopad na určitou oblast hodnocených parametrů závisí na typu použitého sacharidu (Yildiz, 2000). Při použití glukózy (koncentrace 300 mM) v kombinaci s TRIS ředidlem je motilita a viabilita spermií vyšší (42 % a 41 %), než při použití ředidel s obsahem glycerolu (Yu, 2014).

Peña et al. (2000) dosáhli nejvyšší viability a termorezistence spermií po rozmrazení, pokud použili TRIS – glukózové ředidlo s vaječným žloutkem, 7% glycerolem a 0,5% Equex. Vzorky byly ředěny ve dvou krocích namísto jednoho a lepších výsledků dosáhli rozmrazováním při 70 °C po dobu 8 sekund, než při 37 °C a 15 sekund. Equex dále zvyšuje permeabilitu membrány a redukuje osmotický stres během zmrazování a rozmrazování (Arriola et Foote, 1987).

Pokud je nutné ejakulát psů mrazit, semeno vhodné pro kryokonzervaci by mělo mít ≥ 70 % motilních a morfologicky normálních spermií a koncentraci $\geq 50 \times 10^6$ spermií v nativním ejakulátu. Je vhodné ho ředit tak, aby v 1,5 ml ředidla bylo 100 mil. motilních spermií. Důležité je dodržet čas ekvibrace, aby měly spermie čas na vyloučení přebytečné vody. Nakonec se ejakulát plní do pejet o objemu 0,5 ml (Kosiniak – Kamysz et al., 2007).

Naplněné pejety se nejdříve ochladí deset minut nad párami z dusíku (-120 °C) a teprve poté, se do něj ponoří. Ještě je možné použít počítačově řízené zmrazování, což ale navyšuje cenu celého procesu (Parkinson, 2001). Bylo prokázáno, že na životaschopnost spermií (viabilitu) má vliv i délka mrazicího procesu. U ředidla určeného pro psy byla viabilita spermií po rozmrazení vyšší, pokud proces mrazení trval 30 minut (49,4 %) a ne 60 minut (44,0 %; du Bois et al., 2012). Rozmrazování musí být

rychlé, protože pomalé umožňuje rekrystalizaci ledu v buňkách a způsobuje poškození membrány (Salisbury et al., 1961). Kryokonzervované inseminační dávky se rozmrazují ve vodní lázni buď po dobu 5–8 sekund při 70 °C (Rodenas et al., 2014), nebo 1 minutu ve 37 °C (Kurien et al., 2012). Po rozmrazení by mělo být motilita spermií alespoň 30 %. Navíc Neves et al. (2009) zjistili, že při rozmrazování psího ejakulátu způsobuje teplota 52 °C více akrozomálních abnormalit, než teplota rozmrazování 37 °C.

U skotu bylo zjištěno, že na viabilitu a motilitu spermií nemá vliv technika zmrazování (Forero – Gonzalez et al., 2012). I když ejakulát býků ve většině případů není před naředěním centrifugován, u psího ejakulátu bylo po rozmrazení pozorováno zvýšení procent živých buněk, pokud byl ejakulát před naředěním centrifugován, než když centrifugován nebyl (64,9 % a 51,4 %; Schäfer – Somi et al., 2006).

4 Materiál a metody

4.1 Zvířata

Ejakulát byl získán od 7 psů plemene sibiřský husky (H) ze soukromé chovatelské stanice a od 5 německých ovčáků (NO) ze Střediska speciálních kynologických činností Policie ČR Domašín. Stáří psů bylo v rozmezí od 1 roku do 9 let.

4.2 Odběr

Každý pes byl odebrán minimálně jednou, většina z nich dvakrát, přičemž odstup mezi jednotlivými odběry činil 24 hodin. Odběr byl proveden digitální manipulací do jednorázových kalibrovaných zkumavek. Použita byla pouze druhá, spermatická frakce ejakulátu. Ihned po odběru byl stanoven objem, motilita a viabilita pomocí eosin – nigrosin barvení. Průměrný objem spermatické frakce činil u plemene sibiřský husky 1 ml, u německých ovčáků 1,5 ml. K hodnocení motility byl použit mikroskop Nikon Eclipse Ci–L s fázovým kontrastem, zvětšení 100 ×. Pro potřeby mrazení se používal ejakulát s motilitou vyšší než 70 %. Koncentrace byla stanovena hematocytometrickou metodou, pomocí Bürkerovy komůrky.

Tab. 1: Počet odebraných vzorků podle ředidla, plemene a odběru.

Plemeno	Husky (N = 7)		NO (N = 5)		Celkem
	1. odběr	2. odběr	1. odběr	2. odběr	
NOEY	17	7	22	17	63
NOCY	17	6	21	16	60
CFEY	17	6	23	16	62
CFCY	15	6	20	14	55
Celkem	66	25	86	63	240
	91		149		

4.3 Ředidla

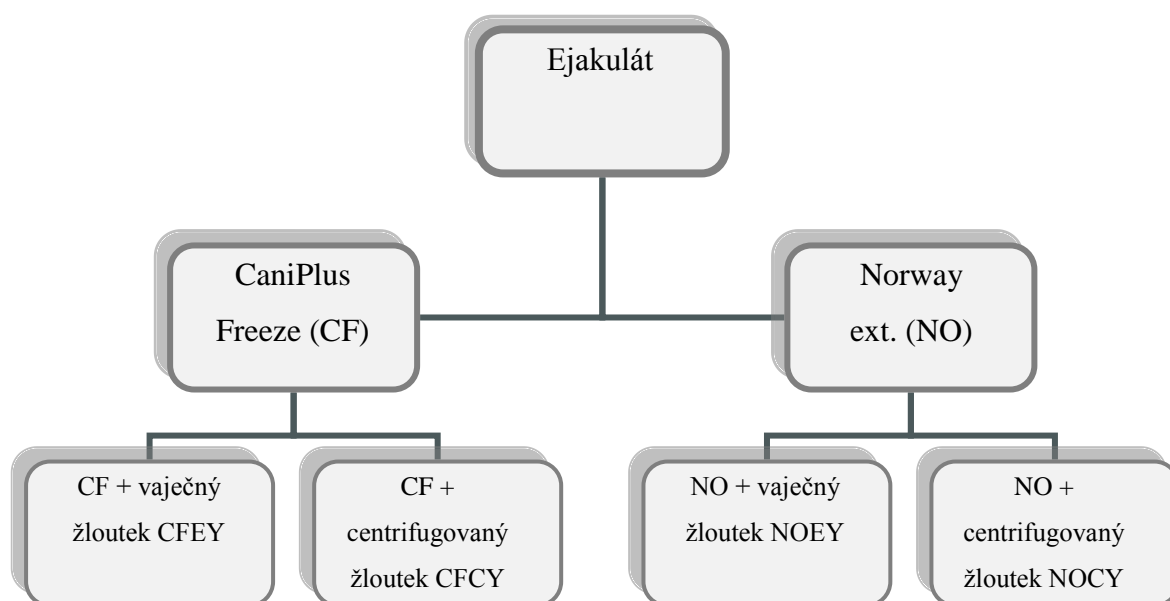
Ejakulát byl rozdělen na čtyři části, které se lišily použitými ředidly.

1. NOEY – tzv. norské ředidlo podle Martins – Bessa et al. (2006) s modifikací, a to přidání pouze 3,6 ml glycerolu na 200 ml ředidla. Výsledná osmolalita byla 844 mOsm. Toto ředidlo se skládalo z TRIS, kyseliny citronové, fruktózy, glycerolu, benzylpenicilinu, streptomycinu, vaječného žloutku a destilované vody. Výsledné pH bylo 6,62.

2. NOCY – stejné složení jako v prvním případě, ale s centrifugovaným vaječným žloutkem.

3. CFEY – komerčně vyráběné ředidlo CaniPlus Freeze (Minitübe, Německo) s přidáním 20 obj. % vaječného žloutku. CaniPlus Freeze se skládalo z purifikované vody, TRIS, kyseliny citronové, cukru, antioxidantů, glycerolu, antibiotik a vlastních komponentů.

4. CFCY – CaniPlus Freeze (Minitübe, Německo) a 20 obj. % centrifugovaného vaječného žloutku.



4.4 **Mrazení**

Žloutek byl, mimo centrifugace, připraven podle postupu Fernández – Santos et al. (2006) ze slepičích vajec. Vejce byla rozbita a žloutek byl oddělen od bílku. Následně byl ještě vysušen na filtračním papíře, aby se zbavil chalázového bílku a zbytků albuminu. Později se rozřízl skalpelem a obsah se nasál jehlou do sterilní stříkačky. Získaný žloutek se ředil destilovanou vodou v poměru 1:3 a centrifugoval (klarifikoval). Ředidla se pomalu smíchala se žloutkem a připravila se v požadovaném množství do zkumavek. K manipulaci se používaly sterilní špičky, nebo stříkačky se sterilními jehlami. Odebraný ejakulát se nechal centrifugovat 2 × při rfc 4000 g, dokud v supernatantu zbývalo jen malé množství spermií. Supernatant se následně odsál a přidal se příslušný objem ředidla tak, aby výsledná koncentrace byla 100-200 mil./0,5 ml. Teplota ředidla a ejakulátu se lišila max. 0 ± 1 °C. Dávky byly plněny do pejet o objemu 0,25 ml při pokojové teplotě. Pejety se následně ochladily v chladničce na 5 °C. Po dvou hodinách ekvibrace se držely 20 minut ve stojanu 4-5 cm nad hladinu tekutého dusíku (N₂), kde byla teplota -90 °C. Po dalších 20 minutách se vložily, otevřeným koncem nahoru, do kontejneru s tekutým N₂.

4.5 **Hodnocení viability**

Ejakulát byl rozmrazován po dobu 1 minuty ve vodní lázni o teplotě 37–38 °C. Po rozmrazení se rozdělil na dvě části. První část (T0) se naředila fyziologickým roztokem o pH 6,8 a nechala se 5 minut inkubovat ve vodní lázni (38°C). Druhá část (T30) se nechala inkubovat 30 minut a následoval stejný postup.

