



UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Odběr, hodnocení a kryokonzervace ejakulátu psů**

Autoři

Ing. Ondřej Šimoník, Ing. Jiří Šichtař, Ph.D.

doc. MVDr. Radko Rajmon, Ph.D., Ing. Ivona Svobodová, Ph.D.

Ing. Petra Folková, Ing. Adéla Dokoupilová, Ph.D.

Eliana Pintus, DVM, Ph.D., Ing. Roman Končel

doc. Ing. Lukáš Jebavý, CSc., Ing. Helena Chaloupková, Ph.D.

Ing. Adéla Palacká

ISBN 978-80-213-2640-8

2016

## Obsah

I)	Úvod .....	1
II)	Cíl metodiky .....	3
III)	Vlastní popis metodiky .....	3
	Příprava před odběrem ejakulátu .....	3
	Odběr ejakulátu .....	4
	Manipulace se vzorkem ejakulátu .....	6
	Hodnocení ejakulátu .....	6
	Zpracování ejakulátu .....	8
	Mrazení ejakulátu .....	9
	Rozmrazování kryokonzervovaných inseminačních dávek .....	9
IV)	Srovnání novosti postupů .....	9
V)	Popis uplatnění certifikované metodiky .....	10
VI)	Ekonomické aspekty .....	10
VII)	Seznam související použité literatury .....	11
VIII)	Seznam publikací, které předcházely metodice .....	13
IX)	Dedikace .....	14
X)	Jména oponentů .....	14
XI)	Podíl práce .....	14

## I) Úvod

V posledních letech stoupá zájem o asistovanou reprodukci psů. Jednou z nejvíce využívaných metod je umělá inseminace. Feny mohou být inseminovány čerstvým, krátkodobě nebo dlouhodobě konzervovaným ejakulátem (England et al., 2014). Právě dlouhodobá konzervace ejakulátu výrazně rozšiřuje výhody umělé inseminace oproti přirozenému průběhu páření, je však spojena i s jistými problémy.

Kryokonzervace je nefyziologický proces, během kterého jsou buňky vystavovány řadě stresových podnětů působících na strukturu a fyziologické pochody spermií a právě díky těmto faktorům je negativně ovlivněna kvalita kryokonzervovaných spermií. Jejich fertilizační schopnost je snižována minimálně o 50 % (Forero-Gonzalez et al. 2012) v porovnání s nativním ejakulátem. Mezi důležité faktory ovlivňující kvalitu kryokonzervované inseminační dávky (ID) lze zařadit metodu odběru ejakulátu (vlastní provedení, frekvence a pořadí), metodu a kvalitu jeho zpracování, způsob uskladnění inseminační dávky (postupy mražení) a její přípravu k inseminaci. Autorský tým se zaměřil především na dva aspekty – odběr ejakulátu a složení ředidla použitého při kryokonzervaci.

Pokud chtějí chovatelé od plemenných psů vyrobit kryokonzervované inseminační dávky, mnohdy se nevyhnou dlouhým cestám do specializovaných pracovišť. Vzhledem k ekonomickým požadavkům na výrobu kryokonzervované ID, se může opakovaný odběr ejakulátu v krátkém časovém intervalu, jevit jako výhodný postup k získání většího množství ID od jednoho plemeníka. Bylo zjištěno, že kvalita nativního ejakulátu je ovlivněna frekvencí odběrů (England et al., 1999; Gunay et al., 2003; Vágenknechtová et al., 2010). Nicméně vliv opakovaných odběrů ejakulátu na mrazitelnost psiho ejakulátu nebyl doposud zkoumán.

Nejpoužívanějším nepermeabilním kryoprotektantem je vaječný žloutek (Hu et al., 2010), který spermie ovlivňuje jak pozitivně tak v některých směrech i negativně. Za jeho pozitivními vlastnostmi stojí složka LDL – nízko densitní lipoprotein (Moussa et al., 2002), tvořená především fosfolipidy, triglyceridy a proteiny (Anton et al., 2003). Mezi vlastnosti LDL patří například zvyšování antioxidační aktivity, respektive snižování tvorby volných radikálů (Hu et al., 2011) či interakce s proteiny semenné plazmy, které mohou negativně ovlivnit stabilitu plazmatické membrány spermií v průběhu kryokonzervace (Bergeron et al., 2003). V neposlední řadě je také možná interakce LDL s plazmatickou membránou spermií a její stabilizace vytvořením ochranné vrstvy (Bergeron et al., 2004). Vaječný žloutek má však

