

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

---

**Katedra speciální zootechniky**

**Obor: zootechnika**

***TÉMA DIPLOMOVÉ PRÁCE***

**VLIV INTRAUTERINNÍ APLIKACE AUTOPLAZMY NA  
PLODNOST KLISNY**

Autor diplomové práce:  
**Hana Stránská**

Vedoucí diplomové práce:  
**doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.**

**2010**

## **Poděkování**

Děkuji touto cestou vedoucímu diplomové práce, doc. Ing. Miroslavu Maršálkovi, CSc. za poskytnutý čas, odborné vedení a cenné informace. Dále MVDr. Helze Koudelkové za spolupráci na praktickém provedení pokusu a odbornou pomoc.

V neposlední řadě také Mgr. Veronice Karlové za vysvětlení práce se statistickým a matematickým programem při zpracování a vyhodnocení výsledků.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Vliv intrauterinní aplikace autoplazmy na plodnost klisny“ vypracovala samostatně a na základě vlastních zjištění. V seznamu použité literatury jsem uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala. V souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 2010

.....

Podpis

## Abstrakt

Cílem této práce bylo u sledovaného souboru klisen vyhodnotit vliv intrauterinní aplikace autoplazmy na zabřeznutí v připouštěcí sezóně 2008 a 2009. Klisnám byla aplikovaná vlastní plazma vždy po inseminační dávce čerstvého spermatu a následně byla úspěšnost připouštění porovnána s kontrolním souborem klisen.

Dále byl sledován vliv věku klisen na úspěšnost zabřezávání, počet dávek, velikost a umístění preovulačního folikulu a úspěšnost zapouštění v jednotlivých měsících v roce a vyhodnocena prokazatelnost rozdílu mezi úspěšností zapouštění klisen po hříběti a klisen zapouštěných poprvé.

Statistické vyhodnocení bylo zpracováno s využitím kontingenčních tabulek a jednofaktorové analýzy variance (Anova). Dále byla využita regresní a korelační analýza. Všechna statistická hodnocení byla provedena v programu STATGRAPHICS Plus 5.0.

Z výsledků vyplynulo, že sledování úspěšnosti zabřezávání z hlediska počtu dávek dalo stejný výsledek jako při hodnocení říjí, ve kterých klisny zabřezly. Neprokázal se statisticky významný vliv aplikace plazmy na úspěšnost zabřezávání. Pokud byl k aplikaci autoplazmy připojen ještě faktor věku, statisticky významný rozdíl zde již prokazatelný je. Tedy, byl statisticky potvrzen vliv aplikace plazmy na úspěšnost zabřeznutí u klisen ve věku do 14 let. Výsledkem další analýzy je statisticky neprokazatelný rozdíl v úspěšnosti zabřezávání mezi klisnami po aplikaci plazmy a bez její aplikace ve skupině klisen po minimálně jednom hříběti.

**Klíčová slova:** Reprodukce; klisna; inseminace; děloha; krevní plazma; březost; folikul;

## **Abstract**

The objective of this study was to evaluate the effect of intrauterine plasma infusion on conceiving rate in selected group of mares during the breeding seasons 2008 and 2009. The fresh sperm insemination was followed by the infusion of self-plasma and subsequently the successivity of the insemination was compared with the control group of mares.

Next, there were observed following factors which could influence the effectiveness of conceiving: age of the mares, number of insemination doses, size and location of preovulating follicle, month of the year. There was also evaluated the difference between multiparous (with one and more births) and nulliparous mares.

The statistical analyses were proceeded by the use of contingency tables and the one-factorial analysis of variance (ANOVA). Next, the regression and correlation analyses were used. All the statistical procedures were performed with the use of statistical software STATGRAPHICS Plus 5.0.

The results showed that there were the same results in observing of both number of insemination doses and fertile heats evaluation. There was found no significant effect of plasma infusion on the conceiving rate. In the model with the effects of plasma infusion and the age of the mare there were found statistically significant differences. It means that the effect of plasma infusion on conceiving rate was confirmed in the mares of the age up to 14 years. The result of the following analysis is the non-significant difference in conceiving rate between the groups of multiparous mares with or without plasma infusion.

**Key words:** reproduction; mare; insemination; uterus; blood plasma; pregnancy; follicle;

# Obsah

1. ÚVOD .....	9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	10
<b>2.1. Morfologická stavba pohlavní soustavy klisny .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2. Pohlavní cyklus klisny .....</b>	<b>11</b>
2.2.1. Reprodukční období klisen .....	11
2.2.2. Říjový cyklus klisny .....	13
2.2.3. Faktory ovlivňující průběh pohlavního cyklu .....	14
2.2.4. Vliv hormonální činnosti na pohlavní cyklus .....	15
2.2.5. Říjové chování klisen .....	16
2.2.6. Detekce říje .....	17
<b>2.3. Metody zapouštění klisen .....</b>	<b>18</b>
2.3.1. Přirozená plemenitba .....	18
2.3.2. Inseminace klisen .....	19
2.3.3. Embryotransfer .....	21
<b>2.4. Sonografické vyšetření klisny .....</b>	<b>22</b>
2.4.1. Sledování průběhu říje pomocí sonografie .....	22
2.4.2. Sonografická diagnostika březosti .....	23
<b>2.5. Březost klisny .....</b>	<b>24</b>
<b>2.6. Úroveň březosti po inseminaci .....</b>	<b>24</b>
<b>2.7. Plodnost klisen .....</b>	<b>25</b>
2.7.1. hodnocení plodnosti klisen .....	26
2.7.2. Poruchy plodnosti klisen .....	27
2.7.3. Morfologické anomálie pohlavního ústojí .....	28
2.7.4. Funkční poruchy plodnosti .....	29
2.7.5. Získané poruchy plodnosti .....	29
2.7.6. Intrauterinní terapie .....	31
<b>2.8. Efekt intrauterinní aplikace autoplazmy .....</b>	<b>31</b>
2.8.1. Složení krevní plazmy .....	32
3. HYPOTÉZA .....	34
4. CÍL PRÁCE .....	35
5. MATERIÁL A METODIKA .....	36
<b>5.1. Sběr dat .....</b>	<b>36</b>

6. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
6.1. Sledování vlivu intrauterinní aplikace autoplazmy na zabřezávání.....	39
6.2. Sledování vlivu věku klisen na úspěšnost zabřezávání.....	47
6.3. Porovnání dvou věkových skupin z hlediska zabřezávání a aplikace plazmy.....	56
6.4. Sledování počtu dávek potřebných k zabřeznutí u klisen s aplikovanou plazmou a bez její aplikace.....	61
6.5. Velikost a umístění folikulů.....	64
6.6. Přehled zapouštění během jednotlivých měsíců.....	65
6.7. Porovnání klisen po hříběti a zapouštěných poprvé.....	67
7. ZÁVĚR.....	73
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	74

# 1. ÚVOD

Koně mají obecně nejnižší efektivitu reprodukce ze všech hospodářských zvířat. Mezi významné příčiny nízké plodnosti patří infekce pohlavní soustavy, hormonální poruchy, nepřiměřený management, nedostatečná selekce na plodnost, ale i samotné fyziologické zvláštnosti reprodukčního cyklu klisen jako vysoká variabilita v délce trvání říje, sezónnost reprodukčního cyklu spojená s množstvím neplnohodnotných říjí a poměrně častý výskyt nežádoucích dvojčat.

Během devadesátých let došlo na našem území k rozšíření umělé inseminace a současně s tím i sonografické techniky. Díky těmto prostředkům se podařilo eliminovat výše uvedené negativní faktory ovlivňující reprodukci klisen.

Správným načasováním inseminace lze snížit riziko endometritid, které se zvyšuje se zapuštěním klisen v nekvalitní říji nebo období mimo říje, kdy jsou pohlavní orgány klisny značně náchylné k infekci.

V moderní veterinární medicíně již existuje mnoho metod a postupů, které se používají především za účelem produkce vysoce výkonných sportovních koní. Kromě umělé inseminace čerstvým nebo krátkodobě i dlouhodobě konzervovaným spermatem sem patří i transfer embryí, aspirace vajíčka z folikulu, dělení embryí.

Pro všechny tyto finančně náročné metody je však nejdůležitější, aby pohlavní orgány klisny byly prosté infekcí a patologických zárodků, které by mohly ohrozit nidaci vajíčka a později i vývoj plodu.

Dobrou technikou jak tohoto dosáhnout se zdá být i intrauterinní aplikace autoplazmy, který se používá k ošetření a prevenci výskytu infekcí dělohy a vedle toho se osvědčuje jako dobrá terapie při výskytu zadržení plodových obalů u chovných klisen.

V současných ekonomických podmínkách je snahou chovatele mít klisnu, která pravidelně zabřežne a porodí dobře vyvinuté a životaschopné mládě každý rok až do vysokého věku zvířete.

Na takovém úspěchu se může podílet i intrauterinní aplikace autoplazmy. Proto je vhodné zhodnocení dosavadních výsledků této metody a její přínos ke zlepšení výsledku plodnosti klisen.



## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Morfologická stavba pohlavní soustavy klisny

Reprodukční funkce u samic zajišťují produkci vajíček a poskytují prostředí pro růst a vývoj plodu, který se vyvíjí po oplození zralého vajíčka spermií. Samice tak plní svoji základní roli-rodit ve správném čase živé mládě a laktací zajišťovat jeho výživu. K tomu je nutná koordinace komplexních vztahů mezi hormony a tkáňovými změnami v těle samice. To vše slouží pro zachování druhu (**REECE, 1998**).

K samičím pohlavním orgánům patří vaječníky, vejcovody, děloha, pochva a poševní předsíň - vnitřní pohlavní orgány a vulva a klitoris - zevní pohlavní orgány (**SOVA a kol., 1978**).

**Vaječník** (ovarium) je párová žláza, ve které se vyvíjejí vajíčka a kde se produkují pohlavní hormony. Jsou zavěšeny na vlastním okruží. Volnějším zavěšení umožňuje u klisen snadnou manipulaci při rektální palpaci.

Klisna má vaječník ve tvaru fazole nebo ledviny, ovulace je omezena na malou ovulační plochu, nazývá se ovulační jamka. Ta dává vaječnickům klisny fazolovitý tvar (**REECE, 1998**). Ke kraniálnímu konci vaječnicku se třásněmi připojuje vejcovod.

**Vejcovod** (tuba uterina) je párová, zvlněná hladkosvalová trubice vystlaná sliznicí, která přivádí vajíčka od vaječnicku do příslušného rohu dělohy. U domácích druhů zvířat je to místo pro oplození vajíček spermiemi (**REECE, 1998**). Nálevkou s třásněmi se vejcovod přikládá k vaječnicku, druhý konec vejcovodu se děložním ústím otevírá do děložního rohu (**KRESAN a kol., 1979**).

**Děloha** (uterus) je dutý orgán, sloužící k vývoji zárodka. Je rozdělena na tělo, dva rohy a děložní krček. U klisny se vyskytuje jednoduchá, dvourohá, nerozdělená děloha. Má dva rohy a jednotné tělo, přecházející v kanálek krčku. Děložní rohy jsou uloženy v břišní dutině. U klisny se jen mírně zvedají nahoru a jsou asi 25 cm dlouhé. Děložní krček má silně vyvinutou svalovinu a prochází jím klikatě kanálek krčku. Je uzavřený a otevírá se při říji a při porodu. Klisny ho mají 5 - 7,5 cm

dlouhý. Děložní stěna se skládá ze tří vrstev: sliznice, svalová vrstva a seróza (**SOVA a kol., 1987**).

**Pochva** (vagina) je pářící orgán a porodní cesta klisny a má charakter široké trubice dlouhé 15 - 20 cm.

**Poševní předsíň** (vestibulum vaginae) je kaudální pokračování pochvy a slouží zároveň jako vývodná močová cesta. Je dlouhá 10-20 cm.

