

Stanovení vlivu krystalizace a metabolických indikátorů cervikálního hlenu na přežitelnost spermií u skotu

metodická příručka



Luděk Stádník, Jan Beran, Zdenka Hegedušová, Alexander Makarevich,
Elen Kubovičová, František Louda



VÝZKUMNÝ ÚSTAV
PRO CHOV SKOTU

metodická příručka

Stanovení vlivu krystalizace a metabolických indikátorů cervikálního hlenu na přežitelnost spermií u skotu

Luděk Stádník, Jan Beran, Zdenka Hegedüšová, Alexander Makarevich, Elen Kubovičová, František Louda

ISBN 978-80-87144-26-8



Vydal Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o.
2013



**VÝZKUMNÝ ÚSTAV
PRO CHOV SKOTU**

Výzkumný ústav pro chov skotu, s. r.o.

STANOVENÍ VLIVU KRYSTALIZACE A
METABOLICKÝCH INDIKÁTORŮ CERVIKÁLNÍHO
HLENU NA PŘEŽITELNOST SPERMIÍ U SKOTU

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Autoři:

doc. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.

Ing. Jan Beran, Ph.D.

Ing. Zdenka Hegedüšová, Ph.D.

MVDr. Alexander Makarevich, DrSc.

RNDr. Elen Kubovičová, Ph.D.

prof. Ing. František Louda, DrSc.

Dedikace:

Uplatněná certifikovaná metodika byla zpracována v rámci řešení „S“ grantu
MŠMT a grantového úkolu MZe ČR, NAZV č. QI91A061.

Autorský kolektiv:

doc. Ing. Luděk Stádník², Ph.D.

Ing. Jan Beran², Ph.D.

Ing. Zdenka Hegedüšová¹, Ph.D.

MVDr. Alexander Makarevich¹, DrSc.

RNDr. Elen Kubovičová¹, Ph.D.

prof. Ing. František Louda¹, DrSc.

¹ Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o.
Výzkumníků 267, 788 13 Vikýřovice

² Česká zemědělská univerzita v Praze
Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 - Dejvice

Oponent: prof. Ing. Gustav Chládek, CSc.
Ing. Jan Vodička, MZe ČR

Schválil za orgán státní správy Mze ČR:

ISBN 978-80-87144-26-8

STANOVENÍ Vlivu KRYSTALIZACE A METABOLICKÝCH INDIKÁTORŮ CERVIKÁLNÍHO HLENU NA PŘEŽITELNOST SPERMIÍ U SKOTU

ABSTRAKT:

Cílem metodiky je podat systémově utříděný a ověřený přehled informací o interakcích mezi ukazateli metabolismu (močovina a aceton v krvi a mléce) a kvalitou cervikálního hlenu dojnic (arborizace, aceton, močovina). Dále je cílem vyhodnotit přímý vliv kvality cervikálního hlenu, vyjádřený jeho arborizací, resp. obsahem močoviny a acetonu na přežitelnost spermií po inseminaci. Metodika má přispět ke zlepšení zabřezávání a plodnosti krav cestou optimálního načasování inseminace v návaznosti na intenzitu metabolismu dojnic.

I.	Cíl metodiky	4
II.	Vlastní popis metodiky	5
1	Úroveň reprodukce	5
2	Činitelé ovlivňující plodnost dojnic.....	6
	2.1 Vztah metabolických ukazatelů krve, mléka, hlenu a plodnosti	6
	2.1.1 Močovina v mléce	7
	2.1.2 Aceton v mléce.....	8
	2.2 Cervikální hlen	9
	2.2.1 Složení cervikálního hlenu	9
	2.2.2 Arborizace (krystalizace) cervikálního hlenu.....	10
	2.2.3 Přežitelnost spermií v cervikálním hlenu	10
3	Vlastní výsledky	12
	3.1 Metodické postupy	12
	3.1.1 Vyhodnocení obsahu acetonu a močoviny v tělních tekutinách	12
	3.1.2 Vyhodnocení kvality cervikálního hlenu	12
	3.1.3 Vyhodnocení vlivu kvality cervikálního hlenu na přežitelnost spermií.....	15
	3.2 Výsledky sledování	16
	3.2.1 Sledování obsahu acetonu a močoviny v tělních tekutinách.....	16
	3.2.2 Hodnocení krystalizace hlenu	17
	3.2.3 Vliv kvality cervikálního hlenu dojnic na přežitelnost spermií	21
4	Závěr a doporučení pro praxi.....	25
III.	Srovnání „novosti postupů“	26
IV.	Popis uplatnění metodiky.....	27
V.	Ekonomické aspekty	28
VI.	Seznam použité související literatury	29
VII.	Seznam publikací, které předcházely metodice	34

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je podat systémově utříděný a ověřený přehled informací o interakcích mezi ukazateli metabolismu (močovina a aceton v krvi a mléce) a kvalitou cervikálního hlenu dojnic (arborizace, aceton, močovina). Dále je cílem vyhodnotit přímý vliv kvality cervikálního hlenu, vyjádřený jeho arborizací, resp. obsahem močoviny a acetonu na přežitelnost spermií po inseminaci. Metodika má přispět ke zlepšení zabřezávání a plodnosti krav cestou optimálního načasování inseminace v návaznosti na intenzitu metabolismu dojnic.

Dobrá úroveň reprodukce je důležitou podmínkou ekonomické efektivnosti chovu skotu. Na jedné straně se neustále zvyšují nároky na množství a kvalitu nadojeného mléka, na straně druhé jsou známé negativní korelace těchto znaků k reprodukci. Problém se zabřeznutím krávy nebo jalovice je často spojený s narůstajícím počtem tzv. tichých, nevýrazných řhjí. Aktuálně je tedy populace dojnic ve stavu zmenšování podílu inseminovaných krav při současném snižování úrovně jejich zabřezávání. Vzhledem k ekonomickému významu plodnosti je tato situace dlouhodobě neudržitelná a také hrozí riziko neschopnosti zabezpečit prostou reprodukci populace, tedy udržení počtu chovaných dojnic. V současné době se hledají cesty, jak tento nepříznivý trend zvrátit.

II. Vlastní popis metodiky

1 Úroveň reprodukce

Úroveň reprodukce skotu a její pravidelnost jsou parametry chovu neustále sledovanými pro jejich vysoký ekonomický význam. Zajištění pravidelné reprodukce je základní podmínkou ekonomické produkce v chovu hospodářských zvířat. U skotu je tato stránka ještě důležitější vzhledem ke skutečnosti, že skot produkuje během relativně dlouhé březosti pouze jedno mládě a březost a porod spouští důležité hormonální mechanismy hospodářsky důležité laktace. Z tohoto pohledu má starý chovatelský požadavek „každý rok od každé krávy tele“ svoji platnost a odráží v sobě i tvrzení zootechnického klasika, že „bez reprodukce není produkce“.

Při zvyšování užitkovosti dochází často ke snižování schopnosti zvířat k reprodukci. Je to stav objektivní, i když některé literární prameny to neuvádějí a považují to za neschopnost chovatelů přizpůsobit podmínky prostředí, především kvality výživy, potřebám zvířat (LeBlanc, 2010).

Současná situace v reprodukci je charakterizována zhoršujícími se ukazateli plodnosti plemenic. Snižování počtu krav a jalovic a s tím související snižující se počet 1. inseminací je v souladu s celkovým trendem v chovu skotu již alarmující. Z procentického zastoupení opakovaných inseminací ve sledovaných intervalech od 1. provedené inseminace je pak zřejmá nízká úroveň detekce říje nebo malý zájem a motivace pracovníků v chovu krav, kteří se zabývají touto problematikou.

Tab. 1 Zabřezávání po první inseminaci, inseminační interval, servis perioda a mezidobí (Kvapilík et al., 2013)

Rok	Březost po první inseminaci (%)			Délka (dnů)		
	Krávy	Jalovice	Celkem	Ins. interv.	SP	Mezidobí
1990	52,2	67,5	56,7	69,1	99,0	383
1998	47,0	63,5	51,7	80,1	115,2	400
2000	44,9	63,2	50,1	82,1	117,1	399
2002	43,3	62,6	48,6	84,9	123,6	404
2004	42,8	62,3	48,4	86,1	124,9	409
2006	41,8	62,0	47,8	85,3	125,8	410
2008	41,7	60,7	47,4	83,0	152,1	412
2009	41,5	60,7	47,2	83,6	122,9	411
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

2 Činitelé ovlivňující plodnost dojnic

Na plodnost působí celá škála vlivů (Walsh et al., 2011). Zejména genetické založení jedince (Hanuš et al., 2010), management stáda (Vacek et al., 2007), systém ustájení (Sawa a Bogucki, 2011), podmínky prostředí (Nardone et al., 2006) a chyby ve výživě dojnic (LeBlanc, 2010), které zapříčiňují negativní energetickou bilanci (NEB) dojnic v první fázi laktace (Stádník et al., 2002), ovlivňují délku postpartálního anestru (Řehák et al., 2012) a zároveň brání úspěšné detekci říje (Palmer et al., 2010).

NEB je v praxi nejčastěji hodnocena pomocí sledování aktuální tělesné kondice (BCS) dojnic (Aktas et al., 2011) a jejich změn (Ducháček et al., 2012). Použití 5 bodové stupnice s odchylkou 0,25 bodu je vhodným nástrojem k detekci NEB (Roche et al., 2009). U krav s extrémními hodnotami BCS (<1,5 a >4) dochází podle Pryce et al. (2000) ke zhoršování reprodukčních ukazatelů. Úroveň metabolismu dojnic můžeme také sledovat pomocí obsahu pevných složek v mléce, zejména tuku a bílkovin a jejich poměru (Hanuš et al., 2011), obsahem acetonu (Clark et al., 2006), močoviny (Řehák et al., 2009) anebo kyseliny citronové (Kubešová et al., 2009) v mléce. Dále můžeme využít jako indikátoru potenciální plodnosti skotu složení cervikálního hlenu dojnic (Zaaijer et al., 1993).