mimo pozitivních účinků také negativní dopady. Obsah vysoko denzitního proteinu (HDL) a některých dalších složek ředidla spermie zatěžuje (Watson, 1981) a může interferovat při hodnocení spermií (Wall et Foote, 1999). Současně existuje u vaječného žloutku riziko mikrobiální kontaminace (Bousseau et al., 1998). Aktuálně byla prověřována možnost náhrady vaječného žloutku v ředidlech pro kryokonzervaci spermií jeho účinnou složkou – LDL (e.g. Bencharif et al., 2010). Samotná příprava frakce LDL, její následná konzervace a dialýza konzervačních látek před jejím použitím ale představují složitý proces (Moussa et al., 2002). Nabízí se alternativa v podobě tzv. klarifikovaného vaječného žloutku, jehož příprava centrifugací je významně jednodušší (Holt et al., 1996) a také by neměl obsahovat škodlivé částice obsažené v celém žloutku (Soler et al., 2003). Použití klarifikovaného žloutku bylo s různými úspěchy testováno u spermií býků (Wall et Foote, 1999), jelenovitých (Fernández-Santos et al., 2006) a vlků (Lockyear et al., 2009). Při kryokonzervaci ejakulátu psů dosud tato metoda nebyla prověřena.

Autoři metodiky ověřovali možnost využít klarifikovaného namísto celého žloutku k modifikaci kryokonzervačního média pro kryokonzervaci spermií psů a současně byl hodnocen vliv opakovaného odběru v rozmezí 24 hodin na motilitu a integritu plasmatické membrány psích spermií (Šichtař et al., 2016a). V tomto experimentu bylo zjištěno, že kinematické parametry motility spermií byly ihned po rozmražení u obou skupin v normálních mezích, v případě přidání normálního žloutku ovšem dosahovaly vyšších hodnot. Na integritě plasmatické membrány zmrazených spermií se efekt úpravy žloutku neprojevil. Dále se dá na základě publikovaných výsledků motility rozmrazených spermií (Šichtař et al., 2016a) říci, že jak při použití normálního, tak klarifikovaného žloutku byl získán kvalitnější ejakulát z druhých odběrů. Tento trend se ovšem opět neprojevil na integritě plasmatické membrány spermií. V dalším experimentu (Folková et al., 2016) byl sledován vliv přídavku klarifikovaného žloutku a pořadí odběru na motilitu a viabilitu rozmrazených spermií psů s delší sexuální abstinencí. Na základě výsledků lze říci, že přidání klarifikovaného žloutku pozitivně ovlivnilo motilitu spermií, především díky schopnosti významně zpomalit pokles motility a viability spermií. Tento efekt byl pozorován ihned po rozmražení vzorků a po třiceti minutové inkubaci byl ještě více evidentní. Dále bylo v tomto experimentu zjištěno, že opakované odběry v intervalu 24 hodin poskytly ejakulát vhodný ke kryokonzervaci, tudíž se dá říci, že ani delší doba sexuální abstinence před odběrem nemusí znamenat horší kvalitu odebraného ejakulátu (Folková et al., 2016).

Autoři předkládané metodiky se také zaměřili na efekt plemenné příslušnosti na kvalitu kryokonzervovaného ejakulátu po přidavku klarifikovaného žloutku získaného ve 24 h intervalech (Šichtař et al., 2016b). Byla potvrzena signifikantní interakce plemene a typu použitého žloutku se všemi hodnocenými parametry motility a procentem abnormálních akrozomů rozmrazených spermií. Na druhou stranu nebyl tento trend pozorován při hodnocení viability a integrity plasmatické membrány spermií. Navíc lze dodat, že kryokonzervované spermie psů plemene husky vykazovali signifikantně lepší parametry motility a viability (vyšší procento živých spermií) ihned po rozmrazení i po třicetiminutové inkubaci. Oproti tomu kryokonzervovaný ejakulát psů plemene německý ovčák obsahoval méně odumírajících spermií, lepší integritu plasmatické membrány a nižší procento abnormálních akrozomů spermií ihned po rozmrazení i po třiceti minutové inkubaci.

## II) Cíl metodiky

Hlavním cílem metodiky bylo ověřit vliv frekvence odběru ejakulátu na kvalitu kryokonzervovaných psích inseminačních dávek a zefektivnit účinnost metod kryokonzervace psiho ejakulátu cestou modifikace kryokonzervačních médií.

