

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra speciální zootechniky**



**Zabřezávání dojníc po inseminaci dávkami vyrobenými  
konvenčně a s přídavkem LDL cholesterolu**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Valérie Sojková**

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

© 2015 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Zabřezávání dojnic po inseminaci dávkami vyrobenými konvenčně a s přídavkem LDL cholesterolu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Lud'ku Stádníkovi, Ph.D. za odborné vedení práce. Také děkuji Ing. Jaromíru Ducháčkovi, Ph.D. a Ing. Janu Beranovi, Ph.D. za pomoc při zpracování výsledků. Dále společnosti Natural s.r.o. za poskytnutí metodické spolupráce. Děkuji své rodině a přátelům a partnerovi za pomoc a podporu při studiu.

# Zabřezávání dojnic po inseminaci dávkami vyrobenými konvenčně a s přidavkem LDL cholesterolu

## Souhrn

Předmětem této diplomové práce bylo vyhodnocení úspěšnosti zabřezávání dojnic po inseminaci dávkami naředěnými ředidly běžně používanými a obohacenými o lipoprotein s nízkou hustotou (LDL). Hypotézou práce je předpoklad, že LDL má výborné kryoprotektivní vlastnosti, které ochrání spermie před poškozením během mrazení / rozmrazení inseminačních dávek a tím si ejakulát zachová dobré fertilizační schopnosti. Proto dalším cílem práce bylo vybrat vhodné ředidlo ejakulátu býků.

Pro splnění výše uvedených cílů byl zrealizován pokus na inseminační stanici býků Natural spol. sr.o. Do pokusu byli vybráni 4 býci holštýnského plemene. K výrobě inseminačních dávek byla použita 3 různá, na trhu běžně dostupná, ředidla: AndroMed<sup>®</sup>, Bioxcell<sup>®</sup> a Triladyl<sup>®</sup>, každé ve standardní a pokusné variantě obohacené o LDL cholesterol. V případě AndroMedu<sup>®</sup> a Bioxcellu<sup>®</sup> činil přídavek 6% LDL. V případě Triladylu<sup>®</sup> nahradil 8% přídavek standardní komponentu ředidla (vaječný žloutek). Kvalita ID byla hodnocena laboratorně in vitro TDT testem, pomocí počítačové metody CASA a testem na integritu plazmatické membrány (HOS test).

Na základě výsledků laboratorních analýz byly pro inseminaci *in vivo* vybrány inseminační dávky ředěné AndroMedem<sup>®</sup> a AndroMedem<sup>®</sup> obohaceným o 6% LDL. Na farmě Ruda, náležící k ŠZP Lány, bylo náhodně vybráno a zapuštěno 39 plemenic v různých fázích laktace, s různým denním nádojem a obsahem základních složek mléka. Březost byla zjišťována pomocí ultrasonografické metody.

Z výsledků je zřejmé, že i přes fenotypový rozdíl v úrovni zabřezávání dojnic inseminovaných LDL dávkami (+3,16 %) nebyl pomocí obecného lineárního modelu zjištěn statisticky významný vliv typu ID na zabřezávání. Pro potvrzení hypotézy o pozitivním účinku LDL cholesterolu na zabřezávání krav je zapotřebí realizovat rozsáhlejší provozní sledování na větším souboru plemenic.

**Klíčová slova:** LDL cholesterol, býčí ejakulát, zabřezávání, inseminace, ředidla

# **Pregnancy rate of dairy cows inseminated by doses produced conventionally and with addition of LDL cholesterol**

## **Summary**

The subject of this thesis was to evaluate the success of pregnancy rate of dairy cows after breeding, using insemination doses diluted by commonly used extenders and doses enriched for low density lipoprotein (LDL). The hypothesis is the assumption, that LDL has excellent cryoprotective attributes which protect the sperm from damage caused during freezing / thawing of insemination doses and thus maintain a good fertilizing ability of the ejaculate. Therefore, the next goal was to select an appropriate extender for bull semen.

To accomplish the objectives listed above an experiment was conducted in the bull stud Natural spol. s.r.o. Four bulls of Holstein breed were selected for this experiment. Three different, commercially available extenders were used to produce insemination doses: AndroMed<sup>®</sup>, Bioxcell<sup>®</sup> and Triladyl<sup>®</sup>. Each one of them in standard and experimental variant enriched with LDL cholesterol. For AndroMed<sup>®</sup> and Bioxcell<sup>®</sup>, addition of 6% LDL was used. A standard component (egg yolk) was replaced with 8% LDL in case of Triladyl<sup>®</sup>. The quality of insemination doses was evaluated in laboratory *in vitro* by TDT test, using the CASA computer method and the plasma membrane integrity test (HOS test).

Based on the results of the laboratory analyzes, insemination doses diluted with standard AndroMed<sup>®</sup> and AndroMed<sup>®</sup> enriched by 6% LDL, were selected for *in vitro* insemination. On farm Ruda, belonging to the SŽP Lány operation, 39 cows were randomly selected and bred in different stages of lactation, with different daily milk yields and contents of basic milk components. The pregnancy was being detected by using an ultrasonographic method.

The results clearly show, that despite the phenotypic difference in the level of conception of dams bred by LDL insemination doses (+3,16 %), no statistically significant effect of different type of ID was determined on pregnancy rate, using the general linear model. To confirm the hypothesis of a positive effect of LDL cholesterol on conception, a

more extensive operational monitoring would have to be implemented on a larger group of cows.

**Key words :** LDL cholesterol, bull semen, conception, insemination, extenders

## Obsah

1 Úvod.....	9
2 Cíl práce.....	10
2.1 Hypotéza práce.....	10
3 Literární rešerše.....	11
3.1 Přehled a hodnocení reprodukčních ukazatelů.....	11
3.2 Inseminace .....	12
3.3 Složení býčího ejakulátu .....	13
3.3.1 Morfologie spermií.....	13
3.3.2 Metabolismus spermií .....	15
3.3.3 Motilita.....	15
3.4 Kvalitativní a kvantitativní ukazatelé ejakulátu býka .....	16
3.4.1 Zpracování ejakulátu.....	16
3.4.2 Makroskopické posouzení.....	16
3.4.3 Mikroskopické posouzení .....	17
3.4.4 Ředění ejakulátu.....	17
3.5 Ředidla ejakulátu.....	17
3.5.1 Bežloutková ředidla.....	18
3.5.2 Žloutková ředidla .....	19
3.6 LDL – low density lipoprotein.....	20
3.7 Kryokonzervace ejakulátu.....	21
3.7.1 Poškození při zmrazování .....	22
3.7.2 Poškození při rozmrazování .....	22
3.8 Biologické zkoušky ejakulátu .....	22
3.8.1 Hypoosmotic swelling test .....	23
3.8.2 Barvení spermií na živé/mrtvé .....	23
3.8.3 CASA -computer assisted semen analysis .....	24
3.8.4 Dlouhodobý chladový test přežitelnosti.....	24
3.8.5 Krátkodobý tepelný test přežitelnosti.....	24
3.8.6 TDT - Thermodynamics Diagnostic test.....	25
4 Materiál a metodika .....	26

4.1 Inseminační stanice býků .....	26
4.2 Býci .....	27
4.3 Výroba ID .....	28
4.3.1 Odběr.....	28
4.3.2 Makroskopické a mikroskopické posouzení ejakulátu.....	28
4.4 Ředidla .....	28
4.4.1 Ředění ejakulátu.....	29
4.5 Hodnocení rozmrazených inseminačních dávek .....	30
4.5.1 Hos test (hypoosmotic swelling test) .....	30
4.5.2 TDT test (Thermodynamics Diagnostic Test).....	30
4.5.3 CASA (Computer-assisted sperm analysis) .....	31
4.6 Charakteristika chovu.....	31
4.7 Inseminace plemenic v podniku ŠPZ Lány.....	32
4.8 Statistické vyhodnocení výsledků .....	32
5. Výsledky .....	34
5.1 Hodnocení vlivu přídatku LDL do ředidel na motilitu spermií.....	34
5.2 Hodnocení vlivu přídatku LDL na zabřezávání dojnic. ....	34
6. Diskuze.....	40
7. Závěr .....	43
8. Seznam literatury .....	44
9 Přílohy.....	51

## 1 Úvod

Úroveň reprodukce je ukazatelem pohody organismu v daném prostředí, vyrovnanosti podmínek vnějšího i vnitřního prostředí organismu jako celku. Chovy v České Republice se delší dobu potýkají se zhoršujícími se reprodukčními ukazateli. Toto má za následek zhoršenou ekonomiku výroby mléka a masa. Březosti krav po první inseminaci klesají a březost plemenic celkem se dostává pod hranici 50%. Bez dobrých reprodukčních ukazatelů nebude zajištěna ani dobrá produkce, ani dostatečné množství potomstva na obnovu stáda. Pravidelnost reprodukčního cyklu je ukazatelem zdravého chovu.

V chovech skotu jsou využívány dva způsoby plemenitby a to buď přirozená plemenitba, nebo inseminace. Inseminace přináší chovateli mnoho výhod v oblasti šlechtění, managementu a zlepšování zdravotního stavu. Správná inseminace hraje velmi důležitou roli v zabřezávání, neméně důležitá je i správná důkladná příprava inseminační dávky.

Kvalitní plemenný materiál je velmi ceněný, avšak stupeň využitelnosti špičkových plemenů z hlediska jejich reprodukční kapacity má sestupný trend. Tento fakt, je dán akutním či chronickým zatížením organismu a negativními vlivy v odchovu a chovu.

U býků je plemenný materiál konzervován především dlouhodobě, což sebou nese větší riziko poškození spermií. V důsledku toho, je kladen velký důraz na způsob konzervace materiálu a jeho zpracování. Hlavním opatřením proti poškození spermií, je vhodné ředidlo, které vytvoří takové podmínky, ve kterých budou spermie schopny přežít.

Způsob konzervování spermií, volba vhodného ředidla a vliv na zabřezávání plemenic se stále zkoumá a vyvíjí.

## **2 Cíl práce**

Cílem práce je vybrat vhodné ředidlo inseminačních dávek s přídavkem LDL a statisticky vyhodnotit úspěšnost zabřezávání dojnic po inseminaci dávkami vyrobenými s přídavkem LDL v porovnání s dávkami konvenčními.

### **2.1 Hypotéza práce**

Hypotézou práce je předpoklad, že kryoprotektivní vlastnosti LDL použitého při výrobě pokusných inseminačních dávek zajistí lepší motilitu spermií v ředidle a zvýší úroveň zabřezávání.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Přehled a hodnocení reprodukčních ukazatelů

Hlavní ekonomický zisk v chovech skotu spočívá v produkci telat a množství nadojeného mléka. Správná reprodukce je prvním krokem k ziskovosti chovu.

Z analýz provedených Českomoravským svazem chovatelů je patrné, že v období uplynulých 15 let došlo k nárůstu mléčné užitkovosti doprovázených také prodloužením délky mezidobí (Kučera et Král, 2005). Tabulka č. 1.

Snížená schopnost reprodukce plemenic se vztahuje zejména na vysokoprodukční dojnice a je obvykle odezvou organismu především na úroveň výživy, kondici, ustájení, management chovu a celkový zdravotní stav zvířete. Dalším faktorem ovlivňujícím výsledek zabřezávání je práce inseminačního technika a oplozovací schopnost spermatu použité inseminační dávky.

Hlavním důvodem poklesu parametrů reprodukce je zvýšení produkce mléka. Není pochyb o tom, že čím je kráva více produkčně zatížená, projeví se tento stav i při zabřezávání. Doposud není zřejmé, do jaké míry produkce ovlivňuje reprodukci. Parametry plodnosti jsou zhoršené ve stádech s vysokou i nízkou užitkovostí (LeBlanc, 2010).

Mezi základní problémy patří špatný management stáda, výživa a zdravotní stav zvířat. Ježková (2008) uvádí, že výsledky reprodukce plemenic skotu vykazují dlouhodobě negativní trend. Poruchy reprodukce plemenic skotu jsou způsobeny nedostatky managementu (ze 40 %), výživou a krměním (z 30 %), genetickými dispozicemi (z 15 %), nedostatečnou hygienou, infekcemi a parazity (z 10 %), podmínkami chovu (z 5 %).

Většina autorů se shoduje, že březost plemenic je za standardních podmínek ovlivněna faktory vnějšího prostředí (96%), plemenicí (3%). Jen 1 % tvoří sperma plemeníka (DeJarnete et al., 2008). Vliv plemeníka a inseminační dávky na reprodukci je sice malý, ale výběr plemeníka s dobrou oplozovací schopností, je pro stádo s nižší úrovní reprodukce nezbytným opatřením.

Cílem všech inseminačních stanic je produkce inseminační dávky s dostatečnou oplozovací schopností. Systém kontroly spermatu a vyřazování podprůměrných ejakulátů býků má svá přísná pravidla. V zájmu všech plemenářských firem je zpracovat a uchovat co nejdéle kvalitní ejakulát od nejlepších býků (LeBlanc, 2010).

Tabulka 1: Souhrn výsledků reprodukce skotu v průběhu 13 let (ČMSCH a.s.)

Rok	Březost po 1. Inseminaci			Délka dnů		
	krávy	jalovice	celkem	Ins. interval	SP	Mezidobí
2000	44,9	63,2	50,1	82,1	117,1	399
2002	43,3	62,6	48,6	84,9	123,6	404
2003	42,7	62,2	48,4	86,3	124,6	408
2005	42,3	62,4	48,2	83,7	124,3	412
2006	41,8	62,0	47,8	85,3	125,8	410
2007	41,6	61,4	47,5	85,2	125,3	409
2008	41,7	60,7	47,4	83,0	125,1	412
2010	41,1	61,0	47,1	83,0	122,9	410
2011	40,3	60,0	46,3	80,5	121,0	407
2012	40,0	59,4	45,9	77,3	121,5	407
2013	40,9	60,0	46,7	76,3	120,9	406

### 3.2 Inseminace

Umělá inseminace hospodářských zvířat je velmi ceněnou technikou při selektování populace z hlediska genetiky. Technicky nahrazuje pohlavní rozmnožování a díky ní je usnadňována celostátní koncepce rozvoje chovů a plemenářských programů (Peters & Ball, 2004).

Inseminace hospodářských zvířat se začala postupně rozšiřovat začátkem minulého století, největší rozvoj nastal po druhé světové válce, kdy se začaly intenzivně studovat otázky dlouhodobé konzervace spermií. Využití glycerinu (1949) v kryokonzervaci a zavedení biologických kontejnerů pro uchování inseminačních dávek v tekutém dusíku (1964), významně ovlivnilo šlechtitelský pokrok v chovu skotu (Louda et al., 2001).