2.1 Vztah metabolických ukazatelů krve, mléka, hlenu a plodnosti

K dosažení vysoké produkce a uspokojivé reprodukce je třeba zajisti řadu nutričních faktorů, které je nutné často ověřit metabolickými profily. Stanovení toxických metabolitů umožňuje určit úroveň proteino-energetického metabolismu ze snadno odejíratelných vzorků tělních tekutin a sekretů (krevní sérum, mléko, cervikální hlen).

Koncentrace močoviny v krvi je parametrem metabolismu dusíkatých látek, neboť je nejen přímým ukazatelem energeticko-proteinové rovnováhy, ale rozhoduje i o dalších způsobech přestupu močoviny do jiných tkání či biologických tekutin, např. mléka a cervikálního hlenu (Hanuš et al., 2004).

Z důvodů snadné dostupnosti vzorků mléka a vysokým korelacím mezi močoviny v tělních tekutinách je nejčastěji analyzována mléčná močovina. Změny ve složení mléka nebo obsah metabolitů zjištěných v bazénových vzorcích mléka mohou být prvním varovným signálem metabolických poruch, resp. produkčních chorob na úrovni stáda. Na základě vyhodnocení zjištěných hodnot je možné upravit nebo řídit režim výživy stáda, který se svou kvalitou podílí 20 až 30 % na úrovni a poruchách plodnosti dojnic i stád (Pechová et al., 2009).

Významným prvkem pro řešení výživy a signály pro nedostatky resp. nevyrovnanost výživy jsou změny v obsahu mléčné močoviny a obsahu bílkovin. Produkce a reprodukce je tedy zřejmě funkcí genetického potenciálu podpořeného dobrou výživou. Z tohoto pohledu je důležitá především **proteino - energetická vyváženost výživy**.

Koncentrace močoviny v mléce je vhodným a aktuálním ukazatelem bilance dusíkaté a energetické složky krmné dávky. Zvýšené resp. snížené obsahy močoviny v mléce indikují vždy nějaké formy odchylek výživy od normy. Obecně jsou nevyhovující obsahy močoviny v mléce spojovány se zhoršenými technologickými vlastnostmi mléka a rovněž nevýhodnými reprodukčními ukazateli.

Říha et al. (2002) uvedli zajímavé výsledky na základě zjištěných hodnot složek mléka a metabolitů, především močoviny a konstatovali, že:

- práce ukázala možnosti zjišťování metabolických ukazatelů a jednoduše odebrání tělní tekutiny s poměrně dobrými vypovídacími schopnostmi a jejich vztah ke stádové a individuální plodnosti;
- poznatky je možné využít v praktické prevenci reprodukčních poruch ve stádech dojníc při formulaci korektur chovatelských postupů s cílem pozitivně modifikovat zdravotní situaci individuálních zvířat.

2.1.1 Močovina v mléce

Močovina v tělních tekutinách je velmi vhodným metabolickým parametrem, neboť se jedná o ukazatel využití jak sacharidů, tak dusíkatých látek, které se na ovlivnění reprodukce z pohledu výživy značně podílí (Kubešová et al., 2009). Močovina je považována za konečný produkt přeměny dusíkatých látek (Řehák et al., 2009).

Jednotlivé dusíkaté látky podléhající v předžaludcích mikrobiální fermentaci se postupně štěpí za vzniku amoniaku, který může být opětovně využíván bachorovou mikroflórou. Přebytek amoniaku se rychle vstřebává přes stěnu předžaludků a odchází portálním krevním oběhem do jater, kde je syntetizován na močovinu (Sova et al., 1990). Ureogeneze představuje pro organismus značnou zátěž, neboť odebírá jaterním buňkám potřebnou energii ve formě ATP a také asparágovou aminokyselinu (Guo et al., 2004). Močovina syntetizovaná v játrech se dostává do krve, odkud přechází do ledvin, kde se z velké části vyloučí močí. Močovina také přechází do ostatních tělních tekutin (mléko, sliny), ale i do reprodukčních orgánů.

Koncentrace močoviny v mléce je ve velmi úzké korelaci s koncentrací močoviny v krvi, proto jsou fyziologické hodnoty v obou těchto biologických tekutinách shodné

a pohybují se v rozmezí 2,5–5 mmol/l (145,2 až 290,4 mg/l) (Pechová, 2009). Nízká úroveň močoviny v mléce indikuje buď nedostatek proteinu v krmné dávce, nebo jeho nedostatečné využití (Guo et al., 2004). Zvýšené koncentrace močoviny v krvi a v mléce mají vliv na snížení reprodukčních schopností a zdravotního stavu laktujících krav (Miglior et al., 2006; Chaveiro et al., 2011). Jankowska et al. (2010) udávají optimální koncentraci močoviny v mléce, umožňující úspěšné zabřeznutí krávy, v rozmezí 150 – 300 mg/l.

Výkyvy v koncentraci močoviny v plazmě nebo mléce korelují s poklesem fertility u krav. Vysoká úroveň močoviny v plazmě je zároveň spojena s vytvořením suboptimálních podmínek pro proces oplození a vývoj embrya. Náročná syntéza močoviny zároveň vede k prohloubení energetického deficitu. Kontrolou hladiny močoviny v mléce a produkce složek je možné zachytit určité metabolické zatížení dojnic a jednotlivými korekcemi upravit krmnou dávku tak, aby zabezpečovala požadovanou úroveň produkce a reprodukce (Hanuš et al., 2004).

Stanovení obsahu močoviny v mléce je analýza standardně dostupná v KU České republiky, resp. v případě zájmu chovatele i mimo systém KU. Z důvodu snadné dostupnosti vzorků mléka se hodnocení úrovně metabolismu dojnic pomocí sledování obsahu mléčné močoviny zdá být velmi výhodné a lze jej chovatelům doporučit.

2.1.2 Aceton v mléce

Koncentrace acetonu v mléce souvisí s výskytem subklinických a klinických ketóz, mléčnou užitkovostí a reprodukční výkonností krav (Gustafsson a Emanuelson, 1996). Ketózy jsou charakteristické odbouráváním tělesných energetických (především tukových) rezerv. Tento jev může vést až k poklesu metabolické funkce jater, ale průběžně také ke vzrůstu obsahu ketonových látek v tělních tekutinách.

Některé ketony mohou být dále metabolizovány, jiné (např. aceton) odcházejí z organismu zpravidla močí, dechem, potem a mlékem. Ketóza vzniká především u dojnic s vysokou dojivostí a vykazuje plíživý charakter nástupu a setrvačnost průběhu. V průběhu ketóz je redukována dojivost i obranyschopnost (riziko zvýšeného výskytu nových mastitidních infekcí) a zhoršena plodnost krav.

Existují vysoké korelace mezi koncentrací ketolátek v krvi a koncentrací acetonu v mléce (Pechová et al., 2009). Podle této autorky by koncentrace acetonu v mléce neměla překročit 0,4 – 1,0 mmol/l (23,2–58,08 mg/l) a za výrazné zvýšení je považován vzestup nad 2 mmol/l (116,16 mg/l). Podle Hanuše et al. (1999) lze při vyšších hladinách acetonu v mléce pozorovat horšící se reprodukci dojnic. Podle Gustafssona a Emanuelsona (1996)

klesá denní dojivost u dojnic s obsahem acetonu v rozmezí 0,7 až 1,4 mmol/l, a u krav s obsahem acetonu >1,4 mmol/l se denní dojivost průkazně snižuje. Zároveň byla u těchto krav narušena reprodukční výkonnost.

Dojnice s koncentrací acetonu v mléce >1,4 mmol/l měly o 4,9 dní delší inseminační interval a 5 až 7 krát větší riziko výskytu ovariálních cyst v porovnání s dojnicemi, které měly obsah acetonu <0,7. Jejich výsledky naznačují, že koncentrace 1,4 mmol/l acetonu v mléce může být použita jako kritická hodnota – vyšší koncentrace snižují mléčnou produkci.

2.2 Cervikální hlen

V době říje je vlivem estrogenů sekrečním epitelem děložního krčku produkováno zvýšené množství hlenu. Spermie úspěšně překonají tuto bariéru jen při vhodných podmínkách (Tsiligianni et al., 2001a). Během říjového cyklu se mění jeho fyzikální vlastnosti. Na počátku říje je čirý, vodnatý a volně odtéká. Uprostřed říje se zahušťuje, je vazký, bez výraznějšího zákalu a vytváří provazec visící ven z pochvy. Ke konci říje hlenu podstatně ubývá a po jejím vyvrcholení se v něm někdy objevuje krev (Sova et al., 1990).

Obr. 1 Hlen v období říje



2.2.1 Složení cervikálního hlenu

Cervikální hlen obsahuje 92–95% vody. Dalšími komponenty cervikálního hlenu, kromě buněčných struktur, jsou polotuhé gelové složky a tekutina zvaná cervikální plasma.

V cervikální plasmě jsou pak rozpuštěny látky s nízkou molekulární hmotností, jako např. elektrolyty, karbohydráty (glukóza a fruktóza), aminokyseliny, lipidy a rozpustné makromolekulární sloučeniny, jako např. proteiny a polysacharidy (Tsiligianni et al., 2001b).

2.2.2 Arborizace (krystalizace) cervikálního hlenu

Cervikální hlen (CH), jakož i některé další tělní tekutiny (např. sliny), vytváří specifické krystalické formy. Krystalizaci CH lze pozorovat 3–4 dny před nástupem říje, intenzivněji pak v době říje, zaniká v době působení progesteronu (Ahmadi et al., 2005).