Současně zde byla do ucelené podoby soustředěna i další doporučení vyplývající jak z dostupné literatury, tak ze zkušeností autorského pracoviště.

## III) Vlastní popis metodiky

### Příprava před odběrem ejakulátu

Odběr semene je prvním krokem ke zjištění jeho kvality a kvantity a proces samotný by měl být proveden tak, aby se maximálně zachovaly fertilizační schopnosti ejakulátu. Při odběru je velmi důležité prostředí, ve kterém se pes po dobu procesu nachází. Psi potřebují být uvolnění a musí se cítit pohodlně, strach a bolest u nich zamezují dosáhnutí úplné erekce a ejakulace. Místo by mělo mít neklouzavý povrch a měl by zde být naprostý klid. Veškerá manipulace se psem při odebírání ejakulátu probíhá v klidu, s omezeným počtem lidí na minimum a pokud možno ve známém, ideálně v domácím prostředí psa. Díky tomu se minimalizuje stres psa a tím se zvýší úspěšnost odběru. U bázlivé nebo i agresivní reakce se

postupuje v klidu a pomalu, protože negativní zkušenost spojená s odběrem spermatu může snížit úspěšnost i pro další odběry. V případě, že je zvíře napjaté, je pro uvolnění vhodná hra a psovi, který nemá zkušenosti s odběrem, může pomoci právě přítomnost háravé feny. Velmi plachým psům je dovoleno hrát si s háravou fenou (pokud je přítomna), s majitelem nebo s odběratelem. Ejakulace u psů je dobrovolným procesem, tudíž k ní nelze nutit.

Před odběrem je zapotřebí mít zajištěné všechny pracovníky, kteří budou manipulovat se zvířaty. Stejně tak důležité je mít připraveny všechny potřebné pomůcky k jeho provedení. Jedná se především o sběrnou nádobu, lubrikační gel, mikroskop, podložní a krycí sklíčka, pipetu, ředidla a další potřebné laboratorní vybavení. V praxi je pro odběr ejakulátu využívána celá řada zásobníků, důležitá je sterilita a inertnost materiálu. K tomuto účelu lze použít různých typů sběrných obalů nebo umělé vagíny, vyrobené z gumy či polypropylenu, zakončené centrifugační zkumavkou. Doporučujeme využít polypropylenové sběrné kužely, jejichž používání se jeví jako velmi vhodné, protože při odběru zabraňují ztrátě, nebo kontaminaci vzorku.

Ve veterinární praxi je často psům odebírán ejakulát pro výrobu mrazené inseminační dávky nárazově a s dlouhou časovou prodlevou mezi jednotlivými odběry. Navíc je při jednorázových odběrech možné vyrobit poměrně malé množství ID. Nabízí se tedy otázka možnosti zopakování odběru v krátkém intervalu v rámci jednoho přesunu psa. Autoři odebírali dva vzorky ejakulátu v rozmezí 24 hodin psům s minimálně tříměsíční sexuální abstinencí nebo psům, kteří byli pravidelně využíváni ke krytí (Folková et al., 2016; Šichtař et al., 2016a,b). Ani v jednom případě nebyly zjištěny významné odchylky v kvalitě. Opakovaný odběr jako metodický přístup proto lze doporučit, ovšem individuální indispozici samozřejmě nelze předem vyloučit.

## Odběr ejakulátu

Pes určený pro odběr ejakulátu musí být zdravý, bez jakýchkoli abnormalit týkajících se reprodukce. Někteří samci nepotřebují kromě ruční masáže žádné externí stimuly k dosažení erekce. Pokud ovšem tato skutečnost není předem prověřena, je vhodné pro odběr zajistit háravou fenou, simulace pachu pomocí např. tamponů napuštěných močí háravé feny nemusí dostačovat. Přítomnost feny navíc zajišťuje až čtyřnásobný počet odebraných spermií.