**Ochod** (vulva) je vstupem do pohlavního ústrojí samice a spolu s klitorisem tvoří jeho zevní část (**KRESAN a kol., 1979**).

## **2.2. Pohlavní cyklus klisny**

### **2.2.1. Reprodukční období klisen**

Termín „estrální cyklus“ označuje rytmické změny pozorované v chování všech savců, zahrnují pravidelné, ale omezené periody svolnosti k páření. Jeden interval cyklu je čas od začátku jednoho cyklu říje k dalšímu (ovulační interval). U klisen se tyto změny poprvé začínají projevovat ve věku 12 – 24 měsíců (**NAGY a kol., 2000**). Klisny se však zpravidla zapouštějí nejdříve až po 3 letech věku, tj. po dosažení chovatelské dospělosti.

Klisny patří mezi sezónně polyestrická zvířata, to jsou taková, u nichž se říje opakuje uvnitř fyziologické pářící sezóny (určitá část roku). Následuje perioda anestrú až do příští pářící sezóny. Estrální cyklus může být rozdělen na několik stadií podle ovariálních změn (**REECE, 1998**).

Délka pohlavního cyklu u klisen je v průměru 21 dní, avšak kolísá mezi hodnotami 17-25 a více dnů. Ve skutečnosti délka pohlavního cyklu je určována součtem proměnlivé délky říje (3-10 dnů) a konstantní délky meziříjového intervalu. Ten je podmíněn fyziologickou životností žlutého tělíska, která trvá 15-16 dnů. Prodlužuje-li se délka říje, prodlužuje se i délka pohlavního cyklu (**DOLEŽEL, 2003**). Během pohlavního cyklu probíhají na vaječnicích 2-3 růstové vlny dominantních folikulů.

## **U klisen rozlišujeme 4 reprodukční období:**

- fyziologický zimní anestrus
- jarní přechodné období
- připouštěcí období (druhá polovina jara a léto)
- podzimní dozívání připouštěcího období

### **Zimní anestrus (inaktivní fáze)**

Je u klisen charakteristickým obdobím v měsících listopadu, prosinci a lednu. Je charakterizován nízkou hladinou a nedostatečným signálem hypotalamického GnRH, FSH a LH. Klisny nevykazují příznaky říje, ovariální aktivita je malá nebo žádná a folikuly nepřesahují 25 mm. Při rektálním vyšetření se ovaria jeví jako malá, velmi tuhá, často hrbolatá. Poševní sliznice je bledá. Děloha a krček jsou ochablé a hustota endometriálních žlázek endometria je malá.

### **Jarní přechodné období**

Představuje postupnou normalizaci sekrece GnRH a nárůst gonadotropních hormonů v adenohipofýze. Objevuje se cyklická pohlavní aktivita charakterizovaná tvorbou hroznovitých - multiplicitních folikulů o průměru 20 – 30 mm a více. Tyto folikuly zpočátku nedozrávají a atretizují. V dalších růstových vlnách se však postupně zvětšují a vytvářejí dominantní folikul schopný ovulace (> LH). Říje v tomto období mohou být různě dlouhé, často bez ovulací. S postupem jarního období se pohlavní cyklus dále stabilizuje, příznaky říje se zvýrazňují a dochází k žádoucím ovulacím. Při palpaci mají ovaria sukovitý povrch a obsahují několik folikulů (již mají preovulační průměr 3,5 cm a více) (**BUBENÍČEK, 2005**).

### **Připouštěcí období**

Toto období je charakterizováno plnohodnotným pohlavním cyklem s rozdílnou individuální intenzitou. Zevní příznaky říje nabývají charakteristických forem a žlutá tělíska periodické životnosti. Stěna dělohy je edematózně ztluštělá. Krček děložní je edematózně prosáklý, tonicky ochablý.

Na ovárii je palpovatelný folikul, který před ovulací zcela vyplňuje ovulační jamku. U většiny klisen dochází k ovulaci v době vyvrcholení říje a zapouštění je dobré

orientovat co nejlíže momentu ovulace. Na místě ovulovaného Gráfova folikulu se vytváří žluté tělísko, které nepromínuje nad ovulační jamku.

### **Období doznívání**

Říjová aktivita klisen slábne, cykly se prodlužují, folikuly nedozrávají a říjová aktivita postupně slábne.

Říje se prodlužují, příznaky se stávají nezřetelnými. Folikuly již nedozrávají, nedochází k ovulaci, ale k luteinizaci a atrezii, zanikají i velké folikulární vlny a klisny posléze přecházejí do zimního anestru (**DOLEŽEL, 2003**).

### **2.2.2.Říjový cyklus klisny**

Pro úspěšnou reprodukci klisen je velice důležitá detekce říje a vymezení doby ovulace.

**Proestrus** (fáze předříjová). Plemenice je pod vlivem FSH, vyvolávajícího na vaječnicích růst a zrání Graafova folikulu, v němž dochází ke zvýšené tvorbě estrogenů. Jejich působení způsobuje prokrvení pohlavního ústrojí (**SOVA a kol., 1987**).

**Estrus** (říje) trvá 3-10dní, její délka velmi úzce souvisí s roční dobou. Na začátku připouštěcího období jsou všechny příznaky říje málo zřetelné, na jeho vrcholu je říje kratší, příznaky výrazné: časté močení, zvedání ocasu na bok, vystavení vnějších genitálií, sekret z vulvy. Charakteristické je i tzv. „blýskání“. Klisna je nespolehlivá při práci, nemá chuť k žrádлу, často řehtá, je svolná k páření. Pokud klisna kojí, změní se složení mléka, což způsobuje průjem hřiběte.

Na vaječniku je palpovatelný dominantní folikul, před ovulací zcela vyplňuje ovulační jamku. Graafův folikul má obvykle velikost 4-7 cm a má velmi tenkou stěnu. K ovulaci dochází zpravidla 24 hodin před odezněním zevních příznaků říje.

**Metestrus** je charakterizován zánikem vnitřních i vnějších příznaků říje. Na ovarii se vyvíjí jedno, nebo více žlutých tělísek, v nichž začíná produkce progesteronu

**Diestrus** – klisna se zklidní, mizí příznaky estrogenizace, krček děložní se uzavírá. Po ovulaci se asi po dvanácti hodinách objevuje houbovitý útvar *corpus hemorrhagicum* a z něj se následně vyvíjí žluté tělísko. To dosahuje maximální velikosti kolem 8. dne. Po 15-16 dnech od vzniku CL vlivem  $PGF_{2\alpha}$  z endometria dochází k regresi žlutého tělíska a nastupuje nový pohlavní cyklus (**DOLEŽEL, 2003**).

### 2.2.3. Faktory ovlivňující průběh pohlavního cyklu

Pohlavní aktivita a její výsledný efekt – plodnost – je určována a dalekosáhle ovlivňována dědičným základem a působením faktorů zevního prostředí. Jejich vzájemný poměr při formování se plodnosti u samic jednotlivých druhů zvířat je velmi obtížné. Nicméně se má všeobecně za to, že při odmyšlení biologicky dané schopnosti organismů se rozmnožovat, má dědičné založení menší vliv na jednotlivé ukazatele plodnosti a reprodukční výkonnost určuje maximálně do 20%, zatímco vlivy zevního prostředí a celkově existenční podmínky mají úlohu rozhodující a určují je minimálně z 80%. Jako nejdůležitější vnitřní a zevní faktory ovlivňující pohlavní aktivitu u domácích zvířat lze považovat následující:

Druh představuje základní geneticky determinovaný předpoklad určité formy pohlavní aktivity. Skutečný výraz pohlavní aktivity je však výsledkem interakce s řadou dalších faktorů vnějšího prostředí. V rámci druhu je pohlavní aktivita výrazně ovlivňována plemennou příslušností. Například u většiny druhů zvířat puberty dosahují dříve plemena menšího vzrůstu, u koní plemena teplokrevných klisen ve srovnání s chladnokrevnými, u skotu mléčná plemena ve srovnání s masnými (**DOLEŽEL, 2003**).

**POLANSKÝ a kol., (1983)** zdůrazňuje, že kůň je zvíře uniparní, to znamená, že klisna rodí jedno hříbě po jedenácti měsících a několika dnech (330-353). Všeobecnou praxí je, že se v chovu používají klisny i hřebci dostatečně vyspělí, což je u klisen 3,5 – 4 roky a hřebců 4 roky, i když k pohlavní dospělosti dochází u koní poměrně brzy (u klisniček od 12 měsíců a u hřebečků od 9 měsíců).

Dalším faktorem, který významně ovlivňuje pohlavní aktivitu je výživa. Zvířata se správnou výživou dosahují puberty dříve, než zvířata nedostatečně živěná

(REECE, 1998). Vedle kvantitativních chyb v krmení se na činnosti pohlavního ústrojí negativně uplatňují i kvantitativní nedostatky ve výživě (DOLEŽEL, 2003).

Relativní délka střídajícího se období světla a tmy. Ovariální cykly začínají v pozdní zimě, nebo brzy na jaře s prodlužujícím se dnem (REECE, 1998). Prodlužování dne hraje významnou roli při zahájení cyklu u klisen. Použitím umělého osvětlení lze navodit opětovné zahájení cyklu dříve, než by se tak stalo pod vlivem přírodních podmínek (ALLEN, 1977; COLQUHOUN ET AL., 1987; HUGHES ET AL., 1972; KOOISTRA ET GINTHER, 1975; PALMER ET AL., 1982; SHARP, 1980). Je prokázáno, že za tmy se produkuje hormon melatonin, ten pak zabírá místo jiným hormonům - například estrogeneru a progesteronu (ovlivňují pohlavní cyklus klisny). Principem „fotoperiodismu“ je skutečnost, že dlouhý den stimuluje a naopak kratší den daný prodlužující se nocí, potlačuje funkci hypotalamického sexuálního centra a tvorbu GnRH (BUBENÍČEK, 2005).

Ani způsob chovu není zcela zanedbatelným faktorem. Zatímco při stájovém chovu koní je používán individuální připouštěcí plán a hřebci jsou připouštěni „z ruky“, v zemích, kde se chovají stáda koní volně v pampách, prériích nebo tabunech, je uplatňováno připouštění skupinové. Určitý počet klisen, př. 20 až 30, má přidělen jednoho hřebce, který se s klisnami pase, sám vyhledává říjící klisny a páří se s nimi. Při tomto skupinovém odchovu je dosahováno vysoké březosti (až 100%), zatímco v hřebčinském chovu obvykle činí 60-80 % (DUŠEK a kol., 1999).

#### 2.2.4. Vliv hormonální činnosti na pohlavní cyklus

Pro regulaci endokrinních funkcí pohlavních žláz je primárně důležitá osa hypotalamus-hypofýza-gonády (JELÍNEK a kol., 2003). LOUDA a kol. (2001) říká, že znalosti vzájemného vztahu hypotalamu a epifýzy jsou rozhodující pro pochopení pohlavního chování klisen a záměrného ovlivňování říjového cyklu.

BUBENÍČEK (2005) říká, že jestliže jsou signály GnRH v optimálních hladinách, dochází k indukci adenohipofyzární FSH sekrece a růstu a zrání folikulů. K tomu, aby folikul dozrál a došlo k ovulaci je nutná ještě dostatečná sekrece LH podnětená intenzitou GnRH signálu. Nižší intenzita uvolňovaného množství GnRH

je důvodem neschopnosti organismu reagovat a vyvolat patričnou gonadotropní sekreci s výsledkem vynechání ovulace a následnou atrézií folikulů.

Vlivy vnějšího prostředí-světlo, teplota, kvalita výživy- jsou analyzovány centrální nervovou soustavou. Na základě této analýzy produkuje neurosekrety označené RH, které přímo ovlivňují činnost hypofýzy k produkci gonadotropních hormonů zejména FSH a LH. Prostřednictvím krevního řečiště pak gonadotropní hormony ovlivňují vaječníky.