Posouzením krystalizace CH je možno usuzovat na:

- přítomnost estrogenů v krevní plazmě (Guida et al., 1999);
- fázi říjového cyklu (Hegedüšová et al., 2010);
- výskyt funkčních folikulárních cyst na vaječnících (Hafez a Hafez, 2000);
- úroveň výživy, případně metabolickou poruchu (Na, K) (Ježková et al., 2008);
- přítomnost zánětlivých procesů v pohlavních orgánech (Doležel et al., 2009).

K abnormálním formám krystalizace dochází při zánětlivých onemocněních pohlavního ústrojí. V chovech s neadekvátní výživou, kde dochází ke zkrmování nekvalitních siláží, při nedostatku sušiny a hrubé vlákniny, při poruchách metabolismu bílkovin, glycidů nebo minerálního metabolismu, při intoxikacích apod. dochází k porušení hormonální rovnováhy organismu, ke snížení nebo naopak zvýšení hladiny estrogenů a k biochemickým změnám ve složení cervikálního a děložního sekretu, k poruchám sekrece epitelu děložního krčku. Pro tyto metabolické poruchy jsou charakteristické krystaly ve tvaru nepravidelných hvězdic, mečovitě struktury a jinak nepravidelné krystaly nebo amorfní útvary. Má-li kráva funkční folikulární cysty a poruchy spojené s nadprodukcí estrogenů, lze pozorovat typické kaprad'ovité krystalizace i mimo období říje (Rob a Stehlík, 1983).

Kvalitativní změny hlenu v období říje, projevující se například změnou hodnoty pH a elektrické vodivosti hlenu, umožňují klinickou diagnostiku nejvhodnějšího období říje pro provedení inseminace (Sova et al., 1990).

2.2.3 Přežitelnost spermií v cervikálním hlenu

Spermie v pohlavních orgánech samic musí překonat značné vzdálenosti, aby se dostaly k místu oplození. Během této cesty musí úspěšně projít přes několik bariér. Do děložního krčku proniká pouze malé množství spermií, více než 95 % spermií zůstává

v pochvě, kde během několika hodin odumírají. V kanálku děložního rohu jsou životní podmínky pro spermie mnohem příznivější. Hlen děložního krčku působí jako filtr zadržující neživé spermie a různé mikroorganismy. Mírně kyselá reakce zde způsobuje útlum aktivity spermií, a tím i prodloužení jejich životnosti. Kanálek děložního krčku je tedy jakýmsi rezervoárem spermií, z něhož jsou postupně uvolňovány do dělohy. Další bariérou je pak ústí vejcovodů do děložních rohů (isthmus), který reguluje další postup spermií do vejcovodů (Sova et al., 1990). Jednou z příčin zhoršené plodnosti plemenic je tedy nevhodné prostředí pro spermie v samičích pohlavních orgánech, zejména v děložním krčku. V takovém případě je velmi vhodné ověřit toxicitu cervikálního hlenu pomocí testu přežitelnosti spermií v hlenu.

3 Vlastní výsledky

3.1 Metodické postupy

3.1.1 Vyhodnocení obsahu acetonu a močoviny v tělních tekutinách

V rámci experimentu Výzkumného ústavu pro chov skotu, s. r. o. bylo ve 3 chovech provedeno sledování vlivu spermiotoxických látek na reálnou oplození schopnost spermií a úroveň reprodukce zvířat.

Sledována byla zvířata plemen holštýn (75 ks) a český strakatý skot (26 ks). Od plemenic byl odebrán v den inseminace 1 vzorek krve, mléka a hlenu (101 odběrů). Vzorky cervikálního hlenu byly odebírány sterilní pipetou, rekto-vaginální metodou (Dabas a Maurya, 1988) u skupiny 101 ks plemenic. Odebrané vzorky byly následně transportovány při 4°C do laboratoře Výzkumného ústavu pro chov skotu s.r.o. V laboratoři byly připravovány vzorky na další analýzy. V odebraných vzorcích byly sledovány složky aceton a močovina (metody odběru a analýz popsány níže). Byly vyhodnoceny výsledky analýz u 101 ks vzorků a dále navazující údaje reprodukce a laktace u skupiny 50 ks plemenic.

Na tento výzkum navázal experiment ČZU v Praze, který byl zaměřen na vyhodnocení vztahů mezi obsahem močoviny a acetonu v mléce a cervikálním hlenu dojníc. Od skupiny 64 ks holštýnských plemenic chovaných na univerzitní farmě byl v den inseminace odebrán vzorek mléka a cervikálního hlenu. Odebrané vzorky byly následně posuzovány v laboratoři Katedry speciální zootechniky, ČZU v Praze.

3.1.2 Vyhodnocení kvality cervikálního hlenu

Vzorky cervikálního hlenu byly odebírány sterilní pipetou, rekto-vaginální metodou (Dabas a Maurya, 1988). Odebrané vzorky byly následně transportovány při 4 °C do laboratoře k jejich subjektivnímu a objektivnímu hodnocení. Subjektivně byl sledován jejich charakter a vzhled. Objektivně byla hodnocena jejich hmotnost, pH, krystalizace, obsah acetonu, močoviny a s využitím krátkodobého tepelného testu přežitelnost spermií v CH (spermiotoxicita CH).

Charakter a vzhled vzorků cervikálních hlenů byl posuzován podle předepsané metodiky (Rob a Stehlík, 1983).

Hmotnost byla zjišťována vážením na automatické váze (TB – 224A; Denver Instruments, New York, USA).

Ke zjištění pH byl použit pH metr (330i/set) vybavený pH-elektrodou (Sen Tix Sp) (obojí WTW GmbH, Welheim, Německo).

3.1.2.1 Metoda hodnocení krystalizace hlenu

K detekci říje a určení optimální doby inseminace lze využít metodu posouzení krystalizace – arborizace cervikálního hlenu.

Test arborizace (krystalizace cervikálního hlenu) byl proveden podle standardní metodiky: ze vzorků cervikálních hlenů byly provedeny roztěry na podložní mikroskopická sklíčka.

Po zaschnutí byly roztěry posouzeny mikroskopicky (Nikon Eclipse E200; Nikon® Inc., Tokyo, Japonsko) při 200 násobném zvětšení a byl vyhodnocen typ jejich krystalizace podle standardní metodiky (Hegedüšová et al., 2010; Burdych et al., 2004): 1. větvičkovitá – (V); 2. plavuňovitá – (P); 3. plavuňovitokaprad'ovitá – (P+K); 4. kaprad'ovitá – (K); 5. zbobtnalá – (Z); 6. bez krystalizace – (B); 7. atypická – (A); 8. celularizace – (C).

Pomocí tohoto testu můžeme zjistit:

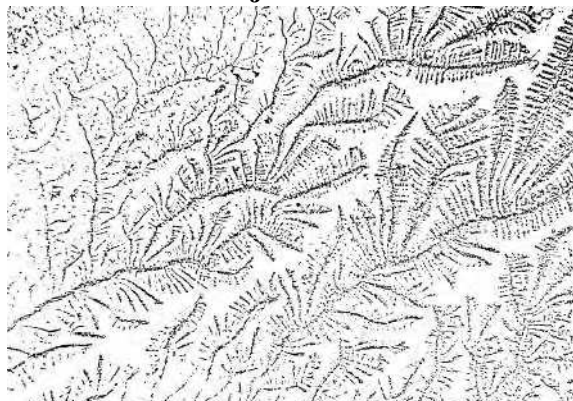
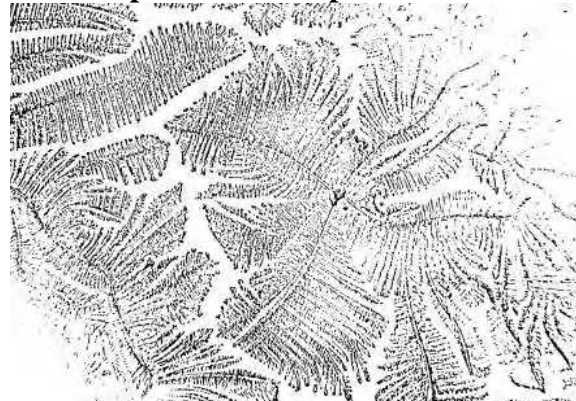
- průběh říje téměř u všech chovaných hospodářských zvířat,
- nejvhodnější dobu k připouštění nebo inseminaci.

Průběh krystalizace lze podle stádia říje rozdělit následovně:

- *období před říjí* – jemné větvičkovité struktury;
- *období těsně před říjí* – zřetelné holé stromkovité větvičky;
- *začátek říje* – plavuně řídké, později zhuštěné, postupně se větvící (obrázek 2);
- *polovina říje* – forma plavuňovito-kaprad'ovitá (obrázek 3);
- *druhá polovina říje* – kaprad'ovitá krystalizace, která se až do ovulace zhušťuje a členitě se větví;
- *po skončení říje* – objevují se krystaly, které bobtnají a rozpadají se;
- *ve fázi žlutého tělíska* – krystaly se netvoří, u nezabřezlé plemenice se objevují až po 17. – 18. dni cyklu (Rob a Stehlík, 1983).