Pokud je fena přítomna, měla by být umístěna tak, aby měla alespoň pánevní končetiny na neklouzavé podložce, a může být opatřena náhubkem, aby se předešlo případnému ohrožení psa. Psovi se umožní zkoumat její zadní část těla, očichávat, nebo olízovat její vnější genitálie. Odběr semene u psa je relativně snadná procedura, která ale vyžaduje určité zkušenosti, především pokud se jedná o odběr psů agresivnější povahy, či psů vycvičených k obraně, jako jsou psi služební. Při odběru takových psů je nutná asistence psovoda. Psovod nasadí psovi košík, stoupne si těsně k hlavě psa a zkrátí si délku vodítka tak, aby pes mohl projevovat sexuální instinkty a zároveň bylo zabráněno nekontrolovatelnému otočení psa a ohrožení osoby odebírající ejakulát. Psovod ale nemůže zasahovat do průběhu odběru. Pokud pes nereaguje na hlasové povely a je stále agresivní, doporučují autoři provést odběr ejakulátu elektroejakulací nebo ponechat psa v přirozené plemenitbě.

Pokud je osoba odebírající ejakulát („odběratel“) pravák, měla by přistupovat ke psu z levé strany, aby měla penis psa ve své pravé a sběrací nádobu v levé ruce. Proces začíná masáží předkožky psa na úrovni bulbus glandis (b.g.) do vyvolání částečné erekce následované rychlým stažením předkožky a odhalením penisu. Je potřeba se ujistit, že se penis neztopořil bez stažení předkožky, protože to bývá pro některé psy bolestivé. Pokud je b.g. příliš překrvený, předkožka se nemusí nechat přetáhnout. Pokud se tak stane, je zapotřebí přerušit odběr, rozptýlit psa (např. krmením nebo krátkou procházkou) a otok nechat odeznít.

Po přetažení předkožky je třeba simulovat svázání - udržuje se stálý tlak proximálně za b.g. pomocí „kroužku“ vytvořeného stlačením penisu mezi ukazováčkem a palcem. Další masáž (tam a zpět) není v této fázi potřeba a může být kontraproduktivní, protože tím může dojít k poklesu erekce.

Jakmile je dosaženo plné erekce a je vytvářen tlak „kroužkem“, může se pes pokoušet „svázat“, což je demonstrováno zvedáním nohy přes pravou ruku odběratele (pokud je pravák). Ztopořený penis je poté potřeba jemně otočit kaudálně o 180°, přičemž je dorsální strana penisu udržována dorsálně. Při těchto úkonech je zapotřebí neustále působit tlakem za bulbus glandis (b.g.). Odebírat lze celý objem ejakulátu nebo pouze jeho druhou, spermatickou, frakci. Je doporučeno odebírat pouze druhou frakci, protože je tak minimalizován negativní vliv prostatické tekutiny na spermie. Spermatická frakce je charakteristická šedobílou až mléčně bílou barvou a dle velikosti psa nabývá objemu 0,1 – 3 ml.

## Manipulace se vzorkem ejakulátu

Spermie jako živé, pohyblivé buňky vyžadují při manipulaci specifický přístup. Především jsou náchylné na náhlé teplotní a osmotické změny, působení toxických látek a mechanické poškození. Při manipulaci se vzorkem nativního ejakulátu po odběru je nutné udržovat stálou teplotu médií určených pro ředění semene i všech pomůcek. Literatura uvádí doporučení v rozmezí 20 – 37 °C, nicméně autoři metodiky doporučují odebraný vzorek ejakulátu manipulovat a zpracovávat při laboratorní teplotě a při této teplotě uchovávat i ředící a mrazící média.

## Hodnocení ejakulátu

Ihned po odběru je nutné odebraný ejakulát zhodnotit. Makroskopicky se hodnotí objem, barva, zápach, vzhled a obsah cizích příměsí. Odběr je tedy vhodné provádět do průhledné a kalibrované nádoby. Mikroskopické hodnocení v provozních podmínkách laboratoří sestává ze stanovení koncentrace, motility a morfologie spermií. Tuto škálu testů hodnotících kvalitu, především zmrazeného ejakulátu lze rozšířit o stanovení viability a integrity plasmatické membrány spermií.

### *Koncentrace*

K určení koncentrace spermií se využije hematocytometrická metoda a například Bürkerova komůrka nebo se stanoví automaticky pomocí přístrojů. Koncentrace spermií v kvalitním nativním ejakulátu vhodného k přípravě kryokonzervované ID by měla být  $> 300 \times 10^6$ .

### *Motilita*

Motilita je většinou hodnocena subjektivně pod mikroskopem vybaveným fázovým kontrastem při stonásobném zvětšení. Hodnotí se procentuální zastoupení spermií s progresivním pohybem vpřed za hlavičkou. Důležité je zhodnotit několik mikroskopických polí. Kvalitní nativní vzorek ejakulátu by měl obsahovat více než 70 % aktivních spermií.