Pod vlivem FSH dochází na vaječníku k růstu folikulů. Ve folikulech se tvoří estrogény, hormony, které navodí říjové chování klisny, překrvení dělohy a pochvy klisny, otevření děložního krčku, tvorbu hlenu. Vše směřuje k přípravě na osemnění klisny.

Při určité hladině estrogenů začíná hypofýza na příkaz hypotalamu uvolňovat gonadotropin LH, který podporuje dozrání folikulu na vaječníku a jeho ovulaci. Při ovulaci dochází k rozvolnění folikulární stěny a k vylití folikulární tekutiny spolu s vajíčkem do ampule vejcovodu. Na místě po ovulovaném folikulu se velmi rychle vytváří luteální tkáň produkující progesteron. Tato luteální tkáň je označována jako primární žluté tělísko. Pod vlivem progesteronu končí příznaky říje, krček se uzavírá a děloha se připravuje na přijetí oplozeného vajíčka (**DUŠEK, 1999**).

Řízení pohlavních funkcí je velmi účinně ovlivňováno ještě látkami nehormonální povahy. Patří sem neurotransmitery, prostaglandiny a feromony (**KUDLÁČ a kol., 1987**).

### **2.2.5. Říjové chování klisen**

V souvislosti s rozmnožováním se u klisen vyskytuje celá řada problémů, jež komplikují jejich zabřezávání a inseminaci. Jedním z klíčových problémů vzhledem k velké variabilitě v délce a projevech říjového chování klisen a faktorech, které je ovlivňují, je stanovení vhodné doby zapouštění.

Rozeznáváme říji bouřlivou a tichou. Při bouřlivé říji se její příznaky projevují velmi intenzivně. Opakem bouřlivé říje je říje tichá, jejíž příznaky jsou sotva znatelné (**ŠTRUPL a kol., 1983**).

Říjové chování se mezi klisnami výrazně liší v trvání a intenzitě jeho projevů. U části klisen jsou říjové projevy méně výrazné (6%) nebo úplně chybí (1%). Důležitou roli v říjových projevech může hrát i sociální chování (**GINTHER, 1992**).

V době říje je sliznice pohlavních orgánů překrvená. Je proto sytě červená. Stydké pysky a celá pochva jsou zvlhlé a zduřelé. Děložní krček je přitom otevřený. Klisna „blýská“, staví se k močení. Přitom otevírá a zase uzavírá stydké pysky, jejichž sliznice je červená. V chování klisen pozorujeme nápadné změny. Již při dotyku se tlačí na ošetřovatele, přitom „blýská“ a z pochvy se táhne hlen. Někdy klisna méně žere, nebo nežere vůbec. Příznaky říje jsou výraznější u klisen teplokrevných než u chladnokrevných.

Říjové chování klisen dělí do tří stupňů: V prvním stupni klisna hřebce odmítá a kope po něm, ve druhém stupni kopání spíš jen naznačuje a zároveň se blýská, ve třetím stupni klisna stojí v klidu, ocas zdvihne a dá stranou a vyloženě čeká na připuštění. Připouštění v této fázi se jeví jako nejsmysluplnější, jelikož je pravděpodobné, že říje dostupuje vrcholu, kterým je uvolnění vajíčka z folikulu. K tomu dochází přibližně 1-2 dny před ukončením říje. Nejvhodnější doba pro připuštění je několik hodin před vrcholem říje, před ovulací (**NĚMEČEK, 2009**).

#### **2.2.6. Detekce říje**

Vliv ročního období – fotoperiody na reprodukční cyklus klisen byl potvrzen mnoha autory. Úprava délky světelného dne umožňuje ovlivňování nástupu připouštěcího období u klisen i hřebců (**LOUDA a kol.**).

Pro úspěšnou reprodukci klisen je velice důležitá detekce říje a vymezení doby ovulace (**BACK a kol., 1974**). **MÉSZÁROŠ (1958)** uvádí, že v předříjovém období klisna vyhledává častěji, než obvykle další klisny, na které se tlačí a výjimečně na ně i skáče. Při přiblížení se k dalším klisnám vykazuje komfortní chování formou olizování jazykem trupu a slabin a poštipováním pokožky pysky. Pokračující říjí uvedené příznaky zesilují. Říjové chování se mezi klisnami výrazně liší v trvání a intenzitě projevů (**GINTHER, 1992**). **LOUDA a kol. (2001)** říká, že nejzřetelněji se říje u klisny projevuje, bez ohledu na způsob chovu, na jaře. Příznaky říje se u klisny projevují daleko intenzivněji v přítomnosti hřebce. Klisna se zkouší u tzv. zkoušecí stěny, která je 150 cm vysoká a 250 cm dlouhá. U této stěny se zkoušejí klisny na říji hřebcem (**ŠTRUPL a kol., 1983**). V pastevním odchovu bude



diestrická klisna hřebce ignorovat, nebo bude agresivní, pokud ve svých pokusech vytrvá. Zatímco klisna v říji ho bude sladovat a vyhledávat jeho společnost. Volba nejvhodnější doby k zapouštění se velmi často stanovuje v důsledku vyšetření klisen. Jedná se zejména o palpační vyšetření (přes rektum) a sonografii.

V chovu koní platí pravidlo, že klisny se inseminují tak dlouho, dokud nevykazují zevní příznaky říje. K vlastní inseminaci přistupujeme, pokud technik, či veterinární lékař zjistí následující příznaky u klisny:

1. u klisny jsou zřetelně patrné zevní příznaky říje – otok vulvy a tzv. blýskání (mírné otvírání a zavírání stydkých pysků),
2. je-li při vyšetření zjištěno, že děložní krček je otevřený,
3. je-li sonograficky zjištěn, nebo je-li přes rektum nahmatán dostatečně veliký a odpovídající folikul.

### **2.3. Metody zapouštění klisen**

V chovu koní se pracuje buď s čerstvým, krátkodobě, nebo dlouhodobě konzervovaným spermatem. Oplozovací schopnost je u krátkodobého semene 24 – 48 hodin a jeho objem pro inseminaci je 10 cm<sup>3</sup>. U dlouhodobě konzervovaného semene je přistupováno k mražení v pejetách, které jsou o objemu 0,5 cm<sup>3</sup>, 1 cm<sup>3</sup>. Semeno se také může mrazit v objemech 3 – 6 cm<sup>3</sup>. Je důležité, aby technika připouštění, zejména při umělé inseminaci zajišťovala správnou deponaci spermatu do pohlavních orgánů klisny (MÜLLER, 1999).

#### **2.3.1. Přirozená plemenitba**

Připouštění může být buď skupinové, nebo z ruky. Nejrozšířenější je připouštění z ruky. Pokud se klisna doveze na připouštěcí stanici ke hřebci, zapouští se ve většině případů jedenkrát za 48 hodin, jelikož oplozovací schopnost spermií při přirozené plemenitbě trvá asi 48 hodin. Hygiena připouštění může velmi významně ovlivnit výsledek celého snažení. Důležité je před samotným aktem důkladné omytí vulvy klisny mýdlem a vhodným dezinfekčním prostředkem. Používáme nejlépe jednorázové hygienické pomůcky. Kořen ocasu klisny se ováže obinadlem, aby zíně

nepřekážely při vlastním připouštění. Klisna se přivede k tzv. zkušební stěně, ta má význam v případě, že je klisna bázlivější a mohla by zranit ošetřovatele nebo hřebce. Klisna se tedy nejdříve „zkouší“. Stojí bokem za stěnou a z druhé strany se kolmo ke stěně přivádí hřebec. Říjící klisna se nechá od hřebce očichávat a dráždit. Stojí-li klidně, přivede se kolmo ke stěně a zapustí se. Je důležité, aby připouštění prováděl zkušený pracovník, který celý akt sleduje a zvláště si všímá, jestli hřebec dostatečně odsemenil. Po připouštění je nutno provést hřebci dezinfekci pyje a klisnu chvíli provádět, aby nevytlačila semeno. Po připouštění ošetřujeme klisnu běžným způsobem, měla by mít možnost pravidelného pohybu ve výběhu a vyváženou krmnou dávku (**MALÍKOVÁ, 2008**).

### **2.3.2. Inseminace klisen**

Umělé oplodňování domácích zvířat pravděpodobně začalo u koně. A to v roce 1322, kdy arabský náčelník údajně ukradl sperma vynikajícího hřebce, který patřil jeho soupeři, a oplodnil si klisnu (**BOWEN, 1969**).

U nás se jako první zabýval inseminací koní od roku 1925 prof. Dr. Sigmund ve Státním hřebčíně v Kladrubech nad Labem. Po něm se zabýval inseminací prof. Dr. Příbyl. Prakticky se u nás začala inseminace 1946-1948. Inseminací se zabraňovalo šíření hřebčí nákazy, která se v poválečných letech na našem území objevila (**ŠTRUPL a kol., 1983**). U tohoto způsobu zapouštění klisen je nejdůležitější správné načasování. Před inseminací je nutné provést důkladné vyšetření pohlavního systému klisny: Klisna by měla být bez výtoku, děložní krček nesmí být poškozen a nesmí jevit známky infekce. Klisna by také měla být v dobré kondici.

Na vaječníku by měl být přítomen velký preovulační folikul, který je měkký, obvykle nad 35mm) a krček děložní musí být otevřený. Involuce dělohy musí být dokončena a v děložním lumen se nesmí nacházet větší množství volné tekutiny (**PYCOCK, 2003**). Termín inseminace je určen především předpokládanou dobou ovulace (**MÜLLER, 2009**).

## **Výhody inseminace**

- Umělá inseminace může představovat účinný způsob tlumení pohlavně přenosných nemocí
- Jedním ejakulátem může být inseminováno více klisen, což znamená, že hřebec je za rok schopen oplodnit více klisen.
- Je možný snadný transport spermatu, dokonce i v mezinárodním měřítku
- Klisna (a malé hříbě) zůstává doma, a tak se snižuje riziko přenosu infekcí a nebezpečí spojená s dopravou zvířat
- Je eliminováno nebezpečí poranění klisny hřebcem a naopak
- Protože sperma hřebce využívaného k inseminaci je vyšetřováno mnohem častěji, rychleji se také zjistí poruchy jeho plodnosti. Existují předpisy, jak je třeba chovat hřebce využívaného k inseminaci, a stálá kontrola chorob garantuje, že sperma je zdravé (**PYCOCK, 2003**).

## **Inseminace čerstvým spermatem**

**MÜLLER a kol. (2006)** uvádí, že při inseminaci čerstvým spermatem přežívají hřebčí spermie v pohlavním aparátu klisny 48, při inseminaci mraženým spermatem jen 12-24 hodin. Pokud při inseminaci čerstvým spermatem nedojde k ovulaci do 48 hodin po inseminaci, je nutno inseminaci opakovat.

Inseminace klisen čerstvým spermatem vychází z možnosti použití naředěného a na teplotu 4 - 8°C zchlazeného spermatu k umělému oplodnění (inseminaci). Toto sperma si uchovává zpravidla do 12- ti hodin po odběru neomezenou oplozovací schopnost a do 36- ti hodin po odběru je ještě stále použitelné k inseminaci. Po provedené inseminaci přežívají oplozeníšopné spermie v pohlavních orgánech klisny 48 hodin (**MÜLLER, 2008**).

## **Inseminace krátkodobě konzervovaným spermatem**

V praktických podmínkách chovu koní se v současné době nejvíce uplatňuje inseminace krátkodobě konzervovaným spermatem. Tato reprodukční metoda je ve srovnání s přirozenou plemenitbou mnohem náročnější na znalosti a zkušenosti, i když v podmínkách široké praxe přináší dobré výsledky březosti klisen a předčí přirozenou plemenitbu, je třeba hledat zdroje dalšího zlepšení (**NOVOHRADSKÁ a**

**JISKROVÁ, 2008**). Čerstvé sperma a krátkodobě konzervované se liší tak, že čerstvé sperma je neředěné sperma získané pomocí umělé vaginy a použité ihned k inseminaci klisny. Krátkodobě konzervované sperma je sperma ředěné a zchlazené na teplotu asi 4°C. K inseminaci je použitelné 12 až 48 hodin po jeho odběru podle použitého ředidla (**MÜLLER, 1999**).