Tab. 2 Hodnocení krystalizace hlenu

Druh krystalizace	Označení	Inseminace	Poznámka
větvičkovitá	V	předčasná	inseminovat za 10-14 hodin a opakovat kontrolu krystalizace
smíšená forma	V+P	předčasná	
plavuňovitá	P	předčasná, je ji ale možné provést	pokud přetrvávají příznaky říje za 10-12 hodin provést reinseminaci
smíšená forma	P+K	vhodná	
kaprad'ovitá	K	vhodná	
zbojtnalá	Z	nehodná	poříjové období
atypická	A	nehodná	metabolické poruchy
celularizace	C	nehodná	zánět

Obr. 2 Počátek říje**Obr. 3 Optimální doba pro inseminaci**

3.1.2.2 Stanovení obsahu acetonu

Aceton byl stanovován na plynovém chromatografu (Master GC; DANI Instruments S.p.A., Cologno, Monzese, Itálie) upravenou head-space metodou: vzorky krve, mléka nebo hlenu byly odměřeny do 20 ml head-space vialek a do každé vialky bylo přidáno 10 ml nasyceného roztoku NaCl. Vialky byly následně ponořeny do vodní lázně, vytemperované na 70 °C na dobu 1 hodiny. Po této době byly vialky vyjmuty a odpipetovalo se 5 µl plynu z horní části každé vialky, pomocí gas mikropipety do injektoru s teplotním režimem 50 °C (1 minuta), po 10 °C/1 minutu až do 55 °C s výdrží 1 minuty. Byla použita kolona typu FAMEVAX o délce 30 m. Pro detekci vzorku byl použit detektor FID. Výsledná koncentrace acetonu ve vzorku byla vyhodnocena v závislosti na kalibrační acetonové řadě pomocí softwaru Clarity[®], Verze 5.2 (Data Apex, s. r. o., Praha, Česká republika).

3.1.2.3 Stanovení obsahu močoviny

Obsah močoviny byl stanovován spektrofotometricky při vlnové délce 528 nm na spektrofotometru (GENESYS 10vis; Thermo Fischer Scientific Inc., Madison, USA) podle upravené metodiky pro stanovení močoviny v odpadní vodě (Merck, 2012): vzorky krve, mléka nebo hlenů byly naváženy do kádinek a naředěny podle potřeby destilovanou vodou (5 ml). Následně byly vzorky homogenizovány pomocí přístroje SilentCrusher M (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Německo). Do odměrných baněk bylo následně odpipetováno 0,5 ml zhomogenizovaných vzorků a doplněno destilovanou vodou na objem 5 ml. Poté byla připravena série kalibračních vzorků a slepý pokus podle návodu. Do všech baněk, včetně kalibračních vzorků a slepého pokusu, bylo přidáno 15 ml předem připraveného činidla podle návodu. Poté byly baňky vloženy do sušárny, vyhřáté na 120 °C, na dobu 40 min. Po této době byly baňky vyjmuty, ochladily se na 20 °C a doplnily destilovanou vodou po rysku (na celkový objem 25 ml). Obsah baněk byl následně promíchán a změřen na spektrofotometru v 1 cm kyvetě při vlnové délce 528 nm. Poté byla sestrojena kalibrační křivka, ze které byly odečteny hodnoty obsahu močoviny ve vzorku, které byly následně přepočteny na mg/l.

3.1.2.4 Test přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu

Přežitelnost spermií byla hodnocena pomocí rozdílné motility spermií, která byla posuzována subjektivně za použití mikroskopu s fázovým kontrastem (Nikon Eclipse E200; Nikon® Inc., Tokyo, Japonsko) při 200 násobném zvětšení. Motilita byla odečtena na počátku krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu a následně po 30, 60 a 90 min. jeho trvání v suchém termostatu (Thermo-block FALC; Falc Instruments s.r.l., Treviglio, Bergamo, Itálie) při teplotě 38 ± 1 °C. V testu byly použity inseminační dávky vybraného holštýnského býka, které byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 38 ± 1 °C a vloženy do predehřáté zkumavky s cervikálním hlenem nebo fyziologickým roztokem (0,9% NaCl, pH 6,8 – kontrolní vzorky).

3.1.3 Vyhodnocení vlivu kvality cervikálního hlenu na přežitelnost spermií

V 1 chovu byl sledován vliv kvality cervikálního hlenu na přežitelnost spermií býků se známou plodností. Kvalita cervikálního hlenu byla vyjádřena obsahem acetonu, močoviny a posouzením krystalizace. Přežitelnost spermií byla hodnocena subjektivně pomocí rozdílné motility spermií v čase 0, 30, 60 a 90 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu.

Pro potřeby statistického vyhodnocení byl soubor sledovaných plemenic rozdělen na 8 skupin podle krystalizace cervikálního hlenu a na 3 skupiny podle obsahu acetonu nebo močoviny v hlenu. Pro vyhodnocení byla použita následující modelová rovnice:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + e_{ij};$$

Y_{ij} = hodnota závisle proměnné (motilita spermií na počátku, po 30, 60 a 90 minutách krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu);

μ = průměrná hodnota závisle proměnné;

A_i = fixní efekt i – té skupiny podle krystalizace CH (i = sk. 1 – větvičkovitá krystalizace, $n = 10$; sk. 2 – plavuňovitá krystalizace, $n = 10$; sk. 3 – plavuňovito-kaprad'ovitá krystalizace, $n = 27$; sk. 4 – kaprad'ovitá krystalizace, $n = 59$; sk. 5 – zbobtnalá krystalizace, $n = 32$; sk. 6 – bez krystalizace, $n = 6$; sk. 7 – atypická krystalizace, $n = 32$; sk. 8 – celularizace, $n = 16$) nebo obsahu acetonu v CH (i = do 5,25 mg/l, $n = 59$; od 5,26 do 14,51 mg/l, $n = 70$; od 14,52 mg/l, $n = 52$) nebo obsahu močoviny v hlenu (i = do 260,40 mg/l, $n = 61$; od 260,41 do 524,92 mg/l, $n = 61$; od 524,93 mg/l, $n = 70$);

e_{ij} = zbytková chyba.

3.2 Výsledky sledování

3.2.1 Sledování obsahu acetonu a močoviny v tělních tekutinách

V experimentech Výzkumného ústavu pro chov skotu, s. r. o. byl sledován obsah acetonu a močoviny v tělních tekutinách (krevním séru, mléce a hlenu). Výsledky jsou uvedeny v tab. 3. Zjistili jsme, že obsah močoviny v CH byl signifikantně ($P < 0,001$) vyšší ($123,84 \pm 167,28$ mg/l) než v krevním séru ($32,10 \pm 9,89$ mg/l) a v mléce ($31,36$ mg/l $\pm 21,10$). Obsah močoviny v mléce a krevním séru se signifikantně nelišil ($P = 0,061$). Obsah acetonu v CH byl $5,46 \pm 8,63$ mg/l, v mléce $2,48 \pm 11,81$ mg/l a v krevním séru $3,08 \pm 8,55$ mg/l. Tyto dosažené hodnoty se mezi sebou signifikantně lišily ($P < 0,01$). Na základě těchto dosažených výsledků můžeme konstatovat, že toxické metabolity (aceton, močovina) se hromadí převážně v pohlavních orgánech krav. Tyto toxické komponenty mohou mít vliv na skutečnou oplozovací schopnost spermií a úroveň reprodukce u vysokoprodukčních a metabolicky stresovaných zvířat. Vyšší koncentrace acetonu a močoviny v CH než v mléce byla detekována také v práci Beran et al. (2012). Vyššímu zastoupení močoviny v mléce odpovídal vyšší obsah močoviny, resp. acetonu v CH, který může omezovat schopnost dojnice zabřeznout, přičemž jako hraniční hodnota obsahu močoviny v mléce byla stanovena 250 mg/l.

Tab. 3 Hodnoty acetonu a močoviny v tělních tekutinách (n = 101)

Výsledky	krevní sérum		mléko		hlen	
	aceton (mg/l)	močovina (mg/100 ml)	aceton (mg/l)	močovina (mg/100 ml)	aceton (mg/l)	močovina (mg/100 ml)
min	0,16	13,32	0,13	12,39	0,01	15,27
max	13,53	1519,55	30,03	60,74	5,65	58,83
\bar{x}	5,46	123,84	2,48	31,36	3,08	32,10
s	8,63	167,28	11,81	21,10	8,55	9,89

Obsah močoviny a acetonu v mléce a v hlenu v den inseminace byly sledovány také v rámci experimentu ČZU v Praze v roce 2011 u skupiny 64 ks plemenic vybraných z celkového počtu 382 plemenic chovaných na univerzitní farmě. Výsledky toho sledování jsou uvedeny v tab. 4.

Průměrný obsah močoviny v mléce ve sledované skupině dojnic byl 224,69 mg/l, což je v souladu s prací od Jankowska et al. (2010). Oproti tomu průměrný obsah močoviny v hlenu byl výrazně vyšší a to 746,13 mg/l, což odpovídá zjištěním Hegedüšové et al. (2009). Průměrný obsah acetonu v mléce byl 2,56 mg/l a v cervikálním hlenu 4,6 mg/l. Hanuš et al. (2004) uvádějí obsah acetonu v mléce a krvi do 5 mg/l jako fyziologicky přiměřený pro zdravá zvířata, zatímco Hegedüšová et al. (2009) zjistili v cervikálním hlenu vyšší průměrný obsah acetonu. Vyšší průměrné zastoupení obsahu močoviny a acetonu v cervikálním hlenu lze vysvětlit lepší stabilitou a menší úrovní oxidace těchto produktů metabolismu v cervikálním hlenu a zvýšenou kumulací toxických metabolitů v pohlavních orgánech plemenic. Byly tak potvrzeny předchozí výsledky Výzkumného ústavu pro chov skotu, s. r. o.

