

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ

Klinika chorob přežvýkavců a prasat

**Příručka pro praktická
cvičení z andrologie**

V. Kos
a kolektiv

Příručka pro praktická cvičení z andrologie

MVDr. Vojtěch Kos
MVDr. Michaela Andrlíková
MVC. Alžběta Ledabylová
MVDr. Beáta Marková
MVC. Aneta Koudelová
MVDr. Robert Novotný, PhD.
Mgr. Lenka Vránová
doc. MVDr. Svatopluk Čech, PhD.

OBSAH

1. Anatomie samčího pohlavního aparátu	3
1.1 Býk	7
1.2 Beran, kozel	9
1.3 Hřebec	10
1.4 Kanec	11
1.5 Pes	12
1.6 Kocour	13
2. Klinické vyšetření samce	14
3. Speciální vyšetření samce	17
4. Odběr ejakulátu	19
4.1 Odběr semene u býka	20
4.2 Odběr semene u hřebce	21
4.3 Odběr semene u berana, kozla	22
4.4 Odběr semene u kance	23
4.5 Odběr semene u psa	24
4.6 Elektroejakulace	25
5. Posouzení ejakulátu	27
5.1 Makroskopické vyšetření	27
5.2 Mikroskopické vyšetření	28
6. Ředění a konzervace ejakulátu	36
7. Videodokumentace	38

Příručka pro praktická cvičení z andrologie

Andrologie je medicínský obor zabývající se fyziologií a patologií samčího reprodukčního systému, diagnostikou a terapií onemocnění pohlavního aparátu.

Příručka popisuje základní údaje o anatomii pohlavního aparátu samců, klinické vyšetřovací metody, odběr, vyšetření a zpracování ejakulátu.


1. Anatomie samčího pohlavního aparátu

Samčí pohlavní orgány slouží k tvorbě, zrání a transportu samčích zárodečných buněk - spermií. Tvoří je šourek, varlata, vývodné pohlavní cesty, přídatné pohlavní žlázy a penis.

Šourek

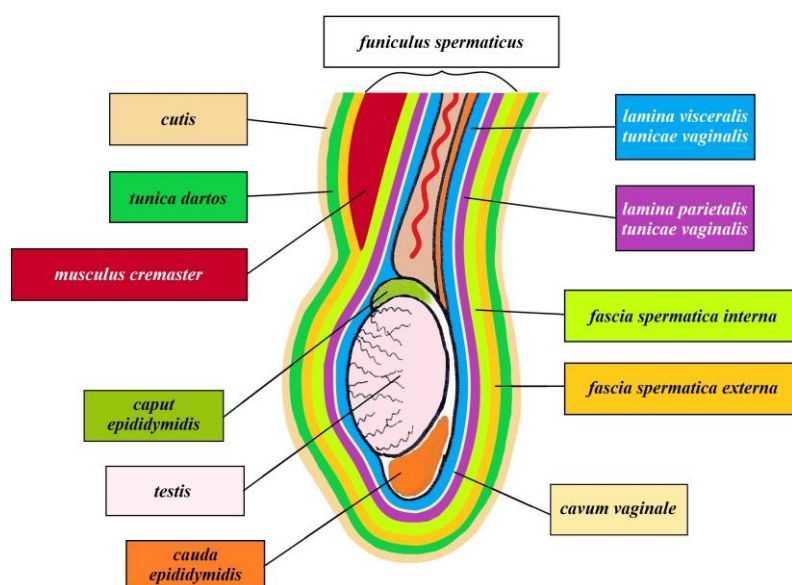
Šourek (*scrotum*) je kožní duplikatura, v níž jsou extraabdominálně uložena varlata. Prostřednictvím hladkosvalových vláken v *tunica dartos* (modifikované podkoží) a činností *m. cremaster* plní šourek důležitou termoregulační funkci, díky které je umožněn správný průběh spermatogeneze v teplotě přibližně o 2-4 °C nižší než je teplota těla.

Stěna šourku se skládá z několika vrstev. Směrem od vnější plochy šourku k varletí se nacházejí:

- kůže
- *tunica dartos* (podkoží) - součástí *tunica dartos* jsou hladkosvalové buňky přispívající k regulaci teploty v šourku - svažují kůži šourku a kontrakcemi zužují lumen cév
- *fascia spermatica externa* - vznikající z hluboké a povrchové fascie trupu
- *musculus cremaster* vznikající z *m. obliquus abdominis internus* – je součástí termoregulačního mechanismu šourku. Kontrakcí a přiblížením varlat k dutině tělní zvyšuje teplotu uvnitř šourku a naopak.
- *fascia spermatica interna*
- *lamina parietalis tunicae vaginalis*  společně tvoří výchlípku peritoneální dutiny tzv. *processus vaginalis peritonei*
- *lamina visceralis tunicae vaginalis* těsně naléhající k *tunica albuginea*

Fascia spermatica interna tvoří vnější hranici semenného provazce (*funiculus spermaticus*), v němž se kromě výše zmíněných anatomických struktur nacházejí *a. a v. spermatica* a *n. spermaticus*. Proximálně při varletí vytvářejí uvedené cévy vaskulární pletěň *plexus pampiniformis*, ve kterém je centrálně procházející *a. spermatica* obklopena periferně uloženou cévní sítí *v. spermatica*. Funkcí pampiniformního plexu je ochlazování arteriální krve přicházející z dutiny břišní krví venózní, a tím udržování stabilní vnitřní teploty varlete. Další rolí je protiproudový přestup steroidních hormonů z žilní do arteriální části plexu, a tím zajištění zvýšené koncentrace androgenů ve tkáni varlete.

Obrázek 1 Schéma šourku býka



Varle

Varlata (*testes*) jsou párově založené pohlavní žlázy, ve kterých se tvoří spermie a hormony (dihydrotestosteron, testosteron, estradiol, inhibin).

Zakládají se retroperitoneálně, v průběhu pre- i postnatálního vývoje jedince sestupují mimo tělní dutinu do šourku. V průběhu sestupu je varle taženo vazivovým pruhem *gubernaculum testis*, který svým postupným zkracováním zajistí průchod varlete přes tříselný kanál do dutiny šourku. Po dokončení sestupu se *gubernaculum testis* transformuje na *lig. caudae epididymidis*, *lig. testis proprium* a *lig. scroti*. Zkracování gubernacula je stimulováno hormonem descendinem produkovaným v Sertoliho buňkách varlete. Sestup varlat je ukončen u různých druhů zvířat v odlišném období. U býka a berana jsou varlata sestouplá přibližně v polovině březosti, u kance během poslední čtvrtiny březosti a u hřebce, psa a kocoura krátce před či po narození. Opoždění nebo selhání tohoto procesu se označuje jako kryptorchismus.

Maximální velikost varlat je dosažena v průběhu pohlavní zralosti a periodicky se mění v závislosti na pohlavní aktivitě. Ve stáří varlata naopak podléhají atrofii a zmenšují se.

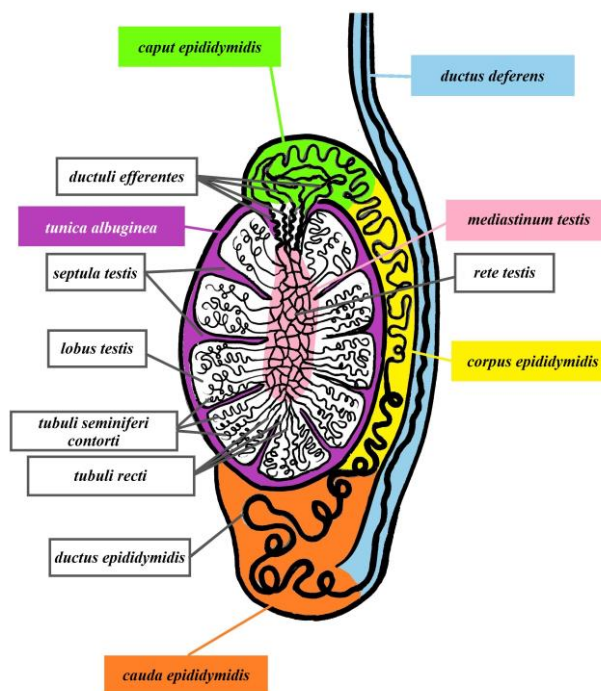
Anatomicky je varle tvořeno lalůčky, *lobuli testis*, které jsou od sebe odděleny vazivovými septy vystupujícími z vazivového obalu varlete tzv. *tunica albuginea*. Jednotlivé lalůčky obsahují 2-5 stočených semenotvorných kanálků (*tubuli seminiferi contorti*). Při bazální membráně semenotvorných kanálků se nacházejí Sertoliho buňky a nejméně diferencované buňky zárodečné, spermatogonie. Při postupné migraci zárodečných buněk prostorem mezi jednotlivými Sertoliho buňkami probíhá jejich diferenciací až na konečné stádium spermií. Sertoliho buňky kromě ochrany a výživy diferencujících se gamet současně zabraňují také kontaktu buněk imunitního systému s nově vytvořenými spermii

prostřednictvím hematotestikulární bariéry. Jednotlivé kanálky se spojují v *tubuli recti*, které po výstupu z *lobuli testis* vytvářejí centrálně uložené *rete testis*.