Pro fluorescenční barvení podle Harrison et Vickers (1990) byl použit carboxyfluoresceindiacetat (CFDA; Sigma – Aldrich, ČR) propidium iodid (PI; Sigma – Aldrich, ČR) a 0,3% roztok formalínu. Chemikálie se vyjmuly z mrazáku 15 minut před použitím a vložily se do inkubátoru (37°C). Následně se pipetovaly do 0,5 ml zkumavek eppendorf v poměru 2,1 µl CFDA, 2,1 µl PI, 1 µl 0,3% formalínu. Po celou dobu byly uchovávány ve tmě a v teple.

Do takto připravených zkumavek eppendorf se přidalo 100 µl suspenze spermií o koncentraci 10^6 – 10^7 sp. ml⁻¹. Vzorky se nechaly inkubovat 10 minut ve tmě, při 37 °C. Po vyjmutí z inkubátoru se nanoslo 8 µl vzorku na vyhřáté podložní sklíčko,

přikrylo se krycím sklíčkem, a to se zafixovalo lakem na nehty. Připravený vzorek se nechal zaschnout na vyhřívací destičce. Následně se pozoroval pod fluorescenčním mikroskopem. Hodnotilo se 200 spermií na sklíčko. Výsledkem byl procentuální podíl živých (Ž), mrtvých (M) a umírajících (moribundo, MOR) spermií.



4.6 Statistika

Výsledky byly vyhodnoceny v programu STATISTICA ver. 12 (StatSoft). Pro porovnání rozdílu mezi dvěma proměnnými, v našem případě plemeny, časy inkubace a odběry byl použit t – test pro závislé výběry. Pro vyhodnocení dat tříděných podle ředidla byla použita jednofaktorová ANOVA, které předcházely Levenův a Shapiro–Wilksův test normálního rozdělení dat. Data byla hodnocena na hladině významnosti $P = 0,05$. Hodnoty ve všech tabulkách se rovnají aritmetickému průměru sledovaných vzorků \pm směrodatná odchylka.

5 Výsledky

5.1 Vztah mezi plemenem a pořadím odběru

V prvním odběru se ve všech kategoriích hodnocených spermií statisticky významně liší plemeno husky od plemene NO ($P < 0,01$; Tab. 2). Ve druhém odběru se plemena významně liší jen v kategorii MOR ($P < 0,05$).

První a druhý odběr se statisticky významně liší v procentuálním zastoupení všech kategorií hodnocených spermií u plemene NO. Plemeno husky se mezi odběry statisticky významně liší pouze v procentuálním zastoupení spermií MOR ($P < 0,05$).

V prvním odběru dosáhlo vyššího procenta \checkmark spermií plemeno husky, ve druhém odběru naopak plemeno NO, i když spermií M má ve druhém odběru plemeno NO více, než plemeno husky. Plemeno husky dosahuje v kategorii spermií MOR v obou odběrech vyšších procent, než je tomu u plemene NO.

Tab. 2: Procentuální zastoupení hodnocených kategorií spermií v čase T0 v závislosti na plemeni a pořadí odběru.

Odběr	1			2		
	\checkmark	M	MOR	\checkmark	M	MOR
Husky	$33,6 \pm 17,3^a$	$63,1 \pm 16,4^a$	$3,3 \pm 3,3^{a1}$	$28,7 \pm 16,5$	$65,8 \pm 13,7$	$5,5 \pm 4,5^{a2}$
NO	$26,0 \pm 10,6^{b1}$	$72,9 \pm 10,7^{b1}$	$1,1 \pm 1,5^{b1}$	$30,6 \pm 13,9^2$	$66,2 \pm 12,8^2$	$3,2 \pm 3,6^{b2}$

^{a, b, c} Hodnoty s různým označením ve sloupci se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

^{1, 2} Hodnoty s různým označením v řádku se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

Stejně jako v čase T0 se na hladině významnosti $P < 0,01$ plemena statisticky významně liší v procentuálním zastoupení hodnocených kategorií spermií pouze v odběru 1 (Tab. 3). V odběru 2 se statisticky významně liší mezi plemeny pouze kategorie spermií MOR ($P < 0,05$).

V prvním a druhém odběru se statisticky významně liší pouze plemeno NO ($P < 0,01$). Plemeno husky se vzhledem k pořadí odběru neliší ani v jedné kategorii spermií. Vyšších hodnot spermií \checkmark dosahuje plemeno husky v odběru 1 a plemeno NO v odběru 2. I když ve druhém odběru plemeno husky počet spermií \checkmark klesl, počet

M zůstal téměř stejný. Druhý odběr se vyznačuje zvýšenými procenty spermií MOR u obou plemen.

Tab. 3: Procentuální zastoupení hodnocených kategorií spermií v čase T30 v závislosti na plemeni a pořadí odběru.

Odběr	1			2		
	Ž	M	MOR	Ž	M	MOR
Husky	28,3 ± 15,6 ^a	68,3 ± 15,3 ^a	3,4 ± 3,3 ^a	27,7 ± 15,3	68,1 ± 14,5	4,3 ± 3,1 ^a
NO	22,2 ± 9,2 ^{b1}	76,7 ± 9,4 ^{b1}	1,1 ± 1,8 ^{b1}	29,1 ± 11,3 ²	68,4 ± 10,8 ²	2,6 ± 3,3 ^{b2}

^{a, b, c} Hodnoty s různým označením ve sloupci se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

^{1, 2} Hodnoty s různým označením v řádku se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

Tab. 4: Procenta živých spermií seřazených od nejvyššího k nejnižšímu.

Plemeno	Pořadí odběru	Čas inkubace	Procenta Ž
Husky	1	T0	33,6 %
NO	2	T0	30,6 %
NO	2	T30	29,1 %
Husky	2	T0	28,7 %
Husky	1	T30	28,3 %
Husky	2	T30	27,7 %
NO	1	T0	26,0 %
NO	1	T30	22,2 %

5.2 Vztah mezi plemenem a časem inkubace

Vzhledem k časům inkubace se v procentuálním zastoupení jednotlivých kategorií spermií mezi sebou obě plemena statisticky významně liší ($P < 0,01$; Tab. 4). Čas inkubace má statisticky významný vliv pouze na procentuální podíl spermií Ž a M u plemene NO. Na procentuální zastoupení jednotlivých kategorií spermií plemene husky nemá čas inkubace statisticky významný vliv. Plemeno husky v obou časech inkubace dosahuje vyššího procenta spermií Ž, než plemeno NO, a zároveň nižších

procent spermií M. Slabou stránkou plemene husky je vyšší počet spermií MOR v obou časech.

Tab. 5: Procentuální zastoupení hodnocených kategorií spermií v závislosti na plemeni a čase inkubace.

Čas	T0			T30		
	Ž	M	MOR	Ž	M	MOR
Husky	32,3 ± 17,1 ^a	63,8 ± 15,7 ^a	3,9 ± 3,8 ^a	28,1 ± 15,4	68,2 ± 15,0 ^a	3,7 ± 3,3 ^a
NO	27,9 ± 12,3 ^{b1}	70,1 ± 12,1 ^{b1}	2,0 ± 2,8 ^b	25,0 ± 10,6 ²	73,2 ± 10,8 ^{b2}	1,7 ± 2,6 ^b

^{a, b, c} Hodnoty s různým označením ve sloupci se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

^{1,2} Hodnoty s různým označením v řádku se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

5.3 Vztah mezi pořadím odběru a časem inkubace

Pořadí odběru se v procentuálním zastoupení jednotlivých kategorií spermií u obou plemen statisticky významně liší ($P < 0,05$) v obou časech inkubace, až na spermie M v čase T0 (Tab. 5). Samotné časy inkubace se v procentuálním zastoupení spermií mezi sebou statisticky významně liší v kategoriích Ž a MOR u odběru 1 ($P < 0,01$) a v kategorii spermií Ž u odběru 2 ($P < 0,05$). V odběru 2 stouplo v obou časech procento MOR spermií. U odběru 1 dopadl procentuálně lépe čas inkubace T0, u odběru 2 naopak čas T30, i když v tomto případě stoupl i počet spermií M.

Tab. 6: Procentuální zastoupení hodnocených kategorií spermií v závislosti na pořadí odběru a čase inkubace.

Čas	T0			T30		
	Ž	M	MOR	Ž	M	MOR
Odběr 1	29,3 ± 14,4 ^{a1}	68,7 ± 14,3	2,0 ± 2,7 ^{a1}	24,8 ± 12,7 ^{a2}	73,1 ± 12,9 ^a	2,1 ± 2,8 ^{a2}
Odběr 2	24,7 ± 13,1 ^{b1}	66,1 ± 13,0	3,9 ± 4,0 ^b	28,7 ± 12,5 ^{b2}	68,3 ± 11,9 ^b	3,0 ± 3,3 ^b

^{a, b, c} Hodnoty s různým označením ve sloupci se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

^{1,2} Hodnoty s různým označením v řádku se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

5.4 Srovnání různých druhů ředidel v závislosti na času inkubace

Mezi dvojicemi ředidel NOEY, NOCY a CFEY, CFCY je u obou časů inkubace mezi všemikategoriemi spermií statisticky významný rozdíl procentuálním zastoupením ($P < 0,01$; Tab. 6). V případě klarifikovaného žloutku a neupraveného žloutku je statisticky průkazný rozdíl v zastoupení spermií MOR pouze mezi ředidly NOEY a NOCY ($P < 0,05$). Čas inkubace má statisticky významný negativní vliv na počet živých a mrtvých spermií u komerčně vyráběných ředidel CFEY ($P < 0,01$) a CFCY ($P < 0,05$). Po 30 minutách inkubace klesá procento živých spermií a stoupá počet mrtvých i u ředidel NOEY a NOCY, ale rozdíl není statisticky průkazný.

Tab. 7: Procentuální zastoupení hodnocených kategorií spermií v závislosti na použitém ředidle a čase inkubace.