### **Inseminace zmrazeným spermatem**

Dlouhodobě konzervované sperma je sperma uchované převážně zmražením a uchované v tekutém dusíku. Takto konzervované sperma si zachovává svou oplozovací schopnost po desítky let (**MÜLLER, 1999**). Po odběru je sperma hodnoceno, ředěno, zchlazeno a zmrazeno v kapalném dusíku, ve kterém je dále dlouhodobě skladováno při extrémně nízké teplotě -196 st. celsia. Sperma je mrazeno v různých technologiích. Jedna inseminační dávka obsahuje zpravidla 200 milionů pohyblivých spermií. Každá inseminační dávka je opatřena zřetelným označením které nelze změnit nebo zlikvidovat.

Po rozmrazení a provedené inseminaci přežívají oplozeníschopné spermie v pohlavních orgánech klisny 12 až 24 hodin. Nedošlo-li k ovulaci, je třeba opakovat inseminaci po maximálně 24 hodinách (**MÜLLER a kol., 2006**).

### **2.3.3. Embryotransfer**

Princip transferu embryí spočívá v možnosti vyjmutí embrya z dělohy matky a jeho přenesení do dělohy jiné klisny. Nutnou podmínkou je, že tento přenos musí být uskutečněn v raném vývojovém stádiu (do osmi dní po ovulaci) a pohlavní cyklus dárkyně a příjemkyně embrya musí být přesně sladěn (**MÜLLER, 1999**). Metoda transferu koňských embryí zatím stále zůstává spíše v oblasti výzkumu a vývoje technologií. Navzdory poměrně nestabilní úspěšnosti a vysoké finanční nákladnosti je tato moderní reprodukční metoda již v praktickém chovu využívána.

Organizačně se jedná o pečlivě plánovanou akci vyžadující důkladnou přípravu jak klisny "dárce" tak klisen "příjemců". Embryotransfer umožňuje reprodukční využití již tříletých, případně dvouletých klisen. Zkracuje tedy generační interval o dobu danou rozdílem mezi dobou pohlavní a tělesné dospělosti.

## 2.4. Sonografické vyšetření klisny

Ve veterinární medicíně se ve stále hojnější míře uplatňují moderní diagnostické postupy, souborně označované jako zobrazovací diagnostické metody. Jednou z nich je sonografie, respektive ultrasonografie. Velkou předností sonografické diagnostiky je, že se jedná o metodu neinvazní, která pacienta nepoškozuje, je nebolestivá, a zpravidla nevyžaduje zvláštní fixační postupy. V současnosti jsou již k dispozici vhodné ultrasonografické diagnostické přístroje, které umožňují různé způsoby zobrazení nejrozmanitějších patologických stavů (**HOFÍREK, 2006**). Sonografie využívá ultrazvukové vlnění. Sonografické vyšetření klisny je nezbytné k určení vhodné doby pro inseminaci či zapuštění, k detekci patologických stavů v děloze, k diagnostice březosti, ke zjištění přítomnosti dvojčat a k jejich redukci a k diagnostice embryonální a fetální mortality (**MÜLLER, 2009**). Je to moderní metoda umožňující spolehlivé určení optimální doby k inseminaci klisny, rannou diagnostiku březosti (od 12tého dne od posledního připuštění), detekci, případně následnou redukci dvojčat, včasné odhalení patogenních stavů a reprodukčních anomálií pohlavních orgánů klisny - možnost předcházení reprodukčním problémům, případně možnost včasného terapeutického zásahu (**GRYGAR A KUDLÁČ, 1997**). Vzhledem k těmto skutečnostem je v dnešní době provádění inseminace klisen bez využití sonografického přístroje prakticky nemyslitelné.

### 2.4.1. Sledování průběhu říje pomocí sonografie

Sonografické zobrazení reprodukčních orgánů je u klisny velmi zřetelné a přehledné a diagnostika jednotlivých jevů je dobře propracována (**ZAVADILOVÁ, 2006**). **LOUDA a kol. (2001)** uvádí, že se v poslední době k předpovědi nástupu ovulace využívá sonografické sledování sliznice endometria. Je-li sliznice zduřelá, je možno provést inseminaci klisny. **FORTUNE (1994)** uvádí, že pravděpodobně existují dva modely pro růst a rozvoj folikulů u hospodářských zvířat. První vzor zastupují prasnice, u kterých je rozvoj rostoucích folikulů tlumen mimo období

folikulární fáze estrálního cyklu. Naproti tomu u klisen a přežvýkavců růst folikulů není omezen v průběhu estrálního cyklu.

Stupnice vyjadřující změny na vaječniku, způsob označování.

$f_0$  normální vaječník v klidu: forma bobovitá, průměrné rozměry 5-7cm, šířka 3cm, tloušťka 3cm. Konzistence tuho-elastická, není folikul.

$f_1$  začátek zrání folikulu: vaječník má tvar nepravidelně bobovitý, v jednom místě je hmatný folikul.

$f_2$  zrající folikul: vaječník věnuje rozměry, tvar se mění na hruškovitý, ve folikulu lze zjistit slabou fluktuaci.

$f_3$  folikul téměř dozrál: vaječník je ještě větší, tvar výrazně hruškovitý, folikul je velký a zřetelně fluktuuje.

$f_4$  zralý folikul: folikul je výrazný, jeho stěny jsou velmi ztenčené (připomínají svojí konzistencí vajíčko bez skořápky), silná fluktuace.

OV ovulace: vaječník se silně zmenšuje, místo, kde byl folikul je měkké, prohloubenina je hmatná, není fluktuace

CL - žluté tělíčko: na místě prasklého Graffova váčku vzniká žluté tělíčko. Jeho tvar je nepravidelný, velikost od 2 do 4 cm, konzistence měkká.

#### **2.4.2. Sonografická diagnostika březosti**

Diagnostikovat graviditu klisny můžeme několika způsoby. Je možné využít hormonálních metod. V praxi se uplatnila zejména metoda chemického průkazu estrogenů v moči klisen od 120. dne březosti nebo metoda biologického průkazu séra březích klisen v krvi klisny od 40. do 120. dne březosti. Jde však o metody nepřímé, které i při poměrně značné spolehlivosti neprokazují přímo přítomnost živého plodu. Přímo metodou průkazu gravidity je do jisté míry palpační vyšetření gravidní dělohy, která může poskytovat poměrně přesné údaje asi od prvního měsíce březosti. Absolutně nejspolehlivější přímo metodou, a v poslední době velmi využívanou, je sonografické vyšetření. Pro potřebu vyšetření gravidity je možné použít sonograf od

11. dne po oplodnění. Sonografem je možné posoudit vývoj embrya a jeho životní projevy. Vyšetření se provádí rektálním způsobem, sondou přiloženou na dělohu klisny. Sonografické vyšetření umožňuje také zjistit gravidní dělohu se dvěma nebo více plody ve velmi raném stádiu, kdy je možné přebytečný plod mechanicky zlikvidovat a zajistit tak další fyziologický vývoj pouze pro jeden plod. Likvidaci dvojčat je možné úspěšně provést do 20. dne březosti, pak úspěšnost zákroku klesá. Všechny metody vyšetření gravidity provádí veterinární lékař, sonografické vyšetření může provést i inseminační technik (**MALÍKOVÁ, 2008**).

## 2.5. Březost klisny

**BÍLEK (1955)** říká, že březost klisny trvá 334 dní, počítáme tedy, že hříbě se narodí přesně po jedenácti měsících od posledního skoku. Často je však klisna březí buď další, nebo kratší dobu. Délka březosti je závislá na mnohých okolních vlivech (roční doba, krmení, ustájení apod.). Nejsou vzácné případy, kdy kobyla rodí předčasně už o tři týdny, nebo zase že o tři týdny přenáší. Během jedenácti měsíců se plod vyvine do normální velikosti a váhy. Ta je samozřejmě různá podle rasy koně. U teplokrevného koně, u nás chovaných ras, dosahuje hříbě po porodu v průměru 105 cm KV, 85cm objem hrudi a 52 kg váhy.

### ***Březost tedy můžeme zjistit:***

- *rektálním vyšetřením* - to je pohmatem přes konečník, kdy na vaječniku nahmatáme žluté tělísko - lze zjistit už po 3 týdnech
- *laboratorním vyšetřením* - zjišťuje se hormon progesteron v krvi nebo moči - ten můžeme objevit po 3 měsících
- *ultrazvukem* - první známky můžeme pozorovat 15. - 16. den
- *podle pohybu hříběte* - až v pokročilém stádiu březosti

## 2.6. Úroveň březosti po inseminaci

Zabezpečení reprodukce koní je složitým plemenářským, provozním, ale i ekonomickým problémem. Na kvalitě výsledků reprodukce je do značné míry závislá produkce nové generace. V této oblasti jsou v chovu koní obrovské rezervy. Statisticky jsou vyhodnotitelné pouze údaje o počtu zapuštěných klisen a počtu

narozených hříbat. Z podkladů o zapouštění často nelze objektivně vyhodnotit ukazatele plodnosti uplatňované například u skotu (březost po první inseminaci a po všech inseminacích, inseminační interval a index, a interinseminační interval apod.) (**MARŠÁLEK, 2008**).

Podle **BÍLKA (1955)** je nutné si uvědomit, že právě u klisen není příčinou jalovosti často chorobný podklad v pohlavní ústrojí, nýbrž připouštění klisen v nesprávnou dobu říje. Takzvaná fyziologická neplodnost bývá často zapříčiněna chovatelem a činí 20 až 30% celkové neplodnosti u klisen.

## **2.7. Plodnost klisen**

Plodnost patří mezi nejdůležitější vlastnosti hospodářských zvířat nejen z důvodu zachování druhu, ale především pro svůj hospodářsko-ekonomický význam, neboť reprodukce a plodnost podmiňují produkci hospodářských zvířat a tím i rentabilitu chovu. Plodnost je velice složitá vlastnost, neboť závisí od reprodukční schopnosti samců i samic, od dědičného založení nově vzniklého jedince a velice důležitou roli mají vnější podmínky chovatelského prostředí, neboť dědivost plodnosti vyjádřená heritabilitou patří do skupiny vlastností nízcě dědivých. Snížená plodnost – subfertilita a neplodnost, kterou označujeme jako sterilitu či infertilitu, způsobují vysoké národohospodářské ztráty (**HAJIČ, KOŠVANEC, 1998**).

Plodnost koní je velmi důležitá hospodářská vlastnost, kterou je třeba při výběru plemenných zvířat sledovat. Soudíme na ni podle výsledků připouštění hřebců a klisen během jejich použití v plemenitbě. Na dobrou plodnost lze také usuzovat podle počtu životaschopných hříbat, neboť potraty a rození nedochůdných hříbat svědčí o snížené plodnosti.

Při posuzování plodnosti je třeba znát podmínky prostředí, v jakých žili jedinci, jejichž plodnost posuzujeme, a také jejich použití k práci. Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí mohou snížit plodnost, která se však ihned změní po zlepšení životních podmínek.

Jindy však snížení plodnosti může mít hlubší příčiny, zvláště v používání dlouho trvající příbuzenské plemenitby. V každém chovu se pak vyskytují jedinci s vysokou plodností, kterých se má co nejlépe využít, aby tuto svou cennou vlastnost v potomstvu rozšířili (**BÍLEK, 1955**).



Plodností samic se rozumí pravidelnost v oplození po předchozím spáření a pravidelnost v porodech dobře vyvinutých a životaschopných mláďat v normálním počtu až do vysokého věku (**MARŠÁLEK, 2008**).