Vývodné pohlavní cesty

Z *rete testis* pokračují vývodné cesty jako *ductuli efferentes testis* tvořící hlavu nadvarlete. Následující anatomickou strukturou je *ductus epididymidis* vytvářející tělo a ocas nadvarlete a postupující dále jako chámovod (*ductus deferens*) přes tříselný kanál intraabdominálně. Chámovod poté ústí v místě nazývaném *colliculus seminalis* do uretry. V průběhu pasáže spermií nadvarletem dochází k jejich postupnému dozrávání a terminální úsek nadvarlete (ocas, u některých druhů i tělo) slouží jako depo spermií. Sekreční buňky vývodných pohlavních cest vytvářejí tzv. semennou plazmu.

Obrázek 2 Schéma varlete býka



Přídavné pohlavní žlázy

Přídavné pohlavní žlázy jsou u jednotlivých druhů zvířat vyvinuty v různém rozsahu. V močové trubici se spermie mísí se sekrety přídavných pohlavních žláz (*glandulae genitales accessoriae*), čímž vzniká ejakulát, který je během kopulace transportován pyjem do pohlavních orgánů samice. K přídavným pohlavním žlázám se řadí: ampuly chámovodu, semenné váčky, bulbouretrální žlázy a předstojná žláza.

Penis

Penis je tvořen dvěma rameny (*crura penis*) odstupujícími z *arcus ischiadicus* pánevní kosti a spojujícími se v kořen penisu (*radix penis*) přecházející v tělo (*corpus penis*), které je zakončeno žaludem (*glans penis*). U domácích zvířat se penis nachází v mezinoží a směřuje kraniálně k pupku. U kocoura je situován více v perineální krajině a směřuje v neerigovaném stavu kaudálně.

Anatomicky je pyj tvořen třemi topořivými tělesy, která se podílí na erekci. Jedná se o párová topořivá tělesa neboli *corpora cavernosa* tvořící ramena, kořen a tělo penisu a třetí nepárové těleso *corpus spongiosum penis*, které obklopuje uretru. Nepárové *corpus spongiosum* pokračuje až do oblasti žaludu, kde se označuje jako *corpus spongiosum glandis*. Podle stavby párových topořivých těles rozlišujeme u domácích zvířat dva typy penisu.

Penis fibroelastického typu mají přežvýkavci. *Corpora cavernosa* jsou tvořena malými krevními kavernami obklopenými fibroelastickým vazivem. K erekci dochází prodloužením penisu po vyrovnání esovitého zakřivení penisu (*flexura sigmoidea penis*) díky ochabnutí svalů *mm. retractores penis*.

Penis muskulokavernózního typu se vyskytuje u koně a psa. *Corpora cavernosa* jsou tvořena rozsáhlými kavernami ohraničenými jemnějšími septy obsahující hladkou svalovinu. Při erekci se kaverny plní krví. V důsledku naplnění kaveren dochází ke stlačení odtokových žil a tím k zadržení krve v topořivých tělesech. Dochází k prodloužení jak délky, tak průměru kopulačního orgánu.

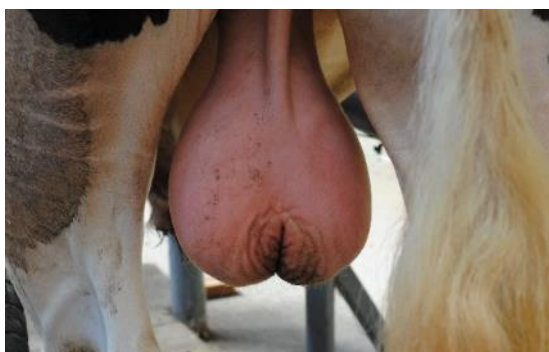
V případě prasete dochází k erekci pyje současně vyrovnáním esovitého zakřivení i naplněním topořivých těles. Tento typ penisu se proto nazývá intermediární. Pyj kocoura bývá označován jako indiferentní, ale erekce je dosaženo naplněním kavernózních těles.

1.1 BÝK

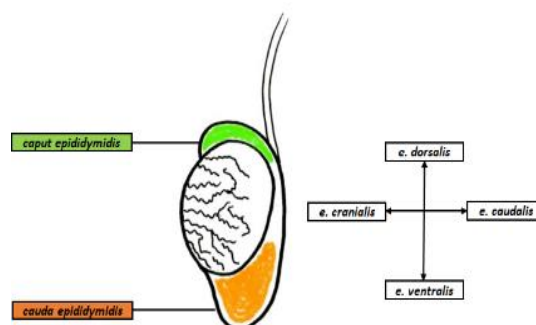
Šourek se u přežvýkavců nachází v inguinální krajině. Osa varlete uloženého uvnitř je orientována svisle. Hlava nadvarlete naléhá dorzálně na varle, tělo přechází distálním směrem, kde se rozšiřuje v ocas nadvarlete.

U býků často bývá levé **varle** větší a uloženo ventrálněji. V době pohlavní zralosti varle váží 250-300g.

Obrázek 3 Umístění šourku



Obrázek 4 Schéma uložení varlete a nadvarlete u býka



Přídavné pohlavní žlázy jsou u býka kompletně zastoupeny.

Ampuly chámovodu (*glandulae ampulae ductus deferens*) představují sekrečním epitelem vystlané rozšíření terminální části chámovodu před jeho vyústěním do močové trubice.

Předstojná žláza (*prostata*) býka se skládá z roztroušené části (*pars disseminata*) a těla prostaty (*corpus prostaticae*). Tělo prostaty je malé a oploštěné, nachází se v oblasti krčku močového měchýře. *Pars disseminata prostaticae* je umístěna v *corpus spongiosum penis*.

Bulbouretrální žlázy (*glandulae bulbourethrales*) jsou velikosti lískového oříšku a nachází se na kaudálním konci pánevní části močové trubice. Žlázy však zakrývá *m. bulbospongiosus*, proto nejsou rektálně hmatné.

Semenné vāčky (*glandulae vesiculares*) s hrbolatým povrchem jsou rektálně palpovatelné. Nacházejí se dorzolaterálně od krčku močového měchýře. Vývod semenných vāčků (*ductus excretorius*) se u přežvýkavců spojuje s *ductus deferens* ve společný *ductus ejaculatorius*, kterým ústí do močové trubice.

Penis přežvýkavců je fibroelastického typu. Na hrotu volné části penisu, která se mírně stáčí doleva, nasedá žalud (*galea glandis*) v podobě malé čepičky a nese krátký *processus urethrae*. Penis býka měří zhruba 100 cm.

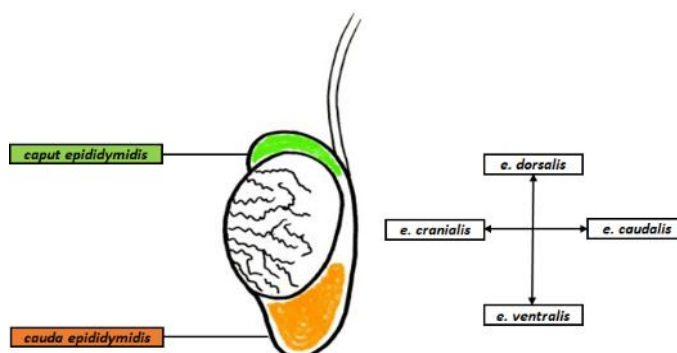
Obrázek 5 Penis býka



1.2 BERAN, KOZEL

Šourek a uložení **varlat** je u malých přežvýkavců totožné s uložení varlat u býka. U berana a kozla je šourek poměrně dlouhý a kůže osrstěná.

Obrázek 6 Schéma uložení varlete a nadvarlete u kozla



Přídavné pohlavní žlázy jsou u malých přežvýkavců až na drobné odchylky vyvinuty stejně jako u býka.

Předstojná žláza (prostata) je tvořena pouze *pars disseminata prostatae*.

Bulbouretrální žlázy (*glandulae bulbourethrales*) jsou velikosti lískového oříšku.

Semenné vāčky (*glandulae vesiculares*) dosahují u berana větších rozměrů než u kozla a jsou více zaoblené.

Penis berana a kozla má zesílený žalud, ze kterého vystupuje dlouhý *processus urethrae*. Ten měří asi 4 cm u berana a přibližně 2,5 cm u kozla. Samotný *processus urethrae* obsahuje topořivou tkáň. Tento výběžek je nejužší částí močové trubice a místem časté obstrukce močovými kameny. Penis malých přežvýkavců dosahuje během erekce délky 30-50cm..