Čas	T0			T30		
	Ž	M	MOR	Ž	M	MOR
NOEY	22,5 ± 12,8 ^a	74,2 ± 13,1 ^a	3,2 ± 3,1 ^a	21,8 ± 11,7 ^a	75,3 ± 12,2 ^a	2,8 ± 2,8 ^a
NOCY	21,9 ± 11,6 ^a	73,2 ± 11,0 ^a	4,9 ± 4,6 ^{b, c}	20,4 ± 9,5 ^a	75,2 ± 9,9 ^a	4,4 ± 4,2 ^{b, c}
CFEY	37,0 ± 13,7 ^{b1}	61,8 ± 13,8 ^{b1}	1,2 ± 1,6 ^b	30,2 ± 12,4 ^{b2}	68,6 ± 12,8 ^{b2}	1,2 ± 1,6 ^b
CFCY	38,0 ± 10,6 ^{b1}	60,3 ± 10,9 ^{b1}	1,6 ± 1,8 ^b	32,9 ± 12,5 ^{b2}	65,7 ± 13,2 ^{b2}	1,4 ± 1,5 ^b

^{a, b, c} Hodnoty s různým označením ve sloupci se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

^{1, 2} Hodnoty s různým označením v řádku se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

5.5 Srovnání různých druhů ředidel v závislosti na pořadí odběru

Statisticky významné rozdíly v procentuálním zastoupení jednotlivých kategorií spermií jsou patrné z Tab. 7 mezi skupinami ředidlem NOEY, NOCY a CFEY, CFCY, a to v prvním odběru v kategoriích M a MOR ($P < 0,05$; $P < 0,01$, dle uvedeného pořadí) a ve druhém odběru v kategoriích Ž a M (vše $P < 0,01$). V prvním odběru v kategorii Ž a ve druhém odběru v kategorii MOR se procenta spermií statisticky průkazně liší pouze mezi ředidly NOEY a CFEY, tedy ředidly s neupraveným žloutkem. Ředidla CFEY a CFCY dosahují výrazně vyšších procent živých spermií než ředidla NOEY a NOCY ($P < 0,05$). Nejméně živých spermií je patrné u ředidla NOCY ve druhém odběru, kde klesá pod 20 %.

První a druhý odběr se statisticky významně liší pouze v procentech spermií kategorie MOR, a to u ředidel NOEY a CFCY ($P < 0,01$; $P < 0,05$, dle uvedeného pořadí) a v kategorii spermií Ž ředidla CFEY ($P < 0,05$). Pouze u ředidla CFCY došlo ve druhém odběru ke zvýšení počtu živých spermií. U ostatních ředidel procentuální zastoupení živých spermií ve druhém odběru kleslo.

Tab. 8: Procentuální zastoupení hodnocených kategorií spermií v čase T0 v závislosti na použitém ředidle a pořadí odběru.

Odběr	1			2		
Ředidlo	Ž	M	MOR	Ž	M	MOR
NOEY	27,8 ± 13,2 ^{a, b}	67,0 ± 14,1 ^a	3,3 ± 2,3 ¹	21,2 ± 12,3 ^a	74,2 ± 11,4 ^a	4,6 ± 3,7 ^{a, b2}
NOCY	23,7 ± 12,7 ^b	71,3 ± 12,4 ^a	5,1 ± 3,9 ^a	17,1 ± 8,9 ^a	75,5 ± 8,4 ^a	7,4 ± 4,9 ^b
CFEY	41,2 ± 14,1 ^{c1}	56,9 ± 14,5 ^b	1,9 ± 1,8 ^b	40,7 ± 11,4 ^{b2}	58,0 ± 11,6 ^b	1,3 ± 1,3 ^c
CFCY	38,3 ± 11,7 ^{a, c}	60,1 ± 12,0	1,6 ± 1,4 ^{b1}	40,6 ± 7,9 ^b	57,4 ± 7,7 ^b	2,0 ± 2,1 ^{a, c2}

^{a, b, c} Hodnoty s různým označením ve sloupci se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

^{1, 2} Hodnoty s různým označením v řádku se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

V kategorii spermií Ž u prvního odběru se statisticky významně liší pouze ředidla NOCY a CFCY ($P < 0,05$), tedy obě s centrifugovaným žloutkem (Tab. 8). NOCY v tomto případě dosahuje nejnižších procent živých spermií, CFCY naopak nejvyšších, stejně tak i u druhého odběru. V kategorii spermií M u prvního odběru se ředidla mezi sebou významně neliší. V prvním i druhém odběru dosahuje poměrně vysokých hodnot v kategorii MOR ředidlo NOCY. Ve druhém odběru stoupl počet živých spermií, a zároveň klesl počet mrtvých, u ředidel CFEY a CFCY. Ve druhém odběru se v procentuálním zastoupení jednotlivých kategorií spermií mezi sebou statisticky významně liší ředidla NOEY, NOCY s ředidly CFEY, CFCY (vše $P < 0,01$), kromě zastoupení spermií v kategorii MOR, kde se liší ředidlo NOCY se všemi ostatními. Mezi prvním a druhým odběrem je významný rozdíl pouze u ředidla NOCY v kategorii MOR a u ředidla CFEY v kategoriích Ž a M. V čase T30 došlo u ředidel CFEY a CFCY u druhého odběru ke zvýšení procentuálního zastoupení živých spermií.

Tab. 9: Procentuální zastoupení hodnocených kategorií spermií v čase T30 v závislosti na použitém ředidle a pořadí odběru.

Odběr	1			2		
	Ž	M	MOR	Ž	M	MOR
NOEY	24,1 ± 11,2	72,3 ± 12,0	3,6 ± 2,7	23,9 ± 12,2 ^a	73 ± 11,9 ^a	3,1 ± 2,9 ^{a, c}
NOCY	21,0 ± 10,5 ^a	73,4 ± 11,1	5,6 ± 3,9 ^{a1}	18,4 ± 7,6 ^a	75,8 ± 7,6 ^a	5,7 ± 4,6 ^{b2}
CFEY	32,5 ± 12,8 ¹	65,8 ± 13,0 ¹	1,7 ± 1,5 ^b	36,0 ± 10,3 ^{b2}	62,5 ± 10,8 ^{b2}	1,6 ± 1,7 ^c
CFCY	35,3 ± 13,0 ^b	63,0 ± 13,6	1,7 ± 1,3 ^b	37,9 ± 10,9 ^b	60,5 ± 11,8 ^b	1,6 ± 1,8 ^c

^{a, b, c} Hodnoty s různým označením ve sloupci se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

^{1,2} Hodnoty s různým označením v řádku se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

5.6 Srovnání různých druhů ředidel v závislosti na plemenné příslušnosti

Z tabulky 9 je patrný statisticky významný rozdíl v procentuálním zastoupení jednotlivých kategorií spermií mezi ředidly NOEY, NOCY a CFEY, CFCY (vše $P < 0,01$), až na kategorii MOR plemene husky, kde je statisticky významný rozdíl mezi ředidly NOCY a CFEY, CFCY ($P < 0,01$), a kategorií Ž plemene NO, kde se NOEY statisticky významně liší s CFCY, a NOCY s CFEY a CFCY ($P < 0,01$). V procentuálním zastoupení spermií kategorie M u plemene NO se statisticky významně liší pouze NOEY a NOCY s CFCY ($P < 0,01$). V rámci jednoho druhu ředidla je patrný procentuální rozdíl mezi použitými žloutky pouze u plemene NO kategorie spermií MOR, a to mezi ředidly NOEY a NOCY ($P < 0,05$).

Meziplemenný rozdíl je průkazný u ředidla CFEY, a to v procentuálním zastoupení spermií Ž a M, a u ředidla CFCY v kategorii MOR (vše $P < 0,01$). U ředidla NOEY dosahuje vyšších procent spermií Ž plemeno NO, ale rozdíl není statisticky průkazný. U ředidel NOCY, CFEY a CFCY je trend opačný. Procenta spermií Ž jsou vyšší u plemene husky, rozdíl je ale statisticky průkazný jen v případě ředidla CFEY ($P < 0,01$). U všech ředidel dosahuje plemeno husky v kategorii MOR vyšších čísel, než plemeno NO ($P < 0,01$). U plemene husky, u ředidel s centrifugovaným žloutkem, zvláště pak u ředidla CFCY, dochází ke snížení procent spermií Ž, oproti ředidlům s neupraveným žloutkem, rozdíly ale nejsou statisticky průkazné. U plemene NO, pouze

v jediném případě (ředidla CFEY a CFCY), došlo ke zlepšení v počtu živých spermií ve prospěch klarifikovaného žloutku, rozdíl také není statisticky průkazný. Pozoruhodný je pak zvláště vysoký procentuální podíl spermií MOR u obou plemen.

Nejvyššího procenta spermií Ž bylo dosaženo u ředidla CFEY plemene husky v čase T0. Naopak u plemene NO v čase T0 dopadlo lépe ředidlo CFCY s centrifugovaným žloutkem.

Tab. 10: Procentuální zastoupení hodnocených kategorií spermií v čase T0 v závislosti na použitém ředidle a plemeni.

Plemeno	Husky			NO		
	Ž	M	MOR	Ž	M	MOR
NOEY	23,8 ± 13,5 ^a	71,6 ± 13,6 ^a	4,6 ± 3,0 ¹	25,6 ± 12,4 ^{b, c}	71,9 ± 12,7 ^a	2,5 ± 2,8 ^{b2}
NOCY	23,8 ± 15,3 ^a	69,9 ± 13,3 ^a	6,4 ± 5,4 ^{a1}	22,3 ± 8,6 ^c	72,9 ± 8,9 ^a	4,8 ± 3,8 ^{a2}
CFEY	43,8 ± 15,7 ^{b1}	54,1 ± 14,8 ^{b1}	2,1 ± 2,1 ^{b1}	31,9 ± 10,7 ^{a, b2}	67,3 ± 11,0 ²	0,8 ± 0,9 ^b
CFCY	39,2 ± 13,6 ^b	58,6 ± 13,6 ^b	2,2 ± 1,5 ^{b1}	37,2 ± 8,4 ^a	61,6 ± 8,7 ^b	1,2 ± 1,8 ^{b2}

^{a, b, c} Hodnoty s různým označením ve sloupci se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

^{1, 2} Hodnoty s různým označením v řádku se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

Po 30 minutách inkubace jsou z tabulky 10 patrné statisticky významné rozdíly mezi ředidly pouze u plemene husky v procentech spermií Ž (ředidla NOEY, NOCY a CFEY, CFCY; $P < 0,01$), v kategorii spermií M konkrétně mezi ředidly NOEY a CFEY a CFCY, NOCY a CFCY ($P < 0,01$; $P < 0,05$; $P < 0,01$, dle uvedeného pořadí) a v kategorii MOR mezi ředidlem NOCY a ředidly CF s oběma typy žloutku ($P < 0,01$). Plemeno NO vykazuje statistické rozdíly mezi ředidly pouze v procentuálním zastoupení spermií kategorie MOR, kde se liší ředidlo NOCY se všemi zbývajících ($P < 0,05$).