Umělá inseminace přináší řadu výhod, zejména možnost využití býků ze zahraničních populací, možnost tvorby individuálního přípařovacího plánu, genetický pokrok, využití špičkových plemenů ve větší míře.

Hlavním cílem a zároveň největší výhodou inseminací je genetický zisk. Díky inseminaci se můžou rozšiřovat jen ty nejlepší geny a plemenné materiály v mnohem větší míře, nežli u přirozené plemenitby. Chovatelé mají přístup ke špičkovému genetickému materiálu, který je prověřován, testován a k dispozici.

Efektivnost nákladů je další významnou výhodou inseminace. Na inseminačních stanicích jsou dávky pečlivě zkoumány před i po zmrazení a tím se eliminuje riziko fertilizační neschopnosti. Pokud je býk neplodný, či má nějaké genetické i negenetické vady ejakulátu, inseminační dávky se nevyrábějí. Pokud však chovatel pořídí subfertilního býka, což zjistí až několik měsíců po jeho koupi, je pro něj tento krok vysoce ztrátový.

Při inseminaci se eliminuje riziko nákazy. Inseminační stanice řádně prověřují a kontrolují zdraví každého nově koupeného býka, čímž se znemožňuje přenos jakékoliv nemoci do chovu skrz inseminační dávku.

Chovatel si vybírá při individuálním přípravném plánu, na každou kategorii krav, či skupinu jiného býka, který zlepšuje jinou vlastnost. Během této selekce se jednoduše vytvoří produkční a stabilní stádo, což v přirozené plemenitbě není možné.

Díky inseminaci se vše pečlivě eviduje, tudíž je detailně znám reprodukční cyklus každé plemence a původ telete, což má pozitivní dopad při řízení a managementu stáda. (Peters & Ball, 2004).

### **3.3 Složení býčího ejakulátu**

Ejakulát je složený z části buněčné – spermie, a z části tekuté – semenné plazmy. U býků je denně produkováno okolo  $6,5 \cdot 10^9$  spermií a objem ejakulátu se pohybuje od 2 do 10 ml. S věkem se denní produkce zvyšuje a dosahuje maxima až okolo 7 let (Reece, 2011). Přidatné pohlavní žlázy vytvářejí semennou plazmu, která vytváří přirozené ředidlo spermiím. Je to tekutina specifického množství a barvy, jejíž pH se pohybuje v rozmezí 6,20 – 7,50. V semenné plazmě je přítomno mnoho nízkomolekulárních i vysokomolekulárních látek – zejména lipidy, proteiny, sacharidy, anorganické ionty, organické kyseliny a vitaminy (Marvan et al., 2011). Z celkového počtu proteinů v semenné plazmě tvoří 65 % BSP (bovine seminal plasma) proteiny, které hrají významnou roli při kryokonzervaci ejakulátu. Semenná plazma se podílí na celkovém ejakulátu býka z 90% (Gamčík et al., 1992).

#### **3.3.1 Morfologie spermií**

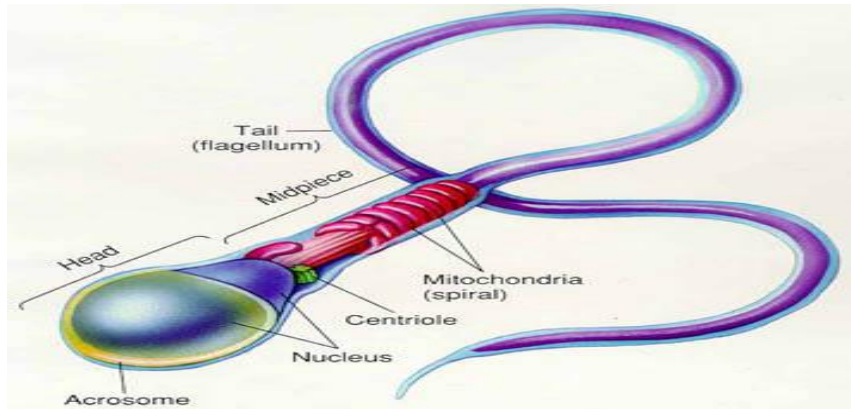
Spermie jsou díky své morfologické stavbě samostatné motilní buňky určené k cílené funkci. Spermie je tvořena hlavičkou a bičíkem. Celý povrch je pokryt plazmatickou membránou.

Základem hlavičky je nukleoplazma, která je krytá jadernou membránou s výjimkou oblasti spoje bičíku k hlavičce. V přední části hlavičky je akrozomální váček, který pokrývá její polovinu a obsahuje enzymy, které napomáhají průniku spermie do vajíčka. Spodní část hlavičky má vykrojený tvar, který se označuje jako implantační jamka. Do této jamky zapadá spojovací část bičíku, označovaná také jako krček.

Bičík je hlavní částí spermie, která zajišťuje pohyb. Lze ho rozdělit na čtyři části - část spojující (krček – connecting - piece) bičík s hlavičkou, střední část (mid - piece) – kde se nachází mitochondriální pochva, tedy hlavní energetické centrum spermie, dále ho dělíme na část hlavní (principal - piece) a koncovou (end - piece). Základem bičíku je axonema. Ta je tvořena dvěma hlavními mikrotubuly, okolo kterých je dalších 9 párů vláken označovaných jako dublety. Po celé délce bičíku s výjimkou koncové části je komplex vláken držen pohromadě fibrózní keratinoideální pochvou nasedající na vlákna. V nich jsou enzymy ATPázy využívající energii z ATP, čímž je zajištěn asynchronní, ale koordinovaný pohyb po celé délce bičíku. (Vinkler, 2009; Věžní et al., 2004; Fawcett, 1975).

Hlavní fyzickou bariéru proti poškození spermie z vnějšího prostředí tvoří plazmatická membrána. Zároveň je také místem, které je nejcitlivější na kryokonzervaci. Dochází zde k největšímu poškození spermií v důsledku mrazení. Hlavním předpokladem úspěšné fertilizace je integrita a normální funkce plazmatické membrány (Eddy, 1994).

Obr. 1 Morfologická stavba spermie



<http://absolventi.gymcheb.cz/2010/doungro/TEHOTENSTVI/OBRAZKY/spermie1.jpg>

### 3.3.2 Metabolismus spermii

Základem pro pohyb spermii, je převod chemické energie na mechanickou, pomocí kontraktilních proteinů, které využívají ATPázovou aktivitu k získání energie. Spermie získávají energii buď fruktolýzou nebo respirací. Většina energie je uvolňována oxidací v mitochondriích a její přenos je zprostředkován transportními látkami obsahující snadno štěpitelné vazby (Věžník et al., 2004).

### 3.3.3 Motilita

Motilita - její posuzování a kvalitativní hodnocení, patří na přední místa výčtu spermoanalytických hodnot. Současně jsou zkoumány dvě veličiny a to pohyblivost a rychlost. Rychlost pohybu spermii většina autorů považuje za klíčovou veličinu při posuzování fertilizační schopnosti semene. Kliment et al., (1983) tvrdí, že významnější veličinou pro fertilizaci spermii je časový interval, po který si spermie uchová svůj progresivní pohyb. Při velmi rychlém pohybu, spermie ztrácí své enzymy a takový ejakulát musí být co nejdříve uveden do anabiózy. Z funkčního hlediska je pohyb spermii nutnou podmínkou k jejich průniku do vaječné buňky. Proto je připravenost energie (ATP) základní potřebou vybavenosti každé spermie. Motilitu spermii ovlivňují endogenní i exogenní faktory. Mezi endogenní faktory patří věk donora, doba pobytu spermii v nadvarletí, zrání spermii, energetická zásoba ATP, membránový transport, pohyb bičíku, vazebné proteiny, aglutinační faktory, protilátky, membránová integrita. Z exogenních faktorů jsou to biofyzikální a

fyziologické faktory jako – hydrodynamika, viskozita, osmolarita, pH prostředí, teplota, iontové složení, semenná plazma, vaginální prostředí, cervikální sekret.

Zralé a integritní spermie se prezentují v ejakulátu pohybem, který označujeme za souvislý, dopředný, tedy progresivní. Spermie při progresivním pohybu rotují kol své osy 3-15 otáček za sekundu a tento spirálový pohyb je též ovlivňován proudící tekutinou (Věžník et al., 2004).

Základní ukazatele nativního semene býka - objem > 4 ml; koncentrace spermií v mm<sup>3</sup> >700 000; pH 6,9; procento pohyblivých spermií > 70 %; patologické spermie max. do 20 %.

### **3.4 Kvalitativní a kvantitativní ukazatelé ejakulátu býka**

#### **3.4.1 Zpracování ejakulátu**

Poté co se odebere semeno, musí být zachovaná jeho původní teplota 30-35°C. Vstupní hodnocení kvality spermatu je provedeno okamžitě po odběru. Sperma je kontrolováno vizuálně, musí být prosté od jakýchkoliv příměsí, krve, chlupů, nečistot, hnisu, slámy atd. Při vstupním hodnocení ejakulátu se měří hustota, objem a mikroskopicky se posuzuje aktivita (Peters & Ball, 2004).

#### **3.4.2 Makroskopické posouzení**

Získaný ejakulát se makroskopicky hodnotí v laboratoři při teplotě 18 – 25 °C, aby nedocházelo k chladovému šoku. Místnost musí být čistá, suchá, dobře větratelná, s umělým osvětlením, bez možnosti průniku přímého slunečního světla. Všechny pomůcky, které přijdou do kontaktu s ejakulátem, musí být dokonale omyty, opláchnuty destilovanou vodou, aby nedocházelo k tvorbě vodního kamene a sterilizované. Před použitím se pomůcky přehřívají v termostatu na teplotu ejakulátu. Ejakulát se posuzuje okamžitě po odběru, nejpozději však do 10 minut po odběru. Kvalitní ejakulát má smetanovou až mléčnou barvu a jeho pach připomíná pach nadojeného mléka, pH se pohybuje v rozmezí 6,4 – 7 (Gamčík et al., 1992). Vyšetřuje se makroskopicky a mikroskopicky (Andrabi, 2009).

Makroskopicky se hodnotí množství ejakulátu pomocí laboratorních vah. Smyslově se hodnotí zrnitost, barva, pach a přímíseniny (Gamčík et al., 1992).

### 3.4.3 Mikroskopické posouzení

Mikroskopické hodnocení ejakulátu se provádí hned po odběru, nejpozději do 10 minut. Vyšetření se provádí při teplotě 38 – 40 °C pod mikroskopem. Mikroskopicky se posuzuje koncentrace spermií, aktivita, intenzita pohybu a morfologie spermií. Patogenní spermie se v ejakulátu mohou vyskytovat maximálně do 20 %. Mikroskopické posouzení aktivity spermií je prováděno subjektivně vyškoleným technikem (Andrabi, 2009; Věžník et al., 2004; Gamčík et al., 1992).

### 3.4.4 Ředění ejakulátu

Do ejakulátu se přidávají komerčně dostupná ředidla, která mají za cíl ochránit spermie před chladovým šokem během zpracování a zároveň zvyšovat objem ejakulátu. Ředění ejakulátu musí proběhnout nejpozději do 10-15 minut od vlastního odběru. Během této doby se ejakulát makroskopicky i mikroskopicky hodnotí o konstantní teplotě. Teplota po celou dobu zpracování by měla být stejná ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), aby se zabránilo chladovému šoku. Ředidlo se přidává do ejakulátu postupně, o stejné teplotě jakou má ejakulát (Lukáč et al., 2007). Po přidání ředidla do ejakulátu se obě složky musí nechat pár minut promíchat, nežli přijde na řadu další proces výroby – plnění ejakulátu do pejet (Peters & Ball, 2004; Louda et al., 2009; Stádník et al., 2014).

### 3.5 Ředidla ejakulátu

Výběru ředidla je třeba věnovat patřičnou pozornost. Nejvhodnější ředidlo lze vybrat provedením biologických zkoušek ejakulátu.

Složení ředidel lze podle Klimenta et al., (1989) rozdělit do tří skupin podle účinnosti:

Extendory – slouží pouze ke zvětšení objemu semene.

Protektory – slouží jako zdroj výživy a ochraňují spermie mimo organismus.

Implementory – jsou v podstatě protektory, kterým byly přidány látky působící na pohlavní orgány samic, ovlivňující příznivě spermie a proces oplození.

Ředidlo by mělo obsahovat složky, které mají za úkol chránit spermie před chladovým šokem. Složení ředidla a začlenění vhodných kryoprotektantů do něj, jsou důležité faktory při úspěšné kryokonzervaci spermií (Bousseau, 1998; Holt, 2000). Kryoprotektanty řadíme do

dvou skupin, penetrující do buňky a nepenetrující do buňky. Mezi kryoprotektanty pronikající do buňky řadíme glycerol, dimethylsulfoxid, ethylenglykol, propylenglykol. Kryoprotektanty, chránící buňky na povrchu, jsou například - vaječný žloutek, odstředěné mléko, aminokyseliny, dextransy a sacharóza.

Jako kryoprotektanty se používají lipoproteiny, nebo látky s vysokou molekulární hmotností, například mléko či vaječný žloutek. Z rostlinných komponent tuto funkci zastává sojový lecitin či glycerol. Dalšími přísadami jsou antibiotika, která zabraňují kontaminaci ejakulátu, ale nijak neovlivňují životaschopnost spermií. Základní komponente ředidel je Bi-distilovaná voda, která plní funkci nosiče látek v ředidle obsažených (Aires et al., 2003; Peters & Ball, 2004).

Mezi základní prvky ředidel patří látky, které jsou zdrojem energie – glukóza či fruktóza. Tyto látky poskytují spermiím okamžité a dostatečné množství energie. Pro dlouhodobou konzervaci je vhodná fruktóza, místo ní lze také využít jako plnohodnotnou náhradu laktát, či pyruvát (Ford 2006). Dle Kňazické et al. (2010) je nejvhodnějším energetickým substrátem v ředidlech kombinace glukózy a sacharózy. Jelikož koncovým produktem metabolismu spermií je kyselina mléčná, která okyseluje prostředí, musí být v ředidle přítomny iontové i neiontové látky, které plní funkci pufru například citrát sodný či fosfát.

Nově jsou zkoumány například přísady mastných kyselin (kyselina arachidonová), aminokyselin (glutamin, cystein) a jiných cenných látek do ředidel, za cílem snižovat poškození spermií v důsledku kryokonzervace a tím zvyšovat šanci na zabřezávání (Ejaz et al., 2014; Topraggaleh et al., 2014).