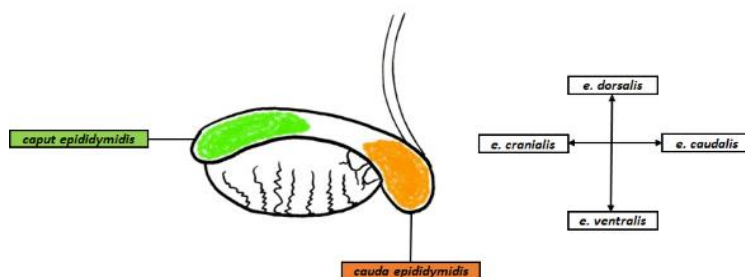
Obrázek 7 Penis kozla



1.3 HŘEBEC

Šourek se u hřebce nachází v inguinální krajině. Osa varlete uvnitř je orientována horizontálně, což následně ovlivňuje celkový tvar šourku. Na povrchu je možné pozorovat hlubokou brázdou (*raphe scroti*) rozdělující šourek na dvě poloviny. Kůže šourku je na rozdíl od přežvýkavců tenká a černě pigmentovaná.

Obrázek 8 Schéma uložení varlete a nadvarlete u hřebce



Přídavné pohlavní žlázy jsou u hřebce kompletně zastoupeny

Ampuly chámovodu (*glandulae ampulae ductus deferens*) představují sekrečním epitelem vystlané rozšíření terminální části chámovodu před jeho vyústěním do močové trubice.

Předstojná žláza (*prostata*) hřebce je tvořena pouze *corpus prostaticae*.

Bulbouretrální žlázy (*glandulae bulbourethrales*) jsou velikosti vlašského ořechu a nachází se na kaudálním konci pánevní části močové trubice.

Semenné vāčky (*glandulae vesiculares*) mají hladký povrch a velkou dutinu obdanou silnou svalovou stěnou. Vývod semenných vāček (*ductus excretorius*) se u hřebce spojuje s *ductus deferens* ve společný *ductus ejaculatorius*, kterým ústí do močové trubice.

Penis je zakončen žaludem (*glans penis*), který má podobu “kapuce”. Je možné na něm pozorovat struktury jako krček žaludu (*collum glandis*), korunku žaludu (*corona glandis*) a prohlubeň (*fossa glandis*), do které vyčnívá *processus urethrae*. Žalud je kryt předkožkou (*prepuccium*), která je na rozdíl od ostatních druhů tvořena dvěma manžetami (*pars externa* a *pars interna*). V záhybech předkožky se často hromadí smegma, buněčný detritus a sekret mazových žláz, které jsou obsaženy v *lamina externa* a *interna* vnější manžety a v *lamina externa* vnitřní manžety předkožky. Penis hřebce je asi 50 cm dlouhý a během erekce se z předkožky vysouvá úsek dlouhý 30-50 cm.

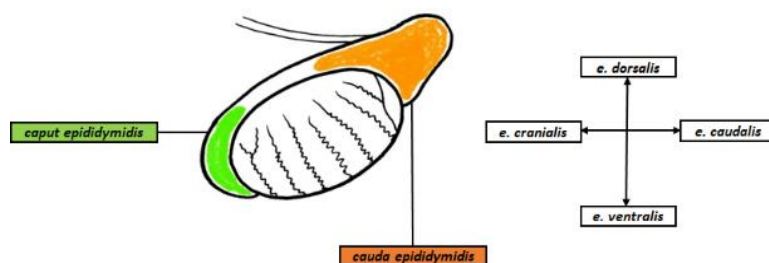
Obrázek 9 Penis hřebce



1.4 KANEC

Šourek se u kance nachází perineálně a **varle** uvnitř něj je uloženo šikmo. Hlava nadvarlete směřuje ventro-kraniálně a ocas nadvarlete dorzo-kaudálně.

Obrázek 10 Schéma uložení varlete a nadvarlete kance



Přídavné pohlavní žlázy kance jsou: předstojná žláza, bulbouretrální žlázy, semenné vajíčky.

Předstojná žláza (*prostata*) kance je tvořena menším *corpus prostaticae* naléhajícím na močovou trubici a výraznější částí *pars disseminata*.

Bulbouretrální žlázy (*glandulae bulbourethrales*) jsou u kance velké žlázy válcovitého tvaru táhnoucí se po stranách močové trubice. U vepřů po rané kastraci zůstávají mnohem menší, což umožňuje určit, zda byla kastrace provedena již v raném věku.

Semenné vajíčky (*glandulae vesiculares*) jsou rozsáhlé, mají trojúhelníkový tvar a ústí do močové trubice samostatně.

Penis kance má malé krevní kaverny obklopené převažujícím fibroelastickým vazivem. Zakončení penisu kance je vývrtkovitě stočené, kde *glans penis* je na samotném hrotu jako malá čepička. Během erekce dosahuje penis kance délky 60 cm.

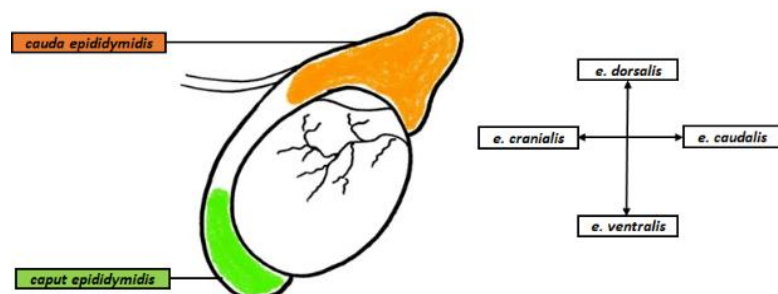
Obrázek 11 Penis kance



1.5 PES

Šourek se u psa nachází v mezinoží. Varle uvnitř něj je uloženo šikmo, přičemž hlava nadvarlete směřuje ventro-kraniálně a ocas nadvarlete dorzo-kaudálně.

Obrázek 12 Schéma uložení varlete a nadvarlete u psa

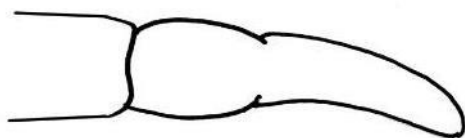


Přídavné pohlavní žlázy u psa jsou zastoupeny pouze prostatou.

Předstojná žláza (*prostata*) má *pars disseminata*, která je rozptýlena ve stěně močové trubice a *corpus prostatae*, které je rozsáhlé a zcela obepíná močovou trubici. Dorzálně je tělo rozděleno prohlubeninou na dvě symetrické části. Velikost těla prostaty je přibližně 1,5 až 3cm.

Penis psa je muskulokavernózního typu na jehož konci se nachází rozsáhlý žalud, který se skládá z dlouhého předního úseku (*pars longa glandis*) a z rozšířeného kaudálního úseku (*bulbus glandis*). Žalud je podepřen kostí (*os penis*), která má ve své ventrální části žlábek, v němž probíhá močová trubice. V místě kaudálního konce *os penis*, se mohou v močové trubici nahromadit močové konkrementy. Penis velkých plemen psů je až 25 cm dlouhý a 2-3 cm silný.

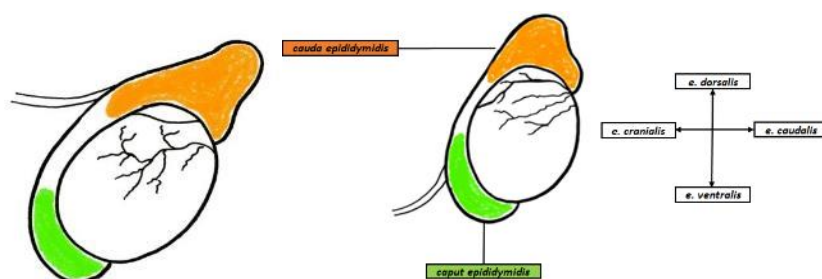
Obrázek 13 Penis psa



1.6 KOCOUR

Šourek se u kocoura nachází pod anem. Varle je v něm uloženo šikmo, přičemž hlava nadvarlete směřuje ventro-kraniálně a ocas nadvarlete dorzo-kaudálně v některých případech může být uloženo i svisle.

Obrázek 14 Schéma uložení varlete a nadvarlete u kocoura



Přídavné pohlavní žlázy u kocoura tvoří bulbouretrální žlázy a prostata.

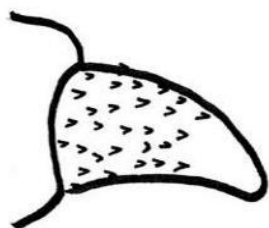
Předstojná žláza (*prostata*) kocoura má *pars disseminata*, která je rozptýlena ve stěně uretry a *corpus prostaticae* zcela obklopující močovou trubici. Vazivovým pruhem je tělo prostaty rozděleno na dvě poloviny.

Bulbouretrální žlázy (*glandulae bulbourethrales*) jsou u kocoura malé a kulovitého tvaru.

Penis kocoura na žaludu nese zrohovatělé papily, které na neztopořeném penisu směřují proximálně a při erekci se staví radiálně. Jejich existence je podmíněna přítomností testosteronu. Jsou tedy dobrým odlišovacím znakem kastráta a kryptorchida. Penisem kocoura též prochází os penis, na rozdíl od psa však nemá ventrální rýhu.