Mezi plemeny se procentuálně liší ve všech kategoriích spermií pouze ředidlo CFEY ($P < 0,01$). Ředidla NOEY a CFCY se liší mezi plemeny v zastoupení spermií MOR ($P < 0,01$). Ostatní meziplemné rozdíly nejsou statisticky významné.

V čase T30 dosahuje nejvyšších procent spermií Ž ředidlo CFCY, a to u obou plemen. Plemeno NO dosáhlo vyššího počtu spermií Ž než plemeno husky pouze u ředidla NOEY. Opět se s nejvyšším počtem spermií MOR u obou plemen setkáváme u ředidla NOCY.

Tab. 11: Procentuální zastoupení hodnocených kategorií spermií v čase T30 v závislosti na použitém ředidle a plemeni.

Plemeno	Husky			NO		
	Ž	M	MOR	Ž	M	MOR
NOEY	22,3 ± 10,5 ^a	73,0 ± 10,6 ^a	4,7 ± 3,0 ¹	24,3 ± 12,5	74,4 ± 13,0	1,3 ± 2,0 ^{a, c2}
NOCY	21,6 ± 12,7 ^a	72,8 ± 12,7 ^{a, b}	5,6 ± 4,4 ^a	21,4 ± 7,1	75,6 ± 7,8	3,0 ± 4,0 ^b
CFEY	36,0 ± 15,5 ^{b1}	61,6 ± 15,3 ^{b, c1}	2,3 ± 2,0 ^{b1}	25,5 ± 9,2 ²	74,1 ± 9,5 ²	0,4 ± 0,7 ^{c2}
CFCY	39,2 ± 16,7 ^b	58,4 ± 17,4 ^c	2,4 ± 1,4 ^{b1}	30,2 ± 9,2	69,5 ± 9,9	0,4 ± 1,4 ^{c2}

^{a, b, c} Hodnoty s různým označením ve sloupci se statisticky významně liší na hladině významnosti

$P < 0,05$.

^{1, 2} Hodnoty s různým označením v řádku se statisticky významně liší na hladině významnosti $P < 0,05$.

6 Diskuze

V našem experimentu má pořadí odběru ejakulátu statisticky významný vliv na viabilitu psích spermií, konkrétně ve druhém odběru bylo dosaženo více živých spermií, než v prvním (Tab. 2), ale England (1999) zjistil, že u nativního ejakulátu různých plemen psů bylo dosaženo pouze u 28 % psů vyššího procenta živých spermií ve druhém odběru následujícím 45–75 minut po prvním (68,7 % a 69,8 %, dle uvedeného pořadí), u 3 % se hodnoty nezměnily a u 69 % psů došlo k poklesu živých spermií. Proto by měla být při výrobě inseminačních dávek věnována pozornost i tomu, kdy a kolikrát byl ejakulát odebrán jednotlivým psům. V našem případě byl ejakulát psům odebrán v rozmezí 24 hodin, ale Gamčík et Kozumplík (1992) tvrdí, že u psů je vhodné provádět jeden odběr za 48 hodin.

Při srovnávání plemen bylo zjištěno více živých spermií v prvním odběru v obou časech inkubace (T0 33,6 % a T30 28,3 %) u plemene husky, i když rozdíl mezi pořadím odběru není statisticky průkazný. U plemene německý ovčák bylo zjištěno naopak statisticky průkazně více živých spermií ve druhém odběru (T0 30,6 % a T30 29,1 %), než v prvním (T0 26,0 % a T30 22,2 %). Bartlett (1962) zjistil u dvou kříženců, že jsou schopni normální produkce spermií u dvou, maximálně tří ejakulací jdoucích 15 minut po sobě. Pak výrazně klesá objem ejakulátu i koncentrace a motilita spermií, a po 60 minutách, tedy u pátého odběru, již nebyly ejakulovány žádné spermie.

V prvním i ve druhém odběru bylo v čase inkubace T0 dosaženo nejvyššího počtu živých spermií u ředidla CaniPlus Freeze s necentrifugovaným žloutkem (Tab. 8). Pouze u ředidla CaniPlus Freeze s centrifugovaným žloutkem došlo ve druhém odběru v čase inkubace T0 ke zvýšení počtu živých spermií, ale bez průkazného rozdílu mezi odběry. U stejného ředidla, ale s necentrifugovaným žloutkem, jako u jediného došlo ve druhém odběru k výraznému poklesu počtu živých spermií, to znamená, že centrifugovaný žloutek může přispívat ke stabilizaci buněčné membrány po delší dobu, jak napovídají i výsledky v čase inkubace T30 (Tab. 9), kde bylo u obou odběrů více živých spermií v případě ředidla CaniPlus Freeze s centrifugovaným žloutkem. Obě norská ředidla nedosahují v prvním i druhém odběru v žádném z časů inkubace více jak 30 % živých spermií. Norská ředidla vykazují v obou časech inkubace srovnatelný počet živých spermií, z čehož vyplývá, že norská ředidla pomáhají zachovat

viabilitu spermií po delší dobu, než ředidla CaniPlus Freeze, u kterých došlo mezi časy inkubace k výraznému poklesu počtu živých spermií v prvním i druhém odběru ($P < 0,05$).

Viabilita spermií závisí také na času inkubace. V prvním odběru bylo u všech psů dosaženo prokazatelně vyšší viability spermií, pokud byly vzorky vyhodnoceny ihned po rozmrazení. Ve druhém odběru bylo naopak dosaženo více živých spermií po 30 minutách inkubace (Tab. 6).

Pokud byl ejakulát vyšetřen ihned po rozmrazení, a ne až po 30 minutách inkubace, byla u všech psů pozorována vyšší viabilita spermií (Tab. 5), například Okano et al. (2004) v pokusu na bíglech zjistili ihned po rozmrazení 50,7 % spermií s nepoškozeným akrozomem, což je více, než v našem pokusu u obou plemen. Rozdíl v počtu živých spermií mezi oběma časy inkubace je u plemene německý ovčák statisticky průkazný. Čas inkubace má negativní vliv na počet živých spermií, i když u plemene husky není tento rozdíl statisticky významný. Ejakulát obou plemen je tedy určen k okamžité inseminaci, protože rychle dochází k degradaci spermií.

Norská ředidla s necentrifugovaným žloutkem i centrifugovaným žloutkem vykazují v obou časech inkubace nízký počet živých spermií (Tab. 7; 22,5 % \pm 12,8 % a 21,8 % \pm 11,7 %, dle uvedeného pořadí). U norských ředidel po 30 minutách inkubace počet živých spermií statisticky výrazně neklesl (21,9 % \pm 11,6 %; 20,4 \pm 9,5 %), na rozdíl od ředidel CaniPlus Freeze (Tab. 8).

Kurien et al. (2012) použil u psů ředidlo Tris ve stejném složení jako norské ředidlo a po rozmrazení došel k výsledku 39,5 % živých spermií, tedy zhruba o 20 % více, než v našem případě. Oliviera et al. (2006) zkoumal integritu plazmatické a akrozomální membrány spermií u rozmrazeného ejakulátu ředěného TRIS s 5 % ethylen glykolu a zjistil 49,7 % živých spermií. Ethylen glykol by tedy mohl mít, oproti glycerolu použitému v našem experimentu, pozitivnější vliv na integritu membrány.

Ve studii Martins – Bessa (2006), kde použily také norské ředidlo, ale s jinou výslednou osmolalitou ejakulátu, zjistily v čase inkubace T0 36,5 % živých spermií s neporušeným akrozomem. Po 90 minutách inkubace počet klesl až na 30,3 %. Ve výše zmíněném experimentu bylo vyhodnoceno více živých spermií, než v našem experimentu u norských ředidel s oběma typy žloutku v čase inkubace T0 i T30. Rozdíl

je pravděpodobně způsoben rozdílnou osmolalitou u ředidel použitých v naší studii a ve studii Martins – Bessa (2006).

V případě norských ředidel bylo v obou časech inkubace více živých spermií v ředidle s neupraveným žloutkem (22,5 %), i když v průběhu času došlo ke zhoršení, zato u komerčně vyráběného ředidla CaniPlus Freeze přežilo v obou časech inkubace více spermií v ředidle s centrifugovaným žloutkem (38,0 %), ale po 30 minutách došlo také ke snížení počtu živých spermií (Tab. 7 a 8). Rozdíly mezi použitými žloutky v rámci jednoho ředidla nejsou statisticky průkazné. V ředidle CaniPlus Freeze je obecně dosahováno vyššího počtu živých spermií, než v norských ředidlech, ale celkově méně než například v pokusu Hidalgo et al. (2014), kde použili ředidlo CaniPro Freeze (Minitübe, Německo) a zjistili po rozmrazení 46,7 % spermií s neporušeným akrozomem.

