

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ

Optimalizace metod řízení kvality ejakulátu a inseminačních dávek u býků v závislosti na úrovni metabolismu a teplotního stresu

(typ výsledků „Nmet“ – Metodika)

Ing. Filipp Georgijevič Savvulidi, Ph.D.

Ing. Jaromír Ducháček, Ph.D.

Ing. Veronika Kovářová

Ing. Radim Cobl, Ph.D.

Ing. Matúš Gašparík, Ph.D.

Ing. Martin Ptáček, Ph.D.

Mgr. Martina Janků, Ph.D.

Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.

doc. Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.

prof. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.



Univerzita Palackého
v Olomouci



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Optimalizace metod řízení kvality ejakulátu a inseminačních dávek u býků v závislosti na úrovni metabolismu a teplotního stresu

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Filipp Georgijevič Savvulidi a kol.



Dedikace:

Uplatněná certifikovaná metodika byla zpracována v rámci řešení grantového úkolu MZe
NAZV č. QK22010270 (Optimalizace řízení individuální reprodukční výkonnosti dojeného
skotu) a interního grantu SGS s číslem SV24-3-21320

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Předkládaná metodika je určena pracovníkům v oblasti chovu skotu. Mezi cílové skupiny lze zařadit pracovníky plemenářských organizací a inseminačních stanic, chovatele, chovatelské svazy dojených plemen, řídící pracovníky a poradce v chovu a šlechtění skotu.

Dedikace: výsledků typu „N“ - Uplatněná certifikovaná metodika byla zpracována v rámci řešení grantového úkolu MZe NAZV č. **QK22010270 (Optimalizace řízení individuální reprodukční výkonnosti dojeného skotu)** a interního grantu SGS s číslem **SV24-3-21320**.

Kolektiv autorů:

Ing. Filipp Georgijevič Savvulidi, Ph.D.¹

Ing. Jaromír Ducháček, Ph.D.¹

Ing. Veronika Kovářová¹

Ing. Radim Codl, Ph.D.¹

Ing. Matuš Gašparík, Ph.D.¹

Ing. Martin Ptáček, Ph.D.¹

Mgr. Martina Janků, Ph.D.²

Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.²

doc. Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.³

prof. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.¹

¹) Česká zemědělská univerzita v Praze, FAPPZ, Katedra chovu hospodářských zvířat

²) Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie

³) Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra zoologie

Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení:

1) **Odborník z daného oboru:** doc. Ing. Jan Beran, Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FZT, KZVE

2) **Pracovník státní správy:** Ing. Jan Vodička, Ph.D., ze, Oddělení hospodářských zvířat

Certifikováno Ministerstvem zemědělství ČR, 19.12.2025.

Číslo osvědčení: MZE-89513/2025-13141.

ISBN 978-80-213-3517-2

Abstrakt

Tato metodika shrnuje nedávný pokrok v inseminaci býčího spermatu se zaměřením na nová ředidla spermatu a jejich vliv na kvalitu, bezpečnost a plodnost spermií. Porovnává ředidla rostlinného a živočišného původu pro kryokonzervaci a konstatuje, že zatímco tradiční ředidla na bázi vaječného žloutku podporují lepší přežití spermií po rozmrazení, rostlinná ředidla s lipoproteiny s nízkou hustotou zvyšují toleranci vůči mrazu a nabízejí bezpečnější alternativu. Metodika se dále zabývá jak sezónní a klimatické faktory ovlivňují kvalitu ejakulátu u holštýnských býků v ČR chovaných ve stájích bez aktivní ventilace. I přes neideální mikroklimatické podmínky nebyly pozorovány žádné negativní účinky na kvalitu spermatu. Navíc nebyl zaznamenán ani tepelný stres, protože hodnoty THI zůstaly pod kritickými úrovněmi. Korelační a multi-parametrová analýzy nepotvrdily žádné významné souvislosti mezi oxidačními metabolity stanovenými z krve a kvalitou spermií. Využití počítačově asistované analýzy spermií a průtokové cytometrie poskytlo v rámci ověření výsledků spolehlivé údaje o motilitě a buněčné struktuře spermií. Tato zjištění napomáhají k optimálnímu načasování odběru spermatu a výběru ředícího media pro zlepšení kvality a množství inseminační dávky. Implementace těchto přístupů může snížit náklady, zvýšit efektivitu a minimalizovat dopad na životní prostředí, což podporuje udržitelnější a ziskovější chov mléčného skotu.

Klíčová slova: spermatogeneze, produkce spermatu býků, sezónnost, teplotně-vlhkostní index, oxidační stres, mikroklimatické podmínky, ředidla, odběr krve, biochemická analýza, odběr spermatu, průtoková cytometrie spermií, analýza motility, kvantitativní a kvalitativní parametry spermií, korelační analýza

Abstract

This methodology summarizes recent advances in bull semen insemination, with a focus on novel semen extenders and their effects on sperm quality, safety, and fertility. It compares plant- and animal-based extenders for cryopreservation and concludes that, while traditional egg yolk-based extenders support better post-thaw sperm survival, plant-derived extenders containing low-density lipoproteins enhance freeze tolerance and offer a safer alternative. Furthermore, the methodology addresses how seasonal and climatic factors affect ejaculate quality in Holstein bulls in the Czech Republic housed in barns without active ventilation. Despite suboptimal microclimatic conditions, no negative effects on semen quality were observed. Moreover, no signs of heat stress were detected, as THI values remained below critical thresholds. Correlation and multiparametric analyses did not confirm any significant associations between oxidative metabolites measured in blood and sperm quality. The application of computer-assisted sperm analysis (CASA) and flow cytometry provided reliable data on sperm motility and cell structure within the validation process. These findings contribute to optimizing semen collection timing and the selection of extenders to improve the quality and quantity of insemination doses. The implementation of these approaches may reduce costs, increase efficiency, and minimize environmental impact, thereby supporting more sustainable and profitable dairy cattle breeding.

Keywords: spermatogenesis, bull semen production, seasonality, temperature-humidity index, oxidative stress, microclimatic conditions, diluents, blood collection, biochemical analysis, semen collection, sperm flow cytometry, motility analysis, quantitative and qualitative sperm parameters, correlation analysis

Obsah

I. CÍL METODIKY	6
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
1. Úvod	7
1.1. Sezónnost produkce spermatu býků.....	7
1.2. Ředidla pro kryokonzervaci spermií	9
2. Metodika a výsledky.....	11
2.1. Metodické postupy	11
2.1.1. Metodika hodnocení sezónnosti produkce spermatu u býků	11
2.1.2. Metodika porovnání ředidel založených na rostlinném a živočišném základu.....	16
2.1.3. Metodika zlepšování ředidel s rostlinným základem doplňováním lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL)	17
2.2. Výsledky sledování	19
2.2.1. Výsledky hodnocení sezónnosti produkce spermatu u býků	19
2.2.2. Výsledky vlivu ředidel na zmrazení spermií	23
3. Závěr a doporučení pro praxi.....	25
3.1. Závěr a doporučení pro praxi: hodnocení sezónnosti produkce spermatu u býků.....	25
3.2 Závěr a doporučení pro praxi: o ředidlech a jejich důležitých rolích pro zlepšení zpracování inseminačních dávek býčích spermií.....	25
III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	27
IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	28
V. EKONOMICKÉ ASPEKTY	29
VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	30
VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	36
VIII. SEZNAM ZKRATEK.....	37
IX. DEDIKACE	39

I. CÍL METODIKY

Cílem této metodiky je shrnout nejnovější poznatky v aspektu optimalizace výroby inseminačních dávek býků. Zaměřuje se zejména na inovace v oblasti ředidel, s důrazem na využití rostlinných či syntetických složek. Tyto složky mohou snížit riziko přenosu nebezpečných chorob prostřednictvím ředidel a zároveň zlepšit kvalitu inseminačních dávek. Dále se věnuje sezónním a klimatickým vlivům na produkci spermatu u býků. Tyto informace jsou dále zasazeny do kontextu celkového oxidačního stavu krve býků. Na základě těchto poznatků nabízí praktická doporučení pro optimální načasování odběru ejakulátu a výroby inseminačních dávek. Uplatnění poznatků z této metodiky přispěje ke zlepšení kvantitativních i kvalitativních parametrů inseminačních dávek s předpokladem vyšší plodnosti krav, a tím i k vyšší ekonomické efektivitě chovu skotu.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. Úvod

1.1. Sezónnost produkce spermatu býků

Globální oteplování je v posledních letech intenzivně diskutovaným tématem s rozsáhlou důkazní základnou (Wang et al. 2023; Park 2022). Zvláštní pozornost je věnována oteplování v Evropě, kde se průměrné roční teploty zvyšují tempem $+ 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ za desetiletí, což je dvojnásobek celosvětového průměru (World Meteorological Organization 2023). Není proto překvapivé, že řada studií v oblasti fyziologie hospodářských zvířat se zaměřuje na hodnocení rizik spojených s teplotním stresem (Vanselow et al. 2024; Vinet et al. 2024; Morrell 2020; Sabés-Alsina et al. 2019).

Chov skotu patří mezi klíčové sektory živočišné výroby a pro predikci rizik i vývoje účinných opatření proti teplotnímu stresu je nezbytné podrobně studovat vliv zvýšené teploty na produkci a reprodukci (Chen et al. 2023; Kulaz and Ser 2022; Bezdíček et al. 2021). Přestože se problematika teplotního stresu často více soustředí na samice, nelze opomenout roli samčí populace. Je však důležité poznamenat, že projevy snížené produkce, reprodukce a zhoršeného welfare se mohou objevit i bez zjevného výskytu teplotního stresu. Jedním z nejobjektivnějších způsobů hodnocení teplotního diskomfortu a teplotního stresu je výpočet teplotně-vlhkostního indexu (THI) (Gloria et al. 2021; Llamas-Luceño et al. 2020; García-Isperto et al. 2006). Podle dostupných studií lze již při hodnotě THI nad 60 u některých plemen býků pozorovat negativní dopady na objem, produkci a kvalitu spermatu. Při hodnotě THI nad 70 se předpokládá zvýšená míra teplotního stresu, zatímco při překročení hranice 80 může dojít k výraznému poklesu kvality spermatu a reprodukční výkonnosti (Llamas-Luceño et al. 2020; Al-Kanaan et al. 2015).