V neztopořeném stavu směřuje penis včetně žaludu kaudálně. Během erekce je pomocí vazy (*lig. apicale penis*) převrácen dopředu. Penis je dlouhý 4-5 cm.

Obrázek 15 Penis kocoura



2. Klinické vyšetření samce

Nejprve se posoudí celkový zdravotní stav, kondice, stavba těla, končetin a sexuální výraz. Vhodné je posoudit plemeníka v pohybu. Pro vyšetření pohlavních orgánů je nutná fixace samců, podle druhu zvířete se používá fixační klec, nosní smyčka nebo uložení na bok (na hřbet), v případě agresivity medikamentózní zklidnění.

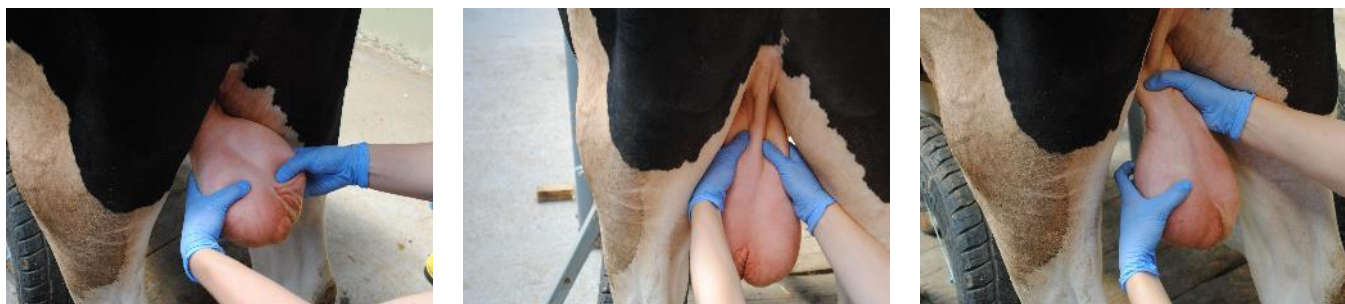
Vyšetření libida a pohlavních reflexů:

Posuzuje se v přítomnosti samice, u samců působících v inseminaci za obvyklých podmínek odběru ejakulátu. Během vyšetření nesmí na samce působit rušivé vlivy. Hodnotíme rychlost nástupu a průběh distančních, kontaktních a kopulačních reflexů. Vyšetření libida může být zakončeno odběrem ejakulátu, který završí vyšetření androgenní aktivity samce. Na základě vyšetření je s ohledem na druh, plemeno, věk a případné onemocnění pohybového aparátu stanovena úroveň pohlavní aktivity plemeníka. U býků je sexuální libido hodnoceno v pěti stupních (L0 – L4).

Vyšetření vnějších pohlavních orgánů:

Provádí se adspekce a palpace šourku, varlat, nadvarlat, semenného provazce, předkožky a pyje. Posuzuje se povrch šourku, případná poranění nebo zánětlivé změny. Palpačně se hodnotí tloušťka stěny šourku a reakce šourku na palpaci. Palpací varlat se hodnotí jejich uložení v šourku, citlivost, pohyblivost a konzistence parenchymu. Podobně se palpují nadvarlata (nej snadněji ocas nadvarlete) a semenný provazec. Výhodné je provést transkutánní sonografické vyšetření, které umožní posouzení všech struktur v šourku a odhalí případné ložiskové i difúzní změny parenchymu varlat. Adspekce prepucia hodnotí tvar prepuciálního vaku (zejména u kanců) a stopy případného výtoku. Palpace se zaměřuje na teplotu, bolestivost a konzistenci předkožky, případně lokální tvarové změny. Současně s předkožkou se palpuje penis (skot, malí přežvýkavci, pes). U přežvýkavců může být palpována i kaudální část penisu a esovitá klička. Adspekce penisu je možná u hřebce po nástupu erekce za přítomnosti klisny nebo u psa po manuálním vybavení. U přežvýkavců je nutné provedení umělého prolapsu penisu.

Obrázek 16 Palpační vyšetření vnějších pohlavních orgánů



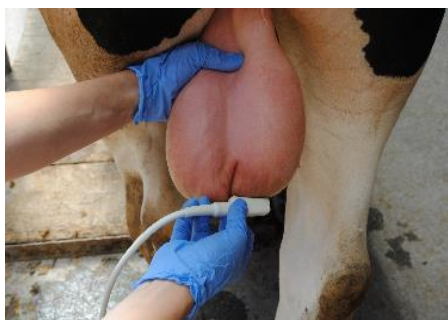
Vyšetření vnitřních pohlavních orgánů:

U velkých zvířat se provádí transrektální palpace ampul chámovodu (lze vyvolat ejakulaci) a vezikulárních žláz. Ostatní přídatné pohlavní žlázy se palpují obtížně. Vnitřní pohlavní orgány u velkých zvířat lze vyšetřit transrektální sonografií.

Ultrasonografické vyšetření pohlavních orgánů:

Sonografické vyšetření pohlavních orgánů je využitelné k posouzení parenchymu varlat, kde hodnotíme jeho izoechogenitu, přítomnost anizoechogeních ložisek, v případě intraabdominálního uložení u kryptorchidů jeho lokalizaci. Sonograficky jsou zobrazitelné také přídatné pohlavní žlázy. U velkých zvířat posuzujeme přídatné pohlavní žlázy rektálním přístupem, u malých zvířat transabdominálně.

Obrázek 17 Sonografie varlat



Obrázek 18 Transrektální sonografie přídatných pohlavních žláz



Umělý prolaps penisu:

U přežvýkavců se provádí umělý prolaps penisu, je-li třeba posoudit vizuálně penis nebo při terapeutických zákrocích. Pro praxi je vhodná lokální anestezie zatahovačů penisu (*mm. retractores penis*) v místě přechodu pudendálních nervů přes sedací oblouk. Po přípravě operačního pole na perineu ventrálně od anu se vypalpuje sedací oblouk. Přibližně na vzdálenost dlaně ventrálně od anu v linii sedacího oblouku a na 2-3 prsty laterálně od mediální linie perinea se na obě strany injikuje 20 ml 2% procainu (mírně vějířovitě). Anestezie nastupuje za 10-15 minut a projeví se zřetelným posunem penisu směrem k prepuciálnímu otvoru v důsledku uvolnění retraktorů. Penis pak lze manuálně vybavit z předkožky. Dále je možné provést přímou anestezii retraktorů po jejich vypalpování nad esovitou kličkou penisu. Metoda anestezie pudendálních nervů hluboko v dutině pánevní, kdy se zavádí jehla délky 100-120 mm v nejhlubším místě sedací prohlubně je spolehlivá, existuje však riziko poranění a vzhledem k těsné blízkosti anu hrozí nebezpečí kontaminace. Prolaps penisu je možné vyvolat velkou epidurální anestezí, samec však uléhá. K prolapsu dochází také po aplikaci některých ataraktik.

Obr 19 Provedení lokálního znecitlivění pudendálních nervů v místě přechodu přes sedací oblouk



Testimetrie:

Přesné stanovení rozměrů varlat slouží k posouzení správného vývoje u mladých samců a k včasné diagnóze vrozených i získaných změn.

Obr 20 Provedení testimetrie u býka



3. Speciální vyšetření samce

Bakteriologické a parazitologické vyšetření:

Vzorky semene pro mikrobiologické vyšetření se odebírají ze sběrače ejakulátu sterilním způsobem do odběrových zkumavek a vyšetřují se v laboratoři. Ejakulát nesmí obsahovat patogenní mikroorganismy.

Za účelem potvrzení nebo vyloučení přítomnosti specifických patogenů (*Trichomonas fetus*, *Campylobacter sp.*) se u býků provádí výplach předkožkového vaku. Po očištění a desinfekci vyústění předkožky éteralkoholem se do předkožkového vaku zavede sterilní pryžový katetr, na který se napojí velká plastová stříkačka (150 ml) obsahující temperovaný fyziologický sterilní roztok. Ústí předkožky se stiskne rukou tak, aby se katetr zafixoval a současně došlo k utěsnění předkožkového vaku. Obsah stříkačky se aplikuje do předkožkového vaku. Ten je masírován tak, aby roztok oplachoval sliznici v celém rozsahu, zejména kaudálně, kde je nejvíce slizničních řas. Po ukončení masáže se výplach jímá do sterilní nádoby a předá k laboratornímu vyšetření.