Na základě našich výsledků lze konstatovat, že úprava žloutku (centrifugace) nezhoršuje viabilitu spermií, protože při porovnávání klasického a centrifugovaného žloutku se hodnoty živých spermií v čase T0 statisticky významně nelišily. U kozlů přidání vaječného žloutku do ředidla zvýšilo procento motilních spermií, ale naopak snížilo integritu membrány (Aboagla et Terada, 2004). Mezi motilitou a integritou membrány však u psů nebyla zjištěna korelace, proto tyto dva parametry nemůžeme srovnávat (Szász et al., 2000). Vyšší viability dosahovaly u kozlů spermie v ředidle z theralózy, než z Tris ředidla s glukózou (Aboagla et Terada, 2004), stejně jako zjistil Yildiz (2000) u psích spermií. Rota et al. (1997) dosáhli při použití Tris (fruktóza, vaječný žloutek, glycerol, Equex STM Paste) po rozmrazení a 30 minutách inkubace 67,7 % viabilních spermií. I po 150 minutách inkubace viabilita významně neklesla (66,5 %), což je v rozporu s našimi závěry, kdy byl zjištěn statisticky významný rozdíl ve viabilitě spermií mezi časy inkubace u plemene německý ovčák, ale již ne u plemene husky. Nicméně rozdílné závěry našeho experimentu je možné přisoudit kratšímu času inkubace vzorku s CFDA/PI, použitím formaldehydu a vyšší inkubační teplotě (37°C), přičemž námi zvolená metodika hodnocení procentuálního zastoupení živých a mrtvých spermií vychází z (Harrison et Vickers, 1990). Meziplennými rozdíly se práce Rota et al. (1997) bohužel nezabývá, nelze tedy říci, zda má inkubace výrazný vliv na viabilitu spermií, ale podle našich zjištění záleží na odebraném plemeni psa. Ovšem uvedená viabilita spermií ve studii Rota et al. (1997) v časech inkubace 1, 2 a 3 hodiny

nemusí být jako ukazatel fertility směrodatná, protože spermie dosáhnou děložního rohu do půl hodiny od deponace do dělohy (Tsuitsui, 1989).

I když v čase inkubace T30 došlo u ředidel CaniPlus Freeze u obou typů žloutku ke statisticky významnému poklesu počtu živých spermií, stále dosahují v průměru alespoň 30 % (Tab. 7).

Szász et al. (2000) srovnávali na psím ejakulátu plemene bulmastif ředidla Triladyl (MiniTübe, Německo), původně určený pro býky, a norské ředidlo s fruktózou, vaječným žloutkem a glycerolem a různé mrazicí protokoly. Na rozdíl od našeho experimentu nezjistili mezi ředidly výrazný rozdíl, pokud byl ale použit mrazicí protokol pro býky, počet nepoškozených akrozomů klesl pod 50 %. Při použití norského ředidla a norského protokolu mražení bylo dosaženo 65 % nepoškozených akrozomů. Dávky ošetřené Triladylem a zmrazené podle norského protokolu byly následně použity k laparoskopické intrauterinní inseminaci sedmi fen. Procento zabřeznutí bylo 57 % a velikost vrhu v průměru 2,8 štěňat na fenu, tedy poměrně nízká. Zjistili také, že integrita akrozomu nekoreluje s motilitou, proto není možné podle procent motilních spermií usuzovat na procenta spermií s nepoškozenou membránou, jak tvrdí i Lorton (2014).

U ředidel CaniPlus Freeze byl zjištěn vliv různých časů inkubace na viabilitu spermií, protože po 30 minutách došlo k výraznému poklesu procent živých spermií (Tab. 7). U norských ředidel tento trend pozorován nebyl, z toho lze vyvodit, že norská ředidla mají díky svému složení lepší schopnost udržet spermie viabilní po delší dobu od rozmrazení.

Centrifugovaný žloutek pouze pomohl v ředidle CaniPlus Freeze udržet u plemene husky po 30 minutách inkubace více živých spermií, než u stejného plemene v čase T0 (Tab. 10 a 11), i když výrobce v návodu uvádí, žloutek nijak neupravovat. Po 30 minutách inkubace dokonce v ředidle CaniPlus Freeze s neupraveným žloutkem nedosáhlo plemeno německý ovčák 30 % živých spermií, a opět centrifugovaný žloutek pomohl udržet více živých spermií oproti necentrifugovanému, tentokrát v obou časech inkubace. Použití norského ředidla, s jakýmkoli žloutkem, se zdá být u obou plemen nevhodné, protože počet živých spermií nedosahuje ani 30 %. Centrifugovaný žloutek u norského ředidla zřejmě způsobuje i nárůst počtu umírajících spermií (MOR), který je významně vyšší, než u ostatních ředidel. Norská ředidla s oběma typy žloutku se u obou

plemen jeví statisticky významně ($P < 0,05$) jako méně kvalitní, a to ve všech kategoriích spermií.

V práci Strzezek et al. (2012) srovnávali u kříženců dvě ředidla pro kryokonzervaci, Tris s celým slepičím žloutkem a Tris s lyofilizovaným pštrosím žloutkem, u kterých zkoumali integritu plazmatické membrány a došli k hodnotám $40,6 \% \pm 2,6 \%$ a $36,6 \% \pm 2,4 \%$ nepoškozených spermií. Ředidla se mezi sebou výrazně lišila a lepšího výsledku dosáhli při použití lyofilizovaného žloutku, který neobsahuje vodu. Díky tomu, že bylo použito jedno ředidlo, je prokazatelné, že vliv na membránu spermií měla úprava žloutku. Vliv vaječného žloutku na integritu membrány spermií a na motilitu byl zaznamenán i u kozlů (Aboagla et Terada, 2004).

Okano et al. (2004) zjistily u plemene bígl při použití ředidla Tris (vaječný žloutek, citrát, glukóza, penicilin, streptomycin) po rozmrazení $50,5 \% \pm 7,4 \%$ živých spermií. Szász et al. (2000) u plemene bulmastif pozorovali po rozmrazení 65% spermií s nepoškozenými akrozomy při použití norského ředidla, což je v rozporu s našimi výsledky, kdy bylo zjištěno u norských ředidel s centrifugovaným i necentrifugovaným žloutkem $23,8 \%$ živých spermií u plemene husky a $22,3 \%$ a $25,6 \%$ u plemene německý ovčák. Z toho lze vyvodit, že spermie různých plemen psů reagují na stejné ředidlo odlišně a vliv na viabilitu spermií má i samotná volba ředidla. Plemenné rozdíly ve viabilitě spermií byly zaznamenány i u nativního ejakulátu ve studii England (1999) u plemene německý ovčák, kde bylo pozorováno menší procento živých a motilních spermií, než u ostatních plemen psů, a to $63,4 \%$ vs. $69,9 \%$ a $64,6 \%$ vs. $71,5 \%$, dle uvedeného pořadí. Důvod těchto meziplemených rozdílů není znám a bylo by potřeba vyšetřit mnoho plemen psů, aby byl objasněn.

Ředidlo CaniPlus Freeze s centrifugovaným žloutkem u plemene husky udrželo stejný počet živých spermií i po 30 minutách inkubace (Tab. 11). U ostatních ředidel u plemene husky měla inkubace negativní dopad na zastoupení živých spermií v ejakulátu ($P < 0,05$). U plemene německý ovčák došlo po inkubaci ve všech kategoriích spermií ke zhoršení, u živých a mrtvých spermií se jedná o průkazný rozdíl. Po 30 minutách inkubace došlo u ředidla CaniPlus Freeze s necentrifugovaným žloutkem u obou plemen, a u ředidla CaniPlus Freeze s centrifugovaným žloutkem u plemene německý ovčák, k výraznému poklesu procent živých spermií.

V kategorii moribundo, tedy umírajících spermií, se zpravidla významně liší norské ředidlo s centrifugovaným žloutkem od ostatních ředidel ve všech porovnávaných případech.

7 Závěr

Cíle práce byly splněny, přičemž meziplenný rozdíl byl pozorován pouze u jednoho ředidla, s jedním typem žloutku. Tato práce pomohla osvětlit reakce psích spermií při procesu kryokonzervace na různá ředidla a vliv plemene na funkční vlastnosti kryokonzervovaných psích spermií. Může tak být přínosem při vývoji standardizovaných inseminačních dávek pro asistovanou reprodukci psů.

- U plemene německý ovčák bylo statisticky průkazně více živých spermií ve druhém odběru.
- Byl prokázán meziplenný rozdíl v počtu živých spermií v 1. i 2. odběru.
- U psů plemene německý ovčák byl zjištěn statisticky průkazný pokles v procentuálním zastoupení živých spermií po třiceti minutách inkubace.
- Oba odběry se v časech inkubace od sebe statisticky významně liší v procentuálním zastoupení živých spermií.
- Obě ředidla CaniPlus Freeze s oběma typy žloutku dosahovala průkazně vyšších procent živých spermií, než norská ředidla v obou časech inkubace.
- U obou ředidel CaniPlus Freeze s oběma typy žloutku došlo po 30 minutách inkubace k průkaznému snížení počtu živých spermií.
- Pokud byl do ředidel přimíchán centrifugovaný a necentrifugovaný žloutek, tak nebyl pozorován rozdíl v počtu živých spermií.
- Meziplenný rozdíl v počtu živých spermií byl pozorován pouze u ředidla CaniPlus Freeze s necentrifugovaným žloutkem, kdy plemeno husky dosáhlo vyšších hodnot v obou časech inkubace.
- U německých ovčáků byl rozdíl pouze v norském ředidle s necentrifugovaným i centrifugovaným žloutkem a ředidlem CaniPlus Freeze s centrifugovaným žloutkem, a to v čase inkubace T0.
- Nejvyššího procenta živých spermií (43,8 %) bylo dosaženo v čase T0 u plemene husky v ředidle CaniPlus Freeze s necentrifugovaným žloutkem.
- U norského ředidla s centrifugovaným žloutkem je patrné zvýšení procent spermií v kategorii moribundo oproti zbývajícím ředidlům v obou časech inkubace, v obou odběrech i u obou plemen psů.

8 **Seznam literatury**

Aboagla, E. M. E., Terada, T. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 62 (6). 1160–1172.

Althouse, M. S., Ko, J. Ch., Hopkins, S. M., Evans, L. E. 1991. Effects of latex and vinyl examination gloves on canine spermatozoal motility. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 199. 227–229.