Tab. 4 Hodnoty acetonu a močoviny v mléce a CH (n = 64)

Výsledky	mléko		hlen	
	aceton (mg/l)	aceton (mg/l)	močovina (mg/l)	močovina (mg/l)
min	0,39	1,49	43,15	77,50
max	11,26	13,6	2464,21	362,95
\bar{x}	2,56	4,6	746,13	224,69
s	2,13	3,33	638,06	61,27

3.2.2 Hodnocení krystalizace hlenu

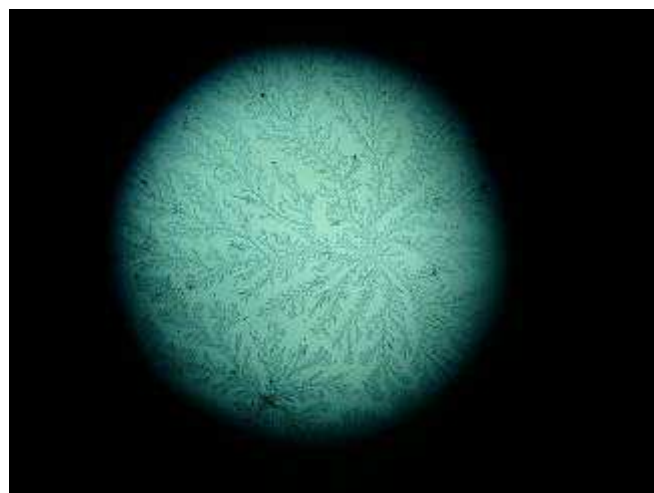
V letech 2008-2009 byly v rámci experimentu Výzkumného ústavu pro chov skotu, s. r. o., odebírány vzorky cervikálního hlenu (CH) v den inseminace u skupiny krav

ve vybraných chovech. Arborizace CH byla hodnocena mikroskopicky. Hleny byly zařazeny do jednotlivých skupin podle druhu krystalizace a byla vyhodnocena úspěšnost inseminace (zabřezávání) jednotlivých plemenic – tab. 5; obr. 4 – 8 (Foto: Zdenka Hegedúšová). Tyto výsledky již byly publikovány v práci Hegedúšová et al. (2010).

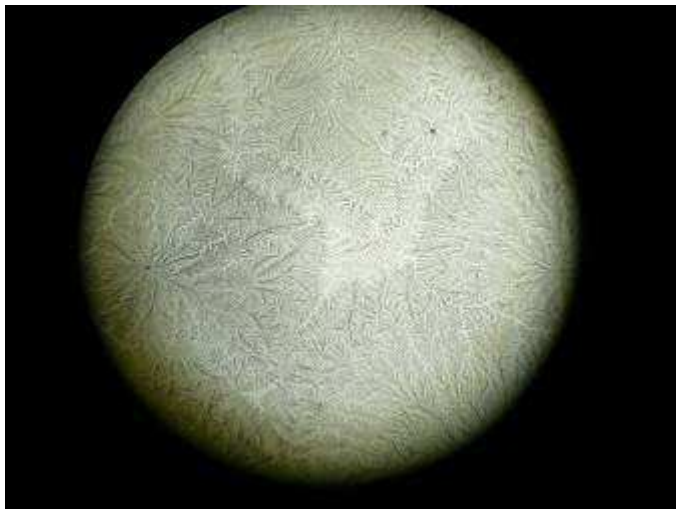
Tab. 5 Sledování krystalizace hlenů (n = 44)

Počet odebraných vzorků (n)	Druh krystalizace	Počet zabřezlých plemenic (n)	% zabřezávání
15	P	8	53,33
20	K	15	75,00
5	V	2	20,00
4	Z	0	0,00

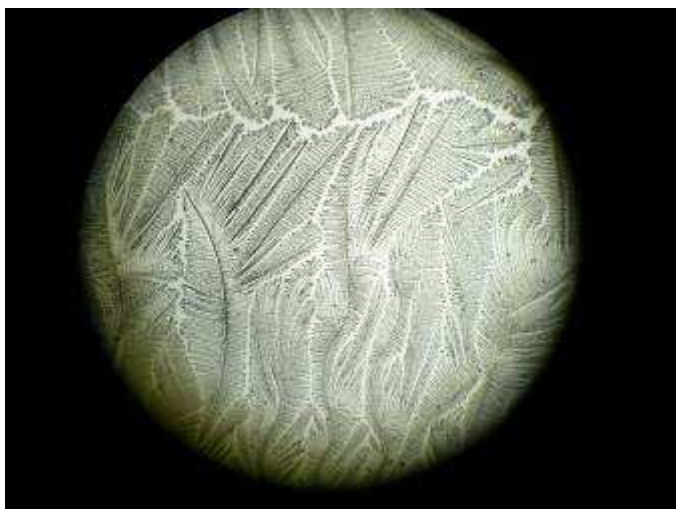
Obr. 4 Foto – větvičkovitá krystalizace



Obr. 5 Foto – plavuňovitá krystalizace



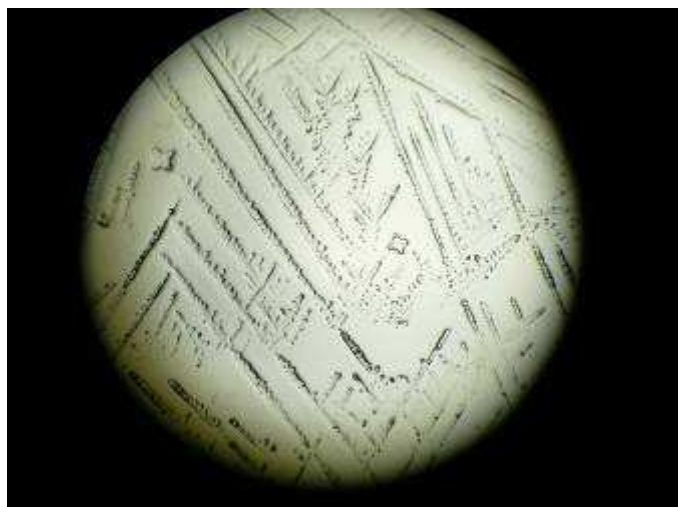
Obr. 6 Foto – kaprad'ovitá krystalizace



Obr. 7 Foto – zbobtnalá krystalizace



Obr. 8 Foto – atypická krystalizace



Krystalizace CH byla dále hodnocena v rámci experimentu ČZU v Praze v letech 2009-2012 u 595 vzorků hlenů, odebraných od skupiny 192 ks holštýnských plemenic, chovaných na univerzitní farmě.

Výsledky tohoto sledování jsou uvedeny v tab. 6. Hodnota aritmetického průměru (\bar{x}) u jednotlivých typů krystalizace udává jejich procentické zastoupení ve sledovaném souboru. Větvičkovitá a plavuňovitá krystalizace se vyskytovala shodně v 5,2% případů, plavuňovito-kaprad'ovitý typ krystalizace byl detekován u 14,1% vzorků, kaprad'ovitá krystalizace měla zastoupení z 30,7% hodnocených vzorků, zbobtnalá a atypická krystalizace se vyskytovala u 16,7% vzorků, celularizace z 8,3% a hleny bez krystalizace se vyskytovaly z 3,1% případů.

Tab. 6 Základní statistické charakteristiky krystalizace CH (n = 595)

Druh krystalizace	\bar{x} (%)	s	V (%)
Větvičkovitá	5,2	8,18	1216,55
Plavuňovitá	5,2	21,90	434,34
Plavuňovito-kaprad'ovitá	14,1	34,32	252,12
Kaprad'ovitá	30,7	47,72	136,52
Zbobtnalá	16,7	43,17	174,72
Bez krystalizace	3,1	17,60	551,06
Atypická	16,7	35,36	241,85
Celularizace	8,3	17,60	551,06

Ježková et al. (2007) hodnotili výsledky reprodukce a zdravotní stav u 391 holštýnských krav a determinovali vztahy mezi těmito výsledky a testem přežitelnosti spermií během 30, 60 a 90 minut v CH. Vysoké procento zabřezávání bylo zjištěno u krav s kaprad'ovitou krystalizací CH ($P < 0,01$). Výsledky testu krystalizace CH ovlivnily výsledky

testu přežitelnosti spermií. Nejvyšší pohyblivost spermií po 30, 60 a 90 minutách testu byla zjištěna v případech plavuňovité a kaprad'ovité krystalizace CH ($P < 0,05$).

Nejnižší motilita spermií ve všech časech byla dosažena v hlenech s žádnou nebo atypickou krystalizací ($P < 0,05$ resp. $P < 0,01$). Tyto výsledky byly potvrzeny o rok později (Ježková et al., 2008). Nejlepších výsledků ($P < 0,01$) v zabřezávání (62,74%) dosahovaly dojnice, u nichž byly zjištěny v testu arborizace CH kaprad'ovité struktury (tzn. optimální doba pro inseminaci). Nejvyšší aktivita spermií ($P < 0,05$) byla detekována v případech plavuňovito–kaprad'ovité a kaprad'ovité krystalizace CH v čase 60 (14,8 a 13,82%) a 90 (7,96 a 8,47%) minut.

Matoušek et al. (1989) zkoumali prostupnost býčího spermatu cervikálním hlenem a dalšími tělními tekutinami (krevním sérem, ovariální tekutinou a semennou plazmou). Dospěli k závěru, že typ krystalizace a složení proteinů CH má signifikantní vliv na rychlost průniku spermií a na jejich pohyblivost. Vztahem mezi pohyblivostí spermií a ultrastrukturou cervikálního hlenu se zabývali také Rutlant et al. (2005).

3.2.3 Vliv kvality cervikálního hlenu dojnic na přežitelnost spermií

Vztahy mezi kvalitou CH dojnic, vyjádřenou jejich krystalizací a obsahem močoviny a acetonu a přežitelností spermií byly determinovány pomocí modelové rovnice. Průkaznosti vlivu jednotlivých faktorů tohoto modelu jsou uvedeny v tab. 7.