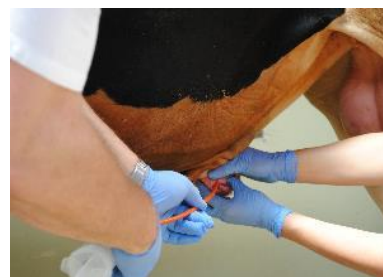
Obr 21 Sterilní katetr, stříkačka, odběrová nádoba na výplach prepucia



Obr 22 Desinfekce ústí prepucia éteralkoholem



Obr 23 Zavedení katetru



Obr 24 Aplikace fyziologického roztoku



Obr 25 Masáž prepucia naplněného fyziologickým roztokem



Obr 26 Odběr výplašku z prepucia



Endokrinologické vyšetření:

Zaměřuje se převážně na stanovení koncentrace testosteronu, který je produkován intersticiálními Leydigovými buňkami parenchymu varlat. Protože koncentrace testosteronu v průběhu dne kolísá (3-4 vrcholy za 24 hodin), je vhodné hodnotit reakci na umělou hormonální stimulaci (TPA, testosterone production assay). Po aplikaci GnRH dochází do 30 minut k peaku LH (v andrologické literatuře nazývaného také ICSH, intersticiální buňky stimulující hormon) a následnému zvýšení koncentrace testosteronu v plazmě. V závislosti na druhu dosahuje hladina testosteronu maximální hodnoty za 1,5 až 4 hodiny.

Histologické vyšetření:

Histologické vyšetření parenchymu varlat může být provedeno ze vzorku odebraného biopsií varlat. Biopsie se provádí buď punkcí nebo excizí parenchymu v lokální nebo celkové anestezii (podle temperamentu samce). Provedení biopsie je indikováno v případech nevysvětlitelné neplodnosti, testikulární asymetrie a abnormálního sonografického nálezu, nesouvisející s hematomem nebo zánětem varlat.

4. Odběr ejakulátu

Ejakulát je tvořen spermiemi a semennou plazmou.

Odběr ejakulátu je prováděn za účelem jeho zpracování a použití k umělé inseminaci, rovněž slouží k posouzení plodnosti plemeníka.

Existuje několik metod, kterými můžeme ejakulát odebírat. Nejčastěji se používá metoda odběru na umělou pochvu (přežvýkavci, hřebec, méně často jiné druhy zvířat), nebo manuální stimulace pyje (pes, kanec). Nelze-li provést odběr ejakulátu na umělou pochvu (pastevně chovaný skot, divoce žijící zvířata, zoo zvířata), lze ejakulát získat elektroejakulací. Rovněž je možné použít odběr ejakulátu masáží ampul chámovodu, postup však vyžaduje jistou zkušenost. Získání ejakulátu z pohlavního aparátu samice po kopulaci je nejstarší popsanou metodou odběru, dnes se nepoužívá.

U býka, berana, kozla a hřebce je nejčastěji využívána metoda odběru na umělou pochvu. Využíváme různé velikosti a typy umělých pochev dle druhu a velikosti zvířete, avšak vždy musí splňovat následující podmínky. Umělá pochva by měla co nejvíce imitovat pochvu plemence. Při přípravě umělé pochevy je důležité dbát na správnou teplotu, tlak a lubrikaci. Teplota, registrovaná Krauseho tělísky na povrchu sliznice pyje, je regulována pomocí vody napuštěné mezi tělem a pryžovou vložkou pochevy. Pro býka je ideální teplota mezi 38-39 °C, malí přežvýkavci a hřebec vyžadují teplotu 40-41 °C. Dalším požadavkem je tlak vyvíjený na stěnu pochevy, který se dá regulovat vzduchovým ventilem tak, aby došlo k podráždění Vater-Pacciniho a Ruffiniho mechanoreceptorů na penisu. Posledním aspektem je lubrikace, detekovaná Meissnerovými tělísky, které je docíleno použitím nespermicidních látek, vazelíny či sonografického gelu. Lubrikant aplikujeme do proximální třetiny pochevy důsledně, další třetinu lubrikujeme pouze mírně a do poslední třetinu nelubrikujeme vůbec, aby nedošlo ke kontaminaci ejakulátu.

Obrázek 27 Umělá pochva k odběru ejakulátu u býka



Obrázek 28 Sestavená umělá pochva



1. plastové tělo pochevy s ventilem, 2. pryžová vložka pochevy, 3. buničitá vata k utěsnění sběrače, 4. pryžové manžety k utěsnění sběrače, 5. sběrač

4.1 Odběr semene u býka

Ejakulát se odebírá ve speciálních připouštědlech, ve kterých je fixována připouštěcí atrapa (nejčastěji jiný býk klidné povahy). Je možné provádět odběr i na fantom. Býk je přiváděn na vodící tyči fixované nosním kroužkem, odebírající posuzuje průběh pohlavních reflexů. Odebírající drží umělou pochvu v ruce sběračem nahoru (teplá voda v pochvě ohřívá ústí, vazelína z pochvy nekontaminuje sběrač). Jakmile dojde k nástupu erekce (špička penisu se vysune z předkožkového vaku) a dojde k výtoku několika kapek sekretu Littreových žláz, nechá se býk vzskočit na atrapu. V průběhu vyhledávacího reflexu (býk se reflexně snaží nalézt vulvu), odebírající uchopí penis za kůži předkožkového vaku (nikoli za volnou sliznici) a vychýlí penis doprava. Odebírající přiloží k žaludu ústí umělé pochvy a býk zasune penis jediným frikčním pohybem do pochvy (doraz). Při jisté zkušenosti odebírajícího je možné zvýšit vzrušení býka krátkým a rychlým posunutím pochvy na špičce penisu (což imituje přirozené vyhledávání). Doraz je zpravidla velmi silný, proto je potřeba pochvu dobře fixovat. Po dorazu je nutno umělou pochvu na penisu ještě 2-3 vteřiny přidržet a odejmout ji až býk sestupuje z atrapy (pro případ opožděné ejakulace.).

Obrázek 29 Vzskok býka s erekcí



Obrázek 30 Odběr býka na umělou pochvu



Obrázek 31 Umělá pochva s ejakulátem



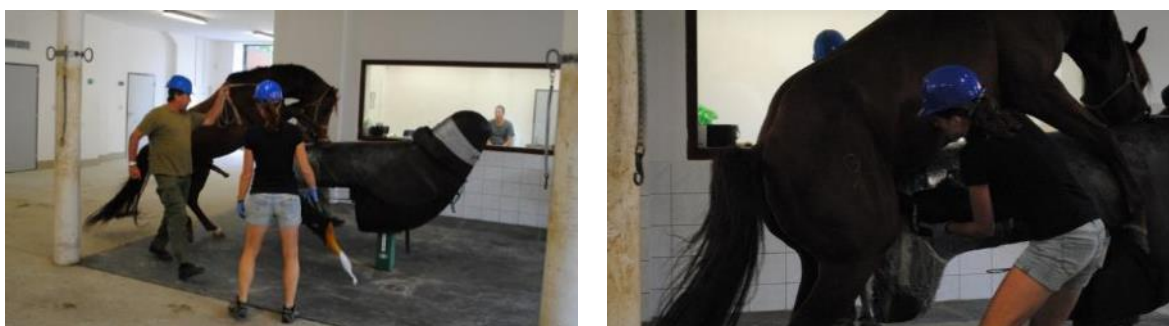
4.2 Odběr semene u hřebce

Hřebci jsou odebíráni na fantom, nejlépe v přítomnosti říjící se klisny. Po vzeskoku hřebce odebírající nasune umělou pochvu na penis, kterou drží oběma rukama, čímž vytváří oporu proti tlaku hřebce. Po několika frikčních pohybech je vyvolán reflex ejakulace, hřebec se uklidní a dochází u něj ke kývavému pohybu kořene ocasu. V tomto momentě se umělá pochva sklání sběračem dolů, aby semeno stékalo do sběrače. V případě použití otevřené umělé pochvy je ejakulát zachycován pomocníkem do volného sběrače.

Obrázek 182 Odběrová pochva typ Missouri k odběru ejakulátu od hřebce



Obrázek 33 Odběr ejakulátu u hřebce



Obrázek 34 Ejakulát hřebce



4.3 Odběr semene u berana, kozla

Odběr je obdobný jako u býka. Umělá pochva je přiměřené velikosti. Odběr je možné provést i na říjící se plemeni.

Obrázek 35 Erekcce u berana



Obrázek 36 Odběr na umělou pochvu



Obrázek 37 Ejakulát berana



4.4 Odběr semene u kance

Odběr semene u kance se provádí na fantomu metodou manuální fixace penisu. Po patřičném nácviku a při odpovídajícím temperamentu kance není potřeba žádná jiná stimulace. Po nástupu pohlavních reflexů (několik minut) kanec vzeskočí na fantom a zafixuje se hrudními končetinami. V této fázi je vhodné provést odstranění obsahu předkožkového vaku krátkou masáží. Kanec ve snaze dosáhnout pohlavního ústrojí prasnice opakovaně vysouvá a zasouvá penis. Vyšetřující penis jemně uchopí rukou v rukavici a nechá kance provést několik frikčních pohybů přes svoje sevřené prsty (imitace pochvy a děložního krčku). Ve vhodnou chvíli sevře penis do dlaně a vytáhne ho z předkožkového vaku tak, že dojde k vyrovnání *flexura sigmoidea*. V tomto okamžiku začíná ejakulace, která trvá až 30 minut. Nejprve odchází pre-spermatická frakce, která je většinou čirá, bez obsahu spermií. Spermatická frakce je jímána do temperovaného sběrače (plastový, skleněný) odpovídající velikosti 500 ml přes gázu, která slouží k separaci gelovitého sekretu bulbouretrálních žláz. Doporučována je metoda „dvou rukavic“ na odběrové ruce. První rukavicí se provede vyprázdnění předkožkového vaku a v druhé rukavici je prováděn vlastní odběr.