Podle **VĚŽNÍKA (2008)** lze všeobecně konstatovat, že plodnost klisen, vyjádřená procentem zabřeznutí, se pohybuje od 50% v provozních chovech a 70% v hřebčinech. Práce popisuje různé příčiny poruch plodnosti klisen a to jak infekční, tak neinfekční etiologie (genetické vlivy, vliv prostředí: mikroklima stáje, klimatické podmínky, způsob chovu, vliv výživy).

### **Dědičnost plodnosti**

Podle **DOLEŽELA (2003)** je plodnost polygenně založená vlastnost a nelze ji oddělovat od dědičnosti konstituce. U zvířat konstitučně pevných, tj. se stabilním neuroendokrinním systémem lze očekávat vysokou schopnost vypořádat se i s nepříznivými podmínkami a udržet sexuální aktivity na normální úrovni. Zároveň však také zdůrazňuje, že velký význam v otázkách dědičnosti plodnosti přísluší některým dědičným poruchám plodnosti, které jsou podmíněny vesměs monogenně a způsobují hlavně vývojové anomálie na pohlavním ústrojí.

#### **2.7.1. hodnocení plodnosti klisen**

Plodností samic se rozumí pravidelnost v oplození po předchozím spáření a pravidelnost v porodech dobře vyvinutých a životaschopných mláďat v normálním počtu až do vysokého věku. Plodnost představuje komplexní vlastnost, která je výsledkem schopností samců a samic poskytovat zdravé potomstvo v optimálním počtu za určitý čas.

Základním kriteriem hodnocení plodnosti samic je počet narozených mláďat za období.

*Potencionální plodnost* daná schopností uvolnit vajíčka je běžným systémem rozmnožování málo využitá.

*Skutečná plodnost* je daná počtem živě a mrtvě narozených mláďat a je ovlivněna počtem ovulovaných vajíček, počtem oplozených vajíček a embryonální (fetální) úmrtností. Můžeme ji hodnotit u jedince i u stáda.

Udržení vysoké úrovně a zlepšování parametrů plodnosti vyžaduje trvalou pozornost chovatele zejména u chovů s vyšší koncentrací. Je třeba vést zodpovědně evidenci v reprodukci každé plemenice (**MAJZLÍK, 1993**).

V dnešní době jsou k dispozici při posuzování kvality reprodukce klisen pro vyhodnocení pouze údaje o zapuštění klisny a narození hříběte.

- výsledky reprodukce obtížně zjistitelné, jsou závislé na řadě činitelů- výživa, pohyb, čistota prostředí, sociální kontakty ve stádě, přiměřená pracovní vytíženost a citlivý přístup ze strany chovatele
- reprodukční funkce jsou pro organismus nadstavbou
- v přirozené plemenitbě je možno zapustit jedním hřebcem 40 až 50 klisen ročně, inseminace několikanásobně vyšší intenzita využití
- výsledky pouze: procento natality z počtu zapuštěných nebo inseminovaných klisen, přičemž v běžné evidenci nejsou údaje o počtu opakovaných skoků či inseminací
- při dobré péči až 80% natalita, průměr ČR je 50%, v některých chovech jen 30%
- inseminace- hlavně čerstvým spermatem – březost 40%, zmrazeným 15%, záleží na zručnosti technika, obtížné vystihnout správný okamžik (cca ½ hod před ovulací)
- chovatel může výsledky plodnosti ovlivnit samotným chovatelským prostředím (**MARŠÁLEK, 2008**)

### **2.7.2 Poruchy plodnosti klisen**

Plodnost je výsledkem řady dějů probíhajících za endogenně řízených podmínek, které jsou výrazně ovlivňovány vnějšími faktory. Proto musí chovatel v

první řadě zajistit odpovídající chovné prostředí. Přesto se u všech druhů hospodářských zvířat setkáváme se situací, kdy při zcela normálním průběhu pohlavních funkcí samice, provedeného připuštění ve vhodnou dobu a s použitím oplození schopného semene, určité procento zvířat nezabřeze. Tato situace se objevuje u klisen asi v 10 až 20 procentech všech oplodnění. Funkční poruchy plodnosti klisen se nejčastěji projevují na začátku sezónního připouštěcího období po dlouhém zimním anestru. Patří sem například anovulační cykly, atrézie a perzistence folikulů, ovariální cysty nebo nymfomanie. Další skupinu problémů tvoří zánětlivé procesy, třeba vulvovaginitida, endometritida, záněty vejcovodů nebo vaječníků (VĚŽNÍK, 2008).

### 2.7.3. Morfologické anomálie pohlavního ústojí

Vrozené anomálie pohlavního ústrojí se vyskytují řídce. Ze získaných morfologických anomálií jsou nejvýznamnější nádory, méně často hematomy a abscesy na vaječnicích, dále děložní cysty a neuzavření štěrbin stydké (DOLEŽEL, 2002). BUBENÍČEK (2005) říká, že nejčastější formy novotvarů vaječníků jsou novotvary granulóznic buněk – teratomy. Jsou většinou unilaterální a vycházejí ze zárodečných buněk. Zvířata s těmito nádory cyklují na kolaterální vaječník a udržují graviditu. Dále sem patří serózní cystadenomy, které představují benigní epiteliální ovariální nádory. Tumor buněk granulozy je obvykle benigní a hormonálně aktivní. Doležel dále uvádí jako morfologickou anomálii děložní cysty, které vznikají v endometriu starších klisen v důsledku degenerativních změn a fibrotizace endometria, hlavně periglandulární tkáně a ucpání vývodů děložních žlázek. Anomálie, která se nazývá „neuzavření štěrbin stydké“ je podmíněna sníženým tonem vulvy při celkovém ochabnutí u starých, nebo hubených klisen nebo často vzniká po poranění stydkých pysků a hrázky při porodu.

#### **2.7.4. Funkční poruchy plodnosti**

Na celkovém objemu poruch plodnosti se podílejí 30-40%. Vznikají v důsledku nepříznivých vlivů zevního prostředí, především malnutrice, nadměrné pracovní exploatace, klimatu, nesprávného managementu a řady dalších stresových faktorů. Společným jejich znakem jsou poruchy v růstu, zrání a ovulaci folikulů, v délce trvání a funkci žlutého tělíska, které se vně projevují více či méně nepravidelnostmi a rytmičtější cyklu nebo charakteru a trvání příznaků říjového chování (**DOLEŽEL, 2002**).

Charakter a úroveň sexuální aktivity klisen je určován úrovní produkce hypotalamického GnRH indukujícího adenohipofýzu k sekreci gonadotropních hormonů FSH a LH, které řídí funkci ovarií a určují průběh pohlavního cyklu. Nízká hladina GnRH v krvi klisny způsobuje ovariální acyklii a následnou anestrii (**BUBENÍČEK, 2007**).

#### **2.7.5. Získané poruchy plodnosti**

Většina infekcí pohlavního ústrojí klisny postihuje zejména endometrium. Postižení hlubších vrstev děložní stěny může vést až ke vzniku perimetritidy, v nejzávažnějších případech i peritonitidy, která může mít samozřejmě pro klisnu významné následky, jako je septikemie a laminitida. Zánět sliznice děložní – endometritida je hlavní příčinou snížené plodnosti klisen a způsobuje výrazné ekonomické ztráty v chovech koní. Infekce má mnoho příležitostí, za kterých může pohlavní ústrojí postihnout. Nejčastějšími zdroji mohou být přirozené připouštění, porod, umělá inseminace, ale i vyšetření pohlavního ústrojí (i v případech, kdy jsou velmi pečlivě dodržována veškerá hygienická pravidla). Endometritida však může být i fyziologickou reakcí, zejména v období bezprostředně po zapuštění. **PYCOCK (2003)** považuje za častou příčinu nezabřeznutí klisny perzistující připouštěním indukovanou endometritidu. Je to v podstatě zánětlivá reakce na sperma, které organismus klisny vnímá jako cizorodou látku. U některých klisen dojde ke spontánnímu potlačení zánětu, ovšem ponechání klisny bez léčby snižuje pravděpodobnost zabřeznutí (**ZAVADILOVÁ, 2006**).

Zjišťujeme-li sonograficky tekutinu v luminu dělohy za více než 12 hodin od připuštění, jedná se již o patologii. Přetrvává-li tento stav 5. den od připuštění, což je doba, kdy z vejcovodu sestupuje do dělohy embryo, působí na něj toto prostředí cytotoxicky.

Na základě pochopení etiologie a patofyziologie může být endometritida chápána jako multifaktoriální onemocnění s nejméně čtyřmi příčinami vzniku:

- **Pohlavně přenosné onemocnění** – Při připuštění dojde k přenosu z infikované klisny na hřebce, který potom nakazí další jím připuštěné klisny. Proto je ve všech případech přirozené plemenitby potřeba klisnu před začátkem připouštěcí sezóny bakteriologicky vyšetřit.

- **Chronická infekční endometritida** – nejčastější příčinou chronických infekcí postihujících pohlavní ústrojí klisny je pneumovagina. V průběhu estru, kdy dochází k fyziologickému otevření cervikálního kanálu, nebo v případech poškození děložního krčku může docházet k nasávání vzduchu spolu s infekčním materiálem až do lumina dělohy. Stále se opakující infekce vede k vyčerpání obranných mechanismů a výsledkem je chronické postižení a neplodnost.

- **Perzistentní endometritida vyvolaná připuštěním** – postihuje přibližně 15 % klisen, výsledkem je výrazné snížení plodnosti. Z praktického hlediska je tento stav nejlépe řešitelný. Pokud známe podrobně reprodukční minulost klisny, je nejjednodušší tomuto stavu předcházet.

- **Endometróza** (chronická degenerativní endometritida) – jedná se o postižení endometria bez infekční příčiny. Bývá popisována v souvislosti se zvyšujícím se věkem klisny a na rozdíl od cyst endometria bez ohledu na počet prodělaných gravidit. Postižení bývá lokalizováno zejména na endometriální žlázy, kolem nichž dochází k ukládání kolagenu. Následkem je porušení bazální membrány buněk. V souvislosti s endometrózou bývá poškozen i mukociliární systém, který také zastává významnou úlohu v obranných mechanismech děložních.

Pohlavně přenosná onemocnění a chronická infekční endometritida jsou často diagnostikovány až v době, kdy už se mikroorganismy začaly množit v děloze. Tak jako u infekčních onemocnění jiných orgánových soustav, dají se i infekce samičího reprodukčního traktu úspěšně léčit příslušnými antibiotiky (**GRYGAROVÁ, 2003**).

V neposlední řadě může být infekce následkem nesprávného uspořádání přirozených bariér, které se v průběhu pohlavního ústrojí nacházejí. Na prvním místě

je samozřejmě nesprávné uspořádání perineální oblasti, ať už vrozené, nebo následkem traumatu (**GRYGAROVÁ, 2003**).

### **2.7.6. Intrauterinní terapie**

Při problémech s intrauterinní infekcí jsou běžně užívána antibiotika: penicillin, gentamycin sulfát, ampicilin, atd. Mezi méně obvyklé terapie, které byly testovány u klisen s intrauterinní infekcí, ale i u zdravých klisen, patří například nálev z kolostra, nebo právě testovaná aplikace autoplazmy.

#### **Nálev z plazmy**

- Další metodou v současné době používanou k léčení a prevenci nitroděložních infekcí je použití nálevu z plazmy.
- Plazma je získávána z klisny sterilní metodou.
- Krev je uchována v nádobách, 2 jednotky heparinu/ml krve.
- Vzorky jsou odstředěny rychlostí 200 x g za 10 minut a získaná plazma se buď používá čerstvá, nebo je zmrazená při -70 C pro příští použití
- Plazma je účinná i po 100 dnech skladování.
- Ošetření plazmou by měl předcházet výplach fyziologickým roztokem, až 3 litry.
- Obvykle je použito 100 ml plazmy denně po dobu 5 dnů během estru a počítá se, že klisna zabřežne (bude se zapouštět) na další říji (**PETER, 2000**).