Proces spermatogeneze a zrání spermií trvá u býků přibližně dva měsíce, během nichž mohou být spermie vystaveny negativním vlivům vysokých teplot v kombinaci s nevhodnou hodnotou relativní vlhkosti vzduchu. Tudíž teplotní diskomfort a stres může narušit nejen samotný proces tvorby a zrání spermií ve varlatech, ale i jejich ukládání v nadvarleti před ejakulací. Důsledkem může být nejen snížení objemu ejakulátu, ale i poškození klíčových buněčných struktur spermií, jako jsou plazmatická membrána, akrozom nebo mitochondrie. Tato poškození se nemusí nutně projevit okamžitým odumřením spermií, ale mohou vést ke snížení jejich pohyblivosti, viability a oplozovací schopnosti. Oplozovací schopnost spermií lze zkoumat *in vivo* pomocí funkčních testů, především na základě umělé inseminace, nebo *in vitro* laboratorními metodami, jako je

počítačová analýza pohyblivosti spermií (CASA) či průtoková cytometrie. Výsledky *in vivo* jsou však ovlivněny řadou faktorů, včetně kvality inseminace, přesného načasování či celkové úrovně chovu (Bezdiček et al. 2024; Boudaoud 2023; Kašná et al. 2023; Beran et al. 2013). Naproti tomu *in vitro* testy, přestože pouze predikují oplozovací schopnost, poskytují spolehlivější a lépe reprodukovatelné výsledky napříč různými laboratořemi (Grba et al. 2024; Pytlík et al. 2023; Savvulidi et al. 2023; Pytlík et al. 2022).

Z výše popsaného textu vyplývá, že spermie jsou poměrně citlivé buňky, jejichž kvalitu a oplozovací schopnost navíc mohou ovlivnit metabolity a oxidační status. Je obecně známo, že pozitivní základní charakteristiky ejakulátu, jako jsou objem, koncentrace, pohyblivost atd. nemusí být vždy ještě jistotou dobré oplozovací schopnosti. Je nutné vzít v úvahu i další faktory, které se často odehrávají na biochemické úrovni (Asadpour & Tayefi-Nasrabadi 2012). Jedním z těchto faktorů je i oxidační stres. Vysoká náchylnost spermií k oxidačnímu poškození souvisí s nízkou hladinou antioxidantů v cytoplazmě a vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin v jejich membránách (Caroppo & Dattilo 2022; O'Flaherty 2014). Oxidační stres je regulován komplexní sítí enzymových a neenzymových antioxidantů (Vince et al. 2018), přičemž teplotní stres může negativně ovlivnit rovnováhu mezi hladinami antioxidantů a hladinami molekul s oxidačním účinkem (tj. volných radikálů) ve prospěch vzniku oxidačního poškození. Parametry, jako jsou celkový oxidační status (TOS) a celkový antioxidační status (TAS), hrají klíčovou roli při hodnocení oxidačního stresu. Nízké hodnoty TAS byly například spojeny s oxidačním stresem u krav v rané laktaci (Gong & Xiao 2016) a s neplodností samců (Subramanian et al. 2018). U býků byla zjištěna negativní korelace mezi TAS a peroxidací lipidů v kryokonzervovaných spermiích (Gürler et al. 2015), což naznačuje, že antioxidační status býka může významně ovlivnit kvalitu jeho spermatu.

Metodice se zaměřuje na analýzu vztahu mezi THI (mikroklimatickými podmínkami), oxidačním stavem krve býků a hlavními kvantitativními i kvalitativními parametry čerstvě odebraného spermatu holštýnských býků chovaných ve vnitřních prostorách v podmínkách střední Evropy.

Oxidační status a volné radikály u spermií

Vznik volných radikálů a antioxidační ochrana je důležitou součástí celé biologie buněk a týká se samozřejmě i fyziologie spermií. Vznik volných radikálů je přirozenou součástí procesu oxidační fosforylace v mitochondriích. Zdrojem volných radikálů je mimo mitochondriálního elektronového transportního řetězce také NADPH–oxidace. Ochrana proti jejich reaktivitě je zajišťována enzymovými a neenzymovými antioxidanty, které jsou přirozenou součástí

aerobních buněk. V případě spermií je specifická situace v tom, že spermie nedisponují cytoplazmou, která by zabezpečila dostatek antioxidantů. Jsou tedy velmi citlivé na oxidační stres a dále také na peroxidaci lipidů z důvodu vysokého obsahu polynenasycených mastných kyselin v plazmatické membráně (Thompson et al., 2014). Významnou roli proto sehrává semenná plazma, která disponuje různými antioxidanty, jako jsou především glutathione peroxidasa (GSH-Px), katalasa (CAT), superoxid dismutasa (SOD), redukovaný glutathion (GSH), vitamin C a E (Vince et al. 2018). Přitom je důležité, že pro řadu fyziologických procesů spermií je důležitá přesná rovnováha mezi vznikajícími volnými radikály a antioxidační ochranou. Významným faktorem, který souvisí se změnou antioxidační ochrany, se ukazuje být také teplotní stres (roční období) a věk. Balic' et al. (2012) zjistili vyšší aktivitu GSH-Px v jarních měsících oproti letním. Dále Asadpour & Tayefi-Nasrabadi (2012) uvádějí vyšší enzymovou aktivitu GPx na podzim. Významným faktorem se ukazuje být dále věk býků, např. Vince et al. (2018) uvádějí vyšší antioxidační ochranu u mladších býků než u starších.

Významným ukazatelem míry oxidačního stresu jsou poté hodnoty TAS a TOS. Obecně lze říci, že nízké hodnoty TAS jsou spojené s nízkou antioxidační ochranou, která se projevuje u krav oxidačním stresem v počátku laktace (Gong & Xiao 2016). Naopak, u lidské populace je u mužů nízká antioxidační ochrana spojována s jejich neplodností (Subramanian et al. 2018; Pasqualotto et al. 2001). U býků Gürler et al. (2015) zjistili negativní korelaci mezi TAS a peroxidací lipidů u kryokonzervovaného spermatu. Ukazuje se tedy, že se jedná o významný parametr charakterizující individualitu býka, který má pozitivní efekt na kvalitu spermatu (Gürler et al. 2015).

1.2. Ředidla pro kryokonzervaci spermií

Srovnání rostlinných a živočišných ředidel

Aby se minimalizovaly škodlivé účinky kryokonzervace, uchovávají se spermatické buňky v různých vodných médiích, známých jako spermatická ředidla, která mají specifické složení (Hashem & Gonzalez-Bulnes 2020). Typické ředidlo pro kryokonzervaci spermií obsahuje pufr, sacharid pro zajištění energetické a osmotické rovnováhy, rozpouštědlo pro úpravu pH a osmolarity, antibiotika a ochranné látky. Tyto ochranné látky se dělí na membránou propustné, kam patří zejména glycerol, a nepropustné, jako je vaječný žloutek (lecithin) (Layek et al. 2016). Vaječný žloutek je považován za jednu z nejdůležitějších složek ředidel díky obsahu lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL), které jsou primárně zodpovědné za kryoprotektivní účinky (Šimoník et al. 2016). LDL frakce pozitivně ovlivňuje buněčnou strukturu spermií i extracelulární prostředí (Hu et al. 2011). Přestože je vaječný žloutek široce

používán jako kryoprotektivum, jeho použití není bez nevýhod. Mezi nejzávažnější problémy patří variabilita složení, riziko mikrobiální kontaminace, možnost přenosu patogenů, přítomnost škodlivých metabolitů, endotoxinů nebo steroidních hormonů a také obtížnější hodnocení kvality spermií. Tyto faktory vedly k rostoucí poptávce po alternativních ředidlech, které neobsahují složky živočišného původu (Miguel-Jimenez et al. 2020; Murphy et al. 2018; Singh et al. 2018).

Řada výzkumů se zaměřuje na nahrazení ochranných látek živočišného původu rostlinnými alternativami, a to zejména s cílem snížit riziko mikrobiální kontaminace a přenosu nákaz, jako je například ptačí chřipka nebo bovinní spongiformní encefalopatie. Dalšími důležitými motivy výzkumů jsou zlepšení standardizace, sledovatelnosti produktů a zvýšení biologické bezpečnosti (Layek et al. 2016; Aires et al. 2003). Mezi nejčastěji zkoumané alternativy patří sójový lecitin, který bývá využíván jako náhrada vaječného žloutku. Výsledky studií hodnotících účinnost ředidel na bázi sójového lecitinu se však různí. Některé studie uvádějí srovnatelné výsledky v kvalitě spermatu *in vitro* a/nebo *in vivo* u skotu či buvolů při použití sójového lecitinu namísto vaječného žloutku (Murphy et al. 2018; Aires et al. 2003). Jiné práce dokonce zaznamenaly lepší zachování kvality spermií nebo vyšší oplozovací schopnost u dávek ředěných pomocí sójového lecitinu ve srovnání s tradičními ředidly obsahujícími živočišné složky (Miguel-Jimenez et al. 2020; Beran et al. 2012). Naopak některé studie poukazují na zhoršení kvality spermií, a to jak v laboratorních podmínkách (Muiño et al. 2007), tak i při praktickém použití *in vivo* (Singh et al. 2018; Crespilho et al. 2014), když byla použita ředidla na bázi sójového lecitinu místo těch s živočišnými složkami.

Dílčím cílem této metodiky je proto objektivně vyhodnotit kvalitu spermií po rozmrazení a změny související s inkubací s ředidlem u kryokonzervovaných subpopulací býčích spermií při použití ředidel na bázi sójového lecitinu (rostlinného původu) ve srovnání s ředidly obsahujícím vaječný žloutek (živočišného původu).

Zlepšení ředidel na rostlinné bázi přídatkem LDL

Vzhledem k tomu, že úprava složení ředidla patří mezi hlavní techniky pro zlepšení konzervace spermatu, může představovat vhodnou možnost přidavek LDL frakce vaječného žloutku k ředidlu na bázi sójového lecitinu (rostlinného původu). Tato kombinace může napomoci zlepšení kvality inseminačních dávek býků. Synergická kryoprotektivní aktivita LDL a sójového lecitinu byla v minulosti prokázána (Stádník et al. 2015; Beran et al. 2013). Dřívější studie se však často opíraly o subjektivní hodnocení spermií pomocí běžné mikroskopie, což může ovlivnit přesnost získaných výsledků. V současnosti je však k dispozici řada *in vitro*

metod, které umožňují objektivní a přesné hodnocení kvality spermií – především prostřednictvím průtokové cytometrie.

Průtoková cytometrie umožňuje kvantitativní a kvalitativní analýzu řady klíčových parametrů spermií, jako je například integrita plazmatické membrány, akrozomální stav či funkčnost mitochondrií, což jsou základní ukazatele kvality spermatu (Savvulidi et al. 2023).

Jedním z cílů této metodiky bylo proto ověřit pomocí průtokové cytometrie, zda přidavek LDL k ředidlu na bázi sójového lecitinu může zvýšit účinnost kryokonzervace býčího spermatu.