Mnohem důslednější přístup k hodnocení motility spermií je možný za využití počítačem asistované analýzy spermií (Computer Assisted Sperm Analysis – CASA). Systém



CASA sestává z počítačové stanice se specializovaným software a kamery připevněné k mikroskopu vybaveným negativním fázovým kontrastem. Naředěný ejakulát se nanese do kalibrované počítačové komůrky, například Leja<sup>®</sup>, která má standardní hloubku 20 μm (IMV, Aigle, France). Pro přesnost měření je nezbytné naředění (např. pufrovaným fyziologickým roztokem pH 6,8) vzorku ejakulátu na standardní koncentraci (optimálně 30 x 10<sup>6</sup> spermii/ml) a použití přiměřeného objemu kvůli omezení nežádoucí turbulence vzorku. U takto připraveného vzorku se pomocí mikroskopu při zvětšení 100 x snímá minimálně 5 náhodných polí a následně se hodnotí kinematické parametry spermii (Mortimer, 2000).

### ***Morfologie spermii***

Pro hodnocení morfologie spermii se používá technika barvení například dle Farrellyho (Věžník et al., 2004). Ze vzorku ejakulátu se vyhotoví nátěr na podložní sklíčko a nechá se zaschnout. Poté se fixuje v roztoku formaldehydu po dobu 15 sekund a opláchne destilovanou vodou. První část barvení probíhá po dobu 15 sekund v 5% roztoku anilinové modři a po jemném oplachu destilovanou vodou následuje barvení v 0,5% roztoku krystal violeti po dobu 10 s. Po závěrečném oplachu destilovanou vodou se zhotovený preparát nechá uschnout. Následně se hodnotí morfologické abnormality minimálně u 200 spermii na vzorek při zvětšení 1000x za použití imerzního oleje. Vzorek ejakulátu vhodný pro výrobu kryokonzervované inseminační dávky by měl obsahovat alespoň 60 % morfologicky normálních spermii.

### ***Integrita plasmatické membrány pomocí HOS testu***

Pro hodnocení integrity plasmatické membrány se používá hypoosmotický roztok, který se připraví smísením 7,35 g citrátu sodného a 13,51 g fruktózy v 1000 ml destilované vody. Výsledná hodnota osmolality je v tomto případě 150 mOsmol/l. Vzorek spermii – 100 μl se přidá k 900 μl hypoosmotického roztoku, temperovaného na 37 °C. Vzniklá suspenze se inkubuje ve vodní lázni při 37 °C po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby se zhotoví nátěr na podložní sklíčko a po zaschnutí se hodnotí při zvětšení 400x minimálně 200 spermii na vzorek. Neporušená integrita plasmatické membrány spermie se vyjádří jako procentuální zastoupení spermii se stočeným bičíkem (HOS+).

### ***Stanovení viability spermii***

Pro stanovení podílu živých a mrtvých spermii, respektive viability, lze použít klasického barvení pomocí barev eosin a nigrosin (Kustritz, 2007). Dále lze doporučit

modernější a přesnější postup využívající fluorescenčního barvení (Rijsselaere et al., 2005). V tomto případě se vzorek spermií po rozmrazení naředí fyziologickým roztokem (pH 6,8) na výsledný objem 950  $\mu\text{l}$  a finální koncentraci  $1 \times 10^6$  spermií/ml. Poté se k této suspenzi přidá 20  $\mu\text{l}$  karboxyfluorescein diacetátu, 20  $\mu\text{l}$  propidium jodidu a následně se spermie fixují pomocí 0,3% roztoku formaldehydu. Inkubace probíhá za nepřístupu světla v inkubátoru při 37 °C po dobu 10 minut. Následně se nanese 7  $\mu\text{l}$  na podložní sklíčko a zamontuje se pod krycí sklo pomocí laku. Vyhodnocení se provádí pod fluorescenčním mikroskopem. Živé spermie emitují zelenou fluorescenci, mrtvé fluorescenci červenou a přechodná kategorie spermií (moribundo) vykazuje zelenou i červenou fluorescenci. U každého vzorku se hodnotí minimálně 200 spermií.