### **2.8. Efekt intrauterinní aplikace autoplazmy**

**PYCOCK (2008)** uvádí, že tato metoda vznikla na základě výzkumů během let 1970 až 1980, které zdůrazňovaly imunologická hlediska děložních obranných mechanismů, nitroděložní plazma byla používána u citlivých klisen. Následující studie použití této metody indikovaly zlepšení plodnosti. Adams a Ginther uvádějí, že plazma měla zlepšující účinky na fagocytózu děložních neutrofilů.

Podle **DOLEŽELA (2003)** léčba děložních zánětů spočívá zpravidla v přímém ošetření dělohy. Provádějí se výplachy dělohy a aplikace bakteriostatických a baktericidních prostředků (chemoterapeutika a antibiotika). Velmi aktuální je intrauterinní aplikace krevní plazmy (zvýšení opsoninů).

Opsonizace je navázání určitých látek na povrch antigenu, které navozuje jeho fagocytózu imunitními buňkami. Látky, jež se na povrch antigenů vážou, se nazývají opsoniny. Mezi nejčastější opsoniny patří protilátky (imunoglobuliny, zvláště IgG) a dále C3b (částice komplementu). Opsonizovány mohou být například bakterie či jiné patogenní organizmy. Když jsou navázané opsoniny rozpoznány Fc receptorem na povrchu fagocytů (např. makrofág, neutrofil), dojde k jejich fagocytóze a zneškodnění (**FERENČÍK, ROVENSKÝ, SHOENFELD, 2005**).

V přeneseném smyslu slova lze opsoniny charakterizovat jako „koření“, které „ochutí“ částici (včetně bakterií) tak, že se stane pro fagocyt mnohem chutnější, a proto se jí snaží velmi rychle „pozřít“, respektive pohltnout.

### **2.8.1. Složení krevní plazmy**

Krevní plazma je žlutavá, průhledná, mírně alkalická intravaskulární kapalina. Z fyziologického hlediska představuje plazma nejpodstatnější část vnitřního prostředí organismu. Obsahuje vodu (80-90 ml ze 100 ml krve), anorganické a organické látky v relativně stálých koncentracích. Pro funkce plazmy je tato stálost nezbytná a je výsledkem dynamických rovnováh mezi intra a extracelulárním kompartmentem. Jsou zde zastoupeny anorganické látky. Ty jsou důležité pro udržování osmotického tlaku, objemu a pH plazmy, pro srážení krve atd.

Z organických látek jsou nejvýznamnější proteiny, sacharidy, lipidy, lipoproteiny aj.

je zejména udržování objemu a pH plazmy, dále pak transport látek, podílejí se na srážení krve, imunitních reakcích, mají nutriční funkci a některé mohou působit jako zhášecí kyslíkových radikálů. Z lipidů jsou to triacylglyceroly, fosfolipidy, cholesterol.

Z ostatních organických látek jsou to např. močovina, keratin, kreatin, aminokyseliny, kyselina mléčná, mastné kyseliny, ketolátky aj., které se pohybují na

různých místech metabolických drah bílkovin, sacharidů, lipidů. Součástí plazmy jsou i plyny-O<sub>2</sub> CO<sub>2</sub> N<sub>2</sub> aj. V krevní plazmě jsou přítomné rovněž hormony, vitamíny, enzymy. Mnohé z těchto fyziologicky významných látek patří mezi již uvedené chemické látky.

Plazma se získává centrifugací nesrážlivé krve, sérum se stahuje po oddělení krevního koagula (**DOUBEK a kol., 2003**).



### 3. HYPOTÉZA

Aby byly výsledky jasné a srozumitelné, byly pro větší přehlednost stanoveny hypotézy, tedy základní myšlenky, na které byly pomocí pokusu hledány odpovědi. K jednotlivým bodům hypotézy byly zaměřeny níže uvedené metodické postupy.

- **Aplikace plazmy má vliv na úspěšnost zabřezávání klisen. Tedy, že klisny, u kterých byla plazma aplikována, zabřezávají lépe.**

První analýza řešila otázku úspěšnosti zabřezávání z hlediska říje, ve které klisna zabřezla. Dalším možným hlediskem je počet dávek, kterých bylo při inseminaci potřeba k úspěšnému zabřeznutí.

- **Na zabřezávání klisen má vliv věk klisny. Tedy, že mladší klisny zabřezávají lépe**

První analýza ve sledování vlivu věku klisen na úspěšnost zabřezávání řešila, zda skupina klisen ve věku 3-7 let zabřezává lépe než další dvě skupiny starších klisen

Pomocí statistiky bylo dále testováno, zda je prokazatelný rozdíl mezi třemi věkovými skupinami v úspěšnosti zabřezávání z hlediska počtu dávek.

- **Pokud je k faktoru věku připojen faktor plazmy je rozdíl v úspěšnosti zabřezávání prokazatelný**

Byl testován statisticky významný rozdíl v úspěšnosti zabřezávání u klisen ve věku do 14 let mezi skupinami s aplikovanou plazmou a bez její aplikace. Stejná analýza byla provedena i u skupiny klisen nad 14 let.

- **Je prokazatelný rozdíl mezi úspěšností zapouštění klisen po hříběti a klisen zapouštěných poprvé**

Bylo vyhodnoceno, zda je prokazatelný rozdíl mezi úspěšností zapouštění klisen, které po hříběti a klisen zapouštěných poprvé. V další analýze byl připojen i faktor plazmy.

## 4. CÍL PRÁCE

Po roce 1989 došlo v naší republice k výraznému poklesu počtu koní. Obrat nastal v roce 1996 a stoupající tendence trvá i nadále. Od roku 1989 nastala i změna v řízení chovu koní. Větší pravomoce získaly vzniklé chovatelské svazy. V rámci změn byly privatizovány některé hřebčiny. Chovaná plemena se nadále udržují a pokračuje jejich zušlechťování. Z hlavních záměrů chovu je patrný větší důraz na chov koní pro sportovní účely a v chovu anglického plnokrevníka snaha o zkvalitnění chovné základny. Podle MARŠÁLKA (2008) se změnilo i složení chovatelů a uživatelů koní. Zatímco v dobách socialismu byli koně v převážné většině soustředěni ve velkochovech, které řídili zkušení profesionálové, dnes je chov v rozhodující míře na úrovni malochovu, kdy majitelé a uživatelé koní mají zájem o koně a jejich chov, ale ne vždy mají dostatečné odborné znalosti a zkušenosti, které jsou k úspěšnému chovu zapotřebí.

V souvislosti s rozmnožováním se u klisen vyskytuje celá řada problémů, jež komplikují jejich zapouštění a inseminaci. Jedním z klíčových problémů je určení optimální doby k zapouštění, vzhledem k velké variabilitě v délce a projevech říjového chování.

Přestože umělá inseminace klisen má na našem území dlouhodobou tradici, k jejímu rozkvětu a zavedení do plemenářské praxe v širším měřítku došlo teprve v průběhu devadesátých let. Tento rozvoj byl umožněn až nástupem využívání sonografické techniky v gynekologii hospodářských zvířat. Do té doby inseminace klisen, i přes svůj zdravotní přínos, nebyla svými výsledky schopna konkurovat přirozené plemenitbě. V sedmdesátých letech byla inseminace klisen v ČR prováděna zejména v rámci výzkumu.

Cílem práce je ověřit efekt intrauterinní aplikace autoplazmy pro zlepšení výsledku plodnosti klisen.

## 5. MATERIÁL A METODIKA

### 5.1. Sběr dat

Podkladovým materiálem byly výsledky reprodukce padesáti klisen za připouštěcí období v roce 2008 a 2009. Pokus byl prováděn ve spolupráci s veterinární ordinací MVDr Helgy Koudelkové a s chovem Oldenburských koní paní Dany Kováčové.

Do testování pozitivního působení intrauterinní aplikace vlastní plazmy byly zařazeny klisny tamního chovu, klisny holandské firmy dlouhodobě ustájené v obci Újezd a zároveň klisny dovezené soukromými majiteli za účelem připuštění inseminací čerstvým spermatem.

Soubor zahrnoval klisny teplokrevných plemen - Oldenburský kůň, holandský teplokrevník (KWPN) a český teplokrevník. K inseminaci byly používány inseminační dávky čerstvého spermatu, které jsou distribuovány inseminačními stanicemi v ČR.

Inseminované klisny byly během říje několikrát sonograficky vyšetřovány, aby došlo k co nejideálnějšímu načasování inseminace. Součástí ordinace byl fixační box, který je nezbytnou součástí při ošetřování, samotné inseminaci, i pokusné aplikaci autoplazmy. Po umístění klisny do fixačního boxu byla klisně důkladně omyta zevní rodidla pomocí roztoku betadinového mýdla rozpuštěného ve vodě. Dále byl klisně fixován ocas pomocí obinadla. Následovalo rektální vyšetření pomocí ultrazvuku a zaznamenání stavu říje pomocí změření velikosti folikulu, v některých případech bylo i zdokumentováno pomocí digitální fotografie. Pokud byla klisna shledána ve stavu říje, byla inseminována a následně jí byla aplikována plazma. Ta byla u pokusného souboru klisen použita vždy po aplikaci inseminační dávky. Klisny nezabřezlé po první říji byly inseminovány v dalších říjích, podle přání majitele až do konce připouštěcí sezóny.

### Odběr krve a příprava preparátu

Od klisny bylo odebráno cca 300 ml krve z jugulární žíly do předem připravené kádinky s heparinem, o celkovém objemu 400-500 ml. Plazmu lze oddělit pomocí odstředivky, nebo jako v tomto případě pomocí sedimentace v chladničce. Po uplynutí doby pro přirozenou sedimentaci (po třech hodinách) bylo možné plazmu

oddělit. Bylo potřeba postupovat velmi opatrně, aby nebyla porušena hladina sedimentovaných krvinek. Svrchní žlutá plazma byla opatrně odtahována do stříkaček, z původních 300 ml krve je možné získat cca 100 ml plazmy. Lze použít hned, nebo možno zmrazit, ale v tomto případě byla vždy plazma užita hned.

### **Postup samotné inseminace**

Klisna byla umístěna ve fixační kleci, ocas omotán obinadlem, či sterilním obvazem. Rodidla byla řádně omyta a vydesinfikována. Poté byla veterinářem zavedena do pochvy klisny pipeta. Ta je zasunuta po prstu do hloubky deset až patnáct centimetrů od vstupu do děložního krčku. Po zasunutí bylo opatrně deponováno semeno a pak katétr šetrně vytažen.

### **Postup aplikace plazmy**

Přes děložní krček byla sterilní soupravou (hadička a vhodný konus na konci) aplikováno 100 ml plazmy. U sledovaného souboru klisen byla autoplazma aplikována vždy po inseminaci. V ideálním případě – jako je uvedeno v návodu (**PETER, 2000**) – je jedna říje klisny pouze ošetřena plazmou a zapouštěna je klisna až v říji následující s opětovnou aplikací autoplazmy. Tento postup však vzhledem k majitelům klisen nebyl v provozních podmínkách možný.

Pokud je vše provedeno správně, mělo by dojít k inseminaci, následné aplikaci plazmy a poté k uzavření děložního krčku.

### **Byla zaznamenávána následující data:**

- Jméno klisny
- Věk klisny v roce zapouštění
- Plemeno klisny
- Datum posledního porodu
- Počet hříbat
- Jméno hřebce
- Počet inseminací v jednotlivých říjích
- Pořadí říjí, ve kterých bylo připouštěno
- Velikost a umístění folikulu
- Zjištěná březost
- měsíc v roce, ve kterém klisna zabřezla

- Použití plazmy

U sledovaného souboru klisen byl posouzen a zdokumentován stav pohlavních orgánů, vhodnost k zapuštění a správné načasování inseminace. Výsledky zabřezávání klisen u pokusné skupiny po provedené aplikaci autoplazmy byly porovnány s kontrolní skupinou klisen chovaných ve stejných podmínkách.