### **3.5.1 Bežloutková ředidla**

Základní složky těchto ředidel tvoří rostlinné prvky, nejčastěji sojový lecitin a glycerol. Jejich použitím se snižuje riziko přenosu patogenů a oplozovací schopnost je zachována (Bosseau et al., 1998; Thun et al., 2002). Tyto látky působí na spermie tak, že procházejí přes plazmatickou membránu a chrání buňky uvnitř. Na rozdíl od živočišných složek ředidla, které vytvářejí ochranný film na povrchu buněk. Glycerol je velmi často používanou látkou v ředidlech, neboť snižuje mechanické poškození spermií. Avšak ve vysokých koncentracích je pro spermie letální, jelikož prostupuje plazmatickou membránou příliš pomalu a narušuje tím osmotický tlak (Farstad, 2009, Dobrinski, 1993). Sojový lecitin

je kvalitní náhražkou vaječného žloutku v ředidlech a výrazně snižuje hygienická rizika oproti jiným používaným komponentům (Forouzanfar, 2009). Prado (2012) nezjistil významný rozdíl mezi použitím přídatku sojového lecitinu a vaječného žloutku v ředidle.

Bezžloutková ředidla: AndroMed (Minitübe Germany, Tiefenbach), BioXcell – IMV France, L'Eigle).

### 3.5.2 Žloutková ředidla

Ředidlo na bázi vaječného žloutku se běžně používá při kryokonzervaci spermatu býků již od roku 1939.

Principem ochrany spermií proti chladovému šoku je fakt, že lipidy a lipoproteiny zejména LDL vytváří ochrannou vrstvu na povrchu membrány spermií, a tím zabraňují procesu vytváření smrtelných intracelulárních ledových krystalů a snižují poškození membrány během a po kryokonzervaci (Amirat et al., 2004). Vaječný žloutek se obvykle používá ve 20 % koncentraci, vyšší koncentrace působí na spermie toxicky (Sansone et al., 2000). Do ředidel se může používat žloutek čerstvý nebo také přečištěný. Přidáním vaječného žloutku do ředidla se dosáhlo >50 % přežitelnosti spermií po kryokonzervaci. I přes tento úspěch v přežitelnosti, je zde vysoké riziko endotoxinu a přenosu patogenů z živočišné složky. Další nevýhodou žloutku je jeho nekonzistentní složení a granula, která ztěžují mikroskopické stanovení aktivity spermií (Ansari et al., 2010). Přítomnost steroidních hormonů ve vaječném žloutku, zejména progesteronu, snižuje fertilizační schopnosti ejakulátu in vivo (Moreno, 2013).

Mléko nebo kombinace vaječného žloutku a mléka mohou být také použity jako kvalitní ředidlo pro spermie. Složky mléka se chovají jako antioxidanty, chrání spermie proti reaktivním formám kyslíku, které mohou být přítomny během zpracování před zmrazením. Zde je možné riziko toho, že krávy, které nemohou zabřeznout po ID ve kterých je přídatek mléko či vaječný žloutek, si vytváří imunitní odpověď na určité proteiny (Foote et al., 2002). Laboratorní studie nyní ukazují na to, že vaječný žloutek metabolicky zatěžuje spermie, je zde velmi vysoké riziko kontaminace a spermie se v tomto ředidle obtížněji pohybují. Kvůli přítomnosti substancí, které zabraňují dýchání spermií nebo snižují jejich motilitu, se začali množit požadavky pro nahrazení celého vaječného žloutku (Moussa et al., 2002).

Proto, je snaha nahradit živočišný přídatek za rostlinný a uchránit tak spermie před možnou kontaminací (Mutalík, 2014).

Bylo zjištěno, že složka, která chrání spermie před kryokonzervací je látka LDL, která se získává ze žloutku ultracentrifugací (Medeiros, 2002).

Žloutková ředidla: Triladyl, Biladyl (Minitübe Germany, Tiefenbach), BullXcell (IMV France, L'Eigle), BoviPRO (Minitube of America), Steridyl – (Minitübe Germany, Tiefenbach), Optidyl (IMV France, L'Eigle)

### **3.6 LDL – low density lipoprotein**

LDL je složka vaječného žloutku, která představuje asi 2/3 sušiny ze žloutku. Tyto proteiny se nachází v tekuté části žloutku i v jeho granulích. Specifické lipoproteiny jsou kulovité částice s jádrem o velikosti v průmětu 17 – 60 nm a pH 6,3 -7,5. Jádro tvoří soubor triglyceridů a cholesterolu, což tvoří asi 74 % z celku a obklopuje ho vrstva fosfolipidů a proteinů. LDL se skládá z 83 – 89 % tuku a 11 – 17 % proteinu (Burley, 1975; Martin et al., 1964).

Použití vaječného žloutku v ředidlech pro kryokonzervaci spermií představuje určité riziko tím, že podporuje růst bakterií nebo již vaječný žloutek do jisté míry kontaminován je (Bousseau, 1998). Vzhledem k těmto rizikům, byla snaha najít látku, která by dokázala nahradit vaječný žloutek, avšak nezatěžovala ejakulát mikrogranuly, či kontaminací a steroidními hormony. Bylo zjištěno, že součástí vaječného žloutku jsou lipoproteiny s nízkou hustotou (low density lipoprotein) neboli LDL a poskytují spermiím ochranu při kryokonzervaci. Tato ochrana spočívá buď ve vytvoření tenkého ochranného filmu na povrchu plazmatické membrány, nebo nahrazením určitých membránových fosfolipidů, které jsou poškozeny během kryokonzervace (Amirat, 2004; Akhter, 2011). Základem této ochrany je složka LDF – (low density frakce), která se specificky a rychle váže na BSP proteiny v plazmě a tím tvoří stabilní, specifický komplex zachovávající si integritu po zmrazení a rozmrazení (Hu et al., 2011; Bergeron, 2004). Moussa et al., (2002) vyvinuli extrakční proces k získání LDL z vaječného žloutku a Amirat et al., (2004) potvrdili, že díky extrakci se snižuje riziko bakteriální kontaminace, avšak neeliminuje se proces gelovatění, který omezuje pohyb spermií (Kojima, 1985; Blume, 2015). Wang et al., (2014) zkoumali vliv LDL v různých druzích ptačích vajec. Z výzkumu vyplývá, že LDL extrahovaný z holubího vaječného žloutku má nejlepší kryokonzervací účinky v optimální koncentraci 0,09 g LDL / ml.

V posledních letech četné studie potvrdily, že LDL extrahován z vaječného žloutku, je úspěšný při kryokonzervaci spermatu kanců, býků a psů (Manjunath, 2002). Moussa et al., (2002); Hu et al., (2011) zjistili, že 8 % přídavek LDL do ředidla má lepší účinky na životaschopnost spermií po rozmrazení nežli 20% přídavek vaječného žloutku. Amirat et al., (2004) publikovali, že kryokonzervace spermií s LDL přídavkem má pozitivní vliv na motilitu, vyšší rychlost pohybu, menší procento porušených plazmatických membrán nežli u kryokonzervace spermií v Optidylu, a to i pro uchovávání čerstvého spermatu po krátkou dobu.

### **3.7 Kryokonzervace ejakulátu**

Je obecně známo, že mrazem konzervované semeno savců má horší fertilizační schopnost než čerstvé semeno. Kryokonzervace - hluboké zmrazování ejakulátu v tekutém dusíku na teplotu  $-196^{\circ}\text{C}$ , je neocenitelná technika v reprodukční medicíně, která pomáhá zachovat životaschopnost a plodnost spermií. Cílem této metody je uchovat plemenný materiál po delší dobu – například několik let (Mutalík et al., 2014; Louda et al., 2001).

Kryokonzervace mění strukturu a fyziologické procesy ve spermii. Buněčná aktivita se zastavuje mrazením a znovu se obnovuje až při rozmrazování inseminačních dávek. Tyto změny se projevují zejména na motilitě spermií, struktuře a ovlivňují fertilizační schopnosti ejakulátu. Kryokonzervace zahrnuje fáze, jako jsou: snižování teploty, buněčná dehydratace, zmrazování a rozmrazování ejakulátu (Barbas, 2009; Medeiros, 2002).

Různé stupně poškození spermií mohou nastat v jakékoliv fázi kryokonzervace. Salamon et al., (2000) uvedli, že nejcitlivější části spermie při kryokonzervaci jsou vnější akrozóm a plazmatická membrána.

Podle Thurson et al. (2002a) kryokonzervace semene velice usnadňuje přenos hospodářsky žádoucích genů, protože semeno je snadno transportovatelné na velké vzdálenosti a rychle zvyšuje genetický potenciál v chovu. Pomocí kryokonzervace je možno kontrolovat přenos určitých patogenů a tím předejít zdravotním problémům ve stádě.

Kryokonzervace semene se úspěšně používá u několika druhů zvířat. Problémem jsou rozdíly fertilizační schopnosti semene po rozmrazení, neboť je velmi rozdílná senzitivita spermií při kryokonzervaci. Při shodném postupu kryokonzervace, bez ohledu na kvalitu spermatu před zamrazováním, má semeno některých jedinců velmi nízkou motilitu. Je to způsobeno porušením akrozómu a plazmatických membrán, což vede ke snížené fertilizační

schopností. Tyto rozdílné vlastnosti plasmatických membrán platí i v rámci stejného druhu (Thurson et al., 2002a).

Thurson et al. (2002b) uvádí, že míra poškození spermií chladem závisí jednak na rychlosti, kterou jsou spermie zchlazovány a také na výsledné teplotě, na kterou se ejakulát zchladí.

### **3.7.1 Poškození při zmrazování**

Když je proces zchlazování příliš rychlý, tak voda ze spermií nestihne proniknout do okolního média a dojde k zformování ledových krystalů uvnitř buňky. Tvořením krystalů ledu dochází k uvolňování latentního tepla, které narušuje optimální průběh mrazení.

Při příliš nízké rychlosti zchlazování sice k tvorbě ledových krystalů nedochází, ale problémem je změna pH a vysoká koncentrace iontů rozpuštěných uvnitř buňky, které mohou poškodit buněčnou membránu nebo způsobit denaturaci DNA. Tento jev se nazývá „sollution effect“.

Práci usnadňují programovatelné zmrazovače, které teplotu zamrazování částečně kontrolují, indukují tvorbu krystalků ve spermiích. V průběhu zchlazování semene může dojít k nežádoucímu procesu zvanému kryokapacitace. Jedná se o změny, které jsou podobné kapacitaci spermií, která není úplně dokončena. Takto pozměněné spermie mohou vykazovat předčasnou akrozomální reakci, ještě před dosažením ampuly vejcovodu a tím ztratit fertilizační schopnost (Holt et Medrano, 1997).

### **3.7.2 Poškození při rozmrazování**

Hanuláková a Máchal (2011) porovnávali nejčastěji používané metody inseminačních technik při rozmrazování inseminačních dávek býků. Bylo prokázáno, že inseminační dávky rozmražené v dlani měly nejnižší aktivitu, dávky ponechané po rozmrazení v lázni 5 min v chladu měly také nižší aktivitu než dávky rozmražené standardní metodou v lázni při 38 °C.

## **3.8 Biologické zkoušky ejakulátu**

Testování ejakulátu nám umožňuje zjistit míru přežitelnosti a odolnosti spermií vůči biologickým zkouškám ejakulátu. Byla prokázána úzká korelace mezi biologickými zkouškami ejakulátu a fertilizační schopností spermií. Díky těmto testům můžeme posoudit

vhodnost použitého ředidla a metodu zpracování ejakulátu pro individuální zvířata (Louda et al., 2001; Věžník et al., 2004).

### 3.8.1 Hypoosmotic swelling test

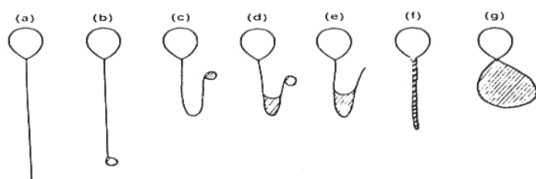
Hypoosmotic swelling test (HOS test) patří mezi jednoduché průkazy membránové úrovně spermií stanovením jejich semipermeability a je doplňkem metod, hodnotící vitalitu spermií. Podstatou HOS testu je fakt, že u nenarušené membrány živé spermie v hypoosmotickém prostředí, dochází průnikem vody ke zvětšování objemu, a tím dojde k reakci bičků spermií jejich stáčením po průniku vody do buňky. HOS test je možný kombinovat s barvením spermií na živé/mrtvé, čímž se upřesní výsledek.

Vyhodnocení HOS testu se provádí mikroskopicky, při 400 násobném zvětšení. HOS pozitivní reakce a zbarvení eosinem negativní - spermie živé a membrány intaktní, HOS negativní reakce a zbarvení eosinem pozitivní - spermie mrtvé a membrány narušené, HOS pozitivní reakce a zbarvení eosinem pozitivní - spermie reagovaly jako živé, ale v průběhu testu došlo k narušení membrán pro sníženou jejich funkční resistenci.

Hypoosmotický roztok: 0,735 g citrátu sodného ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a 1,351 g fruktózy ve 100ml destilované vody

Výsledky tohoto testu byly hodnoceny řadou autorů v návaznosti na fertilizační efekt, pohyblivost spermií a většina závěrů vyzněla v pozitivní posudek (Věžník et al., 2009 ; Věžník et al., 2004).

Obr. 2 Tvary spermií při reakci na HOS test

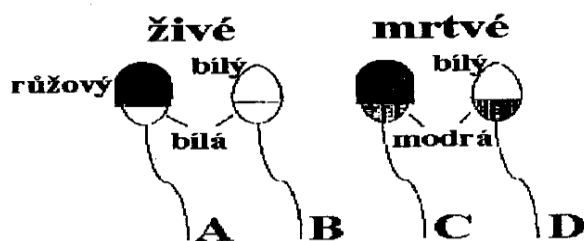


[http://www.kaanaydos.net/androloji\\_laboratuvari.php](http://www.kaanaydos.net/androloji_laboratuvari.php)

### 3.8.2 Barvení spermií na živé/mrtvé

Tímto testem sledujeme vitalitu spermií. Zkouška je založena na rozdílné afinitě živých a mrtvých spermií k barvivům. Narušené a mrtvé spermie přijímají barvivo a jsou růžové a červené, živé spermie nepropustí barvivo a jsou bílé. Výsledek se vyjadřuje v procentech (Louda et al., 2001)

Obr. 3 Spermie po barvení na živé/mrtvé



(Louda et al., 2001)

### 3.8.3 CASA -computer assisted semen analysis

Speciální technikou vyšetření ejakulátu je počítačová analýza spermatu – (CASA). Jejím cílem je stanovení kompletně standardizovaných, objektivních a opakovatelných testů pro stanovení koncentrace, pohybu a morfologie. Zařízení se skládá z fázového mikroskopu, videokamery a rekordéru, monitoru a počítačem s tiskárnou. Sperma je umístěno ve speciálním mikroskopickém sklíčku Leja. Při hodnocení pohybu se stanovuje např. lineární rychlost (straight-line velocity - VSL), průměrná rychlost na skutečné dráze (curvilinear velocity - VCL), parametry oscilace a mnoho dalších veličin. Základní vyšetření spermatu je možné také doplnit řadou dalších testů (Crha et al., 2003). Nicméně korelace mezi údaji získanými pomocí CASA a plodností býků se v práci Saackeho et al. (1980) nelišily od těch získaných pomocí subjektivního hodnocení.