### Zpracování ejakulátu

Za účelem výroby kryokonzervované inseminační dávky se po odebrání vzorku pro vstupní vyšetření ejakulátu vzorky centrifugují po dobu 5 minut při 700 g a následně se odebere supernatant. Poté se přidá k centrifugovanému ejakulátu ředidlo pro kryokonzervaci, tak aby výsledná koncentrace spermií činila 150 - 200  $\times 10^6$ /ml, jako jedno z komerčně dostupných ředidel lze použít CaniPlus Freeze (Minitübe, Tiefenbach, Germany).

Do ředidla pro výrobu kryokonzervované inseminační dávky se aktuálně nejčastěji přidává vaječný žloutek. Jeho příprava spočívá v ručním oddělení žloutku od bílku a poté se pomocí sterilní injekční stříkačky nasaje požadovaný objem žloutku (například 20 objemových %).

S ohledem na některé diskutované problémy s přidavkem žloutku je možnou alternativou klarifikovaný žloutek. Použití klarifikovaného žloutku autoři ověřovali u ředidla CaniPlus Freeze (Minitübe, Tiefenbach, Germany) a na základě výsledků lze říci, že klarifikovaný žloutek pozitivně ovlivnil některé kinematické parametry spermií a jejich viabilitu (Folková et al., 2016). Klarifikovaný žloutek se připraví tak, že se opět ručně oddělí žloutek od bílku, nasaje se požadovaný objem pomocí sterilní injekční stříkačky a naředí se redestilovanou vodou v poměru 1:3. Následně se vzniklá suspenze centrifuguje při 10 000 g po dobu 30 minut při teplotě 5 °C. Vzniklý supernatant se dále používá jako klarifikovaný žloutek. Opět se přidává obvykle jako 20 objemových % do ředidla.

## Mrazení ejakulátu

Nařaděný ejakulát se plní do pejet o objemu 0,5 ml (Pena et al., 2006). Naplněné pejety se poté ekvilibrují na základě doporučení výrobce ředidla, u výrobku CaniPlus Freeze při teplotě 5 °C po dobu 2 hodin. I když existují poloautomatické zmrazovací systémy, v praxi se pro mrazení ejakulátu běžně využívá polystyrénového mrazicího boxu, kde se pejety ve výšce 4 cm nad hladinou tekutého dusíku postupně zmrazují po dobu minimálně 15 minut. Následně se co nejrychleji přemístí přímo do kontejneru s tekutým dusíkem.

## Rozmrazování kryokonzervovaných inseminačních dávek

Pejety se rozmrazí za účelem inseminace nebo zhodnocení jejich kvality následujícím způsobem. Závěs s inseminačními dávkami se vysune do hrdla tak, aby nedošlo k vysunutí zásobníku s pejetami nad okraj hrdla kontejneru. Zároveň však musí být možné identifikovat pejety. V tomto kroku je velmi důležité důsledně dodržovat co možná nejrychlejší manipulaci, jinak se kryokonzervované dávky začínají rozmrazovat a po následném ponoření do tekutého dusíku se opět zmrazují, což vede k jejich znehodnocení. Vybrané pejety pro rozmrazení se uchopí peanem nebo pinzetou a ihned se ponoří do vodní lázně vyhřáté na 38 °C po dobu 60 sekund.

## IV) Srovnání novosti postupů

Inseminace kryokonzervovaným ejakulátem hraje nezastupitelnou roli v procesu šlechtění především u hospodářských zvířat, ovšem čím dál více se uplatňuje jako metoda plemenitby i v chovech zájmových zvířat. I když je princip kryokonzervace znám řadu desetiletí, stále se hledají nové postupy zefektivnění této metody dlouhodobého uchování ejakulátu.

V předkládané certifikované metodice je souborně popsána problematika odběru, hodnocení a zpracování ejakulátu psů. Dále je zde navrženo časové schéma odběrů ejakulátu psů a uveden originální, vlastními výsledky podpořený postup modifikace kryokonzervačního média psího ejakulátu. Publikovaným výsledkům předcházelo systematické studium odborné

literatury, na které navazovalo experimentální ověření hypotéz výzkumnou činností autorů. Z tohoto pohledu je způsob zpracování a zejména obsah metodiky nový a původní.