2. Metodika a výsledky

2.1. Metodické postupy

2.1.1. Metodika hodnocení sezónnosti produkce spermatu u býků

Býci

Do praktického pozorování bylo zařazeno 17 dospělých (3 ± 1 rok starých) zdravých býků holštýnského plemene. Býci byli ustájeni v komerční inseminační stanici, která se nachází ve Středočeském kraji v nadmořské výšce 285 m n. m. v České republice. Býkům byl poskytován optimalizovaný režim krmení a napájení odpovídající jejich tělesné kondici a režimu odběru ejakulátu.

Odběr krve a biochemická analýza

Krevní vzorky byly odebrány během pěti odběrů (červenec 2023, září 2023, listopad 2023, únor 2024 a květen 2024). Každý odběr krve byl proveden jeden týden před odběrem spermatu. Krev byla odebírána z ocasu přímou punkcí v. coccygea do standardních odběrovek typu HEMOS (GAMA GROUP a.s., České Budějovice, Česká republika). Krev byla okamžitě převedena do zkumavek VACUETTE (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmunster, Austria) o objemu 8, resp. 9 ml obsahujících sérum aktivátor tvorby séra, nebo heparin sodný. Následně byly zkumavky při dodržení chladového režimu (4 °C) dovezeny do laboratoře pro další zpracování. Zkumavky pro odběr séra byly následně centrifugovány (Hettich Universal 320) při 2000 g při 4 °C po dobu 10 minut. Po centrifugaci bylo získáno krevní sérum, které bylo následně alikvotováno po 200 µl do mikrozkušavek eppendorf. Zkumavky s heparinem sodným byly centrifugovány při 2000 g při 4 °C po dobu 15 min. Odstředěním byla získána krevní plasma a ze zbylých krevních buněk byly připraveny lyzáty. Krevní sérum a lyzáty krevních buněk (dále jen lyzáty) byly alikvotovány na 500µl do mikrozkušavek eppendorf.

Vzorky séra, plazmy a lyzátů byly poté v laboratoři uloženy při teplotě -60 °C do mrazáku po dobu max. jeden a půl měsíce, než byl stanoven ve vzorcích oxidační status a zjištěny obsahy oxidantů a antioxidantů popsaných níže.

Celkový oxidační status (TOS) krevního séra byl stanoven podle metodiky popsané v článku Erel (2005). Tato metoda je založena na oxidaci komplexu železnatý iont - *o*-dianisidin na železnatý iont oxidanty přítomnými ve vzorku. Železitý iont vytváří v kyselém prostředí barevný komplex s xylenolovou oranží, který lze měřit spektrofotometricky při vlnové délce 560 nm. Test byl kalibrován peroxidem vodíku a výsledky byly vyjádřeny v μmol ekvivalentů $\text{H}_2\text{O}_2/\text{l}$.

Celkový antioxidační status (TAS) krevního séra byl stanoven kolorimetrickou metodou za použití 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazolin-sulfonátu (ABTS) dle metodiky Erel (2004). Při tomto testu dochází k odbarvení charakteristického zbarvení kationtového radikálu ABTS vlivem přítomných antioxidantů ve vzorku. Tento děj je sledován spektrofotometricky při 734 nm, přičemž rychlost snížení intenzity zbarvení je nepřímo úměrná TAS vzorku. Jako standard byl použit Trolox a výsledky byly vyjádřeny v mmol ekvivalentů Troloxu/l.

Index oxidačního stresu (OSI) byl vypočítán pomocí následujícího vzorce: $\text{OSI (\%)} = [(\text{TOS, mmol ekvivalentu } \text{H}_2\text{O}_2/\text{l}) / (\text{TAS, mmol ekvivalentu Troloxu/l}) \times 100]$.

Aktivita GPx v lyzátech RBC byla stanovena spektrofotometrickou metodou (Paglia and Valentine, 1967) založenou na měření poklesu absorbance při 340 nm v důsledku oxidace NADPH reakcí s glutathionreduktázou. Metoda byla upravena pro měření kinetiky v 96jamkové mikrotitrační destičce pomocí spektrofotometru (BioTek Synergy, model H1 (Agilent, Santa Clara, CA, USA)). Aktivita GPx v lyzátech RBC byla vyjádřena jako nkat/mg Hb .

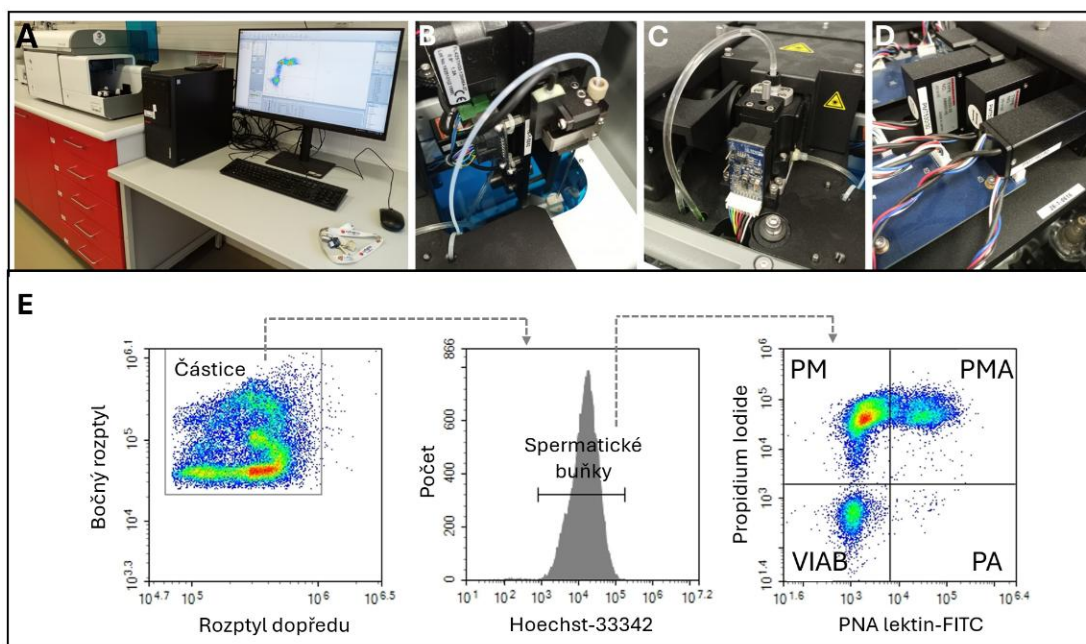
Odběr spermatu

Ejakulát byl odebrán pomocí umělé vagíny během pěti odběrů v různých ročních obdobích, včetně nejteplejších měsíců roku (červenec 2023, září 2023, prosinec 2023, březen 2024 a červen 2024). Ejakuláty byly makroskopicky a mikroskopicky hodnoceny bezprostředně po odběru. Hodnotil se získaný objem (OBJ) a koncentrace spermií (KONC). Pro analýzu motility byl použit mikroskop Axio Scope A1 (Carl Zeiss, 100 Munchen, Německo) a počítačový program Androvision (Minitube, Tiefenbach, Německo), který hodnotil celkovou pohyblivost (CAKT), resp. progresivní pohyblivost (PAKT). Pouze ejakuláty s objemem $\geq 1,5$ ml, koncentrací spermií $\geq 700 \times 10^6$ spermií/ml a pohyblivostí ≥ 70 % byly dále naředěny

pomocí syntetického ředidla OptiXcell (IMV Technologies, L'Aigle, Francie) podle návodu výrobce. Naředěné vzorky spermií byly ihned převezeny do laboratoře k analýze průtokovou cytometrií při teplotě $\geq 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (doba přepravy cca 1 hodina).

Průtoková cytometrie spermií

Vzorky spermií byly ihned po přepravě podrobeny průtokové cytometrické analýze. Vzorky byly zředěny ve fosfátovém pufru (PBS, pH ~ 7.4), aby bylo dosaženo konečné koncentrace 20×10^6 spermií/ml. Pro posouzení základních kvalitativních parametrů byly vzorky inkubovány v temnu při teplotě $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut následujícími fluorescenčními sondami, každé v příslušné konečné koncentraci: $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 (H342) pro identifikaci obsahu DNA, $8\text{ }\mu\text{g/ml}$ Propidium Iodide (PI) pro detekci poškození plazmatické membrány, $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ lektinu (FITC-PNA, Peanut Agglutinin) pro posouzení poškození akrozomu. Hodnocení bylo provedeno pomocí digitálního průtokového cytometru NovoCyte 3000 (Acea Biosciences, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Průtokový cytometr (Obrázek 1) byl vybaven sadou optimálních pásmových filtrů a pevnolátkovými lasery. Pro automatické nastavení cytometru, sledování výkonu a sběr dat byl použit software NovoExpress, v1.3.0 (Acea Biosciences, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Data byla uložena a následně analyzována pomocí stejného softwaru. Bylo postupováno podle dříve uvedené strategie gatingu (Vašíček et al. 2022; Savvulidi et al. 2021), a byla identifikována populace životaschopných spermií (H342+/PI-/PNA-; VIAB %), populace „spermatické buňky - poškozená cytoplazmatická membrána“ (H342+/PI+/PNA-; PM %), populace „spermatické buňky - poškozená cytoplazmatická membrána a akrozom“ (H342+/PI+/PNA+; PMA %), a populace „spermatické buňky - poškozený akrozom“ (H342+/PI-/PNA+; PA %).



Obrázek 1. Průtoková cytometrie: přístrojové vybavení a výstupy. A – celkový vzhled průtokového cytometru; B – uvnitř přístroje: aspirační jehla; C – kyveta, ve které probíhá měření fluorescence; D - fotonásobiče; E - typický výstup z průtokového cytometru: výstupem měření jsou bodové grafy a histogramy které ukazují maxima fluorescence pro kvalitativní hodnocení sledovaných parametrů.

Záznam klimatických parametrů a výpočet teplotně-vlhkostního indexu

Pro trvalé zaznamenávání klimatických parametrů (teplota a relativní vlhkost) v objektu se zvířaty byl použit přístroj pro záznam dat – dataloger Testo řady 175 (Testo, Titisee-Neustadt, Německo). Tento dataloger byl instalován uvnitř objektu na stěně ve výšce dvou metrů nad povrchem podlahy. Klimatické parametry byly snímány každých 15 minut. Pro zpracování klimatických údajů uložených v paměti záznamníku dat byl použit software Testo ComSoft Basic. Průměrný teplotně-vlhkostní index (THI) byl vypočítán podle dřívějších studií (García-Isperto et al. 2006). THI byl vypočítán v den odběru spermatu (THI-0), stejně jako v den předcházející 30 dní před odběrem (THI-30; časový bod pro pozdní spermatogenezi) a v den předcházející 60 dní před odběrem spermatu (THI-60; časový bod pro časnou spermatogenezi). Dále byl vypočítán počet dnů s $THI > 70$ za 30 dnů čili za 1 měsíc ($THI > 70/1m$), resp. za 60 dnů čili za dva měsíce ($THI > 70/2m$) předcházejících odběru spermatu.