Amann, R. P. 1986. Reproductive physiology and endocrinology of the dog. In: Morrow, D. A. (ed.) *Current Therapy in Theriogenology*. 2nd ed. W. B. Sander. Philadelphia. p. 532–538. ISBN: 9780721665801.

Arriola, J., Foote, R. H. 1987. Glycerolation And Thawing Effects On Bull Spermatozoa Frozen In Detergent-Treated Egg-Yolk And Whole Egg Extenders. *Journal of Dairy Science*. 70 (8). 1664–1670.

Baran, A., Ozdas, O. B., Sandal, A. I., Ak, K. 2012. Effects of Skim Milk and Tris Extender on Frozen-Thawed Canine Sperm Morphology. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 11 (17). 3242–3246.

Barber, J. Canine semen collection and evaluation (Proceedings). [online]. dvm360. 1. ledna 2010 [cit. 2-17-2015]. Dostupné z: <<http://veterinarycalendar.dvm360.com/avhc/content/printContentPopup.jsp?id=727382>>.

Bartlett, D. J. 1962. Studies On Dog Semen. 1. Morphological Characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*. 3 (2). 173-&.

Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Le Guillou, J., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M. L., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., Barriere, P., Tainturier, D. 2013. Canine-chilled Sperm: Study of a Semen Extender Made with Low-density Lipoproteins from Hen Egg Yolk Supplemented with Glutamine. *Reproduction in Domestic Animals*. 48 (2). 258–266.

Berntson, W. E. 2014. Semen Production and its Harvest. In: CHENOWETH, P. J., LORTON, S. (eds.). *Animal Andrology: Theories and Applications*. CABI. p. 11–33. ISBN: 1780643160.

Björndahl, L., Mortimer, D., Barratt, Ch. L. R., Castilla, J. A., Menkveld, R., Alvarez, J. G., Haugen, T. B. 2010. *A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology*. Cambridge University Press. Cambridge. p. 348. ISBN: 9780521735902.

Clermont, Y. 1962. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: a revised model for the renewal of spermatogonia. *American Journal of Anatomy*. 111. 111–129.

Curry, M. R. 2010. Electroejaculation. In: Mills, D. S., Marchand – Forde, J. N., McGreevy, P. D., Morton, D. B., Nicol, Ch. J., Phillips, C. J. C., Sandøe, P., Swaisgood, R. R. (eds.). *The Encyclopedia Of Applied Animal Behavior and Welfare*. CABI. p. 211. ISBN: 0851997244.

Červený, Č., Dvorský, P., Postníková, V., Komárek, V., Štěrbá, O., (eds.). 1999. *Koldův atlas veterinární anatomie*. Grada. Praha. 701 s. ISBN: 8071693529.

Dorado, J., Galvez, M. J., Morrell, J. M., Alcaraz, L., Hidalgo, M. 2013. Use of single – layer centrifugation with Androcoll-C to enhance sperm quality in frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*. 80 (8). 955–962.

du Bois, S., Len, J. A., Parlevliet, J. M., Eilts, B. E. 2012. Effects of Cooling Time on Membrane Integrity and Motility of Frozen – Thawed Canine Spermatozoa using Two Different Commercial Egg Yolk – based Extenders at Two Different Cooldown Equilibration Times. *Reproduction in Domestic Animals*. 47 (6). 278–280.

Dunbar, I. 1979. *Dog Behavior*. T. F. H. England. p. 223. ISBN: 0876666713.

England, G. C. W. 1999. Semen quality in dogs and the influence of short – interval second ejaculation. *Theriogenology*. 52 (6). 981–6.

England, G. C. W. 2010. Physiology and endocrinology of the male. In: England, G. C. W., Heimendahl, A. *Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*. 2nd ed. BSAVA. England. p. 13-22. ISBN: 9781905319190.

- England, G. C. W., Allen, W. E. 1992. Factors affecting the viability of canine spermatozoa II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*. 37. 373–381.
- England, G. C. W., Allen, W. E., Middleton, D. J. 1990. An Investigation Into The Origin Of The 1st Fraction Of The Canine Ejaculate. *Research in Veterinary Science*. 49 (1). 66–70.
- England, G. C. W., Ponzio, P. 1996. Comparison of the quality of frozen – thawed and cooled – rewarmed dog semen. *Theriogenology*. 46 (1). 165–171.
- Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M. R. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*. 210. 1131–1133.
- Farstad, W. K. 2010. Artificial insemination in dogs. In: England, G. C. W., HeimendahL, A. *Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*. 2nd ed. BSAVA. England. p. 80-88. ISBN: 9781905319190.
- Farstad, W., Berg, K. A. 1989. Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement. 39. 289–92.
- Feldman, E. C., Nelson, R. W. 2003. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3rd ed. Saunders. USA. p. 1104. ISBN: 0721693156.
- Feldman, E. C., Nelson, R. W. 2007. Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In: Feldman, E. C., Nelson, R. W. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3rd ed. W. B. Sanders. Philadelphia. p. 673–690. ISBN: 9781416053804.
- Fernandez-Santos, M. R., Estes, M. C., Montoro, V., Soler, A. J., Garde, J. J. 2006. Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology*. 66 (8). 1931–1942.

- Fiser, P. S., Fairfull, R. W. 1989. The Effect Of Glycerol – Related Osmotic Changes On Post – Thaw Motility And Acrosomal Integrity Of Ram Spermatozoa. *Cryobiology*. 26 (1). 64–69.
- Forero – Gonzalez, R. A., Celeghini, E. C. C., Raphael, C. F., Andrade, A. F. C., Bressan, F. F., Arruda, R. P. 2012. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia*. 44. 154–159.
- Freshman, J. L. 2001. Clinical management of the subfertile stud dog. *Veterinary Clinic of North America: Small Animal Practice*. 31. 259–269.
- Freshman, J. L., 2002. Semen collection and Evaluation. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 17 (3). 104–107.
- Gamčík, P., Kozumplík, J. 1992. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. Príroda. Bratislava. 299 s. ISBN: 8007005404.
- Gordon, I. 2004. *Reproductive technologies in farm animals*. CABI Publishing. Wallingford. p. 323. ISBN: 0851998623.
- Hafez, E. S. E., Hafez, B. (eds.). 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Williams & Wilkins. p. 509. ISBN: 0683305778.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., Nolan, J. P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm - what we ask them to survive. *Journal of Andrology*. 11 (1). 73–88.
- Hammerstedt, R. H., Lardy, H. A. 1983. The effect of substrate cycling on the atp yield of sperm glycolysis. *Journal of Biological Chemistry*. 258 (14). 8759–8768.
- Harrison, R. A. P., Vickers, S. E. 1990. Use of fluorescent – probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 88 (1). 343–352.

- Hidalgo, M., Portero, J. M., Demyda – Peyras, S., Ortiz, I., Dorado, J. 2014. Cryopreservation of canine semen after cold storage in a Neopor box: effect of extender, centrifugation and storage time. *Veterinary Record*. 175 (1). 20-+.
- Hishinuma, M., Sekine, J. 2003. Evaluation of membrane integrity of canine epididymal spermatozoa by short hypoosmotic swelling test with ultrapure water. *Journal of Veterinary Medical Science*. 65 (7). 817–820.
- Holst, P. A. 2000. *Canine Reproduction: The Breeder's Guide*. 2nd ed. Alpine. USA. p. 228. ISBN: 1577790286.
- Hu, Y. A., Lu, J. C., Shao, Y., Huang, Y. F., Lu, N. Q. 2013. Comparison of the semen analysis results obtained from two branded computer – aided sperm analysis systems. *Andrologia*. 45 (5). 315-318.
- Huggins, C. 1945. The physiology of the prostate gland. *Physiological Reviews*. 25 (2). 281–295.
- Christiansen, J. 1984. *Reproduction in the dog and cat*. Bailliere Tindall. London. p. 320. ISBN: 0702009180.
- Iguer – Ouada, M., Versteegen, J. P. 2001. Evaluation of the "Hamilton Thorn computer – based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology*. 55 (3). 733–749.
- Jeffcoate, I. A., Lindsay, F. E. 1989. Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement. 39. 277–287.
- Johnston, S. D. 1991. Performing a complete canine semen evaluation in small animal hospital. *The Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice*. 21 (3). 545–51.

- Johnston, S. D. 1997. Physiology of spermatogenesis in the dog: An historical and clinical perspective. In: Proceedings of Canine Male Reproduction Symposium: September 1997. Association Offices. Montreal. 19–35.
- Johnston, S. D., Kustritz, M. V. R., Olson, P. N. S. 2001. Canine and Feline Theriogenology. W. B. Sanders. Philadelphia. p. 592. ISBN: 9780721656076.
- Juniewicz, P. E., Lemp, B. M., Batzold, F. H., Reel, J. R. 1989. Transrectal ultrasonography as a method to monitor canine prostatic size in situ: Measurements following endocrine manipulation and ejaculation. *The Prostate*. 14 (3). 265–277.
- Karger, S., Arlt, S., Haimerl, P., Heuwieser, W. 2014. A Systematic Review of Studies Performing the Hypo-Osmotic Swelling Test to Evaluate the Quality of Canine Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 49 (1). 1-6.
- Kawakami, E., Hori, T., Tsutsui, T. 1998. Changes in semen quality and in vitro sperm capacitation during various frequencies of semen collection in dogs with both asthenozoospermia and teratozoospermia. *The Journal of veterinary medical science*. 60 (5). 607–14.
- Kliment, J., Hintnaus, J., Novák, M., Rob, O., Šťastný, P. 1989. Reprodukcia hospodárskych zvierat. *Príroda*. Bratislava. p. 386. ISBN: 8007000275.
- Kosiniak – Kamysz, K., Podstawski, Z., Bittmar, A. 2007. The results of bitch artificial insemination after the use of tested frozen semen. *Scientific papers animal science and biotechnologies*. 40 (1). 136–139.
- Kumi – Diaka, J. 1993. Subjecting canine semen to the hypo – osmotic test. *Theriogenology*. 39. 1279–1289.
- Kuried, M. O., Katheresan, D., Selvaraju, M., Pattabiraman, S. R. 2012. Effect Of Three Different Extenders In Slow Freezing Protocol On Post – Thaw Quality Of Dog Semen. *Journal of Veterinary Animal Science*. 43. 11–14.