## V) Popis uplatnění certifikované metodiky

Předkládaná metodika bude vhodnou pomůckou pro všechny subjekty zabývající se kryokonzervací psího ejakulátu. Především pro veterinární lékaře, výzkumná a univerzitní pracoviště. Nové uvedené poznatky budou sloužit jako studijní materiál při pedagogické a vědecko-výzkumné činnosti, čímž se bude zvyšovat kvalita vzdělávání, výzkumu a konkurenceschopnosti ČR. Současně přispěje ke zvyšování úrovně zájmové i služební kynologie.

## VI) Ekonomické aspekty

Ekonomický přínos předkládané metodiky spočívá zejména v úspoře některých nákladů spojených s přirozenou plemenitbou – transport háravé feny s doprovodem ke krycímu psu na velké vzdálenosti, potřeba dostupnosti krycího psa a jeho psovoda v přesně stanoveném termínu. Dále metoda snižuje ztráty v důsledku selhání oplození vinou nekvalitního spermatu psa, náklady na léčbu v případě přenosu infekce mezi fenou a psem nebo v případě poranění zvířat např. při pokusu o krytí v nesprávnou dobu.

Dalším aspektem jsou přínosy pro chovatele jako – možnost odhalení patologií pohlavního ústrojí, možnost využití ejakulátu u více fen, resp. cílenější využití plemeníků ve šlechtění, zvyšování kvality potomstva, uchování genové rezervy, případně časná kastrace psů vhodných pro služební využití při zachování genetického potenciálu psa.

Metoda kryokonzervace spermatu otevírá širší možnosti pro komerční uplatnění plemeníka, obchod i portfolio specializovaných veterinárních služeb. Uplatnění výše popsaných výhod lze očekávat zejména ve větších chovatelských zařízeních s vyšším počtem chovaných fen.

## VII) Seznam související použité literatury

Anton M., Martinet V., Dalgarrondo M., Beaumal V., David-Briand, E., Rabesona H. (2003): Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry*, 83, 175-183.

Bencharif D., Amirat-Briand L., Garand A., Anton M., Schmitt E., Descherces S., Delhomme G., Langlois M.-L., Barrière P., Destrumelle S., Vera-Munoz O., Tainturier D. (2010): Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex (R) and LDL (Low Density Lipoproteins). *Animal Reproduction Science*, 119, 305-313.

Bergeron A., Crete M. H., Brindle Y., Manjunath P. (2003): Low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk prevents binding of major proteins of bovine seminal plasma to sperm and lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction*, 68, 170.

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, 708-717.

Bousseau S., Brillard J. P., Marguant-Le G. 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, 699-706.

England G. C. W. (1999): Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology*, 52, 981-986.

England G. C. W., Russo M., Freeman S. L. (2014): Artificial insemination in dogs and cats 2. Artificial insemination in dogs. *In Practice*, 36, 183-190.

Fernández-Santos M. R., Estes M. C., Montoro V., Soler A. J., Garde J. J. (2006): Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology*, 66, 1931-1942.

Forero-Gonzalez R. A., Celeghini E. C. C., Raphael C. F., Andrade A. F. C., Bressan F. F., Arruda R. P. (2012): Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia*, 44, 154-159.

Gunay U., Polat U., Gunes N., Soylu M. K., Kil F. (2003): The effects of short-interval ejaculation on semen quality and some biochemical parameters in dogs. *Revue De Medecine Veterinaire*, 154, 459-462.

Holt W. V., Abaigar T., Jabbour H. N. (1996): Oestrous synchronization, semen preservation and artificial insemination in the Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*) for the establishment of a genome resource bank programme. *Reproduction, Fertility and Development*, 8, 1215-1222.

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*, 62, 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*, 117, 11-17.

Kustritz M. V. R. (2007): The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*, 68, 329-337.

Lockyear K. M., Goodrowe K. L., Waddell W. T., MacDonald S. E. (2009): Comparison of different osmolalities and egg-yolk composition in processing media for the cryopreservation of red wolf (*Canis rufus*) sperm. *Theriogenology*, 71, 469-479.

Mortimer S. T. (2002): CASA – practical aspects. *Journal of Andrology*, 21, 515-524.

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, 1695-1706.

Peña F. J., Núñez-Martínez I., Morán J. M. (2006): Semen Technologies in Dog Breeding: an Update. *Reproduction in Domestic Animals*, 41, Suppl 2: 21-29.

Rijsselaere T., Van Soom A., Tanghe S., Coryn M., Maes D., de Kruif A. (2005) : New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology*, 64, 706-719.