Z této tabulky vyplývá, že vliv krystalizace byl vysoce statisticky významný ($P < 0,001$) na motilitu spermií na počátku a po 30 a 60 minutách trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v CH, na motilitu spermií po 90 min. testu byl vliv krystalizace statisticky středně významný ($P < 0,01$).

Vliv obsahu močoviny v CH byl statisticky významný ($P < 0,05$) na motilitu spermií po 30 min. testu, statisticky středně významný ($P < 0,01$) na motilitu spermií na počátku testu přežitelnosti a statisticky nevýznamný ($P > 0,05$) na motilitu spermií po 60 a 90 minutách testu.

Vliv obsahu acetonu v CH byl statisticky středně významný ($P < 0,01$) na motilitu spermií po 90 min. a statisticky vysoce významný ($P < 0,001$) na motilitu spermií na počátku testu a po 30 a 60 minutách jeho trvání.

Vysoce statisticky průkazné závislosti ($P < 0,001$) byly detekovány mezi obsahem močoviny v CH a krystalizací a mezi obsahem acetonu v CH a motilitou spermií v čase 0, 30 a 60 min. trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií.

Středně statisticky významné závislosti ($P < 0,01$) byly detekovány mezi krystalizací CH a obsahem acetonu v CH a motilitou spermií v čase 30 a 60 min. trvání testu; mezi obsahem močoviny v CH a motilitou spermií po 60 a 90 min. trvání testu a mezi obsahem acetonu v CH a motilitou spermií po 90 min. testu.

Statisticky nízce významné korelace ($P < 0,05$) byly potom detekovány mezi krystalizací CH a motilitou spermií po 90 min. testu a mezi obsahem močoviny v CH a motilitou spermií po 30 min. trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií.

Tab. 7 Průkaznost vlivu jednotlivých faktorů modelu

Znak	Model		Krystaliace		MocHlen (mg/l)		AcetHlen (mg/l)	
	r^2	P	F-test	P	F-test	P	F-test	P
AKT 0	0,32	<0,001	3,82	<0,001	6,24	<0,01	24,52	<0,001
AKT 30	0,36	<0,001	7,69	<0,001	3,90	<0,05	16,06	<0,001
AKT 60	0,31	<0,001	5,30	<0,001	0,95	0,3874	12,45	<0,001
AKT 90	0,23	<0,001	3,47	<0,01	0,30	0,7421	5,79	<0,01

Vysvětlivky: MocHlen = obsah močoviny v cervikálním hlenu; AcetHlen = obsah acetonu v cervikálním hlenu; AKT0–90 = motilita spermií v čase 0, 30, 60 a 90 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu.

3.2.3.1 Vliv krystalizace cervikálního hlenu

Výsledky vyhodnocení vlivu krystalizace CH na přežitelnost spermií jsou uvedeny v tab. 8. Z této tabulky vyplývá, že motilita spermií byla na počátku a po 30 a 60 minutách trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií nejvyšší u krav s plavuňovitou krystalizací (68,75%; 70,02%; 47,02%), s kapraďovitou krystalizací (59,60%; 55,32%; 44,10%), s plavuňovito-kapraďovitou krystalizací (56,56%; 52,34%; 42,70%) a zbobtnalou krystalizací (54,87%; 49,05%; 37,64).

Po 90 minutách trvání testu byly nejvyšší hodnoty motility spermií nalezeny u krav s kapraďovitou (33,06%), plavuňovito-kapraďovitou (30,36%) a zbobtnalou krystalizací (26,59%). Nejnižší hodnoty motility spermií byly na počátku a v průběhu celého testu detekovány u krav bez krystalizace CH (36,13%; 12,26%; 4,70%; 2,96%), s atypickou krystalizací (45,15%; 37,23%; 30,68%; 22,52%), s větvičkovitou krystalizací (46,49%; 44,18%; 24,22%; 3,67%) a celularizací (46,68%; 32,93%; 25,04%; 12,98%). Rozdíly mezi nejnižšími a nejvyššími hodnotami motility spermií byly v průběhu celého testu průkazné na hladinách významnosti ($P < 0,05 - 0,001$).

Tab. 8 Vliv krystalizace cervikálního hlenu na přežitelnost spermií

Krystalizace	AKT0 (%)		AKT30 (%)		AKT60 (%)		AKT90 (%)	
	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
V	46,49	10,69	44,18 ^a	12,74	24,42	14,22	3,67	15,36
P	68,75 ^{a,A}	10,69	70,02 ^A	12,75	47,02 ^A	14,22	23,95	15,36
P+K	56,56 ^{a,A}	2,28	52,34 ^A	2,72	42,70 ^A	3,03	30,63 ^A	3,28
K	59,60 ^A	1,99	55,32 ^{a,A}	2,37	44,10 ^{a,A}	2,65	33,06 ^{a,A}	2,86
Z	54,87 ^{a,A}	1,66	49,05 ^{b,A}	1,98	37,64 ^{b,A}	2,21	26,59 ^{a,A}	2,38
B	36,13 ^{a,B}	4,71	12,26 ^{b,B,C}	5,62	4,70 ^B	6,27	2,96 ^B	6,77
A	45,15 ^{b,B}	2,66	37,23 ^B	3,17	30,68 ^{A,B}	3,53	22,52 ^{b,A}	3,82
C	46,68 ^{b,A,B}	3,39	32,93 ^B	4,05	25,04 ^{a,A,B}	4,51	12,98 ^{b,B}	4,88

Vysvětlivky: V = větvičkovitá krystalizace; P = plavuňovitá krystalizace; P + K = plavuňovito-kaprad'ovitá krystalizace; K = kaprad'ovitá krystalizace; Z = zbobtnalá krystalizace; B = vzorek bez krystalizace; A = Atypická krystalizace; C = celularizace; AKT0–90 = motilita spermií na počátku a po 30, 60 a 90 minutách krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu; rozdílná písmena v horním indexu znamenají statisticky průkazný rozdíl mezi řádky v rámci jednoho sloupce – a, b = $P < 0,05$; A, B, C = $P < 0,01$.

3.2.3.2 Vliv obsahu močoviny v cervikálním hlenu

Výsledky vlivu obsahu močoviny v CH na přežitelnost spermií jsou uvedeny v tab. 9. Nejvyšší hodnoty motility spermií byly v průběhu celého krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v CH detekovány u krav ve skupině 1 (58,56%; 50,38%; 35,43%; 21,28%). Nejnižší hodnota motility spermií byla na počátku a na konci testu detekována u krav ve skupině 3 (48,27% resp. 17,91%), po 30 a 60 min. trvání testu byly potom nejvyšší hodnoty motility detekovány u krav ve skupině 2 (40,22% a 29,79%).

Rozdíly mezi nejvyššími a nejnižšími hodnotami motility spermií byly na počátku testu vysoce statisticky průkazné ($P < 0,001$). Po 30 min. jeho trvání byl rozdíl mezi skupinami 1 a 3 pouze statisticky nízce významný ($P < 0,05$) a mezi skupinami 1 a 2 středně významný ($P < 0,01$). Po 60 a 90 min. byly rozdíly mezi skupinami neprůkazné ($P > 0,05$).

Tab. 9 Vliv obsahu močoviny v cervikálním hlenu na přežitelnost spermií

Skupina	MocHlen (mg/l)	AKT0 (%)		AKT30 (%)		AKT60 (%)		AKT90 (%)	
		LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
1	do 260,40	58,56 ^A	2,62	50,38 ^{a,A}	3,12	35,43	3,48	21,28	3,76
2	260,41-542,92	48,50 ^B	2,61	40,22 ^b	3,11	29,79	3,47	19,46	3,74
3	od 524,93	48,27 ^B	2,66	41,89 ^B	3,17	30,90	3,54	17,91	3,82

Vysvětlivky: MocHlen = obsah močoviny v cervikálním hlenu; AKT0–90 = motilita spermií v čase 0, 30, 60 a 90 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu; rozdílná písmena v horním indexu znamenají statisticky průkazný rozdíl mezi řádky v rámci jednoho sloupce – a, b = $P < 0,05$; A, B = $P < 0,01$.

3.2.3.3 Vliv obsahu acetonu v cervikálním hlenu

Výsledky vlivu obsahu acetonu v CH na přežitelnost spermií jsou uvedeny v tab. 10. Nejvyšší hodnoty motility spermií byly ve všech sledovaných časech trvání testu přežitelnosti spermií detekovány u krav ve skupině 1 (60,24%; 52,15%; 40,09% a 25,44%) a nejnižší hodnoty motility spermií byly opět ve všech sledovaných časech detekovány u krav ve skupině 3 (46,31%; 38,09%; 27,26% a 15,69%). Rozdíly mezi uvedenými skupinami byly v čase 0 až 60 min. vysoce statisticky významné ($P < 0,001$) a po 90 min. statisticky středně významné ($P < 0,01$).

Tab. 10 Vliv obsahu acetonu v cervikálním hlenu na přežitelnost spermií

Skupina	AcetHlen (mg/l)	AKT0 (%)		AKT30 (%)		AKT60 (%)		AKT90 (%)	
		LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE
1	do 5,25	60,24 ^A	2,43	52,15 ^A	2,89	40,09 ^A	3,23	25,44 ^A	3,50
2	5,26-14,51	48,79 ^B	2,30	42,26 ^B	2,74	28,76 ^B	3,06	17,51 ^B	3,30
3	od 14,52	46,31 ^B	2,41	38,09 ^B	2,87	27,26 ^B	3,20	15,69 ^B	3,46

Vysvětlivky: AcetHlen = obsah acetonu v cervikálním hlenu; AKT0–90 = motilita spermií v čase 0, 30, 60 a 90 min. krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu; rozdílná písmena v horním indexu znamenají statisticky průkazný rozdíl mezi řádky v rámci jednoho sloupce – A, B = $P < 0,01$.