Obrázek 38 Fixace kance na fantomu



Obrázek 199 Odběr semene u kance



Obrázek 40 Sekret bulbouretrálních žláz



4.5 Odběr semene u psa

Odběr ejakulátu se provádí manuální masáží penisu, nejlépe v přítomnosti hárající feny. Předkožka je frikčními pohyby ruky posouvána po žaludku penisu až dojde ke zduření bulbu. Délka této fáze je individuálně velmi rozdílná podle vzrušivosti, temperamentu psa. Po dosažení dostatečného zduření bulbu je bulbos vybaven z předkožkového vaku a jeho kaudální část je fixována rukou odebírajícího, který jej dále stlačuje. Často už ve fázi manuální masáže dochází k odstříku prespermatické frakce ejakulátu. Ejakulát je zachycován do externího sběrače (skleněný, plastový) nejlépe přes nálevku. V této fázi je vhodné penis sklonit dolů k zemi, nebo mírně kaudálně, aby došlo k imitaci svázání s fenou. Vyšetřující stále masíruje bulbos, dokud cítí pulzaci kořene penisu. Tato fáze odběru je dlouhá (až 15 minut). Je vhodné jímat pouze spermatickou frakci, postspermatická frakce se odebere odděleně pouze proto, aby ejakulace měla fyziologický průběh. Po ukončení odběru je potřeba penis opláchnout vlažným fyziologickým roztokem a psa nechat pod dozorem až dojde k ochabnutí erekce a zasunutí penisu do předkožkového vaku.

Obrázek 41, 42 Odběr semene u psa



Obrázek 43 Spermatická vs. postspermatická frakce



4.6 Elektroejakulace

Elektroejakulace je metoda odběru ejakulátu, při které využíváme vyvolání peristaltické kontrakce vývodných pohlavních cest, zejména chámovodů a jejich ampul, prostřednictvím elektrických impulzů stimulujících pánevní nervy. Elektrické impulzy v rozmezí 0-15V o konstantním proudu v řádu desítek miliampér jsou vytvářeny generátorem a přenášeny prostřednictvím většinou rektální sondy vybavené podélnými, ventrálně směřujícími elektrodami. Pro jednotlivé druhy existují specifická schémata postupného nárůstu napětí, délky impulzů a pauz mezi nimi. Některé generátory mají také přednastavené režimy pro různé druhy zvířat. Elektroejakulace je používána u masožravců, zejména kočkovitých šelem, ZOO zvířat, ale i u zvířat hospodářských. Nevýhodou metody je nutnost pořízení nákladného vybavení a u většiny zvířat provedení v celkové anestezii, případně sedaci.

Obrázek 204 Elektroejakulátor

Obrázek 215 Rektální sondy (býk, pes, kocour)



1. rektální sonda, 2. generátor elektrických impulzů, 3. spojovací kabel sondy, 4. ovladač

Býk:

- fixace v kleci
- mírná sedace
- vyprázdnění rekta
- toaleta předkožkového vaku
- zavedení elektrody do rekta nad přídatné pohlavní žlázy
- postupné zvyšování napětí a sledování reakce samce
- pomocník přidržuje sběrač pod předkožkovým otvorem

Obrázek 226 Zasunutí sondy do rektu



Obrázek 237 Odběr ejakulátu

Obrázek 248 Ejakulace



Obrázek 259 Sběrač se semenem



5. Posouzení ejakulátu

Základní posouzení ejakulátu zahrnuje makroskopické a mikroskopické vyšetřovací metody.

Makroskopické posouzení spermatu se provádí bezprostředně po jeho odběru. Hodnotí se následující parametry: objem, konzistence, barva, pach, obsah cizích příměsí a pH.

Mikroskopické posouzení spermatu se skládá z posouzení motility, koncentrace spermií, morfologie a životnosti samotných spermií. Mimo tato základní vyšetření existuje řada specializovaných mikroskopických metod.

5.1 Makroskopické vyšetření

Objem ejakulátu určujeme v kalibrové nádobě či zkumavce u zvířat s malým objemem ejakulátu je vhodnou metodou použití mikropipety. Viskozitu subjektivně posuzujeme nakloněním odběrové nádoby a zhodnocením ulpívání tekutiny na stěně. Barvu ejakulátu hodnotíme subjektivně, případně porovnáváním se standardizovanou škálou. Pach a přítomnost cizích příměsí posuzujeme senzory. Hodnotu pH vyšetřujeme pH metrem, nebo diagnostickými proužky se škálou odpovídající rozmezí hodnot pH semene, tj. přibližně 6-8.

Tab. 1 Parametry makroskopického vyšetření ejakulátu

	OBJEM (ml)	VISKOZITA	BARVA	PACH	CIZÍ PŘÍMĚSY	pH
BÝK	2-10	smetanovitá - mléčná	žlutobílá	čerstvé mléko	ne	6,8-6,9
BERAN	0,5-7	smetanovitá	mléčná	ovčí vlna	ne	6,3-7,5
KOZEL	0,5-7	smetanovitá	mléčná	typicky kozlí	ne	6,3-7,5
HŘEBEC	20-300	odstředěné mléko - vodnatá	mléčná	neutrální	ne	7,2-7,5
KANEC	130-500	odstředěné mléko - vodnatá	mléčná, našedlá	typicky kančí	ne	7,2-7,5
PES	2-50	odstředěné mléko - vodnatá	mléčná	typicky psí	ne	6,8-7,0
KOCOUR	0,2-0,5	vodnatá	mléčná	neutrální	ne	7,0-7,9

5.2 Mikroskopické vyšetření

Koncentrace

Měření koncentrace spermií je velmi důležitý krok pro hodnocení ejakulátu a jeho následné zpracování při přípravě inseminačních dávek. Stanovuje se počet spermií v mm^3 . Koncentraci spermií je možno stanovit fotometricky, hemocytometricky, nebo počítačově.

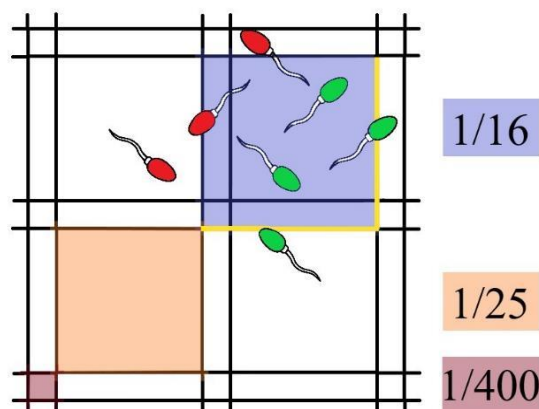
Fotometricky hodnotíme stupeň zákalu, který vznikne po standardním naředění nativního semene. Tento způsob stanovení koncentrace je objektivní, ale vyžaduje vytvoření kalibrační křivky absorbance přesnější hemocytometrickou metodou. Metoda se běžně používá v inseminačních stanicích.

Hemocytometrické stanovení v počítacích komůrkách je základní vyšetřovací metoda stanovené hodnoty jsou poměrně přesné, nicméně provedení je dosti pracné. Kromě Bürkerovy počítací komůrky se ve spermatologii používají i další typy – Thomova, Neubauerova. Semeno je nutné nejdříve naředit Hayemovým roztokem, nebo hypertonickým roztokem NaCl k devitalizaci spermií a důkladně homogenizovat. V závislosti na předpokládané koncentraci semene podle druhu ředíme 100x nebo 200x.

Pro ředění 200x použijeme lahvičku s 4 975 μl Hayemova roztoku, do které napipetujeme 25 μl vzorku ejakulátu. Při ředění 100x smícháme 4 950 μl Hayemova roztoku a 50 μl vzorku ejakulátu. V situaci, kdy máme k dispozici malé množství ejakulátu, je vhodnější použít k naředění ejakulátu hematologický melanžér.

Naředěný vzorek nanese do Bürkerovy komůrky a pozorujeme pod zvětšením 200x nebo 400x. Do analýzy zahrnujeme spermie, které se nacházejí ve čtverci o ploše $1/25$ nebo $1/16$ mm^2 (viz obrázek č. 50). Počítáme všechny spermie, jejichž hlavičky se nachází zcela uvnitř stanoveného sektoru, případně se dotýkají z vnějšíku dvou sousedních stran příslušného čtverce.