### **Statistické vyhodnocení dat**

Ke statistickému vyhodnocení dat byla používána Jednofaktorová analýza variance (Anova). Pro použití této statistické metody musejí jednotlivé výběry pocházet z normálního rozdělení, být nezávislé a mít shodné rozptyly. Shodnost rozptylů u jednotlivých výběrů se nazývá homoskedasticita a lze ji testovat. V této práci byl využíván Levenův test, který v podstatě provádí analýzu rozptylu na reziduích. Nulová hypotéza říká, že se jednotlivé výběry neliší v rozptylech a pro další využití Anova testu je nutné, aby byla potvrzena. Tedy p-hodnota Levenova testu musí být vyšší než hodnota 0,05. Dále se testuje normalita výběrů. U každého výběru lze provést test normality. Po splnění předpokladů při použití Jednofaktorové analýzy variance byla testována nulová hypotéza, že se soubory pod vlivem sledovaného faktoru neliší. Výsledky analýzy rozptylu se zapisují do tzv. tabulky analýzy rozptylu. Nejsledovanějším číslem je p – hodnota. Jestliže je tato hodnota nižší než 0,05, je nulová hypotéza zamítnuta na 95% hladině spolehlivosti a jsou statisticky prokazatelné rozdíly mezi porovnávanými soubory a tím je prokázán vliv sledovaného faktoru. V opačném případě, kdy je p – hodnota vyšší než 0,05, je nulová hypotéza potvrzena a mezi sledovanými soubory není statisticky prokazatelný rozdíl. V případě nezamítnutí nulové hypotézy testování končí. Pokud však dojde k zamítnutí nulové hypotézy ve prospěch alternativní hypotézy, obvykle jsou kladeny další otázky. Hlavní otázkou je, mezi kterými z porovnávaných souborů existují statisticky prokazatelné rozdíly a jaká je tedy struktura nehomogenity středních hodnot. K těmto účelům slouží testy mnohonásobného srovnání, v této práci byla použita Modifikovaná LSD metoda. Ta jednotlivé statistiky hodnotící dvojice seřadí sestupně dle velikosti. Vypočtený rozdíl mezi dvěma sousedními statistikami poté porovnává s tzv. nejmenší signifikantní diferencí. Výsledky jsou sepsány v tabulce, kde jsou křížky označeny homogenní skupiny, tedy ty, které se středními hodnotami neliší.

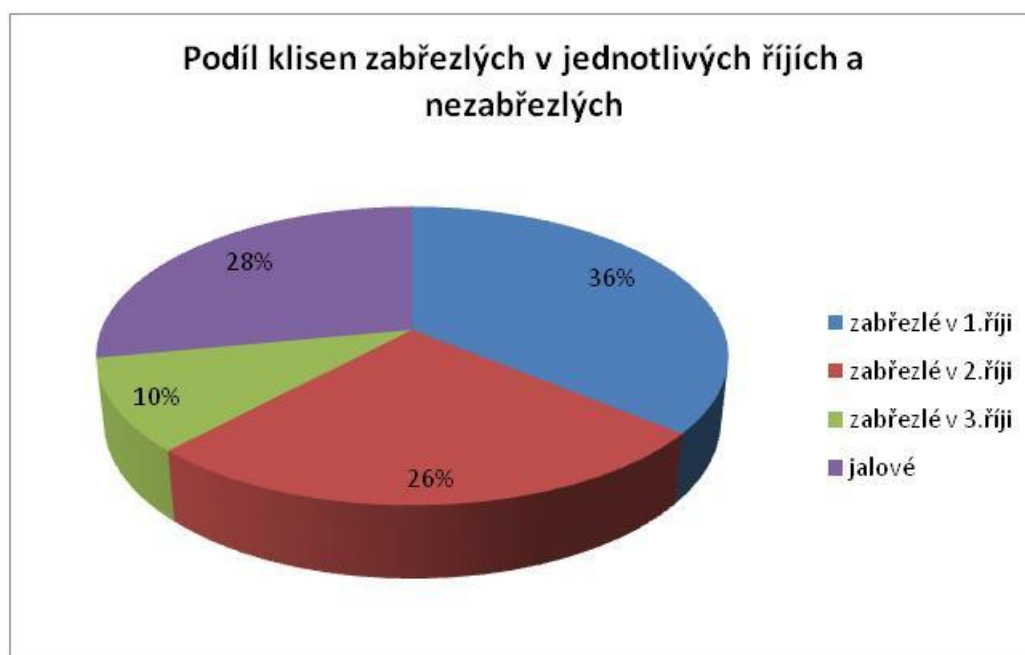
## 6. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1. Sledování vlivu intrauterinní aplikace autoplazmy na zabřezávání klisen

**GINTR a ADAMS (1994)** hodnotili účinek nitroděložního nálevu plazmou u klisen, jako léčby neplodnosti způsobené endometritidou a jeho význačné účinky oproti používání fyziologického roztoku. 43 subfertilních klisen bylo náhodně rozděleno do 3 skupin: kontrolní neošetřená (n=14), druhá skupina ošetřená fyziologickým roztokem (n=14) a poslední skupina ošetřena nálevem z plazmy (n=15). Reprodukční stav byl zhodnocený denně pomocí transrektálního ultrasonografu.

Vzorky s dělohy a biopsie byly získané 8 dní po ovulaci pro cytologické a histologické vyhodnocení a klisny byly ošetřené od 12 dne do 16. Vzorky byly získané znovu z 8 dne dalšího estrálního cyklu a klisny byly připouštěné v následujícím estru. Vzorky z biopsie byly hodnoceny stupnicí od 1 (žádný zánět) do 6 (prudký zánět). Poměr plodnosti byl nižší (p menší než 0.005) u klisen se známkou 5 a 6 než pro ty se zhodnocením 1 až 4. Z výsledků biopsie nebyl prokázán signifikantní účinek mezi interakcí ošetření na poměr plodnosti (**GINTR a ADAMS, 1994**). Troedsson a kolegové navrhují, že ošetření plazmou přináší prospěch určitým vnímavým klisnám. Na tento bod později naráží v poslední době Pascoe, který byl zbylým nadšencem použití autoplazmy v managementu imunoinkompetentních klisen, připustil, že aplikaci lze provádět klisnám bez problému automatického čištění dělohy. Následkem toho, je plazma nejlépe využitelná u klisen, které nemohou opětovně zabřeznout, ale nemají v minulosti výskyt hromadění tekutin v děloze. Protože klisny, které jsou náchylné k endometritidám nemají kvantitativní deficienci protilátek, proto je takové ošetření ve své podstatě sporné (**PYCOCK, 2003**).

Graf č.1

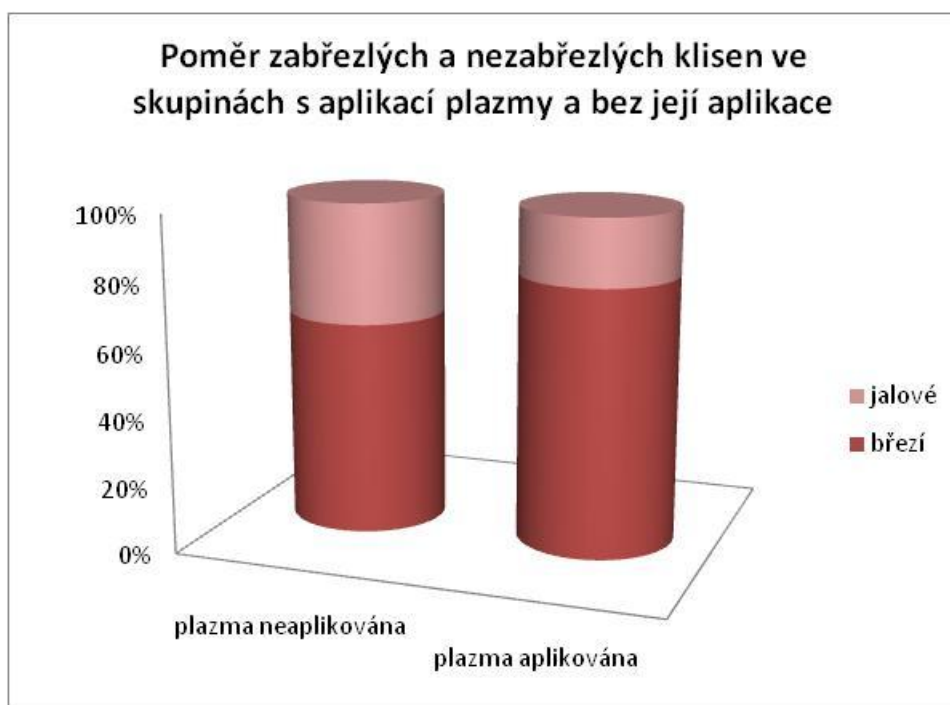


Výšečový graf č. 1 znázorňuje, jak velkou část z celku tvoří skupiny klisen zabřezlých v jednotlivých říjích a ty nezabřezlé. Lze vidět, že největší část s 36% tvoří klisny zabřezlé v 1. říji, následují klisny zabřezlé v 2. říji s 26% a jalové s 28%. Nejmenší část zaujímají klisny zabřezlé ve 3. říji a to 10%.

**DOLEŽEL (2003)** považuje za hlavní ukazatele reprodukční výkonnosti u klisen a jejich uspokojivé hodnoty lze označit:

- termín zařazení do reprodukce 3 – 4 roky
- termín březosti po 1. zapuštění 50 % a více
- celkové procento zabřezlých klisen 60 % v užitkových chovech, 80 % v hřebčinech

Graf č. 2



Na základě výsledků uvedených v grafu č. 2 byla stanovena hypotéza, že aplikace plazmy má vliv na úspěšnost zabřezávání klisen. Tedy, že klisny, u kterých byla plazma aplikována, zabřezávají lépe. Každé klisně bylo přiděleno číslo podle toho, ve které říji zabřezla, či nezabřezla (viz legenda v tabulce č. 1). Pro vyhodnocení této hypotézy pomocí statistické metody analýza rozptylu je nejprve nutné vyhodnotit splnění potřebných podmínek, tedy normální rozdělení dat a jejich homoskedasticitu. Sledovaná data splňují podmínku nezávislosti a homoskedasticity. Po transformaci dat pomocí funkce logaritmus, splňují i podmínku normálního rozdělení.

úspěšnost zabřezávání	
zabřezla v 1.říji	1
zabřezla v 2.říji	2
zabřezla v 3.říji	3
nezabřezla	4

Tab. č. 1



## Testování normality dat

Proměnná	log (úspěšnost zabřeznutí R)
Grupovací proměnná	plazma (0/1)
Rozdělení	normální
Velikost vzorku	25/25
Průměrná hodnota	2,56/2,04
Standartní odchylka	1,227/1,206

Tab. č. 2

Výsledky testu normality sledovaných dat pro skupinu klisen, u kterých nebyla aplikována plazma.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,807	0,103
Z hodnota nesouměrnosti	0,1135	0,909

Tab. č. 3

Výsledky testu normality sledovaných dat pro skupinu klisen, u kterých byla aplikována plazma.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,769	0,067
Z hodnota nesouměrnosti	1,069	0,284

Tab. č. 4

Test homoskedasticity, že je shodný rozptyl hodnot úspěšnosti zabřeznutí (R) mezi skupinou klisen s aplikovanou plazmou a bez její aplikace:

Levene's test: 0,0356083	P-Value
--------------------------	---------

Tab. č. 5

Výsledek ANOVA testu, který hodnotí rozdíl mezi skupinou klisen s aplikovanou plazmou (1) a bez její aplikace (0) (log úsp zab R=zlogaritmovaná data úspěšnosti zabřeznutí z hlediska pořadí říje).