- Kustritz, M. V. R. 2007. Effects of administration of prostaglandin F₂α or presence of an estrus teaser bitch on characteristics of the canine ejaculate. *Theriogenology*. 67 (2). 255–258.
- Kustritz, M. V. R. 2010. *Clinical Canine and Feline Reproduction: Evidence – Base Answers*. Wiley – Blackwell. Iowa. p. 246–249. ISBN: 9780813815848.
- Kutzler, M. A. 2005. Semen collection in the dog. *Theriogenology*. 64. 747–754.
- Linde – Forsberg, C. *Biology of Reproduction of the Dog and Modern Reproductive Technology* [online]. 2007. [cit. 2014-09-25]. Dostupné z <<http://www.yalaphc.net/viewer/eAFc>>.
- Lindsay, S. R. (ed.). 2000. *Handbook of Applied Dog Behavior and Training. Volume One. Adaptation and Learning*. Wiley – Blackwell. Iowa. p. 410. ISBN: 9780813807546.
- Lindsay, S. R. (ed.). 2001. *Handbook of Applied Dog Behavior and Training. Volume Two. Etiology and Assessment of Behavior Problems*. Wiley – Blackwell. Iowa. p. 328. ISBN: 0813828686.
- Lorton, S. P., 2014. Evaluation of Semen in the Andrology Laboratory. In: Chenoweth, P. J., Lorton, S. P. (eds.). *Animal Andrology: Theories and Applications*. CABI. London. p. 595. ISBN: 9781780643168.
- Martínez, A. I. P. 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*. 82–83. 209–224.
- Martínez – Pastor, F., García-Macias, V., Álvarez, M., Herráez, P., Anel, L., de Paz, P. 2005. Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biology of Reproduction*. 72 (2). 316-327.
- Martins – Bessa, A., Rocha, A., Mayenco-Aguirre, A. 2006. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg – yolk TRIS extenders. *Theriogenology*. 66 (9). 2047–2055.

- Mazur, P. 1985. Basic concepts of freezing cells. Proceedings of the First International Conference on Deep Freezing of Boar Semen. Swedish University of Agricultural Sciences and the United States Department of Agriculture. Sweden. 91–112.
- Meyers – Wallen, V. N. 1991. Clinical approach to infertile male dogs with sperm in the ejaculate. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 21. 609–633.
- Mills, D. S. 2010. Reproductive Behaviour. In: Mills. D. S., Marchand – Forde, J. N., McGreevy, P. D., Morton, D. B., Nicol, Ch. J., Phillips, C. J. C., Sandøe, P., Swaisgood, R. R. (eds.). *The Encyclopedia Of Applied Animal Behavior and Welfare*. CABI. p. 521–522. ISBN: 0851997244.
- Neves, M. M., Henry, M., Clemente, C. A. A., Heneine, L. G. D. 2009. Standardization of a technique for canine semen freezing. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37 (3). 259–263.
- Nunez – Martinez, I., Moran, J. M., Pena, F. J. 2006. Results of computer assisted morphometry may reflect freezeability of canine sperm. *Reproduction in domestic animals*. 41 (4). 315–315.
- Oettlé, E. E. 1986. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Animal Reproduction Science*. 12. 145–150.
- Oettlé, E. E. 1993. Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*. 47. 257–260.
- Ohl, D. A., Denil, J., Cummins, C., Menge, A. C., Seager, S. W. 1994. Electroejaculation does not impair sperm motility in the beagle dog: a comparative study of electroejaculation and collection by artificial vagina. *The journal of urology*. 152 (3). 1034–7.
- Okano, T., Murase, T., Asano, M., Tsubota, T. 2004. Effects of Final Dilution Rate, Sperm Concentration and Times for Cooling and Glycerol Equilibration on Post-Thaw Characteristics of Canine Spermatozoa. *Journal of veterinary medical science*. 66 (11). 1359–1364.

- Oliveira, E. C. S., Juliani, G. C., Marques, A. P., Henry, M. 2006. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia*. 58 (6). 1116–1122.
- Olson, O. N. 1992. Collection and evaluation of canine semen. In: Kirk, R. W., Bonagura, J. D. (eds.). *Kirk's Current Veterinary Therapy XI Small Animal Practice*. W. B. Sanders. Philadelphia. p. 938–943. ISBN: 9780721632933.
- Parkinson, T. 2001. The Male Animal. In: Noakes, G. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W. (eds.). *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8th ed. Saunders. USA. p. 673–776. ISBN: 9780702025563.
- Payan – Carreira, R., Miranda, S., Nizanski, W. 2011. *Artificial Insemination in Dogs*. InTech. ISBN: 9789533073125.
- Peña, A., Linde – Forsberg, C. 2000. Effects of Equex, one- or two – step dilution, and two freezing and thawing rates on post – thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 54 (6). 859–875.
- Purswell, B. J., Althouse, G., Root, M. V. 1992. Guidelines for Using the Canine Breeding Soundness Evaluation Form. *Theriogenology Handbook*. Society for Theriogenology. Hastings. 174–181.
- Quintero – Moreno, A., Miro, J., Rigau, A. T., Rodriguez-Gil, J. E. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*. 59 (9). 1973–1990.
- Rand, J., Behrend, E., Gunn – Moore, D., Campbell – Ward, M. (Eds.). 2013. *Clinical Endocrinology of Companion Animals*. Wiley – Blackwell. Iowa. p. 536. ISBN: 9780813805832.
- Rigau, T., Farre, M., Ballester, J., Mogas, T., Peña, A., Rodriguez – Gil, J. E. 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*. 56 (5). 801–815.

- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Tanghe, S., Coryn, M., Maes, D., de Kruif, A. 2005. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology*. 64 (3). 706–719.
- Rodriguez – Martinez, H., Ekwall, H., Linde – Forsberg, C. 1993. Finestructure and elements composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*. 47. 279–285.
- Root Kustritz, M. V. 2007. The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*. 68 (3). 329–337.
- Rota, A., Strom, B., Linde – Forsberg, C., Rodriguez – Martinez, H. 1997. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38 degrees C. *Theriogenology*. 47 (5). 1093–1101.
- Salisbury, G. W., Van Denmark, N. L., Lodge, J. R. 1961. *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. Freeman. Michigan. p. 639. ISBN: 9780716708063.
- Seager, S. W. J. 1986. Artificial Insemination in dogs. In: Burke, T. J. (ed.). *Small Animal reproduction and Infertility*. Lea & Febiger. Philadelphia. 207–217. ISBN: 9780812110425.
- Schäfer – Somi, S., Kluger, S., Aurich, C., Knapp, E., Klein, D. 2006. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen – thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*. 66 (2). 173–182.
- Snoeck, P. P. N., Cottorello, A. C. P., Henry, M. 2012. Viability and fertility of stallion semen frozen with ethylene glycol and acetamide as a cryogenic agent. *Animal Reproduction*. 9 (1). 33–39.
- Strzezek, R., Kozirowska – Gilun, M., Stawiszynska, M. 2012. Cryopreservation of canine semen: the effect of two extender variants on the quality and antioxidant properties of spermatozoa. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 15 (4). 721–726.

Szasz, F., Gabor, G., Solti, L. 2000. Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions. *Acta Veterinaria Hungarica*. 48 (3). 325–333.

Šichtař, J., Šimoník, O., Dokoupilová, A., Svobodová, I., 2014. Současné možnosti hodnocení ejakulátu psů. *Veterinární lékař. Tígris. Praha*. 4 (1). 204–210.

Traas, A. M., Kustritz, M. V. 2004. Effect of administering oxytocin or prostaglandin F2alpha on characteristics of the canine ejaculate. *The Canadian veterinary journal*. 45 (12). 999–1002.

Tsutsui, T., Kawakami, E., Murao, I., Ogasa, A. 1989. Transport of spermatozoa in the reproductive-tract of the bitch – observations through uterine fistula. *Japanese Journal of Veterinary Science*. 51 (3). 560–565.

Urbano, M., Dorado, J., Ortiz, I., Morrell, J. M., Demyda – Peyras, S., Galvez, M. J., Alcaraz, L., Ramirez, L., Hidalgo, M. 2013. Effect of cryopreservation and single layer centrifugation on canine sperm DNA fragmentation assessed by the sperm chromatin dispersion test. *Animal Reproduction Science*. 143 (1–4). 118–125.

Verstegen, J., Iguer – Ouada, M., Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57. 149–179.

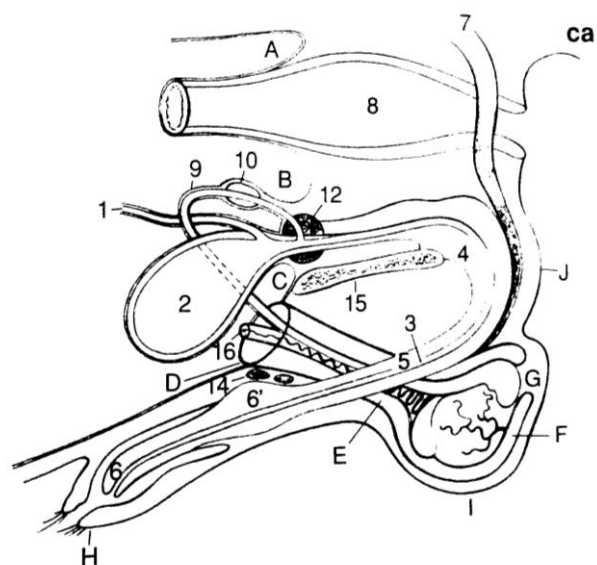
Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Přinosilová, P., Rubeš, J., Rybář, R., Vozdová, M., Machatková, M., Horáková, J., 2004. *Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy*. Výzkumný ústav veterinárního lékařství. Brno. 216 s. ISBN: 8086895017.