Soler A. J., Perez-Guzman M. D., Garde J. J. (2003): Storage of red deer epididymides for four days at 5 degrees C: Effects on sperm motility, viability and morphological integrity. *Journal of Experimental Zoology*, 295A, 188–199.

Vágenknechtová M., Hošek M., Máchal L., Chládek G. (2011): The influence of external and internal factors on the quality of semen collection and qualitative indicators of semen in the dog (*canis familiaris*). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*, 59, 373-380.

Věžník Z., Švecová D., Zajícová A., Přinosilová P. (2004): *Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy*. ISBN 80-86895-01-7, VÚVeL, 266 s., 60 příloh.

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

Watson P. F. (1981): The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees c by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, 62, 483-492.

## VIII) Seznam publikací, které předcházely metodice

Šichtař J., Šimoník O., Pintus E., Folková P., Dokoupilová A., Rajmon R., Svobodová I., Jebavý L. (2016a): The quality of frozen-thawed canine semen with respect to semen extender composition and 2 sequence of ejaculate collection in dogs. *Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* (přijato k publikaci).

Folková P., Šichtař J., Šimoník O., Pintus E., Dokoupilová A., Rajmon R. (2016): Changes in quality of native and frozen-thawed semen in relation to two collections performed in 24 hour interval and addition of clarified egg yolk to extender. *Scientia Agriculturae Bohemica* (přijato k publikaci).

Dokoupilová A., Šichtař J., Vynikalová L. (2015): Vliv vybraných faktorů na počet registrovaných štěnat fen plemene cairn terrier. *Veterinářství*, 69, 690-694.

Šichtař J., Šimoník O., Dokoupilová A., Svobodová I. (2014): Současné možnosti hodnocení ejakulátu psů. *Veterinární lékař*, 12, 210-218.

Hradecká, L., Bartoš, L., Svobodová, I., Sales, J. (2015): Heritability of behavioural traits in domestic dogs. A meta-analysis. *Applied Animal Behaviour Science*, 170, 1-13.

Šichtař J., Šimoník O., Pintus E., Folková P., Rajmon R., Dokoupilová A. (2016b): The effect of breed, 24 hour collection interval and type of egg yolk on quality of frozen-thawed canine semen (rozpracovaný manuskript).

Šichtař J., Dokoupilová A., Vostrý L., Rajmon R., Jílek F., Šimoník O., Folková P., Svobodová I. (2016c): Factors affecting reproductive efficiency in German Shepherd bitches bred in a private kennel over a 12 year period. *Czech Journal of Animal Science* (odesláno do redakce, probíhá oponentní řízení).

Kvapil, R. (2015): Poporodní patologické stavy fen. *Veterinární lékař*, 4, 202-206.

Dokoupilová, A., Svobodová, I., Chaloupková, H., Kouřimská, L., Dvořáková, B., Končel, R. (2016). German shepherd dog milk composition and its changes during lactation. *Scientia Agriculturae Bohemica* (přijato k publikaci).

Končel R. (2014): Variabilita mrazitelnosti psiho ejakulátu. Česká zemědělská univerzita v Praze, Diplomová práce.

Špatná B. (2015): Hodnocení kvality kryokonzervovaných psích spermií. Česká zemědělská univerzita v Praze, Diplomová práce.

Zelenková A. (2015): Vliv vybraných druhů ředidel a plemenné příslušnosti na funkční vlastnosti kryokonzervovaných psích spermií. Česká zemědělská univerzita v Praze, Diplomová práce.

## IX) Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Ministerstva vnitra České republiky č. VG20132015133.

## X) Jména oponentů

doc. MVDr. Radovan Doležel, CSc.

Klinika chorob přežvýkavců a prasat, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno  
Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno

Ing. Jan Vodička

odbor živočišných komodit, Ministerstvo zemědělství  
Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

## XI) Podíl práce

Ing. Ondřej Šimoník (15 %), Ing. Jiří Šichtař, Ph.D. (15 %), doc. MVDr. Radko Rajmon, Ph.D. (10 %), Ing. Ivona Svobodová, Ph.D. (10 %), Ing. Petra Folková (10 %), Ing. Adéla Dokoupilová, Ph.D. (10 %), Eliana Pintus, DVM, Ph.D. (10 %), Ing. Roman Končel (7 %), doc. Ing. Lukáš Jebavý, CSc. (5 %), Ing. Helena Chaloupková, Ph.D. (3 %), Ing. Adéla Palacká (5 %).