4 Závěr a doporučení pro praxi

Porovnání obsahu močoviny a acetonu v krvi, mléce a hlenu

Obsah močoviny byl průkazně ($P < 0,001$) vyšší v hlenu než v mléce a krvi. Z výsledků je dále patrný trend zvyšujícího se obsahu močoviny, resp. acetonu v hlenu v závislosti na vyšším obsahu močoviny, resp. acetonu v mléce ($P < 0,05 - 0,01$). Lze konstatovat, že toxické metabolity (aceton, močovina) se hromadí převážně v pohlavních orgánech plemenic a jejich sekretech.

Vliv kvality cervikálního hlenu dojnic na přežitelnost spermií

Kvalita cervikálního hlenu byla v tomto hodnocení vyjádřena jeho krystalizací a obsahem močoviny a acetonu, přežitelnost spermií byla hodnocena pomocí motility spermií v čase 0, 30, 60 a 90 min. trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti spermií v hlenu. Průkazně ($P < 0,05 - 0,01$) nejvyšší hodnoty motility spermií byly v průběhu celého testu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu detekovány u krav s plavuňovitou, plavuňovito-kaprad'ovitou a kaprad'ovitou krystalizací, tedy u krav v optimální době pro inseminaci. Z výsledků je dále patrný trend klesající úrovně motility spermií v závislosti na zvyšujícím se obsahu močoviny (nad 260 mg/l), resp. acetonu (nad 5,25 mg/l) ve vzorcích cervikálního hlenu ($P < 0,05 - 0,001$). Vyšší intenzita poklesu motility spermií byla zjištěna u acetonu (-12,5%) než u močoviny (-6,67%). Z pohledu přežitelnosti spermií v cervikálním hlenu je tedy možné stanovit optimální hladinu močoviny do 260 mg/l a acetonu do 5,25 mg/l.

Na základě dosažených výsledků lze chovatelům skotu doporučit sledovat úroveň metabolismu chovaných dojnic pravidelným monitoringem jejich tělesné kondice a pomocí obsahu močoviny v mléce. Vzorky mléka jsou od dojnic snadno získatelné a analýza obsahu močoviny v mléce je chovatelům standardně dostupná v rámci KU.

Pro stanovení nejvhodnější doby pro inseminaci a pro rozhodnutí, zda dané zvíře vůbec inseminovat, lze chovatelům doporučit posouzení cervikálního hlenu dojnic. Test arborizace (krystalizace) cervikálního hlenu je velmi jednoduchý na provedení a vyhodnocení. Přesné stanovení optimální doby pro inseminaci má společně s metabolickou kvalitou cervikálního hlenu zásadní význam pro individuální schopnost dojnice zabřeznout.

III. Srovnání „novosti postupů“

V metodice jsou uvedeny metody, vlastními výsledky výzkumně ověřené metodické postupy sledování kvality cervikálního hlenu. Uváděné informace jsou výsledkem výzkumné činnosti autorů a výsledkem systematického studia vědecké literatury v oblasti metod v reprodukci hospodářských zvířat.

IV. Popis uplatnění metodiky

Metodika bude vhodnou pomůckou pro podnikatele v zemědělství, ve šlechtění v chovu skotu při realizaci zvyšování konkurenceschopnosti zemědělství – chovu skotu (osa I PRV, priorita 1.1. Modernizace, inovace a kvalita, 1.2. Přenos znalostí) uplatněním progresivních technologických postupů v reprodukci skotu.

Předložená publikace poskytne informace pracovníkům šlechtitelských organizací, poradcům, chovatelům, pracovníkům v živočišné výrobě. Výsledky jsou využitelné v procesu průběžného vzdělávání a v pedagogické činnosti.

V. Ekonomické aspekty

Reprodukce dojníc je jedním z hlavních problémů současného chovu nejen u nás, ale i ve světě.

Ekonomický přínos, který je umožněn realizací navrhovaných opatření při detekci říje lze spatřovat ve zkrácení mezidobí, snížení spotřeby inseminačních dávek na zabřeznutí každé plemenice u které byla určena optimální doba pro její zapaštění. Mezi další přínosy lze zařadit zvýšení natality a následně počtu odchovaných telat. V důsledku lze očekávat celkové snížení nákladů na krmný den. Na základě dosažených výsledků lze chovatelům skotu doporučit sledovat úroveň metabolismu chovaných dojníc pravidelným monitoringem jejich tělesné kondice a pomocí obsahu močoviny v mléce. Vzorky mléka jsou od dojníc snadno získatelné a analýza obsahu močoviny v mléce je chovatelům standardně dostupná v rámci KU.

Náklady na zavedení metody sledování optimálního stádia říje tzv. "krystalizací cervikálních hlenů" říjí se krávy, spočívají v zakoupení následujících pomůcek chovatelem. Jsou to mikroskop s možným zvětšením obrazu 100 až 200 násobným. K tomuto účelu postačí obyčejný mikroskop v ceně do 300 - 500 Kč. Dále jsou potřeba mikroskopická sklíčka podložní - plochá, 1% roztok NaCl, sterilní pipeta nebo skleněná tyč na odběr hlenů. Cena v podstatě zanedbatelná, vzhledem k přínosům pro chovatele.

V podmínkách ČR představuje prodloužení délky mezidobí nad optimální hranici ekonomickou ztrátu 63-72 Kč na 1 krmný den (Kvapilík a Vacek, 2011). Současná průměrná hodnota mezidobí dojníc je podle výsledků kontroly užítkovosti 407 dnů, tedy o 42 dnů nad optimální délku 365 dnů. Při průměrné ztrátě 67 Kč na krmný den a počtu dojníc v kontrole užítkovosti 288 015 ks lze odhadnout celkovou roční ztrátu více než 810 mil. Kč (42 dnů mezidobí * 67 Kč na 1 den * 288 015 dojníc v KU = 810.474.210,- Kč). Uvedená částka dokumentuje vysoký ekonomický význam dané problematiky a potenciální přínos použití uvedených metod.

VI. Seznam použité související literatury

- Ahmadi, M. R., Kafī, M., Ghodrat, M. 2005. Crystallization and the number of neutrophils increase in the cervical mucus as parturition approaches in dairy cows. *Comparative Clinical Pathology*. 14. 72–75.
- Aktas, M. S., Ozkanlar, S., Ucar, O., Ozkanlar, Y., Kaynar, O., Aytekin, I. 2011. Relationships between Body Condition Score and some metabolic blood parameters in early lactating dairy cows. *Revue De Medecine Veterinaire*. 162 (12). 586–592.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Okrouhlá, M. 2012. Porovnání obsahu močoviny a acetonu v mléce a cervikálním hlenu dojnic. *Náš chov*. 72 (2). 14–16.
- Burdych, V., Všetečka, J., Divoký, L., Brychta, J., Stejskalová, E., Kvapilík, J. 2004. *Reprodukce ve stádech skotu*. Chovservis a. s. Hradec Králové. říjen 2004. 72 s.
- Clark, C. E. F., Fulkerson, W. J., Nandra, K. S., Smith, H., Macmillan, K. L. 2006. Pattern of change in the concentration of milk acetone and its association with ovaria activity for pasture-based cows in early lactation. *Livestock Science*. 105 (1–3). 144–150.
- Dabas, V. P. S., Maurya, S. N. 1988. A field method of collection of bovine cervical mucus for microbiological studies. *Indian Journal of Animal Reproduction*. 9. 138–139.
- Doležel, R. 2009. Záněty pohlavních orgánů. In: Hofírek, B, Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a. s. Brno. s. 502–510. ISBN: 9788086542195.
- Ducháček, J., Vacek, M., Stádník, L., Beran, J., Okrouhlá, M. 2012. Changes in milk fatty acid composition in relation to indicators of energy balance in holstein cows. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*. 60 (1). 29–37.
- Guida, M., Tommaselli, G. A., Palomba, S., Pellicano, M., Moccia, G., Di Carlo, C., Nappi, C. 1999. Efficacy of methods for determining ovulation in a natural family planning program. *Fertility and Sterility*. 72 (5). 900–904.
- Gustafsson, A. H., Emanuelson, U. 1996. Milk acetone concentration as an indicator of hyperketonaemia in dairy cows: The critical value revised. *Animal Science*. 63. 183–188.
- Guo, K., Russek-Cohen, E., Varner, M. A., Kohn, R. A. 2004. Effects of milk urea nitrogen and other factors on probability of conception of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 87 (6). 1878–1885.
- Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 509.