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

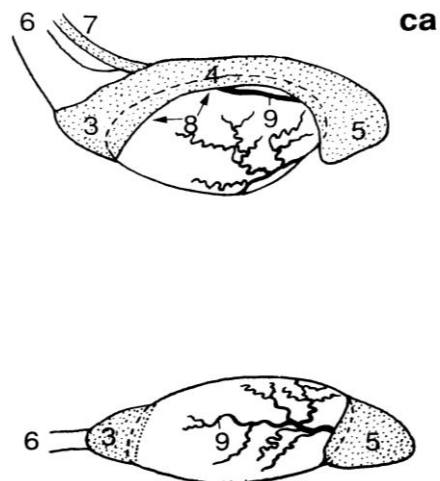
Wall, R. J., Foote, R. H. 1999. Fertility of bull sperm frozen and stored in clarified egg yolk – Tris – glycerol extender. *Journal of Dairy Science*. 82 (4). 817–821.

- Woodall, P. F., Johnstone, I. P. 1988. Dimensions and allometry of testes, epididymides and spermatozoa in the domestic dog (*Canis familiaris*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 82. 603-609.
- Wright, P. J. 1991. Practical aspects of estimation of the time of ovulation and of insemination in the bitch. *Australian veterinary journal*. 68 (1). 10–13.
- Yanagimachi, R. 1981. Mechanisms of fertilisation in mammals. In: Mastroianni, L., Biggers, J. D. (eds). *Fertilization and Emryonic Development In Vitro*. Plenum Press. New York. 81–182.
- Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M., Tekeli, T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*. 54 (4). 579–585.
- Yu, I. J. 2014. Canine sperm cryopreservation using glucose in glycerol – free tris. *Cryoletters*. 35 (2). 101–107.
- Zambelli, D., Levy, X. 2010. Clinical approach to the infertile male. In: England, G. C. W., Heimendahl, A. *Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*. 2nd ed. BSAVA. England. p. 70–79. ISBN: 9781905319190.

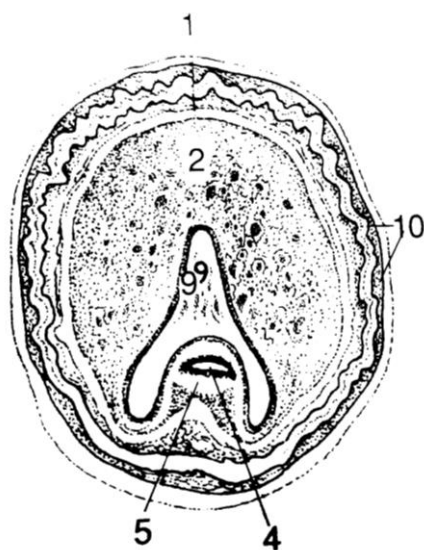
9 Přílohy



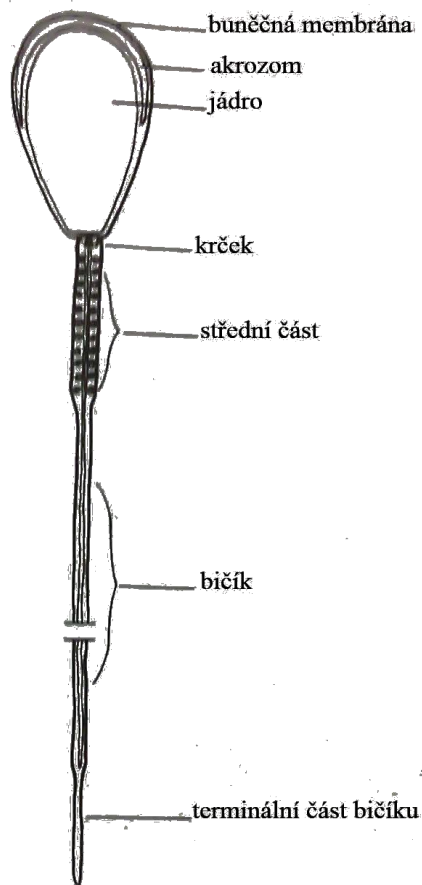
Obr. 1: Schéma močopohlavní soustavy psa. 1 – pravý močovod, 2 – tělo močového měchýře, 3 – močová trubice, 4 – rameno a kořen pyje, 5 – tělo pyje, 6 – žalud pyje, 6' – *bulbus glandis*, 7 – zatahovač pyje, 8 – konečník, 9 – chámovod, 10 – ampule chámovodu, 12 – prostata, 14 – tříselné mízní uzliny, 15 – pánevní spona, 16 – semenný provazec. A – nadkonečníková jáma, B – konečníkopohlavní vyhloubení, C – stydkoměchýřkové vyhloubení, D – poševní prstenec, E – poševní kanál, F – poševní dutina, G – vaz varlete, H – předkožka, I – šourek, J – hráz (Červený, 1999).



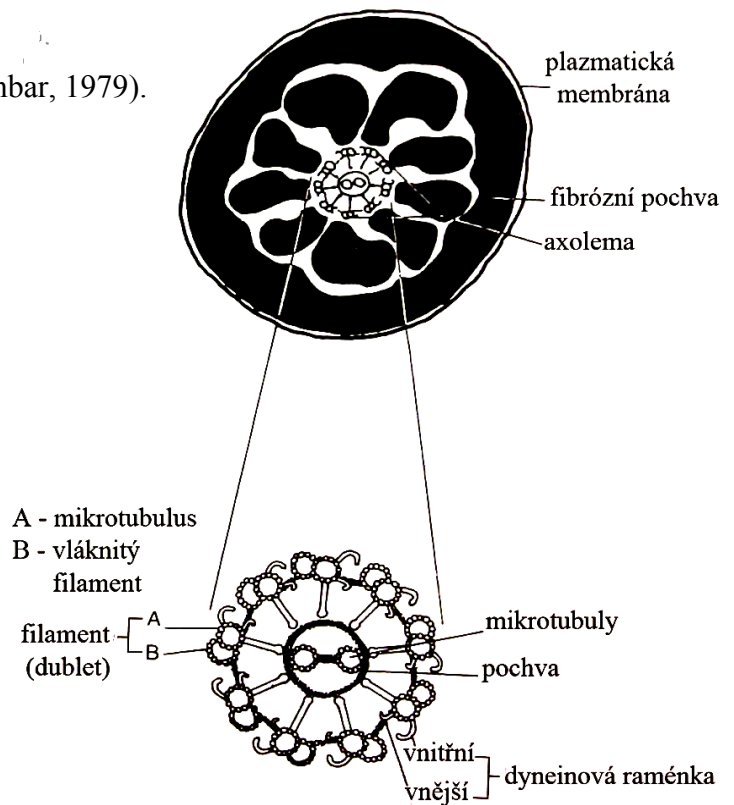
Obr. 2: Schéma varlete u psa. 3 – hlava nadvarlete, 4 – tělo nadvarlete, 5 – ocas nadvarlete, 6 – semenný provazec, 7 – chámovod, 8 – varletní vak, 9 – část varlatové tepny (Červený, 1999).



Obr. 3: Průřez penisem psa. 1 – *tunica albuginea*, 2 – topořivé těleso, 4 – močová trubice, 5 – houbovitě těleso, 9 – penisová kost (Červený, 1999).

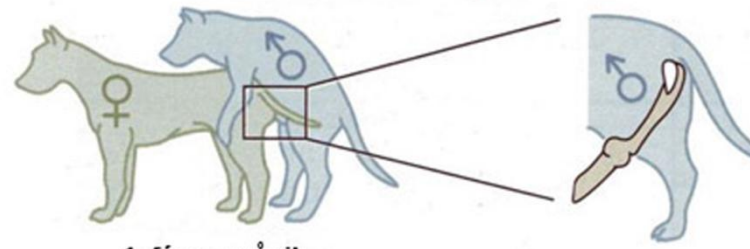


Obr. 4: Schéma spermie (Dunbar, 1979).

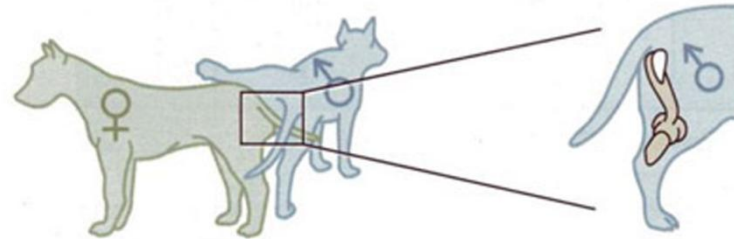


Obr. 5: Průřez bičíkem spermie (Bedford et Hoskins, 1990).

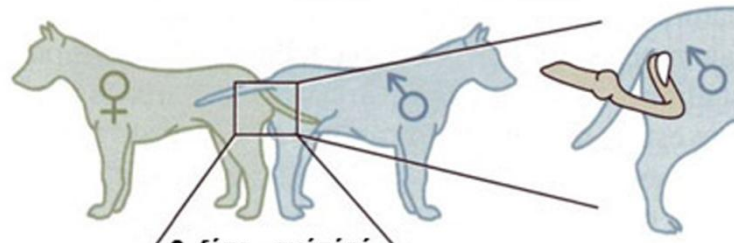
Kopulace



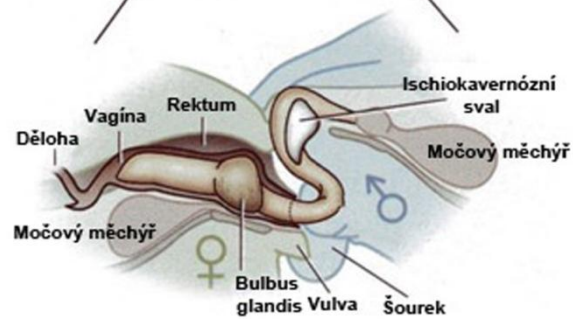
1. fáze - průnik



2. fáze - přetočení



3. fáze - svázání



Obr. 6: Kopulace (<http://www.vetnext.com/search.php?s=onderwerp&id=73341278957%20250>).