Statistické vyhodnocení

Statistické analýzy byly provedeny pomocí softwaru SAS ver. 9.x (SAS/STAT®; SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA). Popisné statistiky byly vypočteny pomocí procedury UNIVARIATE. Pearsonovy korelační koeficienty pro měření těsnosti vztahu mezi analyzovanými proměnnými

byly stanoveny pomocí procedury CORR. Korelační koeficienty byly vyhodnoceny následovně: 0,3 až 0,5 (-0,3 až -0,5) slabé; 0,5 až 0,8 (-0,5 až -0,8) středně silné; více než 0,8 (-0,8) velmi silné. Hodnoty korelačního koeficientu mezi 0 a +0,3/-0,3 byly označeny jako velmi slabá korelace bez ohledu na hladinu významnosti. Data pro proměnné byla vyšetřena na normální rozdělení (Shapiro-Wilkův test) a homogenitu rozptylu (Bartlettův test).

Parametry býčího semene byly vyhodnoceny za pomoci vícefaktorové analýzy rozptylu s náhodným a opakovaným vlivem býka pomocí procedury MIXED. Pro výběr vhodných efektů do modelové rovnice byla použita procedura REG, metoda STEPWISE a parametr Akaikeho informačního kritéria. Modelové rovnice vždy zahrnovaly fixní efekt krevních metabolitů (TOS nebo TAS), THI index (v den odběru spermatu, 30 dní nebo 60 dní před odběrem spermatu) a náhodný opakovaný fixní efekt býků. Vzorky, které by mohly být ovlivněny hemolýzou, byly z analýzy TOS a TAS vyloučeny. Rozdíly mezi průměry byly vyhodnoceny pomocí Tukey-Kramerova testu. Byla použita vícefaktorová analýza rozptylu podle následující modelové rovnice:

$$Y_{ijkl} = \mu + MET_i + THI_j + bull_k + e_{ijkl}$$

kde:

Y_{ijkl} – závislá proměnná (objem ejakulátu [g]; koncentrace ejakulátu [10^9 /ml]; pohyblivost celková [%]; pohyblivost progresivní [%]; viabilní spermatické buňky, VIAB [%]; spermatické buňky - poškozená cytoplazmatická membrána, PM [%]; spermatické buňky - poškozená cytoplazmatická membrána a akrozom, PMA [%]; spermatické buňky - poškozený akrozom, PA [%]);

μ – průměrná hodnota závislé proměnné;

MET_i - skupina fixního efektu koncentrace metabolitů v krvi (varianta TOS - $i = 1$ (< 2,55), $n = 27$; $i = 2$ (2,55 – 4,73), $n = 15$; $i = 3$ (> 4,73), $n = 20$; varianta TAS - $i = 1$ (< 2,90), $n = 30$; $i = 2$ (2,90 - 4,54), $n = 17$; $i = 3$ (> 4,54), $n = 15$;

THI_j - skupina fixního efektu indexu THI (pro všechny varianty THI = v den odběru spermatu, 30 dní před odběrem spermatu, 60 dní před odběrem spermatu - $j = 1$ (< 50), $n = 17$; $j = 2$ (50 - 65), $n = 34$; $j = 3$ (> 65), $n = 34$);

$bull_k$ - náhodný opakovaný fixní efekt býka (16 býků v 5 opakováních, pouze jeden býk byl v průběhu pokusu nahrazen jiným býkem));

e_{ijkl} – zbytková chyba.

Hladiny významnosti byly stanoveny na $P < 0,05$, $P < 0,01$ a $P < 0,001$.

2.1.2. Metodika porovnání ředidel založených na rostlinném a živočišném základu

Býci

Pro tento experiment bylo použito sperma býků holštýnského plemene ($n = 10$) chovaných v inseminační stanici (Středočeský kraj, Česká republika). Býci byli zdraví a pohlavně dospělí ($3,5 \pm 0,5$ roku), běžně používaní pro odběr spermatu. Býci byli ustájeni za stejných optimálních podmínek manipulace, ustájení, krmení, napájení a managementu po celou dobu trvání studie.

Odběr spermatu

Sperma bylo odebíráno standardním postupem v týdenních intervalech po dobu 5 týdnů (celkem 5 ejakulátů na býka). Odběr spermatu byl zajištěn pomocí temperované ($38\text{ }^{\circ}\text{C}$) a sterilizované umělé vagíny. Odebrané ejakuláty byly ihned po odběru vyhodnoceny pomocí elektronické přesné váhy a počítačového systému pro analýzu spermatu AndroVision® (Minitübe GmbH, Tiefenbach, Německo). Pouze ejakuláty s objemem $\geq 1,5$ ml, koncentrací spermií $\geq 700 \times 10^6$ spermií/ml a aktivitou $\geq 70\%$ byly dále zpracovány.

Zpracování, mrazení a rozmrazení spermatu

Po počáteční kontrole kvality byl každý odebraný vzorek spermatu rozdělen do tří alikvotů a zředěn třemi komerčními ředidly: AndroMed® na rostlinné bázi obsahující 1 % sójového lecitinu (Minitübe GmbH, Tiefenbach, Německo), BullXcell® na živočišné bázi obsahující 25 % (v/v) čerstvého vaječného žloutku (IMV Technologies, L'Aigle, Francie) a Optidyl® na živočišné bázi obsahující 20 % (v/v) ionizovaného vaječného žloutku (IMV Technologies, L'Aigle, Francie) na konečnou koncentraci aktivních spermií 10×10^6 na jednu inseminační dávku. Naředěné sperma bylo poté automaticky umístěno do 0,25 ml pejet (IMV Technologies, L'Aigle, Francie). Pejety byly po dobu dvou hodin ekvilibrovány při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a zmrazeny dvoufázovým zmrazováním (Januskauskas et al. 1999) pomocí programovatelného mrazicího zařízení DigitCool® (IMV Technologies, L'Aigle, Francie). Zmrazené dávky byly následně ponořeny do tekutého dusíku a skladovány až do procesu rozmrazování. Rozmrazování probíhalo ve vodní lázni při teplotě $38 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 sekund.

Průtoková cytometrie spermií

Pro posouzení základních kvalitativních parametrů byly vzorky barveny a hodnoceny průtokovou cytometrií, jak je popsáno v oddíle 2.1.1. Dodatečně byly vzorky barveny ve tmě při 38 °C po dobu 10 minut pomocí 80 nM MitoTracker Deep Red (MTR DR) pro detekci mitochondriálního membránového potenciálu a byla identifikována populace životaschopných spermií s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem (H342+/PI-/PNA-/MTR DR+).

Statistické vyhodnocení

Statistická analýza byla provedena pomocí statistického programu SAS (v9.x; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Data pro proměnné spermií byla vyšetřena na normální rozdělení (Shapiro-Wilkův test) a homogenitu rozptylu (Bartlettův test) a následně byla analyzována pomocí zobecněného lineárního modelu (PROC GLM). Nejlepší vyhodnocení modelu bylo vybráno na základě postupu REG (metoda STEPWISE). Závislými proměnnými byly procento životaschopných spermií, procento životaschopných spermií s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem, procento poškození plazmatické membrány a procento poškození akrozomu. Do konečného modelu byly zahrnuty fixní efekty býka, ředidla, doby inkubace a interakce mezi těmito efekty. Rozdíly mezi průměry nejmenších čtverců byly vyhodnoceny Tukey-Kramerovou metodou. Statistická průkaznost byla detekována na hladině významnosti $P < 0,05$.

2.1.3. Metodika zlepšování ředidel s rostlinným základem doplňováním lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL)

Býci

V tomto pokusu bylo použito 5 holštýnských býků ustájených na inseminační stanici (Středočeský kraj, Česká republika). Všechna zvířata byla chována za stejných podmínek výživy a managementu. Plemeníci byli podobného věku ($4 \pm 0,5$ roku), bez známek zdravotních problémů a byli běžně používáni k odběru spermatu.

Odběr spermatu

Vzorky spermatu byly odebírány každému býkovi s umělou vaginou v týdenních intervalech po dobu 6 týdnů. Získané ejakuláty byly ihned po odběru spermatu vyhodnoceny pomocí elektronické přesné váhy a systému počítačové analýzy spermií AndroVision® (Minitübe GmbH, Tiefenbach, Německo). Pouze ejakuláty s objemem $\geq 1,5$ ml, koncentrací spermií $\geq 700 \times 10^6$ spermií/ml a aktivita ≥ 70 % byly dále zpracovány.

Zpracování, mrazení a rozmrazení spermatu

Po počátečním vyhodnocení byly vzorky rozděleny na tři alikvotní části a naředěny na 40×10^6 spermií/ml v komerčním ředidlu AndroMed® (Minitübe GmbH, Tiefenbach, Německo), doplněném 0%, 4% nebo 8% (v/v) koncentrovaným LDL připraveným podle dříve uvedeného protokolu (Šimoník et al. 2019). Zředěné sperma bylo poté automaticky naplněno do 0,25 ml pejet (IMV Technologies, L'Aigle, Francie), pomalu ochlazen na teplotu $+4^\circ\text{C}$ a ekvilibrováno v chladicím boxu po dobu 4 hodin. Dávky byly zmrazeny dvoufázovou rychlostí zmrazování podle doporučení Doležalové et al. (2016) pomocí programovatelného mrazáku DigitCool® (IMV Technologies, L'Aigle, Francie). Zmrazené dávky byly poté ponořeny do kapalného dusíku a skladovány v něm až do procesu rozmrazování. Rozmrazování bylo prováděno ve vodní lázni při $38 \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 30 sekund (Doležalová et al. 2016).

Průtoková cytometrie spermií

Vyhodnocení průtokovou cytometrií bylo provedeno podobně, jak je popsáno v části 2.1.2.4.

Statistické vyhodnocení

Statistická analýza byla provedena pomocí statistického programu SAS (v9.x; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Data pro proměnné spermií byla vyšetřena na normální rozdělení (Shapiro-Wilkův test) a homogenitu rozptylu (Bartlettův test) a následně byla analyzována pomocí zobecněného lineárního modelu (PROC GLM). Nejlepší model byl vybrán na základě Akaikova informačního kritéria. K vyhodnocení rozdílů průměrů nejmenších čtverců byla použita Tukey-Kramerova metoda. Byla použita následující modelová rovnice:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + BC_{jk} + e_{ijkl}$$

kde:

Y_{ijkl} – závislá proměnná (viabilita, vysoký mitochondriální membránový potenciál, poškození plazmatické membrány, poškození akrozomu);

μ – průměrná hodnota závislé proměnné; A_i – pevný efekt býka: i (1, $n = 72$; $i = 2$, $n = 72$; $i = 3$, $n = 72$; $i = 4$, $n = 72$; $i = 5$, $n = 72$); B_j – fixní účinek suplementace LDL: j (kontrola, $n = 120$; 4 % LDL, $n = 120$; 8 % LDL, $n = 120$); C_k – fixní vliv inkubační doby: k (0, $n = 180$; 2, $n = 180$); BC_{jk} – interakce mezi fixním účinkem suplementace LDL a inkubační dobou; e_{ijkl} – zbytková chyba.