### 3.8.4 Dlouhodobý chladový test přežitelnosti

Ejakulát se standardním způsobem naředí a následně vloží do chladničky o teplotě 1 až 3 °C. Každý den přibližně ve stejnou dobu se hodnotí aktivita spermií pod mikroskopem na vyhřívací destičce. Hodnocení probíhá subjektivně. Za dobrý ejakulát se považuje ten, který má po 96h od odběru aktivitu spermií 50% (Louda et al., 2001).

### 3.8.5 Krátkodobý tepelný test přežitelnosti

Naředěný ejakulát se postupně zahřívá ve vodní lázni na 38°C. Po hodinových intervalech se hodnotí aktivita spermií, ve třech zorných polích. Tento test trvá 6h. Spermie

s absolutní délkou životnosti jsou biologicky hodnotnější. Výsledky se vyjadřují v procentech (Louda et al., 2001).

### **3.8.6 TDT - Thermodynamics Diagnostic test**

Termodynamický test je hojně využívaná metoda, kterou se hodnotí pokles aktivity spermií v čase. Inseminační dávky vyrobené z posuzovaného spermatu se rozmrazují ve vodní lázni při teplotě (38°C - 40 °C) po dobu 40 vteřin. Poté se pejetý osuší sterilní buničinou, a odstříhne se zatavený horní konec. Aktivita se vyhodnocuje subjektivně pomocí mikroskopu při 250 násobném zvětšení. Motilita se hodnotí vždy ve třech zorných polích a odhadem se stanoví procentuelní zastoupení spermií, které vykazují rychlý přímočarý pohyb vpřed za hlavičkou. Aktivita se hodnotí až v pěti časech, 0min, 30min, 60min, 90min, 120min, aby bylo zjištěno, jak dlouho po rozmrazení bude zachována aktivita spermií (Věžník et al., 2004; Louda et al., 2001).

## **4 Materiál a metodika**

### **4.1 Inseminační stanice býků**

Inseminační stanice býků firmy Natural s.r.o, se nachází v Hradištku pod Medníkem. Působí na trhu již od roku 1991. Certifikát, který získala - EU CZ21790087, ji opravňuje k prodeji inseminačních dávek nejen v České republice, ale ve všech zemích Evropské unie a dalších s unií asociovaných. Kód NAAB, jenž firma Natural pro stanici obdržela od National Association of Animal Breeders (USA), umožňuje volný vývoz inseminačních dávek do USA.

Na inseminační stanici je momentálně chováno 90 býků. Jsou zde v odběrech býci většiny v ČR chovaných plemen skotu: dojných, kombinovaných i masných.

Vybavení stanice je na vysoké technické úrovni, vyrábí se pod přísným veterinárním dozorem, výsledkem jsou inseminační dávky vynikající kvality z hlediska plodnosti i zdravotních parametrů. Jejich bezpečnou identifikaci zaručuje kontrolovaný systém práce laboratoře i stanice. Provoz splňuje přísné české i evropské hygienické a veterinární podmínky. Motilita spermií inseminačních dávek je před opuštěním stanice opakovaně přezkoušena (Natural, 2007).

## 4.2 Býci

Do pokusu byli vybráni 4 býci holštýnského plemene, ustájených v ISB Natural. Býci byli vybráni na základě jejich plemenných hodnot a požadavku chovu, který se pokusu účastnil. Od každého býka bylo použito 9- 10 inseminačních dávek, z nichž bylo 50 % vyrobeno s přídavkem LDL a zbylých 50 % vyrobeno konvenčně.

**NEO – 739 Laurin** – dcery Laurina vykazují dobrou mléčnou užitkovost, slušný zevnějšek a velmi dobré znaky fitness. Mezi přední vlastnosti toho býka se řadí kg bílkovin, znaky fitness, dobrá vemena.

**NEO – 197 Milano** - Milano má výborné genomické plemenné hodnoty v USA bez jakýchkoli nedostatků.

**NEA – 922 Moxie** – dcery Moxieho mají nadprůměrné výsledky v obsahu mléčných složek, mají vynikající zevnějšek a pevné zdraví. Hlavní předností toho býka je výborná vlastní plodnost a špičkový obsah tuku a bílkovin.

**NEO – 269 Pikant** - Pikant má celkově vynikající profil genomických plemenných hodnot. Býk přenáší na potomstvo špičkový obsah mléčných složek, které byly otestovány na přísné Švýcarské bázi. Býk svým dědičným založením dává předpoklad zdravého, plodného a dlouhověkého potomstva.

Tabulka 2: Plemenné hodnoty vybraných býků (Zdroj: Natural s.r.o.)

Býk	kg M	% T	Kg T	% B	Kg B	RPH SB	RPH dlo.	RPH doj.	opak.	SIH/GT PI
Laurin NEA - 739	911	-0,02	38	0,07	38	98	121	107	89%	128,6
Milano NEO - 197 <sup>1</sup>	1606	0,11	87	0,06	63	2,29	2,8	-	-	2212
Moxie NEA - 922	-461	0,48	16	0,29	3	88	136	96	89%	117,4
Pikant NEO - 269 <sup>2</sup>	767	0,38	65	0,15	29	109	114	107	78%	

### Zkratky

<sup>1</sup>. Genomické hodnoty USA

<sup>2</sup>. Genomické hodnoty Švýcarsko

RPH dlo. – relativní plemenná hodnota pro dlouhověkost

RPH doj. – relativní plemenná hodnota pro dojitelnost

SIH – selekční index Holštýnského plemene

RPH – relativní plemenná hodnota

GTPI – genomické plemenné hodnoty USA

## 4.3 Výroba ID

Výroba ID probíhala 4. 6. 2014 a 18. 6. 2014 na ISB Hradíšťko pod Medníkem.

### 4.3.1 Odběr

Výše vybraní býci byli přivedeni na připouštědlo, kde byl ejakulát odebrán technikem do předem předeřtáté umělé vagíny. Každý býk byl odebrán pouze jednou, tedy na jeden skok. Pokud ejakulát neprošel vstupním hodnocením v prvním termínu odběru, byl býk odebrán druhý termín.

### 4.3.2 Makroskopické a mikroskopické posouzení ejakulátu

Po odběru proběhlo makroskopické a mikroskopické posouzení ejakulátu. Nejdříve se vizuálně posoudila čistota vzorku, ten musí být prostý jakýchkoliv přímísenin, krve, slámy atd. Poté následovalo hodnocení aktivity, hustoty a množství odebraného ejakulátu. Množství bylo zjištěno vážením vzorku na digitální automatické váze (Scout Pro). Hustota se měřila fotometricky (Fotometr SPEKOL II). Aby byl ejakulát dále použit při výrobě, musel mít hustotu  $0,7 \times 10^6 \text{ mm}^3$ . Procento aktivních spermií se posuzovalo subjektivně pomocí mikroskopu (Olympus UPMTVC, Japan) s požitím kamery (COLOR CAMERA, SCAR) s vyhřívanou destičkou při zvětšení až 300x. Hodnotila se minimálně 3 zorná pole, v nichž se odhadem zjišťovalo procentuální zastoupení progresivně pohybujících se spermií. Pokud byl progresivní pohyb spermií zjištěn na 70 a více procent, ejakulát byl dále zpracováván. Tento postup se standardně využívá v provozu inseminačních stanic.

## 4.4 Ředidla

**Andromed®** - bezžloutkové ředidlo, na bázi sojového lecitinu od společnost Minitube Germany Tiefenbach. Byla použita jednostupňová varianta o objemu 200 ml se složkou antibiotik. Toto ředidlo obsahuje sojový lecitin, TRIS, kyselinu citronovou, puřry, bi-destilovanou vodu, cukry, antibiotika EU Směrnice 88/407 (Tylosin, Gentamicin, Spektinomycin, Linkomycin). Pro přípravu je třeba naředit 200 ml koncentrátu 800 ml injekční vody. LDL byl přidán do ředidla v 6 % koncentraci.

**Triladyl®** – žloutkové ředidlo, na bázi vaječného žloutku od německé společnost Minitube Germany Tiefenbach. Byla použita jednostupňová varianta o objemu 250 ml s přídavkem

antibiotik. Toto ředidlo obsahuje, TRIS, kyselinu citronovou, cukr, pufr, glycerol, bi-destilovanou vodu a antibiotika podle EU Směrnice 88/407 (Tylosin, Gentamicin, Spektinomycin, Linkomycin). Pro přípravu je třeba 250 ml Triladyl koncentrátu smíchat se 750 ml injekční vody a 250 ml čerstvého vaječného žloutku při 30°C. LDL byl přidán do ředidla v 8 % koncentraci, místo čerstvého vaječného žloutku.

**Bioxcell®** -bezžloutkové ředidlo od francouzské společnosti IMV Technologie. Byla použita jednostupňová varianta po objemu 250 ml s přidavkem antibiotik. Bioxcell je vyroben dle receptury bez použití živočišných proteinů, obsahuje mix antibiotik Lincomycin, Spectinomycin, Gentamycin a Tylosin. Pro přípravu je třeba naředit 250 ml Bioxcellu 1000 ml injekční vody. LDL byl přidán do ředidla v 6 % koncentraci.

#### 4.4.1 Ředění ejakulátu

Po zhodnocení byl ejakulát rozdělen na 3 díly sterilní pipetou do sběračů pro odběr, z nichž každý díl byl naředěn jiným předem připraveným ředidlem.

K výrobě ID byla použita 3 komerčně dostupná ředidla, Andromed (6 %), Triadyl (8 %) a Bioxcell (6 %). Do těchto ředidel bylo přidáno LDL aditivum v množství 6 % a 8 %, jeden vzorek byl ponechán bez přidavku a sloužil jako kontrolní. Od každého býka a ředidla byly vyrobeny tedy 3 pokusné varianty plus 3 kontrolní vzorky. Toto rozdělení bylo provedeno tak, aby po naředění bylo získáno standardně 10 milionů aktivních spermií v dávce.

LDL aditivum, jako přídavek do ředidel, bylo vyrobenou firmou Hena s.r.o, Česká republika, dle metodiky podle Moussa et.al., (2002).

Dané množství ředidla bylo přidáno do ejakulátu sterilní pipetou po kapkách. Po 10 min. promíchání ředidla s ejakulátem na oscilačním stolku následovalo plnění do pejet o objemu 0,25 ml plnicím přístrojem od firmy IMV Technologies a jejich okamžitá ekvilibrace na 4 °C. Ekvilibrace trvala 120 minut. Mrazení probíhalo v přístroji Mini-Digitcool (IMV Technologies, Francie), standardní mrazicí křivkou. Průběh zmrazování ze 4 °C na -140 °C byl řízen počítačem. Po zmrazení, byly dávky vyjmuty a uloženy do karanténního kontejneru v tekutém dusíku (-196 °C), po dobu 30 dnů.

## 4.5 Hodnocení rozmrazených inseminačních dávek

Hodnocení vyrobených ID probíhalo po skončení předepsané 30 denní karantény. Byly vybrány vždy dvě pejety z každé varianty. Dávky byly zhodnoceny termodynamickým testem a HOS testem a pomocí počítačové metody CASA. Nejlepších výsledky vykazovalo ředidlo Andromed s 6 % přídavkem LDL. Podrobnější vyhodnocení je uvedeno v kapitole příloha - tabulka č. 7 a 8, graf č. 8 a 9.

Rozmrazování probíhalo ve vodní lázni o teplotě 38°C po dobu 40 sekund. Po rozmrazení byly pejety rozstříhány a jejich obsah byl vložen do předem vyhřátých a sterilizovaných zkumavek.

### 4.5.1 Hos test (hypoosmotic swelling test)

#### **Hypoosmotický roztok:**

0,735 g citrátu sodného ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a 1,351 g fruktózy se rozpustí se 100 ml destilované vody. Pro analýzu spermatu jsou následně připraveny 1 ml alikvoty tohoto roztoku, které se uchovávají při -20°C.

#### **Pracovní postup:**

HOS roztok o objemu 1 ml v Eppendorf zkumavce se nechá rozmrazit a následně zahřát ve vodní lázni na 37 °C. Po 5 min. se přidává 100 µl semene a roztok se jemně promíchá. Inkubace probíhá při teplotě 37°C po dobu 30 min. Po inkubaci a promíchání 20 µl vzniklé suspenze kápeme na podložní sklo a vyhotovíme nátěr. Po zaschnutí se mikroskopicky posuzuje reakce spermií na HOS roztok při 400x násobném zvětšení. Hodnotí se vždy 200 spermií z každého nátěru.

### 4.5.2 TDT test (Thermodynamics Diagnostic Test)

Zbýlý objem pejet v malých zkumavkách byl zředěn fyziologickým roztokem (0,9 % NaCl, pH 6,8) a následně byla subjektivně hodnocena aktivita spermií v časech - 0 min, 30 min a 60 min. Inkubace probíhala na vyhřevných deskách o teplotě 38 °C. Aktiva byla hodnocena subjektivně nejméně na 3 zorných polích, pomocí mikroskopu Nikon Elipse E 200 při zvětšení 250 x.

#### 4.5.3 CASA (Computer-assisted sperm analysis)

Motilita spermií byla také hodnocena pomocí CASA modulu (NIS Elements Ar 3. 2.) za použití kamery JENOPTIK ProGres CT1 (30 fps) a stereo mikroskopu (Nikon Eclipse E 600) s vyhřívanou podložkou (Tokai Hit) ve specializované andrologické laboratoři České zemědělské univerzity v Praze. Jeden vzorek byl hodnocen v 6 polích. Kryokonzervované vzorky byly hodnoceny po 5 minutovém temperování v čase 0 a 2 hodiny.

Byly posuzovány 3 parametry motility – VCL,  $\mu\text{m/s}$ , VAP,  $\mu\text{m/s}$  VSL,  $\mu\text{m/s}$ .

#### 4.6 Charakteristika chovu

##### ŠZP Lány, farma dojnic v Rudě

V roce 1960 vznikl Školní zemědělský podnik v Lánech z původního statku kanceláře prezidenta Československé republiky. Podnik hospodaří na 3.000 ha půdy, přibližně 50% výměry je půda univerzitní a zbývající část je pronajata od soukromých vlastníků.