- Hanuš, O., Skyva, J., Ficnar, J., Jílek, M., Ticháček, A., Jedelská, R., Dolínková, A. 1999. Poznámky k interpretačním postupům hodnocení výsledků obsahů ketonů a acetonu (Ketotest) v individuálních vzorcích mléka. *Výzkum v chovu skotu*. 41 (4). 17–34.
- Hanuš, O., Frelich, J., Kron, V., Říha, J., Pozdíšek, J. 2004. *Kontrola tělesné kondice, zdravotního stavu a výživy dojníc a zlepšování jejich produkce*. Ústav zemědělských a potravinářských informací Praha. 72 s. ISBN: 8072711466.
- Hanuš, O., Frelich, J., Tomáška, M., Vyletělová, M., Genčurová, V., Kučera, J., Třináctý, J. 2010. The analysis of relationships between chemical composition, physical, technological and health indicators and freezing point in raw cow milk. *Czech Journal of Animal Science*. 55 (1). 11–29.
- Hanuš, O., Roubal, P., Vyletělová, M., Yong, T., Bjelka, M., Dufek, A. 2011. The relations of some milk indicators of energy metabolism in cow, goat and sheep milk. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 42 (3). 102–112.
- Hegedúšová, Z., Slezáková, M., Bjelka, M., Říha, J. 2009. Content of Acetone and Urea in Cervical Mucus in Cows. *Reproduction in Domestic Animals*. 44 (3). 107–107.
- Hegedúšová, Z., Louda, F., Říha, J., Kubica, J. 2010. *Detekce říje v chovech skotu – cesta ke zlepšení úrovně reprodukce*. Agrovýzkum Rapotín, s. r. o. 38 s. ISBN: 9788087144213.
- Chaveiro, A., Andrade, M., Borba, A. E. S., Silva, F. M. 2011. Association between Plasma and Milk Urea on the Insemination Day and Pregnancy Rate in Early Lactation Dairy Cows. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 1 (4). 221–225.
- Jankowska, M., Sawa, A., Neja, W. 2010. Effect of milk urea and protein levels on fertility indices in cows. *Journal of Central European Agriculture*. 11 (4). 475–480.
- Ježková, A., Stádník, L., Louda, F. 2007. Study of cervical mucus crystallization, sperm survival in cervical mucus and reproductive results of Holstein cows. *Book of abstracts of the 58th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, No. 13*. Dublin, Ireland. 26–29 August 2007. 235–235. ISBN: 9789086860456.
- Ježková, A., Stádník, L., Vacek, M., Louda, F. 2008. Factors affecting the cervical mucus crystallization, the sperm survival in cervical mucus, and pregnancy rates of Holstein cows. *Journal of Central European Agriculture*. 9 (2). 377–384.
- Kubešová, M., Fajmon, T., Frelich, J., Trávníček, J., Maršálek, M. 2009. Analysis of milk urea and milk citrate content during the postpartal period and their impact on reproduction in dairy cows. *Výzkum v chovu skotu*. 51 (1). 2–13.

- Kvapilík, J., Vacek, M. 2011. Jaké jsou možnosti zlepšení ekonomiky výroby mléka. *Náš chov*. 71 (1). 21–24.
- Kvapilík, J., Růžička, Z., Bucek, P. a kol. 2013. *Ročenka – Chov skotu v České Republice – Hlavní výsledky a ukazatele za rok 2012*. Českomoravská společnost chovatelů, a. s., Praha; Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., Praha-Uhřetěves; Svaz chovatelů českého strakatého skotu; Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR, o. s.; Český svaz chovatelů masného skotu. 106 s. ISBN: 9788087633045.
- LeBlanc, S. 2010. Assessing the Association of the Level of Milk Production with Reproductive Performance in Dairy Cattle. *Journal of Reproduction and Development*. 56, S1–S7.
- Matoušek, J., Říha, J., Sršeň, V., Veselský, L., Louda, F. 1989. Penetration of cervical mucus and other body-fluids by bull sperm in capillary tubes. *Animal. Reproduction Science*. 18 (1-3). 161–166.
- Merck, KGaA, 2012. Urea in water and wastewater [online]. EMD Millipore Corporation, 290 Concord Road, Billerica, USA. 2012-10-09. [2013-03-04]. Available from <http://www.merckmillipore.com/chemicals/en_US/Merck-International-Site/USD/ViewProductDocuments-File?ProductSKU=MDA_CHEM-103943&DocumentType=APPL&DocumentId=200607.106.Appl&DocumentSource=GINAPPL>.
- Miglior, F., Sewalem, A., Jamrozik, J., Lefebvre, D. M., Moore, R. K. 2006. Analysis of milk urea nitrogen and lactose and their effect on longevity in Canadian dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 89 (12). 4886–4894.
- Nardone, A., Ronchi, B., Lacetera, N., Bernabucci, U. 2006. Climatic effects on productive traits in livestock. *Veterinary Research Communications*. 30. 75–81.
- Palmer, M. A., Olmos, G., Boyle, L. A., Mee, J. F. 2010. Estrus detection and estrus characteristics in housed and pastured Holstein-Friesian cows. *Theriogenology*. 74 (2). 255–264.
- Pechová, A. 2009. Kontrola produkce a složení mléka. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a. s. Brno. s. 1035–1039. ISBN: 9788086542195.
- Pryce, J. E., Coffey, M. P., Brotherstone, S. 2000. The genetic relationship between calving interval, body condition score and linear type and management traits in registered Holsteins. *Journal of Dairy Science*. 83 (11). 2664–2671.

- Rob, O., Stehlík, I. 1983. *Cvičení z reprodukce hospodářských zvířat II*. VŠZ v Praze. Praha. 122 s.
- Roche, J. R., Friggens, N. C., Kay, J. K., Fisher, M. W., Stafford, K. J., Berry, D. P. 2009. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health and welfare. *Journal of Dairy Science*. 92 (12). 5769–5801.
- Rutlant, J., Lopez-Bejar, M., Lopez-Gatius, F. 2005. Ultrastructural and rheological properties of bovine vaginal fluid and its relation to sperm motility and fertilization: a review. *Reproduction in Domestic Animals*. 40 (2). 79–86.
- Řehák, D., Rajmon, R., Kubešová, M., Štípková, M., Volek, J., Jílek, F. 2009. Relationships between milk urea and production and fertility traits in Holstein dairy herds in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*. 54 (5). 193–200.
- Řehák, D., Volek, J., Bartoň, L., Vodková, Z., Kubešová, M., Rajmon, R. 2012. Relationships among milk yield, body weight, and reproduction in Holstein and Czech Fleckvieh cows. *Czech Journal of Animal Science*. 57 (6). 274–282.
- Říha, J., Hanuš, O., Bjelka, M. 2002. Problémy managementu reprodukce dojníc. *Náš chov*. 62 (6). 23–28.
- Sawa, A., Bogucki, M. 2011. Effect of housing system and milk yield on cow fertility. *Archiv Fur Tierzucht-Archives of Animal Breeding*. 54 (3). 249–256.
- Sova, Z. (ed.). 1990. *Fyziologie hospodářských zvířat*. 2. přeprac. vydání. SZN Praha. 472 s. ISBN: 8020900926.
- Stádník, L., Louda, F., Ježková, A. 2002. The effect of selected factors at insemination on reproduction of Holstein cows. *Czech Journal of Animal Science*. 47 (5). 169–175.
- Tsiligiani, T., Karagiannidis, A., Brikas, P., Saratsis, P. 2001a. Physical properties of bovine cervical mucus during normal and induced (progesterone/PGF2alfa) estrus. *Theriogenology*. 55 (2). 629–640.
- Tsiligiani, T., Karagiannidis, A., Brikas, P., Saratsis, P. 2001b. Chemical properties of bovine cervical mucus during normal estrus and estrus induced by progesterone and/or PGF2alfa. *Theriogenology*. 56 (1). 41–50.
- Vacek, M., Stádník, L., Štípková, M. 2007. Relationships between the incidence of health disorders and the reproduction traits of Holstein cows in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*. 52 (8). 227–235.
- Walsh, S. W., Williams, E. J., Evans, A. C. O. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 123 (3–4). 127–138.

Zaaijer, D., Counotte, G. H. M., Sol, J., Smidt, W. J., Broadbent, P. J. 1993. Changes in the composition of cervical mucus of the cow during the estrous-cycle as parameters for predicting potential fertility. *Theriogenology*. 39 (3). 569–580.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Beran, J., Ducháček, J., Stádník, L., Okrouhlá, M., Čítek, J. 2011. Relationships among crystallization, acetone and urea content in dairy cows cervical mucus. *Reproduction in Domestic Animals*. 46 (3). 89–89.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Okrouhlá, M. 2012a. Porovnání obsahu močoviny a acetonu v mléce a cervikálním hlenu dojnic. *Náš chov*. 72 (2). 14–16.
- Beran, J., Stádník, L., Bezdíček, J., Louda, F., Čítek, J., Ducháček, J. 2012b. Effect of sire and extender on sperm motility and share of live or dead sperm in bulls' fresh ejaculate and in AI doses after thawing. *Archiv Fur Tierzucht-Archives of Animal Breeding*. 55 (3). 207–218.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Okrouhlá, M. 2012c. Relationships between changes in Holstein cow's body condition, acetone and urea content in milk and cervical mucus and sperm survival. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*. 60 (5). 39–48.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Okrouhlá, M., Doležalová, J., Kadlecová, V., Ptáček, M. 2013. Relationships among the cervical mucus urea and acetone, accuracy of insemination timing, and sperm survival in Holstein cows. *Animal Reproduction Science*. 142 (1–2). 28–34.
- Hegedúšová, Z., Louda, F., Říha, J., Kubica, J. 2010. *Detekce říje v chovech skotu – cesta ke zlepšení úrovně reprodukce*. Agrovýzkum Rapotín, s. r. o. 38 s. ISBN: 9788087144213.
- Hegedúšová, Z., Slezáková, M., Bjelka, M., Říha, J. 2009. Content of Acetone and Urea in Cervical Mucus in Cows. *Reproduction in Domestic Animals*. 44 (3). 107–107.
- Ježková, A., Stádník, L., Louda, F. 2007. Study of cervical mucus crystallization, sperm survival in cervical mucus and reproductive results of Holstein cows. *Book of abstracts of the 58th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, No. 13*. Dublin, Ireland. 26–29 August 2007. 235–235. ISBN: 9789086860456.
- Ježková, A., Stádník, L., Vacek, M., Louda, F. 2008. Factors affecting the cervical mucus crystallization, the sperm survival in cervical mucus, and pregnancy rates of Holstein cows. *Journal of Central European Agriculture*. 9 (2). 377–384.

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.

Stádník, L., Ježková, A., Vacek, M. 2008. Factors affecting sperm survival in cervical mucus and pregnancy rates of OVSYNCH-treated Holstein cows. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 39 (1). 24–30.