Signifikantní rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny na $P < 0,05$.

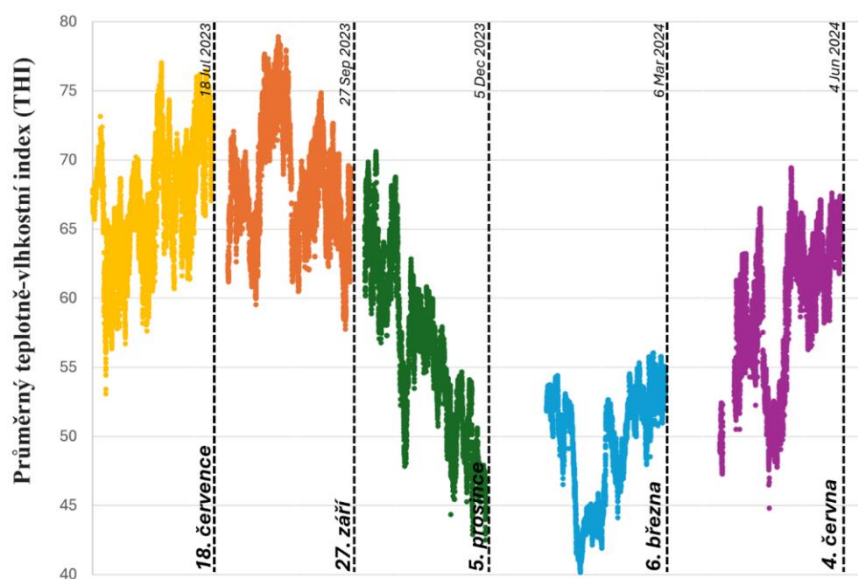
2.2. Výsledky sledování

2.2.1. Výsledky hodnocení sezónnosti produkce spermatu u býků

Vliv mikroklimatických podmínek na kvantitativní a kvalitativní parametry spermií

Bylo hodnoceno kolísání klimatických parametrů (teploty, vlhkosti a teplotně-vlhkostní indexu) uvnitř ustájení býků napříč ročními obdobími. Průměrná teplota v den odběru ejakulátu byla 15,6 °C s relativní vlhkostí 66,3 % za celé sledované období. Tyto ukazatele však vykazovaly poměrně velký rozptyl, a proto byl pro další hodnocení využit kombinovaný index THI. Po převedení na teplotně-vlhkostní index jsme dostali vývoj tohoto ukazatele napříč sledovanými odběry v čase, což je uvedeno v grafu 1.

Graf 1 - Kolísání indexu teploty a vlhkosti (THI) uvnitř zařízení pro chov býků během období pozorování.



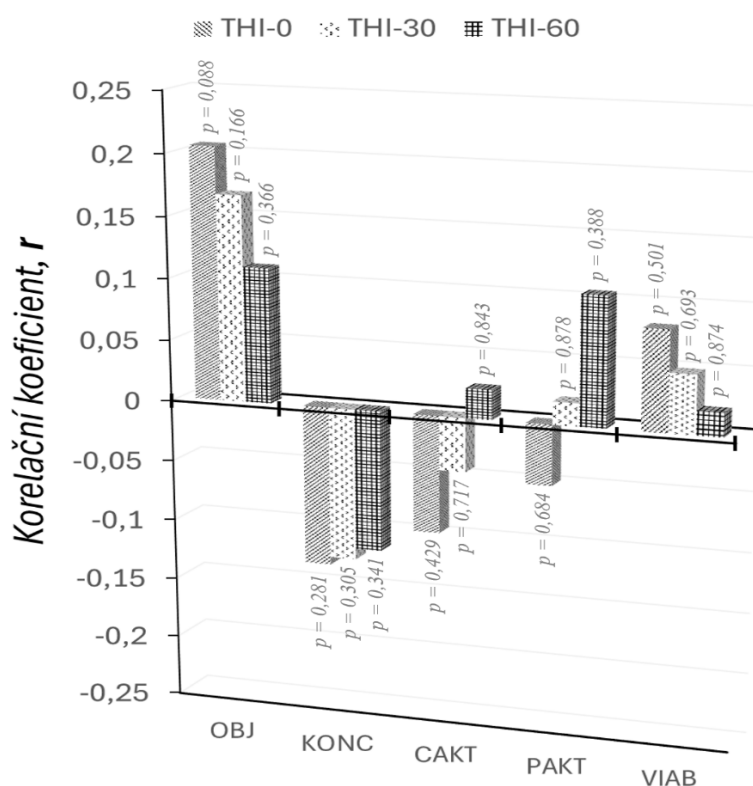
Je zobrazeno pět odběrů ejakulátu během roku a kolísání THI 60 dní před každým z nich. Černé tečkované čáry představují časové body odběru spermatu.

Jak je patrné ze zmiňovaného grafu 1, po většinu sledovaného období byla hodnota indexu pod 70. Průměrná hodnota za celé sledované období byla 59,00; min. THI bylo 40,15; max. THI bylo 78,93; medián byl 59,90.

Dále byla v rámci vyhodnocení realizována korelační analýza, k identifikaci korelace mezi teplotou, relativní vlhkostí a charakteristikami ejakulátu. Nebyly vypočteny žádné statisticky významné korelace. Dále s ohledem na skutečnost, že klimatické faktory (teplota

a vlhkost) neovlivňují zvířata samostatně, ale v kombinaci, jsme se zaměřili na korelaci mezi THI indexem v den odběru ejakulátu, THI indexem 30 dnů před odběrem ejakulátu a THI indexem 60 dnů před odběrem ejakulátu na jedné straně a charakteristikami ejakulátů na straně druhé. Hodnotili jsme vliv jmenovaných THI indexů na vznik, vývoj, zrání spermií a na zralé spermie. Mezi mikroklimatickými podmínkami a charakteristikami získaného semene byly zjištěny slabé, statisticky nevýznamné korelace, které jsou znázorněny v grafu 2.

Graf 2 - Korelační vztahy klimatických podmínek ke kvantitativním a kvalitativním parametrům spermií.

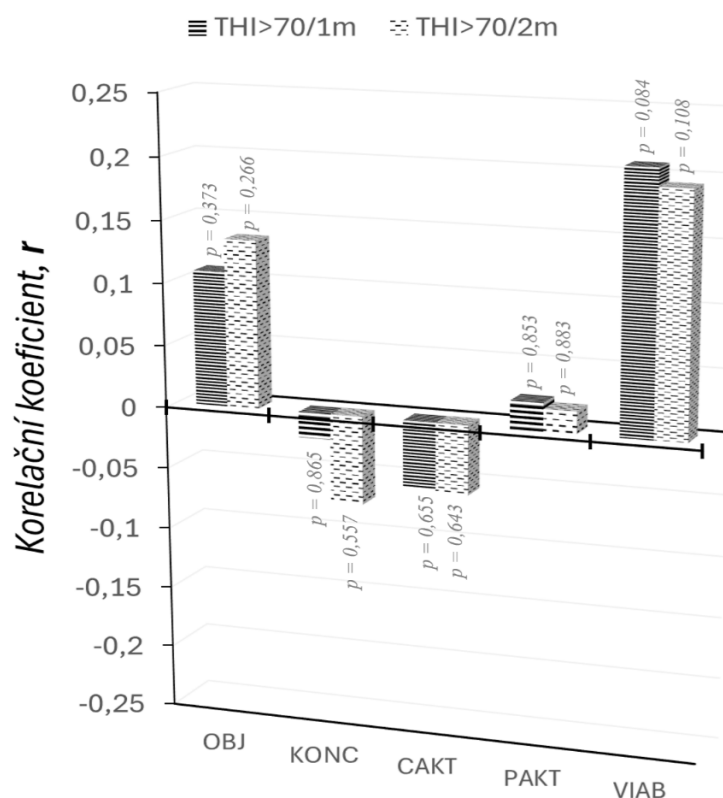


OBJ – objem ejakulátu (g); KONC – koncentrace ejakulátu ($10^9/\text{ml}$); CAKT – celková pohyblivost spermií (%); PAKT – progresivní pohyblivost spermií (%); VIAB – viabilita spermií (%); THI-0 – index vypočtený v den odběru spermatu; THI-30 – index vypočtený v den předcházející 30 dnům před odběrem spermatu; THI-60 – index vypočtený v den předcházející 60 dnům před odběrem spermatu.

Dále bylo také provedeno hodnocení korelací mezi počtem dnů s hodnotami THI nad 70 za celou dobu spermatogeneze a kvalitou spermií. Obecně platí, že stejně jako u předchozích korelací pro parametry objem ejakulátu (OBJ), koncentrace ejakulátu (KONC), celková

pohyblivost spermií (CAKT), progresivní pohyblivost spermií (PAKT) a viabilita spermií (VIAB) jsme pozorovali podobné trendy. Zajímavé je, že pozitivní, i když opět slabá ($r = 0,194 - 0,208$), korelace byla pozorována mezi počtem dnů s $THI > 70$ během spermatogeneze a procentem životaschopných spermií (graf 3). Všechny sledované korelace byly neprůkazné.

Graf 3 - Korelační vztahy klimatických podmínek ku kvantitativním a kvalitativním parametrům spermií.



OBJ – objem ejakulátu (g); KONC – koncentrace ejakulátu ($10^9/\text{ml}$); CAKT – celková pohyblivost spermií (%); PAKT – progresivní pohyblivost spermií (%); VIAB – viabilita spermií (%); $THI>70/1m$ – počet dní s $THI > 70$ za měsíc před odběrem spermatu; $THI>70/2m$ - počet dní s $THI > 70$ za dva měsíce před odběrem spermatu.

Analýza korelace mezi oxidačním stavem krve a kvalitou spermií

Z výsledků korelační analýzy vyplývá, že parametr TOS byl pouze slabě korelován k parametru PM (poškozená cytoplazmatická membrána %) ($r = 0,291$; $P < 0,05$). TAS byl slabě záporně ve vztahu k VIAB (viabilní spermatické buňky %) ($r = -0,326$; $P < 0,05$). Průkaznější závislost pak byla mezi tímto ukazatelem oxidačního statusu býka a PMA (poškozená cytoplazmatická membrána a akrozom %) ($r = 0,371$; $P < 0,01$). Parametr OSI (index oxidačního stresu)

oxidačního statusu byl následně podobně silně, ale opačně ve vztahu k VIAB a PMA. Nakonec GPx (glutathionperoxidasa) byla slabě záporně korelována s objemem ejakulátu GPx ($r = -0,259$; $P < 0,05$), PM (poškozená cytoplazmatická membrána %) ($r = 0,261$; $P < 0,05$) a středně silně s PA (poškozený akrozom %) ($r = 0,479$; $P < 0,01$).