Součástí střediska je chov skotu, výroba krmiv a zpracování veškeré rostlinné produkce. Podnik vyrábí ročně více než 4 miliony kilogramů mléka, základní stádo tvoří plemeno Holštýn – 460 kusů s užitkovostí 9.300 kg mléka za laktaci a plemeno Jersey – 80 kusů s užitkovostí 7.300 kg mléka za laktaci

##### Farma Ruda

Na farmě se chová 430 kusů dojnic holštýnského plemene. Dojnice jsou ustájeny v halách a rozděleny do skupin zhruba po sto kravách podle užitkovosti. Dojení zde probíhá 2 – 3 krát denně. Ustájení je volné, boxové, nastýlané separátem s venkovním krytým krmištem. Větrání je v halách zajištěno ventilátory s teplotním čidlem. Telata jsou chována ve venkovních individuálních boxech.

Záznamy z kontroly užitkovosti za rok 2013 -2014 v podniku Ruda.

Tabulka 3: Výsledky kontroly užitkovosti – metoda KU (A4), plemeno H100

KU	počet krav	laktační dny	mléko kg	tuk %	tuk kg	bílkovin a %	bílkovin a kg	věk při otelení
1. laktace	132	303	7991	3,93	314	3,21	257	24.4
2 a další laktace	194	303	9385	3,75	356	3,2	300	465
všechny laktace	326	303	8821	3,84	339	3,21	283	

#### 4.7 Inseminace plemenic v podniku ŠPZ Lány

Na základě výsledků laboratorních analýz byly pro inseminaci vybrány ID ředěné Andromedem s 6% obsahem LDL. U těchto dávek byla detekována vyšší motilita a integrita plasmatické membrány než u Triladyly, resp. Bioxcellu (viz příloha tab. 7 a 8, graf 8 a 9).

V listopadu 2014 byly provedeny inseminace na farmě Ruda. Bylo inseminováno 39 plemenic, v různých fázích laktace, standardně proškoleným pracovníkem. Plemenice byly zařazeny do programu Ovsynch. Byly vybrány ID od býků holštýnského plemene s 6 % přídavkem LDL do ředidla Andromed a ID bez přídavku. Výsledky březosti byly zjišťovány ultrasonografickou metodou, rovněž proškoleným pracovníkem farmy.

#### 4.8 Statistické vyhodnocení výsledků

Z faremní evidence byla převzata data o výsledku sledované inseminace, o průměrné mléčné užitkovosti za sledovanou laktaci a ukazatele reprodukce inseminovaných plemenic. Výsledky byly vyhodnoceny ve statistickém programu SAS 9.3. Pro stanovení základních parametrů statistického souboru byla použita metoda MEANS. Vztahy mezi vybranými parametry mléčné užitkovosti a zabřezáváním byly posuzovány pomocí korelačních koeficientů za procedury CORR. Pro výběr vhodného modelu hodnocení byla použita procedura REK metoda STEPWISE. Pro vlastní vyhodnocení byla využita procedura GLM (ANOVA), s následným detailním vyhodnocením pomocí TUKEY-CRAMEROVA testu.

#### Modelová rovnice:

$$y_{ijkl} = \mu + a_i + b_j + c_k + b \cdot (SB) + e_{ijkl}$$

kde:

$y_{ijkl}$  - hodnoty závislé proměnné (zabřezávání),

$\mu$  - obecná hodnota závislé proměnné;

$a_i$  - fixní efekt pořadí laktace ( $i = 1, n = 19; i = 2, n = 7; i = 3$  a další,  $n = 13$ );

$b_j$  - fixní efekt přídavku LDL ( $j = \text{ano}, n = 20; j = \text{ne}, n = 19$ );

$c_k$  - fixní efekt býka ( $k = \text{Laurin}, n = 9; k = \text{Miláno}, n = 10; k = \text{Moxie}, n = 10; k = \text{Pikant}, n = 10$ );

$b^*(SB)$  – regrese na obsah somatických buněk;

$e_{ijkl}$  – náhodná reziduální chyba.

Použité statistické průkaznosti  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  a  $P < 0,001$ .

## 5. Výsledky

### 5.1 Hodnocení vlivu přídatku LDL do ředidel na motilitu spermií

Při vyhodnocování nevhodnějšího ředidla byl použit TDT test, HOS test a počítačová metoda hodnocení CASA. Výstupy z těchto analýz jsou uvedeny v příloze v tabulce číslo 7 a 8, graf číslo 8 a 9.

### 5.2 Hodnocení vlivu přídatku LDL na zabřezávání dojníc.

Tabulka 4: Základní statistiky hodnoceného souboru dat

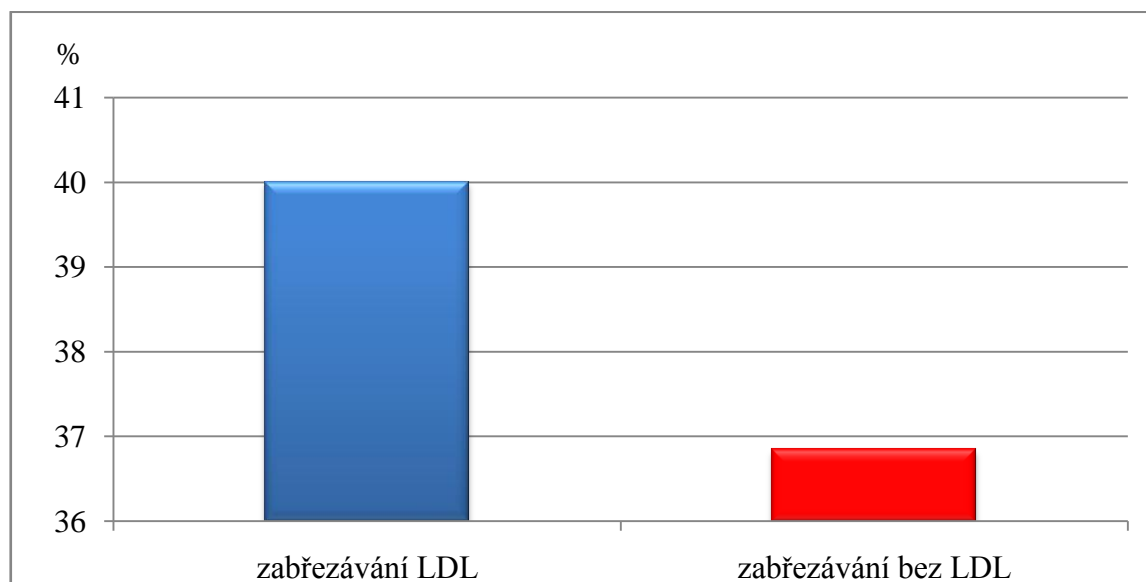
proměnná	n	$\bar{x}$	s	min.	max.	s.e.	V (%)
zabřezávání (%)	39	38,46	49,29	0	100	7,89	128,14
dny laktace	39	237,49	102,21	77	466	16,37	43,04
nádoj v den zapuštění (l)	39	28,75	6,42	15,4	46,4	1,03	22,34
obsah tuku v mléce v den zapuštění (%)	39	4,20	0,64	2,53	6,38	0,11	15,14
obsah bílkoviny v mléce v den zapuštění (%)	39	3,47	0,24	2,84	3,95	0,04	7,04
obsah laktózy v den zapuštění (%)	39	4,88	0,24	4,23	5,29	0,04	4,92
počet somatických buněk v mléce v den zapuštění (tis./ml)	39	421,97	989,89	12	5685	158,51	234,58

n.... četnost,  $\bar{x}$ .....aritmetický průměr; s.... směrodatná odchylka; min. ... minimální hodnota; max. .... maximální hodnota; s.e. .... střední chyba aritmetického průměru; V ..... variační koeficient

V tabulce č. 4 jsou uvedeny základní statistiky hodnoceného souboru dat (průměr, směrodatná odchylka, minimální a maximální hodnota, střední chyba aritmetického průměru a variační koeficient). Průměrné procento zabřezávání u hodnocených plemenic bylo 38,46%. Inseminované plemenice byl v průměru na 237,49 dnů laktace s průměrnou užitkovostí 28,75 l, obsahem tuku 4,20%, obsahem bílkovin 3,47%, obsahem laktózy 4,88% a počtem somatických buněk 421,97 tis./ml. Za pozornost dále stojí poměrně velké rozpětí hodnot mléčné užitkovosti a to především v nádoji v den laktace (15,4 až 46,4 l) a % tuku (2,84 až 3,95%). Dny laktace a parametry mléčné užitkovosti měly poměrně malé koeficienty variability, což svědčí o vyrovnanosti hodnocených plemenic. Poměrně vysoká variabilita

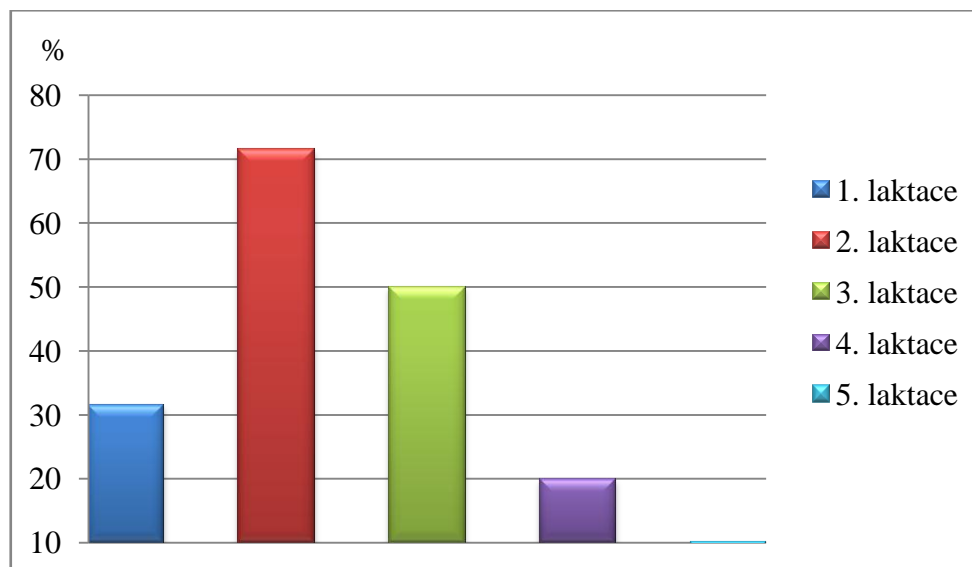
byla ale v počtu somatických buněk, kdy některé z plemenic v době inseminace byly evidentně subklinicky mastitidní.

Graf č.1 Vliv obsahu LDL na výsledky zapouštění krav



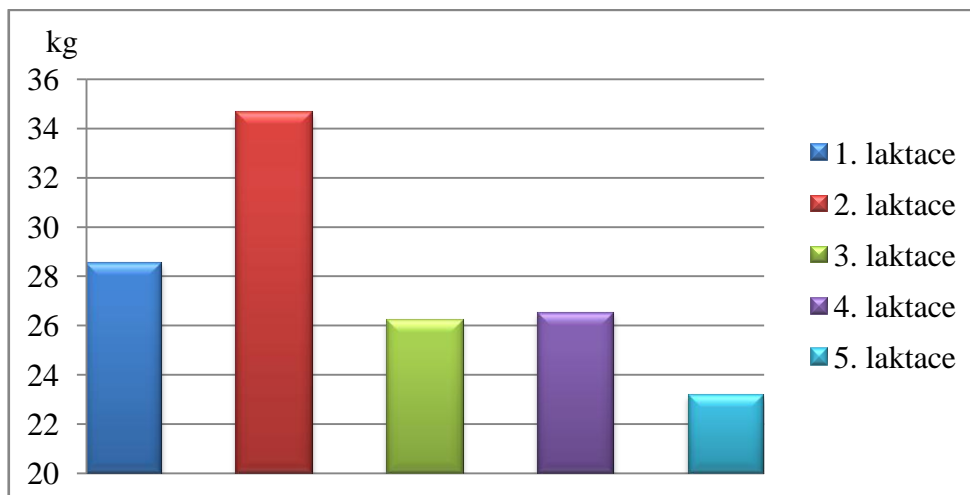
V grafu č. 1 je uvedeno porovnání výsledků zabřezávání po inseminačních dávkách s přidavkem a bez přidavku LDL. Z porovnání aritmetických průměrů je zjevné, že po inseminačních dávkách s přidavkem LDL bylo o 3,16% lepší zabřezávání.

Graf č. 2 Vliv pořadí laktace na % zabřezávání



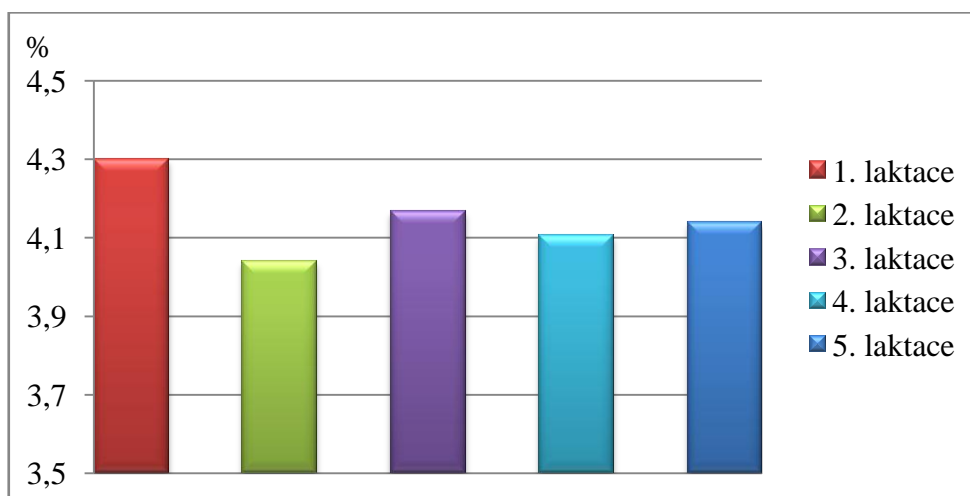
Graf č. 2 znázorňuje zabřezávání zvířat na hodnocených laktacích. V prvních čtyřech laktacích došlo k zabřeznutí u 20 – 71,43% plemenic. Plemenice na páté laktaci (n=2) v rámci tohoto hodnocení měli zabřezávání 0%.