Obrázek 50 Schéma Bürkerovy komůrky



Pro výpočet koncentrace využijeme vzorec:

$$X = \frac{PS \times Z \times \check{C} \times V}{P\check{C}}$$

X počet spermií v 1 mm³ naředěného semene

PS počet napočítaných spermií

Z stupeň ředění (100x nebo 200x)

\check{C} plocha čtverce (1/16 mm², 1/25 mm²)

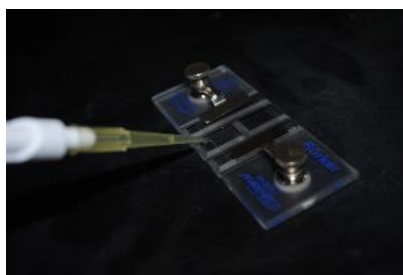
V výška komůrky (1/10 mm)

$P\check{C}$ počet počítaných čtverců

Obrázek 51 Ředění ejakulátu



Obrázek 52 Bürkerova komůrka (a)



Obrázek 53 Bürkerova komůrka (b)



Obrázek 54 Bürkerova komůrka (c)



Motilita

Termínem motilita obecně označujeme jakoukoli schopnost spermií se pohybovat. Motilitou v užším slova smyslu rozumíme pouze tzv. progresivní motilitu, tedy spermie se pohybuje přímočaře dopředu za hlavičkou. Tento typ pohybu se vyjadřuje v procentech. Dále rozlišujeme patologické formy pohybu (např. kruhový, trhavý, přerušovaný, oscilační, retrográdní).

Výsledkem je procentuální hodnota určená posouzením pohybu minimálně 100 spermií při zvětšení 200x. Pro správné posouzení motility je nutno v případě koncentrovanějších ejakulátů semeno před vyšetřením naředit tak, aby bylo možno hodnotit pohyb jednotlivých spermií (většinou 5-20x).

Pro detailnější analýzu pohybu je možno využít i speciální analyzátor CASA (computer assisted sperm analysis), který je schopen diferencovat různé formy pohybu a jeho rychlost na základě předem definovaných parametrů.

U velmi koncentrovaných ejakulátů slouží k orientačnímu zhodnocení pohyblivosti spermií stanovení tzv. vířivého pohybu na hodinovém sklíčku, nebo podložním sklíčku se speciální jamkou. V tomto případě posuzujeme kvalitu pohybu pomocí křížkové škály + až +++. Toto vyšetření se provádí u neředěného ejakulátu.

Stanovení objemu ejakulátu, koncentrace a motility spermií jsou základní veličiny zjišťované po každém odběru při výrobě inseminačních dávek.

Vyšetření integrity povrchových membrán spermií

Toto vyšetření spočívá v mikroskopickém posouzení spermií, u kterých došlo k obarvení pomocí kombinace barviv Eosin, Nigrosin. Nigrosin obarví pozadí preparátu. Eosin proniká u mrtvých spermií přes membránu a obarví je do červena nebo červeno-bíla. Neobarvené, bílé spermie jsou hodnoceny jako živé s intaktní membránou.

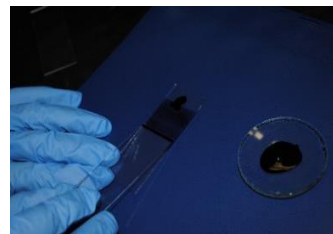
Postup barvení:

Nejprve připravíme roztok barviva. Na hodinové sklíčko nanese a smícháme 2 kapky 10% Nigrosinu a 1 kapku 2,5% Eosinu. Přeneseme 1 kapku na podložní sklíčko, ke které přidáme kapku zkoumaného semene, promícháme, provedeme nátěr a necháme zaschnout. Pozorujeme pod mikroskopem při zvětšení 400 x. Počítáme 100 spermií a výsledek uvádíme v procentech. Přípustných je 30 % mrtvých spermií.

Obrázek 265 Barvení Eosin - Nigrosin



Obrázek 56 Zhotovení nátěru



Obrázek 57 Zhotovený preparát na posouzení integrity membrán



- neobarvené spermie s intaktní membránou = živé
- růžové spermie s porušenou integritou membrány = mrtvé

Morfologie

Morfologické vyšetření patří mezi nejobektivnější metody mikroskopického posuzování ejakulátu. Před samotným hodnocením je nutné vytvořit kvalitní nátěr spermatu na sklíčko a obarvit jej. Používá se barvení dle Brandon-Farelyho, dle Karrase, nebo Hemacolor. Posuzujeme změny primární, které vznikají během spermatogeneze (změny na hlavičce, středním mitochondriálním oddílu, proximální kapka, stočený ocásek). Změny sekundární jsou většinou asociovány s ocáskem, vznikají důsledkem nedokončeného zrání, nebo při odběru a zpracování semene (distální kapka, jednoduše zahnutý ocásek, chybějící ocásek).



Obrázek 58 Fyziologický tvar spermie býka

Primární morfologické abnormality spermií



Obrázek 59 Teratoidní forma hlavičky (a)



Obrázek 60 Teratoidní forma hlavičky (b)



Obrázek 61 Zdvojený bičík



Obrázek 62 Zdvojená hlavička



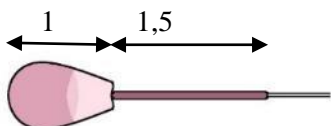
Obrázek 63 Makrocefálie (abnormálně velká hlavička)



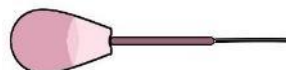
Obrázek 64 Mikrocefálie (abnormálně malá hlavička)



Obrázek 65 Oválná hlavička



Obrázek 66 Fyziologický rozměr spojovací části



Obrázek 67 Zkrácená spojovací část



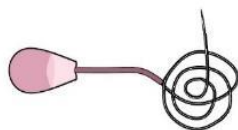
Obrázek 68 Zúžená spojovací část



Obrázek 69 Abaxiální umístění bičíku



Obrázek 70 Perzistující akroblast

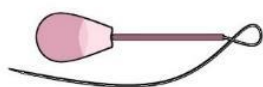


Obrázek 71 Zavinutí bičíku



Obrázek 72 Protoplazmatická kapka na hlavní části bičíku

Sekundární morfologické abnormality spermií



Obrázek 73 Jednoduché ohnutí bičíku



Obrázek 74 Bobtnání akrosomu



Obrázek 75 Uvolněný akrosom



Obrázek 76 Svlečený akrosom

Barvení dle Brandon-Farelyho

- Kapku semene nanese na sklíčko, zhotovíme nátěr a necháme zaschnout.
- Fixujeme v 10% roztoku formaldehydu po dobu 15 vteřin. Po vyjmutí opláchneme vodou.
- Sklíčko obarvíme 5% roztokem anilinové modře v destilované vodě po dobu 10-15 vteřin. Po vyjmutí opláchneme vodou.
- Obarvíme 0,5% krystalovou violetí v destilované vodě po dobu 6-15 vteřin. Po vyjmutí opláchneme vodou a osušíme.
- Takto zhotovený nátěr pozorujeme při zvětšení 1000x za použití imerzního oleje.

Spermie se barví modrofialově, přičemž akrozom je zřetelně barevně diferencován od ekvatoriálního segmentu a zadní části hlavičky

Obrázek 77 Barvení dle Brandon-Farelyho



Obrázek 78 Vzorek semene kance



*Obrázek 279 Vzorek semene
berana*



*Obrázek 81 Vzorek semene
psa*



*Obrázek 81 Vzorek semene
kocoura*



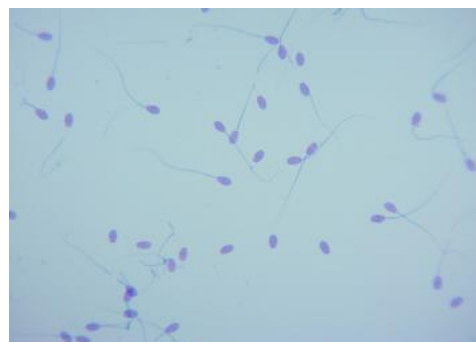
Barvení dle Karrase

- Naneseme kapku semene na sklíčko, zhotovíme nátěr a necháme jej zaschnout.
- Fixujeme 5 minut v 10% roztoku formalin Hancock. Po vyjmutí opláchneme destilovanou vodou.
- Barvíme 7 minut v 3% roztoku bengálské červené. Po vyjmutí opláchneme destilovanou vodou.
- Sklíčko necháme po dobu 3 minut v roztoku dubové kůry. Po vyjmutí opláchneme destilovanou vodou.
- V posledním kroku vložíme do roztoku viktoriánské modře a necháme působit 5 minut. Po vyjmutí opláchneme destilovanou vodou a osušíme.

Obrázek 82 Barvení dle Karrase



*Obrázek 83 Obarvený preparát,
semeno berana*



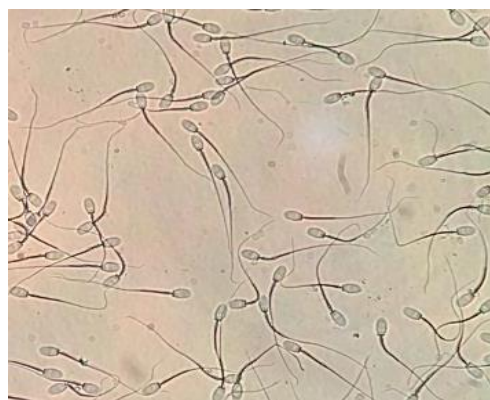
Barvení Hemacolor

- Kapku semene nanese na sklíčko, zhotovíme nátěr a necháme zaschnout.
- Barvíme v jednotlivých roztocích dle daného pořadí.
- roztok č. 1 fixace 5 vteřin
- roztok č. 2 barvení 3 vteřiny (červený)
- roztok č. 3. barvení 6 vteřin (modrý)
- roztok č. 4 fixace 20 vteřin
- Před každým ponořením do roztoku důkladně opláchneme destilovanou vodou, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci roztoků.