Tabulka 1 – Korelace mezi oxidačním stavem býků stanoveným z krve a parametry kvality ejakulátu

		OBJ	KONC	CAKT	PAKT	VIAB	PM	PMA	PA
TOS	r	-0,137	0,129	-0,025	-0,070	0,068	0,093	-0,215	0,291
	P	0,319	0,348	0,855	0,614	0,624	0,505	0,119	0,033
	n	55	55	55	55	54	54	54	54
TAS	r	-0,021	-0,179	0,089	0,076	-0,326	0,190	0,371	0,092
	P	0,877	0,191	0,519	0,582	0,016	0,169	0,006	0,506
	n	55	55	55	55	54	54	54	54
OSI	r	-0,034	0,208	-0,019	-0,035	0,327	-0,153	-0,416	0,043
	P	0,806	0,128	0,893	0,801	0,016	0,271	0,002	0,756
	n	55	55	55	55	54	54	54	54
GPx	r	-0,259	0,141	-0,006	-0,033	-0,149	0,261	-0,036	0,479
	P	0,030	0,244	0,960	0,786	0,218	0,029	0,769	<,0001
	n	70	70	70	70	70	70	70	70

TOS - celkový oxidační status (μmol ekvivalentů $\text{H}_2\text{O}_2/\text{L}$); TAS – celkový antioxidační status (mmol ekvivalentů Troloxu/L) OSI – index oxidačního stresu (%); GPx – glutathionperoxidasa (ngkat/mg Hb); OBJ – objem ejakulátu (g); KONC – koncentrace ejakulátu ($10^9/\text{ml}$); CAKT – celková pohyblivost spermií (%); PAKT – progresivní pohyblivost spermií (%); VIAB – viabilita spermií (%); PM - poškozená cytoplazmatická membrána (%); PMA poškozená cytoplazmatická membrána a akrozom (%); PA - poškozený akrozom (%); r - korelační koeficient; P - hladina významnosti; n - počet pozorování.

Vliv klimatických parametrů a obsahu metabolitů v krvi na kvalitu ejakulátu býků

Detailní vyhodnocení kombinace THI indexů a skupiny ukazatelů oxidačního stavu býků z krve měla za cíl vysvětlení trendů fungování metabolismu býků na kvalitativní parametry ejakulátu. U většiny vyhodnocení nebyly zaznamenány průkaznosti efektů v modelové rovnici s výjimkou náhodného efektu býka. Průkazné efekty byly pouze pro doplňkové charakteristiky ejakulátu, jako je viabilita spermií (VIAB), poškozená cytoplazmatická membrána (PM), poškozená cytoplazmatická membrána a akrozom (PMA) a poškozený akrozom (PA). Výsledky sledovaných parametrů však nebyly zcela jednoznačné, a proto nebylo možné definovat specifické trendy v chování těchto ukazatelů. Přestože statistická průkaznost nebyla prokázána,

určité tendence byly patrné, a při širším rozsahu sledování by mohly být v budoucnu lépe objasněny.

2.2.2. Výsledky vlivu ředidel na zmrazení spermií

Srovnání ředidel na rostlinné a živočišné bázi

Zachování viability spermií se významně lišilo ($P < 0,05$) v závislosti na použitém ředidlu. Jak je patrné z tabulky 2, tak ředidla na živočišné bázi měla průkazně vyšší hodnoty sledovaných parametrů.

Tabulka 2 - Účinek různých ředidel spermatu na viabilitu spermií po rozmrazení

Ředidlo	Viabilita (%)	Vysoký mitochondriální membránový potenciál (%)	Poškození plazmatické membrány (%)	Poškození akrozomu (%)
AndroMed® na rostlinné bázi	41,66 ± 0,281 ^a	53,89 ± 0,608 ^a	57,32 ± 0,281 ^a	35,84 ± 0,244 ^a
BullXcell® na živočišné bázi	47,29 ± 0,281 ^b	80,51 ± 0,608 ^b	51,51 ± 0,281 ^b	29,35 ± 0,244 ^b
Optidyl® na živočišné bázi	50,81 ± 0,281 ^c	60,17 ± 0,608 ^c	47,79 ± 0,281 ^c	28,47 ± 0,244 ^c

a–c Různá písmena označují rozdíly mezi skupinami ve sloupci ($P < 0,05$); výsledky jsou uvedeny jako průměr nejmenších čtverců ± SEM

Suplementace LDL na zlepšení rostlinného ředidla

Ukazatele kvality spermií se signifikantně lišily ($P < 0,05$) v závislosti na suplementaci LDL, jak je patrné z tabulky 3. Ve srovnání s kontrolou (0 % LDL) byly všechny proměnné spermií po rozmrazení zlepšeny ($P < 0,05$) při přítomnosti LDL v ředidle. To se týká i parametru poškození akrozomu, kdy při zvýšení přídavku LDL docházelo ke snížení procenta poškození spermií.

Tabulka 3 - Účinek různé suplementace LDL na proměnné spermií po rozmrazení

Doplňek	Viabilita (%)	Vysoký mitochondriální membránový potenciál (%)	Poškození plazmatické membrány (%)	Poškození akrozomu (%)
0% LDL	24,86 ± 1,133 ^a	47,79 ± 1,252 ^a	74,77 ± 1,142 ^a	42,83 ± 1,125 ^a
4% LDL	31,45 ± 1,133 ^b	66,69 ± 1,252 ^b	67,70 ± 1,142 ^b	41,31 ± 1,125 ^a
8% LDL	30,61 ± 1,133 ^b	68,81 ± 1,252 ^b	68,69 ± 1,142 ^b	38,36 ± 1,125 ^b

LDL - lipoproteiny s nízkou hustotou; a-b Různá písmena ve sloupcích vyjadřují statistickou průkaznost ($P < 0,05$); výsledky jsou uvedeny jako průměr nejmenších čtverců ± SEM

3. Závěr a doporučení pro praxi

3.1. Závěr a doporučení pro praxi: hodnocení sezónnosti produkce spermatu u býků

Jak mikroklimatické podmínky ovlivnily kvantitativní a kvalitativní parametry spermií

Teplota a relativní vlhkost vzduchu měla v podmínkách ustájení býků na inseminační stanici určitou dynamiku. Nicméně v průběhu pozorování nedošlo k narušení teplotního komfortu, protože nebyly zaznamenány hodnoty THI indexu nad 80. Takto chovaní holštýnští býci tedy nejsou ohrožováni teplotním stresem v uzavřených stájích. Při těchto podmínkách nebyly pozorovány žádné nepříznivé účinky na hodnocené kvalitativní proměnné odebraných ejakulátů (objem ejakulátů, koncentrace, celková pohyblivost, progresivní pohyblivost a viabilita spermií). To bylo dále potvrzeno absencí statisticky významné korelace mezi hodnotami THI a degradací spermií. Je možné konstatovat, že získané výsledky odůvodňují předpoklad, že plemenní býci holštýnského skotu chovaní v ČR v zařízeních bez nuceného větrání nebo klimatizace produkovali po celou dobu kalendářního roku vysoce kvalitní ejakulát a spermie.

Jak oxidační stav krve koreloval s kvalitou spermií během různých ročních období

Výsledky korelací mezi obsahem metabolitů v krvi a kvalitou ejakulátu nepotvrdily žádné zásadní vztahy mezi těmito ukazateli. Sice bylo vypočteno několik průkazných korelací, ale především k doplňkovým parametrům ejakulátu. Nelze tedy ani na základě korelačních analýz potvrdit jednoznačný vztah mezi metabolity oxidačního stavu u býků zjišťovanými z krve a kvalitou ejakulátu. Podobné závěry jsou pak zřejmé i v rámci detailního vyhodnocení víceznakovou analýzou. Nicméně při úpravě designu pokusu, zařazením dalších dílčích ukazatelů oxidačního stresu, by mohlo být v budoucnu zjištěno případně více souvislostí.

3.2 Závěr a doporučení pro praxi: o ředidlech a jejich důležitých rolích pro zlepšení zpracování inseminačních dávek býčích spermií

Které ředidlo je pro kryokonzervaci býčích spermií lepší: rostlinného nebo živočišného základu?

Pokud jde o účinky ředidel na funkčnost proměnných býčích spermií po rozmrazení, lze vyvodit několik závěrů. Specifické složení ředidla má evidentní vliv na viabilitu spermií, jejich mitochondriální stav a membránovou integritu. Obecně z výsledků vyplývá, že ředidla na bázi vaječného žloutku, tedy živočišného původu, jsou lepší ve všech analyzovaných parametrech než ředidlo obsahující sójový lecitin, tedy rostlinného původu, což potvrzují výsledky

stanovené s využitím průtokové cytometrie. Závěry konstatují, že vaječný žloutek je stále vhodnou sloučeninou pro kryokonzervaci býčího spermatu navzdory jeho některým nevýhodám souvisejícím s biologickou bezpečností. Na základě našich výsledků navrhuje, že z hlediska zachování lepší kvality spermií *in vitro* po rozmrazení jsou výhodnější ředidla spermatu na bázi vaječného žloutku. Pokud jsou však otázky biologické bezpečnosti nejdůležitější, pak je rostlinné ředidlo (zejména po vhodné úpravě jeho obsahu) správnou volbou.

Jak upravit ředidlo na rostlinné bázi pro zlepšení odolnosti býčích spermií vůči kryokonzervaci

V našich experimentech jsme pozorovali, že suplementace LDL rostlinným ředidlem je velmi účinný způsob, jak zlepšit odolnost býčích spermií vůči kryokonzervaci. Doplnění rostlinného ředidla AndroMed® s 8% LDL vedlo k neoptimálnějším hodnotám viability spermií, zlepšení jejich mitochondriálního membránového potenciálu a snížení poškození plazmatické membrány a akrozomů. Naše výsledky jasně ukazují pozitivní účinek modifikace ředidla spermatu býků na rostlinné bázi se sojovým lecitinem s LDL ke zmírnění škodlivého účinku procesu kryokonzervace na parametry spermií.