Graf č. 3 Vliv pořadí laktace na nádoj kg v den zapaštění



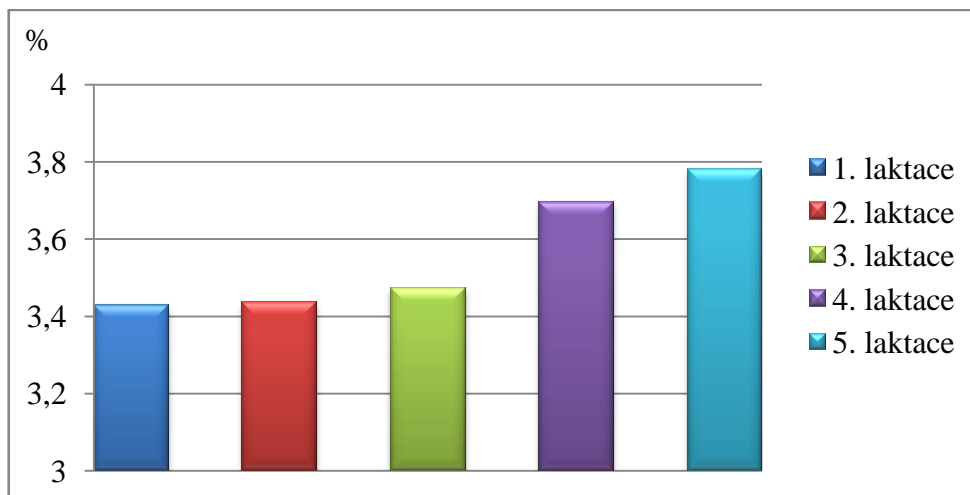
V grafu č. 3 je uvedeno porovnání průměrné mléčné užitkovosti u krav na 1. až 5. laktaci. Nejvyššího nádoje v den zapouštění dosahovaly krávy na druhé laktaci (34,66 l). Naopak nejnižší mléčná užitkovost byla zaznamenána u krav na páté laktaci (23,20 l).

Graf č.4 Vliv pořadí laktace na % tuku v den zapaštění



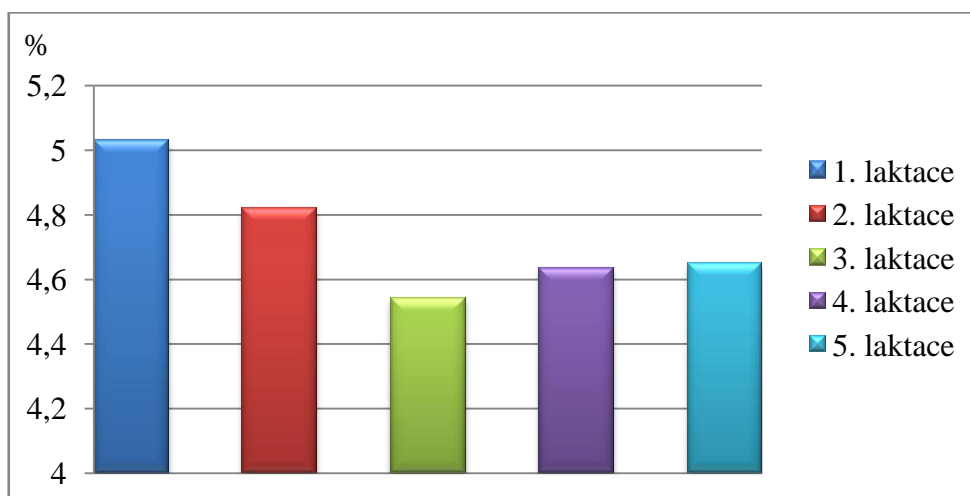
V grafu č. 4 jsou graficky vyjádřeny průměrné % zastoupení tuku v mléce u krav na 1 až 5 laktaci. Nejnižší hodnota byla zaznamenána u krav na druhé laktaci (4,04%) a nejvyšší hodnota u prvotetek (4,30%).

Graf č. 5 Vliv pořadí laktace na % bílkovin v den zapaštění



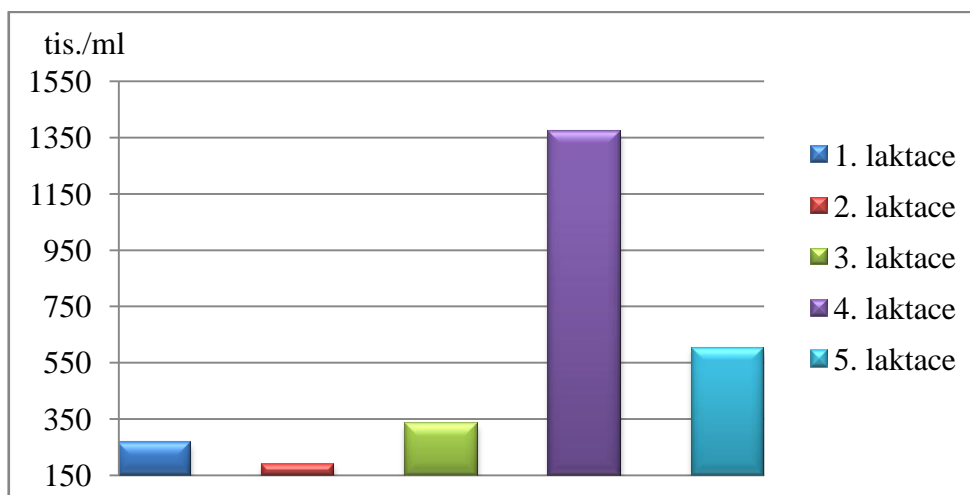
Graf č. 5 prezentuje vývoj % zastoupení bílkovin v mléce u krav na 1 až 5 laktaci. Nejnižší hodnota byla zaznamenána u krav na první laktaci (3,43%) a nejvyšší hodnota u krav na páté laktaci (3,78%). Z těchto výsledků lze konstatovat vzrůstající tendenci hodnot.

Graf č.6 Vliv pořadí laktace na % laktózy v den zapaštění



Graf č. 6 prezentuje vývoj % zastoupení laktózy v mléce u krav na 1 až 5 laktaci. Mezi první a třetí laktací je pozorovatelný pokles průměrného obsahu laktózy z 5,03% na 4,54%. U dojnic na 4., resp. 5. laktaci byl průměrný obsah laktózy v den zapouštění 4,64, resp. 4,65%.

Graf č. 7 Vliv pořadí laktace na počet somatických buněk v den zapuštění



Vývoj průměrného obsahu somatických buněk je prezentován v grafu č. 7. Nejvyšší obsah somatických buněk měly plemenice na čtvrté laktaci (1369 tis./ml). Naopak nejnižší průměrný obsah somatických buněk byl pozorován u krav na druhé laktaci (191,14 tis./ml). Tabulka č. 5 Korelace mezi zabřezáváním a ukazateli mléčné užitkovosti v den zapuštění (n=39)

		nádoj v den zapuštění	% tuku v den zapuštění	% bílkovin v den zapuštění	% laktózy v den zapuštění	počet somatických buněk v den zapuštění
zabřezávání	r	0,116	0,007	0,070	0,058	-0,231
	P	0,482	0,966	0,671	0,726	0,157
nádoj v den zapuštění	r		0,233	0,231	0,272	-0,038
	P		0,154	0,156	0,094	0,820
% tuku v den zapuštění	r			0,924	0,925	-0,042
	P			<0,001	<0,001	0,801
% bílkovin v den zapuštění	r				0,971	0,047
	P				<0,001	0,778
% laktózy v den zapuštění	r					0,015
	P					0,927

Tabulka č. 4-5 obsahuje vyjádření vztahů a jejich síly mezi zabřezáváním a ukazateli mléčné užitkovosti v den zapuštění, resp. počtem somatických buněk v mléce. % zabřezávání nebylo korelováno s žádným parametrem mléčné užitkovosti, ani s počtem somatických buněk ( $P > 0,05$ ). Silné korelace byly vypočteny mezi obsahy pevných složek mléka ( $r = 0,924 - 0,971$ ;  $P < 0,001$ ). Ostatní vztahy mezi hodnocenými proměnnými nebyly statisticky průkazné ( $P > 0,05$ ).

Tabulka č. 6 Vyhodnocení statistického souboru pomocí ANOVA

efekt	úroveň	zabřezávání
		LSM $\pm$ SE
pořadí laktace	1	28,10 $\pm$ 12,384
	2	71,85 $\pm$ 20,488
	3 a další	36,61 $\pm$ 15,040
LDL	ano	39,87 $\pm$ 11,309
	ne	51,17 $\pm$ 13,342
býk	LAURIN	52,63 $\pm$ 17,885
	MILANO	44,92 $\pm$ 16,938
	MOXIE	36,85 $\pm$ 16,889
	PIKANT	47,67 $\pm$ 17,631

V tabulce č. 6 je uvedeno vyhodnocení pro efekty pořadí laktace, obsah LDL a býka. Použitá modelová rovnice vysvětlovala 16,44% proměnlivosti pro zabřezávání. Tato modelová rovnice ovšem, stejně jako efekty v této rovnici nebyly statisticky průkazné ( $P > 0,05$ ). Nicméně takto zvolený model nejlépe odpovídal hypotéze práce. Neprůkaznost modelu je do velké míry způsobena nízkým počtem hodnocených plemenic a použitých býků.

Z této tabulky vyplývá, že neprůkazně nejlepších výsledků zabřezávání dosahovali krávy na druhé laktaci. Naopak nejhorší zabřezávání bylo zjištěno u prvotetek.

Při vyhodnocení efektu přídatku LDL bylo po očištění průměrů o efekty v modelové rovnici dosaženo dokonce opačných výsledků oproti aritmetickým průměrům. Statisticky neprůkazně horších (-11,20%;  $P > 0,05$ ) výsledků bylo dosaženo při přidání LDL.

Z hodnocených býků byly nejlepší výsledky zabřezávání vypočteny u Laurina. Naopak nejhorší zabřezávání bylo patrné u plemeníka se jménem Moxie. Tyto výsledky ovšem nebyly také statisticky průkazné ( $P > 0,05$ ).

## 6. Diskuze

Součástí hypotézy bylo mimo jiné předpoklad, že kryoprotektivní vlastnosti LDL použitého při výrobě pokusných inseminačních dávek zajistí lepší motilitu dávek po rozmrazení a také zajistí vyšší úroveň zabřezávání dojnic. Studium této problematiky se zabývají také Moussa et al. (2002); Amirat et al. (2004); Amirat et al. (2005); Hu et al., (2010); Hu et al. (2011).

V práci je nejprve sledován vliv LDL přídatku na motilitu spermií po rozmrazení ve třech různých ředidlech (AndroMed, Triadyl, Bioxcell). Tato ředidla byla vybrána, jelikož jsou vysoce komerčně využívaná v inseminaci a běžně dostupná. Stejně studie s těmito ředidly publikovali například Vera-Munoz et al., (2009) a Amirat et al., (2005). Do ředidel byl přidáván LDL cholesterol v koncentracích 6 % a 8 %. Ideální koncentrační rozmezí LDL se liší mezi druhy (Akhter et al., 2011). Tyto koncentrace se zdají nejvhodnější, dle mnoha autorů (Bencharif et al. 2008, Amirat et al. 2004, Amirat et al. 2005).

Bylo zjištěno, že 20 % vaječného žloutku obsahuje koncentraci LDL 6,6 %. Bencharif et al., (2008) proto tvrdí, že 6 % přídatku LDL do ředidel má nejlepší potenciál zachování životaschopnost spermií. Hu et al. (2010) dospěli ve své práci k závěru, že nejlepší přídatku do ředidla byla 8 % koncentrace LDL. Moussa et al. (2002) zjistil, že koncentrace LDL v ředidle >10 %, vede ke snížení motility spermií. Nejčastěji se LDL se přidává do ředidel v koncentracích 7-10 %.

V práci byla zkoumána ředidla s přídatkem LDL a jejich vliv na motilitu spermií a membránovou integritu, pomocí biologických zkoušek ejakulátu. Po rozmrazení byla motilita hodnocena TDT testem, kde nejlepších výsledků dosahovala ředidla AndroMed s 6 % přídatkem LDL, Bioxcell 6 % přídatku LDL a kontrolní vzorek Triladyly. Spermie v Triladyly s přídatkem LDL měly aktivitu okolo 30 a méně procent, což může vysvětlovat fakt, že ředidlo Triladyl je ochuzeno o ostatní kryoprotektivní složky, neboť jeho základ tvoří vaječný žloutek, který byl celý nahrazen LDL cholesterolem. Moussa et al., (2002); Amirat et al., (2004); Amirat et al., (2005) Hu et al., (2010); Hu et al., (2011) tuto skutečnost nepotvrzují, neboť ve všech studiích se shodují, že 8 % přídatku LDL použit jako náhrada vaječného žloutku nemá negativní vliv na motilitu a ve srovnání s kontrolním vzorkem má lepší aktivitu. U ostatních ředidel se potvrdila hypotéza, že LDL přídatku má pozitivní vliv na motilitu spermií po rozmrazení.

V pracích Jannet et al., (2005) a Stradaoli et al., (2007) byl zkoumán vliv bezžloutkových ředidel s přídavkem LDL na motilu spermií. Nejlepší výsledky vykazovaly ředidla AndroMed a Bioxcell, s čímž se shodují výsledky naší práce. Z těchto výsledků je možno učinit závěr, že přidáním LDL do ředidel s rostlinnými fosfolipidy má lepší vliv na pohyblivost spermií nežli ředidla bez rostlinné složky (Šimoník et al., 2013).

V posledních letech, četné studie potvrdily, že LDL extrahován z vaječného žloutku je úspěšný pro kryokonzervace spermatu kanců býků i psů (Manjunath et al., 2002). Nicméně, zavést a rozšířit použití LDL cholesterolu jako kryoprotektantu, do inseminačních stanic, vyžaduje další studie, zejména na vliv plodnosti in vivo.

Součástí prováděného výzkumu bylo také hodnocení plodnosti inseminačních dávek in vivo. Z předchozích výzkumů bylo vybráno pro inseminaci ředidlo AndroMed s 6 % přídavkem LDL. Inseminace byla provedena na souboru 39 plemenic v různých fázích laktace s různými nádoji a množství složek v mléce. Freret et al., 2006 se domnívá, že soubor testovaným plemenic nemá být náhodný, nýbrž by všechny krávy měly být ve stejné fázi laktace a jejich nádoje by se neměly výrazně lišit. Také tvrdí, že pokud není testována uniformní skupina zvířat, nelze posuzovat výsledek pokusu objektivně, protože velký význam v takovémto souboru hraje efekt stáda. Z našeho výzkumu vyplívá, že nejlepších výsledků zabřezávání dosahovaly krávy na druhé laktaci, nejhorších výsledků bylo dosaženo u prvotetek. Tuto skutečnost vyvrací Barbat et al., (2005), který uvádí vyšší plodnosti u prvotetek ve srovnání s kravami na dalších laktacích.

Z porovnání aritmetických průměrů v našem výzkumu je zjevné, že po inseminačních dávkách s přídavkem LDL bylo o 3,16% lepší zabřezávání. Při vyhodnocení efektu přídavku LDL bylo po očištění průměrů o efekty v modelové rovnici dosaženo dokonce opačných výsledků oproti aritmetickým průměrům. Statisticky neprůkazně horších (-11,20%;  $P > 0,05$ ) výsledků bylo dosaženo při přidání LDL. Amirat et al., (2010) hodnotili vliv přidání LDL cholesterolu do inseminační dávky na zabřezávání plemenic. Byl hodnocen soubor 193 krav a nebyl zjištěn žádný významný rozdíl ( $p > 0,05$ ) v zabřezávání po dávkách s LDL cholesterolem a dávkách bez přídavku.