Obrázek 84 Barvení Hemacolor



Obrázek 85 Obarvený preparát



Tab. 2 Parametry mikroskopického vyšetření ejakulátu

	MOTILITA	KONCENTRACE (spermie/mm ³)	MORFOLOGIE (max. % abnormálních spermií)
BÝK	min. 70 %	200 000 – 2 000 000 (ø 1 000 000)	20 %
BERAN	min. 70 %	500 000 - 5 000 000 (ø 3 000 000)	30 %
KOZEL	min. 70 %	500 000 - 4 000 000 (ø 3 000 000)	20 %
HŘEBEC	min. 60 %	30 000 - 800 000 (ø 120 000)	40 %
KANEC	min. 70 %	140 - 735 000 (ø 150 000)	20 %
PES	min. 70 %	20 000 - 500 000 (ø 120 000)	30 %
KOCOUR	min. 70 %	100 000	30 %

6. Ředění a konzervace ejakulátu

Cílem ředění a konzervace ejakulátu je příprava racionálního počtu inseminačních dávek z jednoho odběru semene, jejich skladování, distribuce a použití.

Po každém odběru ejakulátu je provedeno základní vyšetření: stanovení objemu ejakulátu, koncentrace spermií a motility spermií.

Výpočtem se zjistí počet aktivních spermií v celém ejakulátu a s ohledem na stanovený minimální počet aktivních spermií v jedné inseminační dávce (u býka 40 mil před konzervací) se vypočítá počet inseminačních dávek, které mohou být vyrobeny z provedeného odběru. Podle užívaného systému balení inseminačních dávek (objem jedné inseminační dávky je u býka 0,1-0,5 ml) se stanoví celkový objem naředěného odebraného ejakulátu a odečtením objemu vlastního ejakulátu se stanoví množství ředidla potřebné pro jeho naředění.

$$V_n = \frac{K \times m \times V_m \times 1000}{P} \times V_e$$

V_n – objem naředěného ejakulátu (ml)

K – počet spermií (mm^3)

m – motilita spermií (např. při motilitě 80 % se do vzorce se dosadí 0,8)

V_m – objem mražené dávky (ml)

V_e – objem získaného ejakulátu (ml)

P – počet spermií v inseminační dávce (u býka obvykle 40 mil)

V_r – objem přidaného ředidla (ml)

$$V_r = V_n - V_e$$

Příklad konkrétního stanovení objemu ředidla po odběru semene býka:

Objem semene	10 ml
Koncentrace	1,3 mil/ mm^3
Motilita	80 %
Koncentrace aktivních spermií	1 mil/ mm^3
Počet aktivních spermií v celém odběru	10 Mld
Minimální počet spermií v jedné dávce před konzervací	40 mil
Počet inseminačních dávek vyrobených z odběru	250
Objem jedné dávky	0,25 ml
Celkový objem naředěného ejakulátu	62,5 ml
Objem ředidla	52,5 ml

Odebraný ejakulát se naředí přidáním 52,5 ml ředidla a vyrobí se 250 inseminačních dávek.

Ředění ejakulátu býka:

Ředidlo vytváří podmínky pro přežívání spermií mimo organismus, udržuje schopnost oplození a současně je konzervačním prostředkem.

Pro krátkodobé ředění se používají ředidla na bázi citrátu sodného, vaječného žloutku a mléka v různých kombinacích. Připravují se denně z čerstvých surovin, naředěné semeno se skladuje při teplotě 2-4°C po dobu 1-2 dnů. Krátkodobé ředění se u skotu používalo v počátcích umělé inseminace, dnes jen ojediněle.

Příklad složení žloutko-citrátového ředidla:

Složení: 1 díl žloutku, 3-4 díly citrátu sodného o pH 6,7

Příprava: Očistit vejce eteralkoholem, rozklepneme, odstraníme bílek a vyklopíme žloutek na filtrační papír s otvorem v nálevce. Po propíchnutí žloutkové blány jímáme žloutek do kádinky. K získanému žloutku přidáme citrát sodný. Ředidlo mícháme na magnetické míchače do homogenizace tukových kuliček žloutku.

V současnosti se používá konzervace spermií hlubokým chladem v kapalném dusíku (-196°C). K ředění se používá žloutko-citrátové ředidlo s obsahem glycerolu. Glycerol je látka s kryoprotektivním účinkem umožňující přežití akceptovatelného množství spermií (cca 30%). Existuje mnoho komerčně dostupných ředidel, která se liší v detailech (poměr základních složek, podíl glycerolu, pufrů, antibiotika) a používají se podobným způsobem.

Po výpočtu objemu se ředidlo pomalu přimíchá do ejakulátu a automaticky se naplní do plastových dutinek – pejet. Pejety se uloží na 2-6 h při teplotě +3°C (ekvilibrace), kdy spermie získají odolnost vůči nízké teplotě. Vlastní zmrazování trvá 10-15 minut a probíhá automaticky v parách kapalného dusíku podle předem nastavené křivky poklesu teploty. Kryokonzervované semeno si udržuje oplozovací schopnost v podstatě neomezeně dlouho.

Ředění ejakulátu kance

Využívá se většinou krátkodobá konzervace (2-7 dní). Kančí spermie jsou velmi citlivé na nízkou teplotu, proto se chlazené inseminační dávky uchovávají v termostatu při 16°C. Používají se komerčně dostupná ředidla např. BTS, Androhep. Inseminační dávky jsou distribuovány ve formě plastových tub o objemu 80-100 ml, a obsahují přibližně 4 miliardy spermií tak, aby byla zajištěna přítomnost minimálně 1,5 miliardy motilních spermií na konci expirace inseminační dávky. Konzervace hlubokým chladem se u kance využívá zřídka, neboť kvůli nízkému obsahu fosfolipidů v membráně spermií bývá její výsledek neuspokojivý. Poškození spermií hlubokým chladem navíc následně vyžaduje intrauterinní depozici inseminační dávky, pro kterou je nutno používat speciální inseminační pipety, které celý proces prodražují.

Ředění ejakulátu hřebce

Využívá se krátkodobá i dlouhodobá konzervace inseminačních dávek. Krátkodobě konzervovaná chlazená inseminační dávka má, dle kvality ejakulátu, objem 10-20 ml. Pro dlouhodobou konzervaci je ředěný ejakulát zmrazován do pejet o objemu 0,5 ml. K

inseminaci se použije takový počet pejet, aby bylo dosaženo celkového počtu 100-200 milionu motilných spermíí. Existuje několik typů komerčních ředidel, např. EquiPRO.

Ředění ejakulátu psa

Ke konzervaci ejakulátu psa používáme metody krátkodobé i dlouhodobé konzervace. V případech, kdy je možné odebrané semeno použít nejdéle do 10 dnů, můžeme použít konzervaci při chladničkové teplotě při naředění semene podle odpovídajícího návodu přiloženého ke komerčně vyráběnému ředidlu, např. CaniPro 5, CaniPro 10. Pro konzervaci používáme pouze spermatickou frakci ejakulátu, tak aby nedošlo k nadměrnému naředění prostatickou frakcí a nutnosti následné centrifugace.

Pro dlouhodobé skladování semene psa používáme metodu konzervace hlubokým chladem. Spermatická frakce ejakulátu je naředěna kryokonzervačním ředidlem (např. Uppsala I, Uppsala II), poté je roztok ekvilibrován několik hodin při chladničkové teplotě, při stejné teplotě adjustován do pejet a poté jsou pejety zmrazeny nejprve v parách kapalného dusíku a poté přímo v kapalném dusíku. K inseminaci je poté použito několik pejet tak, aby bylo dosaženo celkového počtu motilných spermíí v inseminační dávce 100 milionů.

7. Videodokumentace

[Videodokumentace k příručce pro praktická cvičení z andrologie](#)



Použitá literatura:

- GAMČÍK, P., KOZUMPLÍK J. a kol.: Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat, Bratislava: PRÍRODA 1992, ISBN 80-07-00540-4
- HOFÍREK, B. a kol.: Nemoci skotu, Česká buiatrická spoločnosť 2009, ISBN 978-80-86542-19-5
- CHENOWETH, P. J., LORTON, S. P.: Animal Andrology: theories and applications, CABI International 2014, ISBN 978-1-78064-316-8
- KÖNIG, H. E. a LIEBICH, H. G.: Anatomie domácich savců, Bratislava: H & H, 2003. ISBN 80-88700-56-6.
- NAJBRT, R. a kol.: Veterinární anatomie I a II, Praha: SZN, 1980.
- VĚŽNÍK, Z. a kol.: Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy, Brno 2004, ISBN 80-86895-01-7