III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

V metodice jsou uvedeny metody a vlastními výsledky výzkumně ověřeného metodického postupu kryokonzervace ejakulátu býků. Uváděné informace jsou výsledkem výzkumné činnosti autorů a výsledkem systematického studia vědecké literatury v oblasti metod používaných v reprodukci hospodářských zvířat. Inovativní je především sledování klimatických parametrů v kombinaci s oxidačním stresem (biochemická analýza krve) na kvalitu ejakulátu hodnocenou různými laboratorními postupy (hodnotil se získaný objem ejakulátu a koncentrace spermií; pro analýzu motility byl použit počítačový program CASA, který hodnotil celkovou a progresivní pohyblivost spermií; pro posouzení základních kvalitativních parametrů spermií byly vzorky podrobeny průtokové cytometrické analýze). Přínosem je komplexní pohled a hodnocení vlivu exogenních a endogenních faktorů na kvalitu ejakulátu. Využití počítačově asistované analýzy spermií a průtokové cytometrie poskytlo v rámci ověření výsledků spolehlivé údaje o motilitě a buněčné struktuře spermií. Tato zjištění napomáhají k optimálnímu načasování odběru spermatu a výběru ředícího media pro zlepšení kvality a množství inseminační dávky. Implementace těchto přístupů může snížit náklady, zvýšit efektivitu a minimalizovat dopad na životní prostředí, což podporuje udržitelnější a ziskovější chov mléčného skotu. Současně tato metodika dává předpoklad pro pokračování a rozvoj pokusů pro další objasňování biologických vztahů mezi metabolismem býků a kvalitou jejich ejakulátu.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika bude vhodnou pomůckou pro podnikatele v zemědělství, ve šlechtění v chovu skotu při realizaci zvyšování konkurenceschopnosti zemědělství – chovu skotu (Výzkumný směr „Živočišná produkce“, 7.1. Genetika a genomika, šlechtění a reprodukce hospodářských zvířat, využití biotechnologií v živočišné výrobě a 7.2. Systémy a technologie chovu, welfare hospodářských zvířat a ekonomika živočišné produkce; Koncepce výzkumu, vývoje a inovací Ministerstva zemědělství na léta 2023 – 2032) uplatněním progresivních technologických postupů v reprodukci skotu.

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

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

V zájmu každého producenta inseminačních dávek je minimalizace nákladů na jejich výrobu umožňující zvýšení konkurenceschopnosti podniku a dosažení co nejvyššího zisku. Kromě genetické kvality plemenných býků rozhoduje o úspěchu producentů inseminačních dávek také kvalita a množství vyrobených inseminačních dávek. Hlavním cílem je vyrobit dávky v požadované kvalitě, tedy s vysokou oplozovací schopností. Nedostatečná úroveň reprodukce dojnic je jedním z hlavních ekonomických problémů současného chovu nejen u nás, ale i ve světě.

Ekonomický přínos potenciálně umožněný realizací navrhovaných doporučení lze spatřovat v optimálním využití ejakulátu býků, které povede ke zvýšení kvality inseminačních dávek býků. Naše data nám mimo jiné umožňují dospět k závěru, že v současné době i přes všeobecný nárůst průměrných teplot v celé Evropě lze v České republice chovat plemenné býky ve standardních podmínkách bez nucené cirkulace vzduchu a bez klimatizace. To výrazně snižuje energetickou náročnost chovu zvířat a pomáhá minimalizovat náklady. Navíc se snižuje uhlíková stopa chovné stanice.

Navrhovaná doporučení umožní zvýšení počtu vyrobených inseminačních dávek z jednoho odběru býka odhadem o 10 %. Lze tedy předpokládat zvýšení počtu vyrobených inseminačních dávek od jednotlivých býků o cca 20 na jeden odběr. Roční produkce se pak může zvýšit při využívání 20 býků na produkci spermatu 2 x týdně o 43 200 inseminačních dávek za rok. To při průměrné ceně inseminační dávky 500 Kč dělá zvýšení potenciálních tržeb o 21 600 000 Kč. Udržení, resp. zvýšení oplozovací schopnosti inseminačních dávek potenciálně může představovat významný ekonomický přínos pro chovatele dojnic. To při vyčíslení ceny jedné inseminační dávky na zhruba 500 Kč a zvýšení % zabřezávání v průměrném chovu čítajícího 300 kusů základního stáda o 1 %, činí úspory nákladů minimálně 1500 Kč, a to bez započítání nákladů inseminační služby. V měřítku využití ve všech stádech skotu chovaného skotu v ČR (zhruba 1000) pak zisk, resp. snížení nákladů odpovídá 1 500 000 Kč.

Dalším přínosem pak může být, jak bylo výše zmíněno zlepšení efektivity výroby inseminačních dávek, která může u některých býků vést ke zkrácení potřebné doby chovu pro získání určitého potřebného množství inseminačních dávek. To nepřímo sníží potřebu délky chovu a nákladů na krmný den při výrobě jedné inseminační dávky. Uvedené přínosy jsou tedy četné a promítnou se do celé sféry reprodukce, a to především u dojených plemen skotu.

VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aires VA., Hinsch K-D., Mueller-Schloesser F., Bogner K., Mueller-Schloesser S., Hinsch E. (2003). *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60(2): 269-279.
- Al-Kanaan A., König S., Brügemann, K. (2015). Effects of heat stress on semen characteristics of Holstein bulls estimated on a continuous phenotypic and genetic scale. *Livestock Science*, 177: 15-24.
- Asadpour R., Tayefi-Nasrabadi H. (2012). Seasonal variation in antioxidant enzyme activity in seminal plasma in Holstein bulls. *Comparative Clinical Pathology*, 21: 173-176.
- Beran J., Stádník L., Bezdíček J., Louda F., Čítek J., Ducháček J. (2012). 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. *Archives Animal Breeding*, 55(3): 207-218.
- Beran J., Stádník L., Ducháček J., Okrouhlá M., Doležalová M., 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.
- Beran J., Šimoník O., Stádník L., Rajmon R., Ducháček J., Krejčárková A., Doležalová M., Šichtař J. (2013). Effect of bull, diluter and LDL-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 61(6): 1575-1581.
- Balic' IM., Milinkovic' -Tur S., Samardžijab M., Vince S. (2012). Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in simmental bulls. *Theriogenology*, 78(2): 423-431.
- Bezdíček J., Nesvadbová A., Ducháček J., Sekaninová J., Stádník L., Janků M. (2024). Changes in the oxidative - biochemical status in dairy cows during the transition period affecting reproductive and health parameters. *Czech Journal of Animal Science*, 69(9): 345-355.
- Bezdíček J., Nesvadbová A., Makarevich A., Kubovičová E. (2021). Negative impact of heat stress on reproduction in cows: Animal husbandry and biotechnological viewpoints: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 66(8): 293-301.
- Boudaoud A. (2023). Timed artificial insemination protocols in dairy cattle: Functioning, shortcomings, and improvements. *Czech Journal of Animal Science*, 68 (6): 231-244.

- Caroppo E., Dattilo M. (2022). Sperm redox biology challenges the role of antioxidants as a treatment for male factor infertility. *F&S Reviews*, 3(1): 90-104.
- Crespilho AM., Nichi M., Guasti PN., Freitas-Dell'Aqua CP., Sá Filho MF., Maziero RR., Dell'Aqua JA., Papa FO. (2014). Sperm fertility and viability following 48h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. *Animal Reproduction Science*, 146(3-4): 126-133.
- Doležalová M., Stádník L., Biniová Z., Ducháček J., Stupka R. (2016). Equilibration and freezing interactions affecting bull sperm characteristics after thawing. *Czech Journal of Animal Science*, 61(11): 515-525.
- Erel O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4): 277-285.
- Erel O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12): 1103-1111.
- García-Ispuerto I., López-Gatius F., Santolaria P., Yániz JL., Nogareda C., López-Béjar M., De Rensis F. (2006). Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. *Theriogenology*, 65(4): 799-807.
- Gloria A., Candeloro L., Wegher L., Robbe D., Carluccio A., Contri A. (2021). Environmental temperature and relative humidity differently affect the sperm characteristics in Brown Swiss and Belgian Blue bulls. *International Journal of Biometeorology*, 65(12): 2189-2199.
- Gong J., Xiao M. (2016). Selenium and antioxidant status in dairy cows at different stages of lactation. *Biological Trace Element Research*, 171(1): 89-93.
- Grba J., Kuželová L., Makarevich A., Baláži A., Dragin S., Tekić D., Chrenek P. (2024). The effect of ellagic acid on rabbit sperm *in vitro* parameters after cryopreservation. *Czech Journal of Animal Science*, 69(3): 110-117.
- Gürler H., Calisici O., Bollwein H. (2015). Inter- and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 155: 99-105.
- Hashem NM., Gonzalez-Bulnes A. (2020). State-of-the-art and prospective of nanotechnologies for smart reproductive management of farm animals. *Animals*, 10(5): 840.

- Hu JH., Jiang ZL., Lv RK., Li QW., Zhang SS., Zan LS., Li YK., Li X. (2011). The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*, 62(1): 83-87.
- Chen X., Li Y., Jun Xiao, Dong J., Zhao W., Han Z., Xin L., Qin G., Wang T., Zhen Y., Sun Z., Zhang X. (2023). Heat stress affects the milk yield, milk composition, serum oxidative status, and metabolites of Holstein cows during mid-lactation. *Czech Journal of Animal Science*, 68 (8): 333-345.
- Januskauskas A., Gil J., Söderquist L., Hrd MGM., Hrd MCh., Johannisson A., Rodriguez-Martinez H. (1999). Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, 52(4): 641-658.
- Kašná E., Zavadilová L., Krupová Z., Šlosárková S., Fleischer P. (2023). The most common reproductive disorders of cows in Holstein cattle breeding. *Czech Journal of Animal Science*, 68(11): 433-442.
- Kulaz E., Ser G. (2022). A meta-analysis of heat stress in dairy cattle: The increase in temperature humidity index affects both milk yield and some physiological parameters. *Czech Journal of Animal Science*, 67(6): 209-217.
- Layek SS., Mohanty TK., Kumaresan A., Parks JE. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, 172: 1-9.
- Llamas-Luceño N., Hostens M., Mullaart E., Broekhuijse M., Lonergan P., Van Soom A. (2020). High temperature-humidity index compromises sperm quality and fertility of Holstein bulls in temperate climates. *Journal of Dairy Science*, 103(10): 9502-9514.
- Miguel-Jimenez S., Del Alamo MMR., Álvarez-Rodríguez M., Hidalgo CO., Peña AI., Muiño R., Rodríguez-Gil JE., Mogas T. (2020). *In vitro* assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Animal Reproduction Science*, 215: 106315.
- Morrell JM. (2020). Heat stress and bull fertility. *Theriogenology*, 153: 62-67.
- Muiño R., Fernández M., Peña AI. (2007). Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(3): 305-311.
- Murphy EM, O'Meara C., Eivers B., Lonergan P., Fair S. (2018). Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on *in vitro* sperm kinematics and *in vivo* fertility of frozen-thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*, 191: 70-75.