Neprůkaznost modelu v našem výzkumu je do velké míry způsobena nízkým počtem hodnocených plemenic a použitých býků.

Na závěr je nutné konstatovat, že plodnost inseminačních dávek je obtížné měřit vzhledem k různým parametrům testovaného souboru. Úroveň dobré plodnosti inseminačních

dávek s LDL by mohlo být možné zjistit na velkém souboru uniformních zvířat (Barbat et al., 2005).

## 7. Závěr

Cílem práce bylo zjistit vliv LDL cholesterolu na kvalitu inseminační dávky a následně vliv na zabřezávání krav v podmínkách běžného chovu.

V práci jsem zjistila, že LDL cholesterol má pozitivní vliv na kvalitu inseminačních dávek po rozmrazení, hodnocenou laboratorními metodami, čímž jsme potvrdili studie mnoha autorů. LDL přidaný do ředidla ochránil spermie před poškozením mrazem, a tím zlepšil kvalitu inseminační dávky po rozmrazení. Tento fakt, by mohl mít přínos pro praxi při výrobě inseminačních dávek na inseminačních stanicích, kde LDL přidaný do ředidla ochraňuje spermie před zmrazením a tím dojde ke snížení počtu likvidovaných inseminačních dávek následkem poškození spermií mrazem. Tato skutečnost by se měla projevit na fertilizačních schopnostech inseminačních dávek in vivo.

Vliv přídatku LDL do inseminačních dávek byl v této diplomové práci zkoumán také in vivo. Z výsledků je patrné, že nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl v březosti mezi dávkami s LDL přídatkem a bez něj. Tento výsledek je možné dát do souvislosti s tím, že byl zkoumán malý soubor krav. Pro praktické ověření vlivu přídatku LDL na zabřezávání plemenic je zapotřebí provést rozsáhlejší výzkum. Výzkum, který byl prezentován v této diplomové práci není konečný, ale stále probíhá. Další a podrobnější výsledky budou k dispozici během následujících měsíců.

## 8. Seznam literatury

- Aires, V. A., Hinsch, K. D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., Hinsch, E. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk based and soybean lecithin based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. 60. p. 269–79.
- Akhter, S., Ansari, M.S., Rakh, a B.A., Anrabi, S.M.H., Khalid, M., Ullah, N. 2011. Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Theriogenology*. 4. P. 759- 764.
- Amirat, L., Anton, M., Tainturier, D., Chatagnon, G., Battut, I., Courtens, J.L. 2005. Modifications of bull spermatozoa induced by free extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*. 129 (4). p. 535-543.
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gerard, O., Courtens, J.L., Anton, M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl (R), a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 61(5) p. 895 907.
- Amirat-Briand L., Bencharif, D., Vera-Munoz, O. Pineau<sup>a</sup>, S. C., Thorin, S., Destrumelle, S., Desherces, M., Anton, M., Jouan, E., Shmitt, D., Tainturier., 2010. *In vivo* fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: Preliminary results of artificial inseminations. *Animal Reproduction Science* Volume 122, Issues 3–4, December 2010, Pages 282–287.
- Andrabi, S. M. 2009. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 44. p. 552-569.
- Ansari, M.S., Rakha, B.A., Ullah, N., Andrabi, S.M.H., Iqbal, S., Khalid, M., Akhter, S., 2010. Effect of exogenous glutathione in extender on the freezability of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 28. p. 235-244.
- Ball, P.J.H., Peters, A.R. 2004. *Reproduction in cattle*. Great Britain: Blackwell Publishing.
- Barbas, J.P., Mascarenhas, R.D., 2008. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. 10(1):49-62.

- Barbat A, Druet T, Bonaiti B, Guillaume F, Colleau JJ and Boichard D 2005. Bilan phénotypique de la fertilité à l'insemination artificielle dans les trois principales races laitières françaises. Actes des 12<sup>èmes</sup> Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, France, 7–8 décembre 2005, pp. 137–140.
- Bergeron, A., Crete, M. H., Brindle, Y., Manjunath, P. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction*. 70. P. 708-717.
- Blume, K., Dietrich, K., Lilienthal, S., Ternes, W., Drotleff, A. M. 2015. Exploring the relationship between protein secondary structures, temperature-dependent viscosities, and technological treatments in egg yolk and LDL by FTIR and rheology. *Food chemistry*. 173. p. 584-593.
- Bousseau, S., Brillard, J. P., Marquant, B., Guérin, B., Camus, A., Lechat, M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 50. p. 699 – 706.
- Burley, R. W. 1975. Recent advances in the chemistry of egg yolk. *CSIRO Food Research Quarterly*. 35. p. 1-5.
- Crha, I., Žáková, J. 2003. Základní vyšetření spermatu. *Urologické listy*. 2003 (2), p. 35-37. Českomoravská společnost chovatelů a.s. Dostupné z < [www.cmsch.cz](http://www.cmsch.cz) >.
- DeJarnette, J. M., Nebel RL., Marshall, C.E, 2010. Understanding estimates of AI sire fertility: from A to Z. Proceedings of the 23rd Technical Conference on Artificial insemination and Reproduction.
- Dobrinski, I., Lulai, C., Barth, A. D., Post, K. 1993. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *Journal of Reproduction Fertility Suppl*. 47. p. 291-6.
- Eddy, E., O'Brien, D. 1994. The spermatozoon. In Knobil E, Neill ID, eds: *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. New York: Raven Press, p. 29-78.

- Ejaz, R. Ansari, M. S. Rakha, B. A. Ullah, N. Husna, A. U. Iqbal, R. Akhter, S. 2014. Arachidic Acid in Extender Improves Post-thaw Parameters of Cryopreserved Nili-Ravi Buffalo Bull Semen. *Reproduction in domestic animals*. 49 (1). p.122-125.
- Farstad, W. 2009. Cryopreservation of Canine Semen – New Challenges. *Reproduction in Domestic Animals*. 44. p. 336–341.
- Fawcett, D. W. 1975: The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.* 44. p. 394–436.
- Foote, R. H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*. 80 (Suppl. 2). 1–10.
- Ford, W. C. L. 2006. Glycolysis and sperm motility: Does a spoonful of sugar help the flagellum go round. *Hum. Reprod. Update*. 12. p. 269–274.
- Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S.M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H.R., Nasr-Esfahani. M.H. 2009. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 73. p. 480–487.
- Freret S, Ponsart C, Rai DB, Jeanguyot N, Paccard P, Humblot P. Facteurs de variation de la fertilité en première insémination et des taux de mortalités embryonnaires en élevages laitiers Prim'Holstein. *Renc. Rech. Rum.* 2006, 281-284
- Gamčík, P., Kozumplík, J., Mesároš, P., Schvarc, F., Vlček, Z., Zibrín, M. 1992. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. Príroda, Bratislava. 299 pp.
- Hanuláková Š., Máchal L. 2011. The influence of the czech Fleckvieh bull individuality and preparation method to the sperm activity. *Mendel Net*. p. 741-748.
- Holt, W. V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*. 62 (1-3). p. 3-22.
- Holt, W. V., Medrano, J.A. 1997. Assessment of sperm function in relation to freezing and storage. *Journal of Reproduction and Fertility*, 52, p. 213-222.
- Hu, J.H., Jiang, Z.L., Lv, R.K., Li, Q.W., Zhang, S.S., Zan, L.S., Li, Y.K., Li, X. 2011. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*. 1. p. 83-87.

- Hu J.H., Li Q.W., Zan L.S., Jiang Z.L., An J.H., Wang L.Q., Jia Y.H. 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal reproduction science* 1-2. 11-1
- Jannet F., Keo S., Bollwein H., Hassig M., Thun R. 2005. Comparison of AndroMed®, Bioxcell® and Triladyl® extender for cryopreservation of bull semen. *Schweiz Archiv Tierheilk.* 147. 62–62
- Kliment. J. 1983. *Reprodukcia hospodárskych zvierat.* Bratislava. *Príroda.* 391 p.
- Kňažická, Z., Tvrdá, E., Kerti, A., Bulla, J., Massányi, P., Lukáč, N. 2010. Influence of energy components to culture media on the bovine sperm motility parameters in vitro. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 13(1). p. 1-6.
- Kojima, E., Nakamura, R. 1985. Heat gelling properties of hen's egg yolk low density lipoprotein (LDL) in the presence of other protein. *Journal Food Science.* 50. p. 63-66.
- Kučera, J. Král, P. Český strakatý skot – výsledky a budoucnost, Svaz chovatelů českého strakatého skotu, 2005. [cit. 22.3.2015] dostupné z <[www.cestr.cz](http://www.cestr.cz)>.
- LeBlanc, S. 2010. Assessing the Association of the Level of Milk Production with Reproductive Performance in Dairy Cattle. *Journal of Reproduction and Development.* 56. p. 1–7.
- Louda, F. 2001. *Inseminace hospodárskych zvierat: se základy biotechnických metod.* 1.vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita. 225 s. ISBN 80-213-0702-1.
- Louda, F., Vaněk, D., Ježková, A., Stádník, L., Bjelka, M., Bezdíček, J., Pozdíšek, J. 2008. *Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic.* Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o. Rapotín. Česká republika. 56 s. ISBN: 9788087144053.
- Lukáč, N., Massányi, P., Kročková, J., Naď, P., Slamečka, J., Ondruška, Ľ, Formicki, G., Trandžík, J. 2009. Relationship between trace element concentrations and spermatozoa quality in rabbit semen. *Slovak J. Anim. Sci.*, 42. p. 46-50.
- Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., Menard, M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of reproduction.* 67. p. 1250–1258.

- Martin, W. G., Augustyniak, J., Cook, W. H. 1964. Fractionation and characterization of the low-density lipoproteins of hen's egg yolk. *Biochim Biophys.* 84. p. 714-20.
- Marvan, F. (eds.). 2011. *Morfologie hospodářských zvířat*. Brázda. Praha. 304 s. ISBN: 9788021321885.
- Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D., Rodrigues, J.L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*. 57. p. 327-344.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen thawed bull semen. *Theriogenology*. 57 (6). p. 1695–1706.
- Mutalik, S., Salian, S.R., Avadhani, K., Menon, J., Joshi, H., Hegde, A.R., Kumar, P., Kalthur, G., Adiga, S.K. 2014. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 60 (3). p. 183-188.
- Natural spol s.r.o., 2007. Dostupné z < [www.naturalgenetics.cz](http://www.naturalgenetics.cz) > .
- Prado, R.B., Koivisto, M.B., Carreira, J.T., Perri, S.H.V., Rodrigues, L.H., Netto, H.A., Torregrossa, T.L.G., Vicente, W.R.R. 2012: Effect of different bovine semen extenders on in vitro development of bovine embryos. *Arquivo brasileiro de medicina veterinaria e zootecnia*, 64 (5). p. 1118-112.
- Reece, O.W. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat 2*. Grada Publishnig a.s. 473 s. ISBN: 8024732823.
- Říha, J. Brázda, J. 2000. Reprodukce v procesu šlechtění skotu. *Asociace chovatelů masných plemen Rapotín*, 144 p.
- Salamon, S., Maxwell W. M. C., 1995. Frozen storage of ram semen: I Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*. 37. p. 185-249.
- Sansone, G., Natri, M. J. F., Fabbrocini, A. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*. 62. p. 55–76.
- Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Estes, M.C., López-Sebastián, A., Guerra, R., Ruiz, M.J., Mendoza, N., Luna, C., Cebrián-Pérez, J.A., Hildebrandt, T.B. 2013. Cryopreservation of aoudad (*Ammotragus lervia sahariensis*) sperm obtained by transrectal

- ultrasound-guided massage of the accessory sex glands and electroejaculation. *Theriogenology*. 79. p. 383–391.
- SAS Institute Inc. (2011): SAS/STAT® 9.3 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Stádník, L., Beran, J., Doležalová, M., Ducháček, J., Toušová, R. 2015. Vybrané faktory ovlivňující kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků. Česká zemědělská univerzita v Praze. ISBN 978-80-213-2536-4.
- Stradaioli G., Noro T., Sylla L., Monaci M. 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology*. 67. 1249–1255
- Šimoník, O., Stádník, L., Rajmon, R., Beran, J., Šichtař, J., & Ducháček, J. (2013). Influence Of Ldl Addition On Cryoprotective Properties Of Bovine Semen Extenders. In "Fourth International Scientific Symposium" Agrosym 2013", Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 3-6 October, 2013. Book of Proceedings. (pp. 1027-1032). Faculty of Agriculture, University of East Sarajevo.
- Thun, R., Hurtado, M., Janett, F. 2002. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*. 57 (3). p.1087–1094.
- Thurson, L. M., Watson, P. F., Holt, W. V. 2002a. Semen cryopreservation: A genetic explanation for species and individual variation? *Cryoletters*, 2002, vol. 23, p. 255–262.
- Thurston, L.M., Siggins, K., Mileham, A.J., Watson, P.F., Holt, W.V. 2002b. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 66, p. 545-554.
- Topraggaleh, T. R., Shahverdi, A., Rastegarnia, A., Ebrahimi, B., Shafiepour, V., Sharbatoghli, M., Esmaeili, V., Janzamin, E. 2014: Effect of cysteine and glutamine added to extender on post-thaw sperm functional parameters of buffalo bull. *Andrologia*. 46 (7). p. 777–783.
- Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Přinosilová, P. 2004. Repetitorium dermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy. Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno. 258 s. ISBN 8086895017.
- Vera-Munoz O., Amirat-Briand L., Diaz T., Vasquez L., Schmidt E., Desherces S., Anton M., Bencharif D., Tainturier D. 2009. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on

motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl (R) and Bioxcell (R). *Theriogenology* 6. 895-900

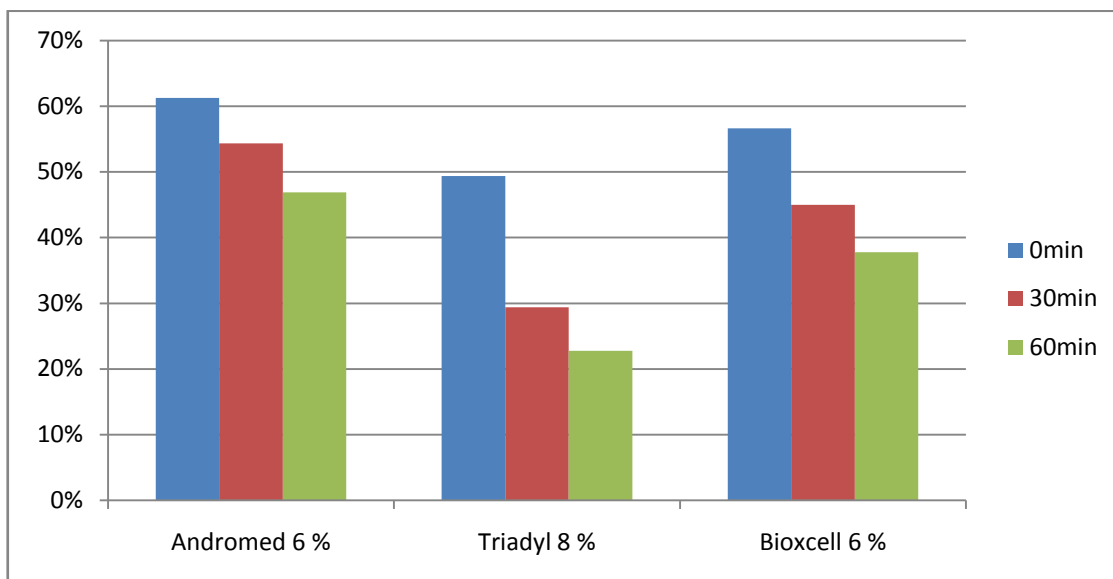
Vinkler, A. 2009. Metody diagnostiky pohlavní aktivity a poruch plodnosti. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a. s. Brno. s. 513–524. ISBN: 9788086542195.

Wang, P.W., Yan-Feng, W., Chun-Wei, B., Shu-Hai, H., Jian-Hong, L., Qing-Wang, P., Wei Jun, Y., Gong, S. 2014. Effects of low-density lipoproteins extracted from different avian yolks on boars spermatozoa quality following freezing-thawing. *Zygote*. 22 (2).p. 175-181.

## 9 Přílohy

Tabulka č. 7 : Procentuální vyhodnocení motility dávek při TDT testu v čase 0 min, 30 min, 60 min.

Ředidlo, % LDL, čas	NEA 739	NEA 922	NEO 269	NEO 197
Andromed 6% LDL,0min	60%		60%	65%
Andromed 6%LDL,30min	50%		50%	55%
Andromed 6% LDL 60 min	40%		50%	20%
Kontrola Andromed 0 min	50%	10%	60%	70%
Kontrola Andromed 30min	30%	5%	55%	40%
Kontrola Andromed 60min	15%	5%	45%	30%
TRIADYL 8%LDL 0 min	10%	70%	60%	
TRIADYL 8%LDL30min	5%	45%	45%	
TRIADYL 8%LDL60min	2%	40%	40%	
Kontrola Triadyl 0min	55%	70%	50%	60%
Kontrola Triadyl 30min	55%	40%	45%	40%
Kontrola Triadyl 60min	50%	40%	30%	40%
BIOXCELL 6% LDL 0min	45%	55%	50%	65%
BIOXCELL 6% LDL 30min	40%	45%	45%	55%
BIOXCELL 6% LDL 60 min	35%	40%	35%	40%
Kontrola Bioxcell 0 min	60%		55%	60%
Kontrola Bioxcell 30min	50%		50%	50%
Kontrola Bioxcell 60 min	50%		30%	30%



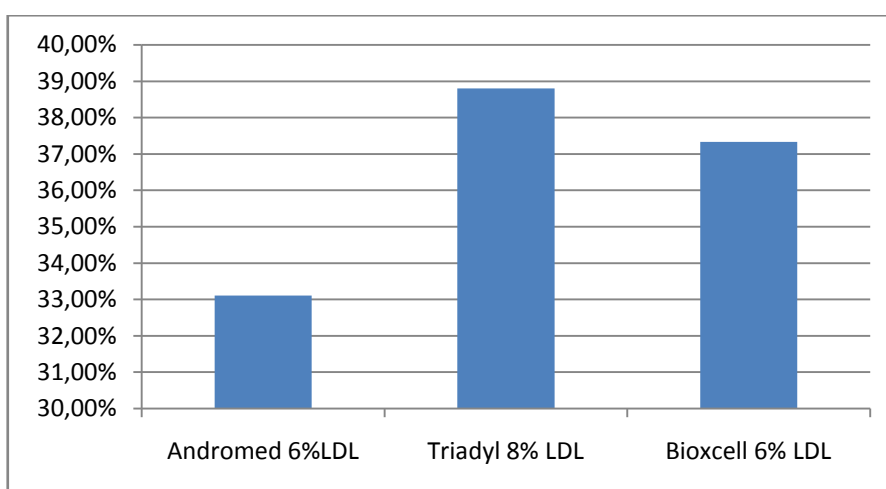
**Graf 8 : Grafické vyjádření poklesu motility dávek v časech 0, 30, 60 min.**

Z tabulky číslo 7 a grafu č 8 vyplývá, že nejlepší motilitu spermií vykazovaly v ředidle Andromed s 6 % přídavkem LDL, dále pak v Bioxcellu a nejhorších výsledků bylo zjištěno v ředidle Triadyl.

Tabulka č. 8 : Procentuelní vyhodnocení reakce dávek na HOS test.

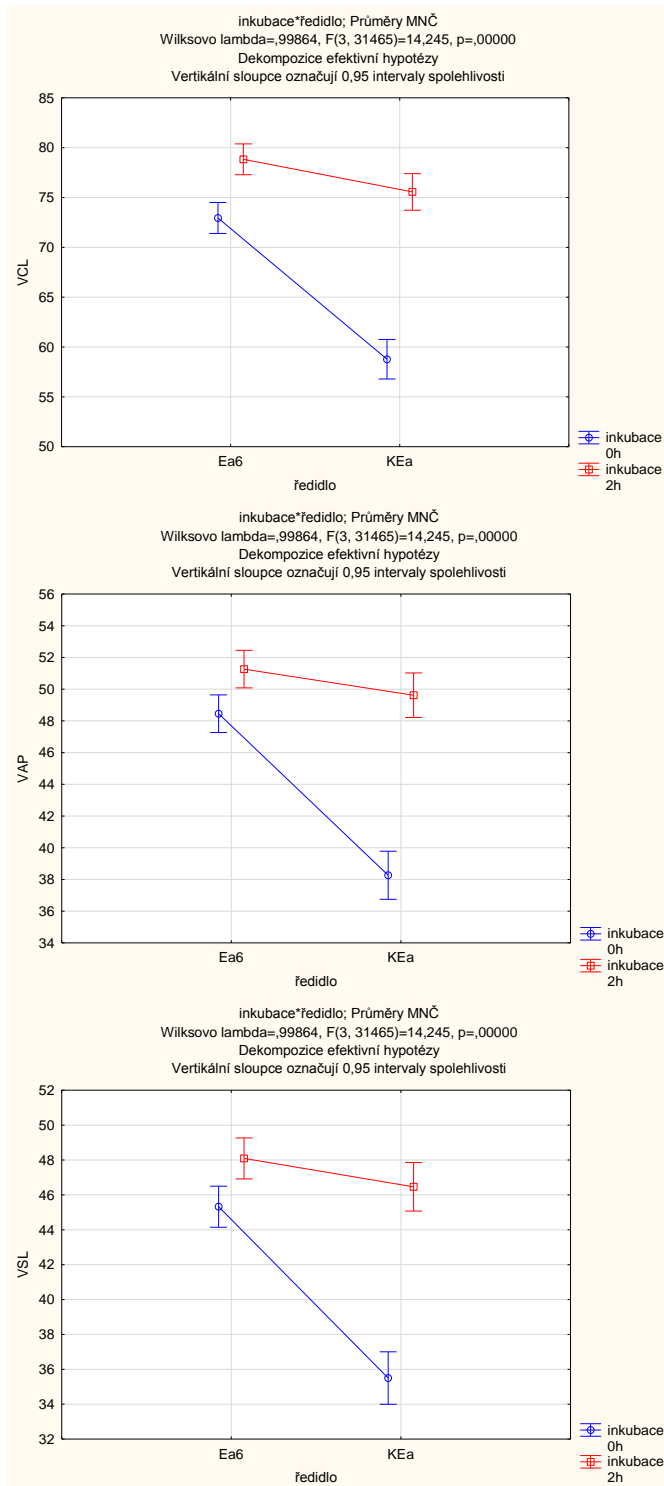
% reakce na HOS	NEO 197	NEA739	NEA 922	NEO 269
Andromed 6%LDL	33,11%	44%	25%	26,56%
AndromedKonrola	40,44%	33,54%	18%	30%
Triadyl 8% LDL	38,80%	44,70%	31,03%	39,79%
Triadyl kontrola	41,73%	43,50%	34%	33%
Bioxcell 6% LDL	37,33%	29,83	28,46%	36,25%
Bioxcell kontrola	39%	31,25%	22,52%	28,34%

Graf 9: Grafické znázornění reakci dávek na HOS test.



Reakce na HOS test vykazuje procentuelní část neporušených plazmatických membrán u živých spermií. Z tabulky č. 8 a grafu č.9, je zřejmé, že na HOS test nejvíce reagovaly spermie v ředidle Triadyl, následně Bioxcell a nejhůře reagovaly spermie v Andromedu.

Výsledky CASA – výstup hodnocení ředidla Andromed ( E ), v parametrech VCL, VAP, VSL.



AndroMed®

Vertikální sloupce označují 0,95 intervaly spolehlivosti.

KEa – kontrolní vzorek, ředidlo bez LDL

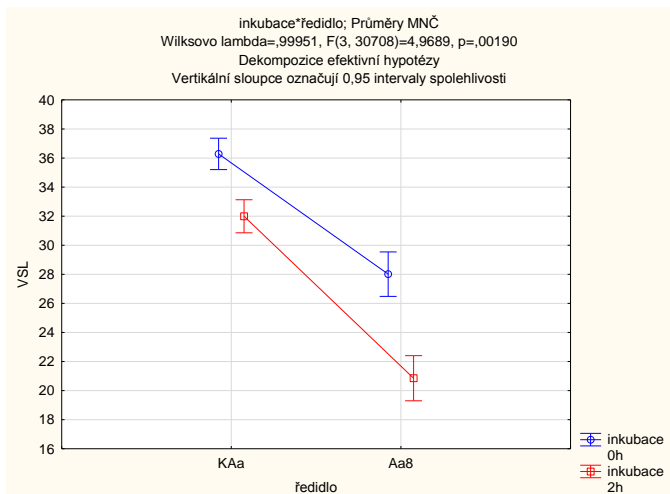
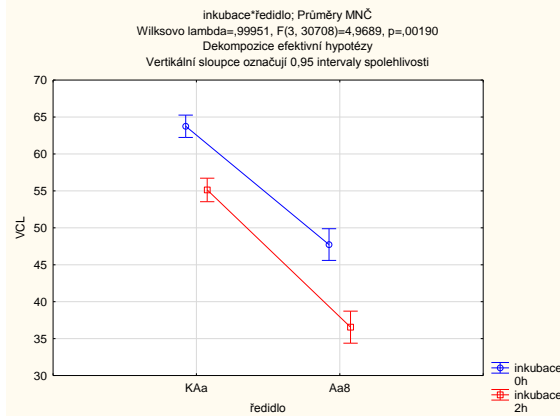
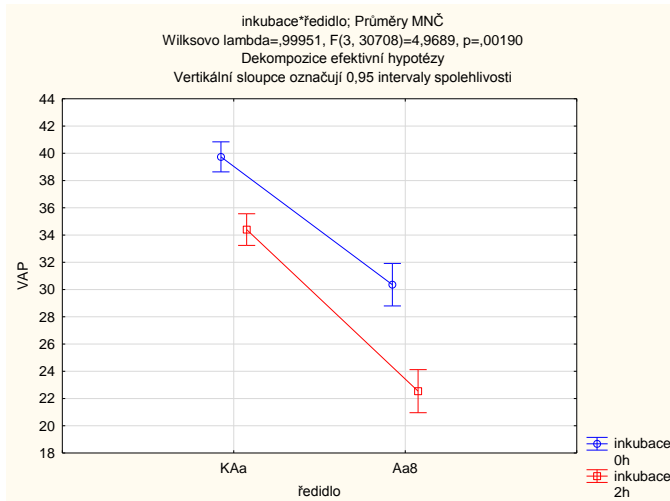
Ea6 – ředidlo s 6% LDL

VCL (µm/s): rychlost hlavičky spermie na skutečné dráze

VAP (µm/s) :tedy průměrná rychlost hlavičky na napřímené dráze

VSL (µm/s): průměrná rychlost měřená přímkou od začátku do konce jedné stopy

Výsledky CASA – výstup hodnocení ředidla Triadyl ( A), v parametrech VCL, VAP, VSL.



Triadyl®

Vertikální sloupce označují 0,95 intervaly spolehlivosti.

KAA – kontrolní vzorek, ředidlo bez LDL

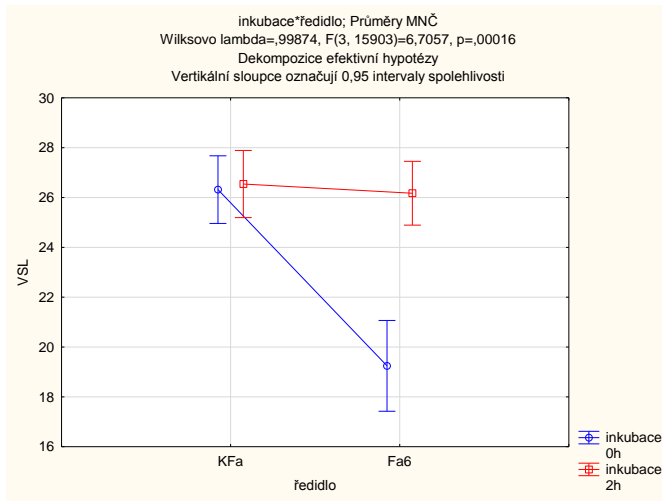
Aa8 – ředidlo s 8 % LDL

VCL (µm/s): rychlost hlavičky spermie na skutečné dráze

VAP (µm/s) :tedy průměrná rychlost hlavičky na napřímené dráze

VSL (µm/s): průměrná rychlost měřená přímkou od začátku do konce jedné stopy

Výsledky CASA – výstup hodnocení ředidla Bioxcel ( F ), v parametrech VCL, VAP, VSL.



Bioxcel®

Vertikální sloupce označují 0,95 intervaly spolehlivosti.

KFa – kontrolní vzorek, ředidlo bez LDL

Fa6 – ředidlo s 6 % LDL

VCL (µm/s): rychlost hlavičky spermie na skutečné dráze

VAP (µm/s) :tedy průměrná rychlost hlavičky na napřímené dráze

VSL (µm/s): průměrná rychlost měřená přímku od začátku do konce jedné stopy