- O'Flaherty C. (2014). The enzymatic antioxidant system of human spermatozoa. *Advances in Andrology*, 2014: 1-15.
- Paglia DE., Valentine WN. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1): 158-169.
- Park SO. (2022). Application strategy for sustainable livestock production with farm animal algorithms in response to climate change up to 2050: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 67(11): 425-441.
- Pasqualotto FF., Sharma RK., Kobayashi H., Nelson DR, Thomas Jr AJ, Agarwal A. (2001). Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *Journal of Andrology*, 22(2): 316-322
- Pytlík J., Codl R., Ducháček J., Savvulidi FG., Vrhel M., Stádník L. (2023). Low-density lipoprotein supplementation improves the quality of Holstein bulls' insemination doses. *Czech Journal of Animal Science*, 68(2): 64-71.
- Pytlík J., Savvulidi FG., Ducháček J., Codl R., Vrhel M., Nagy S., Stádník L. (2022). Effect of extender on the quality and incubation resilience of cryopreserved Holstein bull semen. *Czech Journal of Animal Science*, 67(3): 75-86.
- Sabés-Alsina M., Lundeheim N., Johannisson A., López-Béjar M., Morrell JM. (2019). Relationships between climate and sperm quality in dairy bull semen: A retrospective analysis. *Journal of Dairy Science*, 102(6): 5623-5633.
- Savvulidi FG., Ptacek M., Malkova A., Beranek J., Stadnik L. (2021). Optimizing the conventional method of sperm freezing in liquid nitrogen vapour for Wallachian sheep conservation program. *Czech Journal of Animal Science*, 66(2): 55-64.
- Savvulidi FG., Ptáček M., Nagy S., Stádník L. (2023). Meta-analysis of fluorochrome concentrations to assess bull sperm quality by flow cytometry in 2021-2023. *Czech Journal of Animal Science*, 68(12): 469-485.
- Singh AK., Kumar A., Honparkhe M., Kaur S., Kaur H., Ghuman SPS., Brar PS. (2018). Comparison of *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of buffalo bull semen frozen in egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(1): 195-202.
- Stádník L., Rajmon R., Beran J., Šimoník O., Doležalová M., Šichtař J., Stupka R., Folková P. (2015). Influence of selected factors on bovine spermatozoa cold shock resistance. *Acta Veterinaria Brno*, 84 (2): 125-131.

- Subramanian V., Ravichandran A., Thiagarajan N., Govindarajan M., Dhandayuthapani S., Suresh S. (2018). Seminal reactive oxygen species and total antioxidant capacity: correlations with sperm parameters and impact on male infertility. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 45(2): 88-93.
- Šimoník O., Rajmon R., Stádník L., Šichtař J., Beran J., Ducháček J., Hodek P., Trefil P. (2016). Effect of low-density lipoprotein addition to soybean lecithin-based extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing - preliminary results. *Czech Journal of Animal Science*, 61(12): 560-567.
- Šimoník O., Šichtař J., Beran J., Maňásková-Postlerová P., Tůmová L., Doležalová M., Folková P., Stádník L., Rajmon R. (2019). Low Density Lipoprotein - important player in increasing cryoprotective efficiency of soybean lecithin-based bull semen extenders. *Animal Reproduction* 16(2): 267-276.
- Thompson A., Agarwal A., du Plessis SS. (2014). Physiological role of reactive oxygen species in sperm function: a review. In: Parekattil SJ, editor. Antioxidants in male infertility: a guide for clinicians and researchers. Springer Science+Business Media New York: 2014. pp. 69-89.
- Vanselow J., Wesenauer C., Eggert A., Sharma A., Becker F. (2024). Summer heat during spermatogenesis reduces *in vitro* blastocyst rates and affects sperm quality of next generation bulls. *Andrology*, 12(8): 1897-1906.
- Vašíček J., Baláži A., Svoradová A., Vozaf J., Dujíčková L., Makarevich AV., Bauer M., Chrenek P. (2022). Comprehensive flow-cytometric quality assessment of ram sperm intended for gene banking using standard and novel fertility biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences* 23(11): 5920.
- Vince S., Žaja IŽ., Samardžija M., Balić IM., Vilić M., Đuričić D., Valpotić H., Marković F., Milinković-Tur S. (2018). Age-related differences of semen quality, seminal plasma, and spermatozoa antioxidative and oxidative stress variables in bulls during cold and warm periods of the year. *Animal*, 12(3): 559-568.
- Vinet A., Mattalia S., Vallée R., Bertrand C., Barbat A., Promp J., Cuyabano BCD., Boichard D. (2024). Effect of temperature-humidity index on the evolution of trade-offs between fertility and production in dairy cattle. *Genetics Selection Evolution*, 56(1): 23.
- Wang L., Wang L., Li Y., Wang J. (2023). A Century-long analysis of global warming and earth temperature using a random walk with drift approach. *Decision Analytics Journal*, 7: 100237.

World Meteorological Organization. (2023). *State of the Climate in Europe 2022*.

Erscheinungsort nicht ermittelbar: United Nations.

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METHODICE

Pytlík J., Savvulidi F.G., Ducháček J., Codl R., Vrhel M., Nagy S., Stádník L. (2022): Effect of extender on the quality and incubation resilience of cryopreserved Holstein bull semen. *Czech Journal of Animal Science*, 67(3): 75-86.

Pytlík J., Codl R., Ducháček J., Savvulidi F.G., Vrhel M., Stádník L. (2023): Low-density lipoprotein supplementation improves the quality of Holstein bulls' insemination doses *Czech Journal of Animal Science*, 68(2): 64-71.

Savvulidi F.G., Ptáček M., Nagy S., Stádník L. (2023): Meta-analysis of fluorochrome concentrations to assess bull sperm quality by flow cytometry in 2021–2023. *Czech Journal of Animal Science*, 68(12): 469-485.

Sekaninová J., Janků M., Bezdiček J., Ducháček J., Petřivalský M., Luhová L., Stádník L. (2024): Biochemické analýzy krve pro stanovení oxidačního stresu skotu. *Certifikovaná metodika*. ISBN: 978-80-244-6568-5.

Savvulidi F.G., Kovářová V., Harvánková K., Ptáček M., Ducháček J., Marešová N., Stádník L. (2025): Laboratorní vyšetření inseminačních dávek býků po jejich rozmrazení: hledání nejspolehlivějších prediktorů úspěšnosti zabřezávání. *Náš chov*, 84(5):19-21.

Savvulidi F.G., Ducháček J., Ptáček M., Gašparík M., Kovářová V., Codl R., Stádník L. (2025): Impact of microclimatic conditions on sperm production in Czech Holstein bulls: A correlational study. *Czech Journal of Animal Science*, 70(4):121-129.

VIII. SEZNAM ZKRATEK

ABTS – 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazolin-sulfonátu

CAKT – celková pohyblivost

CASA – počítačová analýza pohyblivosti spermií

CAT – katalasa

DNA – deoxyribonukleová kyselina

FITC – fluorescein-5-isothiokyanát

g – tíhové zrychlení nebo gram

GSH – redukovaný glutathion

GSH-Px – glutathione peroxidasa

H342 – Hoechst 33342

Hb – hemoglobin

Kat – jednotka katalytické aktivity enzymů

KONC – koncentrace

LDL – lipoproteiny s nízkou hustotou

MET – skupina fixního efektu koncentrace metabolitů v krvi

MTR DR – MitoTracker Deep Red

n – počet pozorování

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát

nm – nanometr

OBJ – objem

OSI – index oxidačního stresu

PA – spermatické buňky (poškozený akrozom)

PAKT – progresivní pohyblivost

P(p) – hladina významnosti

PBS – fosfátový pufr

pH – vodíkový exponent

PI – jodid propidia

PM – spermatické buňky (poškozená cytoplazmatická membrána)

PMA – spermatické buňky (poškozená cytoplazmatická membrána a akrozom)

PNA – arašídový lektin

r – korelační koeficient

RBC – červené krvinky

SAS – systém statistické analýzy se statistickými postupy analýzy dat GLM, UNIVARIATE, CORR, MIXED, REG, STEPWISE

SEM – střední chybu průměru

SOD – superoxid dismutasa

TAS – celkový antioxidační status

THI – teplotně-vlhkostní index

THI>70/1m – počet dnů s THI > 70 za jeden měsíc předcházející odběru spermatu

THI>70/2m – počet dnů s THI > 70 za dva měsíce předcházejících odběru spermatu

THI-0 – THI v den odběru spermatu

THI-30 – THI v den předcházející 30 dní před odběrem spermatu

THI-60 – THI v den předcházející 60 dní před odběrem spermatu

TOS – celkový oxidační status

VIAB – spermatické buňky (viabilní)

v/v – objemový zlomek

IX. DEDIKACE

Uplatněná certifikovaná metodika byla zpracována v rámci řešení grantového úkolu MZe
NAZV č. QK22010270 a interního grantu SGS s číslem SV24-3-21320.

Název:

Optimalizace metod řízení kvality ejakulátu a inseminačních dávek u býků v závislosti na úrovni metabolismu a teplotního stresu

Podíl autorů na tvorbě metodiky:

35 % Ing. Filipp Georgijevič Savvulidi, Ph.D.
20 % Ing. Jaromír Ducháček, Ph.D.
10 % Ing. Veronika Kovářová
5 % Ing. Radim Cobl, Ph.D.
5 % Ing. Matúš Gašparík, Ph.D.
5 % Ing. Martin Ptáček, Ph.D.
5 % Mgr. Martina Janků, Ph.D.
5 % Mgr. Jana Sekaninová, Ph.D.
5 % doc. Ing. Jiří Bezdíček, Ph.D.
5 % prof. Ing. Luděk Stádník, Ph.D.

Vydavatel:

Česká zemědělská univerzita v Praze

Vydal:

Katedra chovu hospodářských zvířat, FAPPZ ČZU v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha – Suchbát

Místo vydání:

Praha

Forma vydání:

Metodika je vydávána pouze elektronicky

Zveřejněno na webové stránce:

<https://katedry.czu.cz/ksz/vedecke-publikace-skot>

Podíl firem na tvorbě metodiky:

85 % Česká zemědělská univerzita v Praze
15 % Univerzita Palackého v Olomouci

Podíl projektů na tvorbě metodiky:

90 % QK22010270 - Optimalizace řízení individuální reprodukční výkonnosti dojeného skotu; 10 % SGS SV24-3-21320 - Vlivy klimatu, mikroklimatu a jiných stresových faktorů na užitkové vlastnosti hospodářských zvířat

Pořadí vydání: 1.**Rok vydání: 2025**

ISBN 978-80-213-3517-2