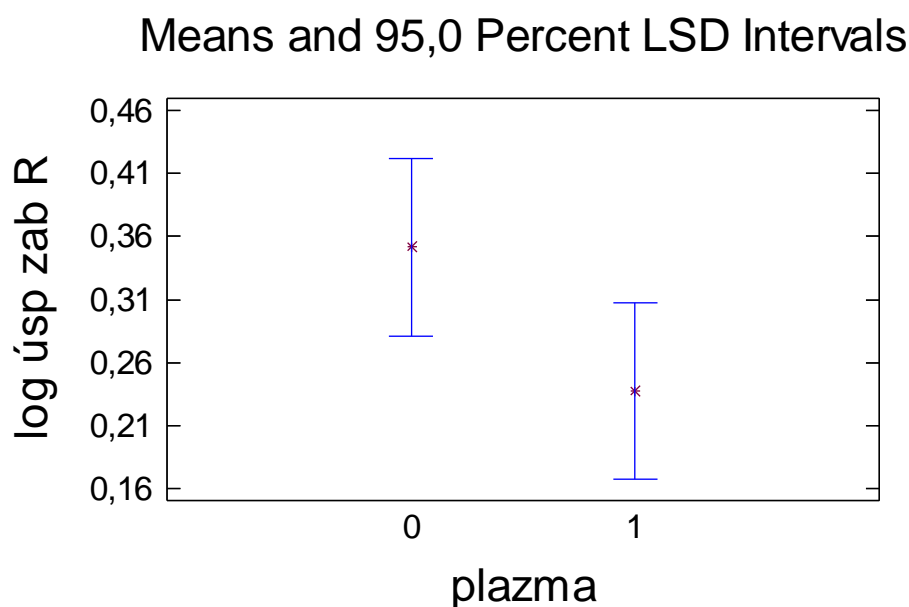
ANOVA Table for log úsp zab R by plazma			
Analysis of Variance			
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square
Between groups	0,160655	1	0,160655
Within groups	2,8921	48	0,0602521
Total (Corr.)	3,05276	49	

Tab. č. 6

Vzhledem k tomu, že p-hodnota je 0,1090, tedy vyšší než 0,05, není v tomto případě na hladině 95% spolehlivosti statisticky prokazatelný rozdíl v úspěšnosti zabřezávání pod vlivem faktoru aplikace plazmy.

Graf č. 3 znázorňující porovnání středních hodnot mezi souborem klisen s aplikovanou plazmou (1) a bez její aplikace (0) z hlediska úspěšnosti jejich zabřezávání (log úsp. zab R=zlogaritmovaná data úspěšnosti zabřeznutí z hlediska pořadí říje).

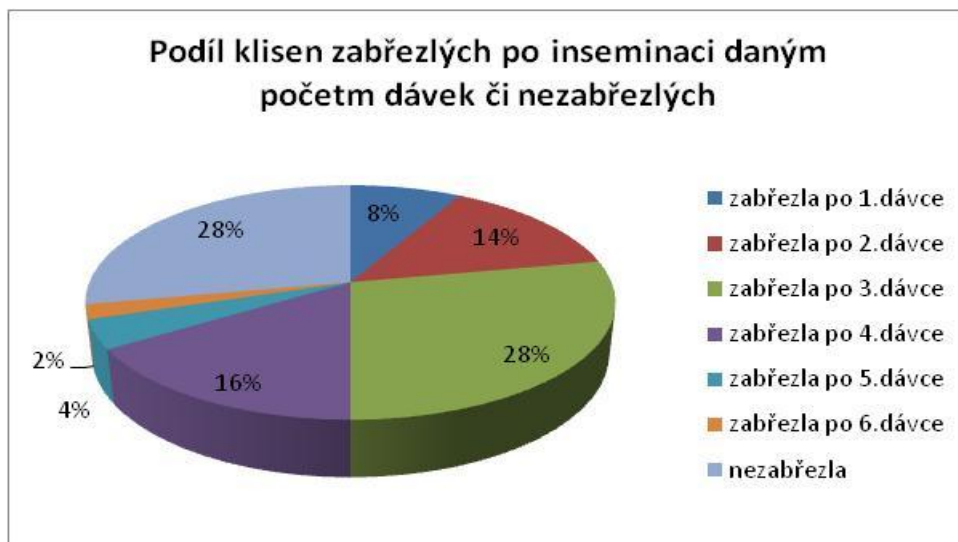
Graf č. 3



Předchozí analýza řešila otázku úspěšnosti zabřezávání z hlediska říje, ve které klisna zabřezla. Dalším možným hlediskem je počet dávek, kterých bylo při inseminaci potřeba k úspěšnému zabřeznutí. Klisnám byla opět přidělena čísla pořadí

dávek, při kterých zabřezly (1-6) a aby bylo možno zahrnout do sledování i nezabřezlé klisny, bylo jim přiděleno číslo 7 (viz legenda v tabulce č. 2).

Graf č.: 3



úspěšnost zabřezávání (D)	
zabřezla po 1.dávce	1
zabřezla po 2.dávce	2
zabřezla po 3.dávce	3
zabřezla po 4.dávce	4
zabřezla po 5.dávce	5
zabřezla po 6.dávce	6
nezabřezla	7

Tab. č. 7

Sledovaná data opět splňují podmínky nezávislosti a homoskedasticity a po transformaci zlogaritmováním podmínku normálního rozdělení. Je proto možné opět využít jednorozměrnou analýzu variance.

Testování normality dat.

Proměnná	log (úspěšnost zabřeznutí D)
Grupovací proměnná	plazma (0/1)
Rozdělení	normální
Velikost vzorku	25/25
Průměrná hodnota	0,603/0,501
Standartní odchylka	0,229/0,262

Tab. č. 8

Výsledky testu normality sledovaných dat pro skupinu klisen, u kterých nebyla aplikována plazma.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,474	0,635
Z hodnota nesouměrnosti	1,073	0,282

Tab. č. 9

Výsledky testu normality sledovaných dat pro skupinu klisen, u kterých byla aplikována plazma.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,693	0,488
Z hodnota nesouměrnosti	0,227	0,82

Tab. č. 10

Test homoskedasticity, že je shodný rozptyl hodnot úspěšnosti zabřeznutí (D) mezi skupinou klisen s aplikovanou plazmou a bez její aplikace:

Levene's test: 0,268817	P - Value
-------------------------	-----------

Tab. č. 11

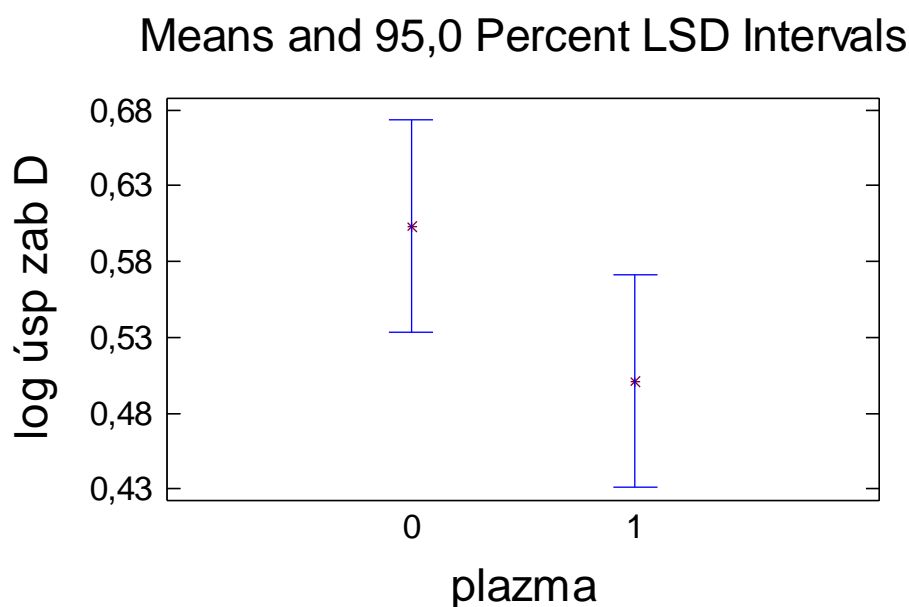
Výsledek ANOVA testu, který hodnotí rozdíl mezi skupinou klisen s aplikovanou plazmou (1) a bez její aplikace (0) (log úsp zab D=zlogaritmovaná data úspěšnosti zabřeznutí z hlediska pořadí říje).

ANOVA Table for log úsp zab D by plazma			
Analysis of Variance			
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square
Between groups	0,130161	1	0,130161
Within groups	2,92513	48	0,0609403
Total (Corr.)	3,05529	49	

Tab. č. 12

Graf č. 4 znázorňující porovnání středních hodnot mezi souborem klisen s aplikovanou plazmou (1) a bez její aplikace (0) z hlediska úspěšnosti jejich zabřezávání (log úsp zab D=zlogaritmovaná data úspěšnosti zabřeznutí z hlediska pořadí říje).

Graf č. 4

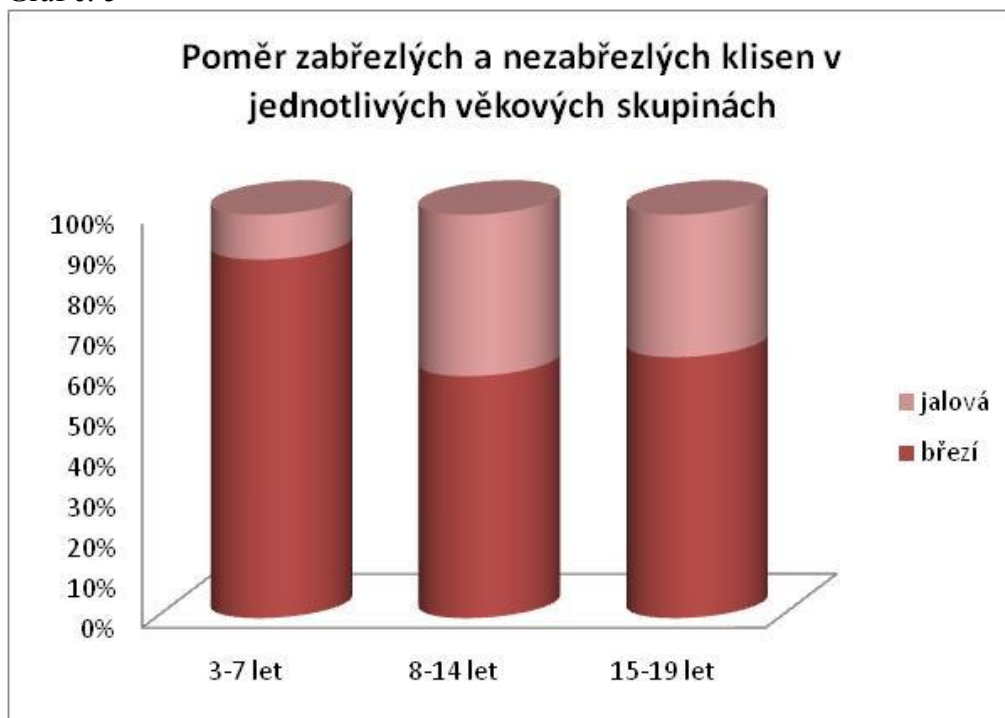


Z výsledků jednorozměrné analýzy rozptylu vychází p-hodnota 0,1504, tedy vyšší než 0,05. **Sledování úspěšnosti zabřezávání z hlediska počtu dávek dává tedy stejný výsledek jako při hodnocení říjí, ve kterých klisny zabřezly. Neprokázal se statisticky významný vliv aplikace plazmy na úspěšnost zabřezávání.**

## 6.2. Sledování vlivu věku klisen na úspěšnost zabřezávání

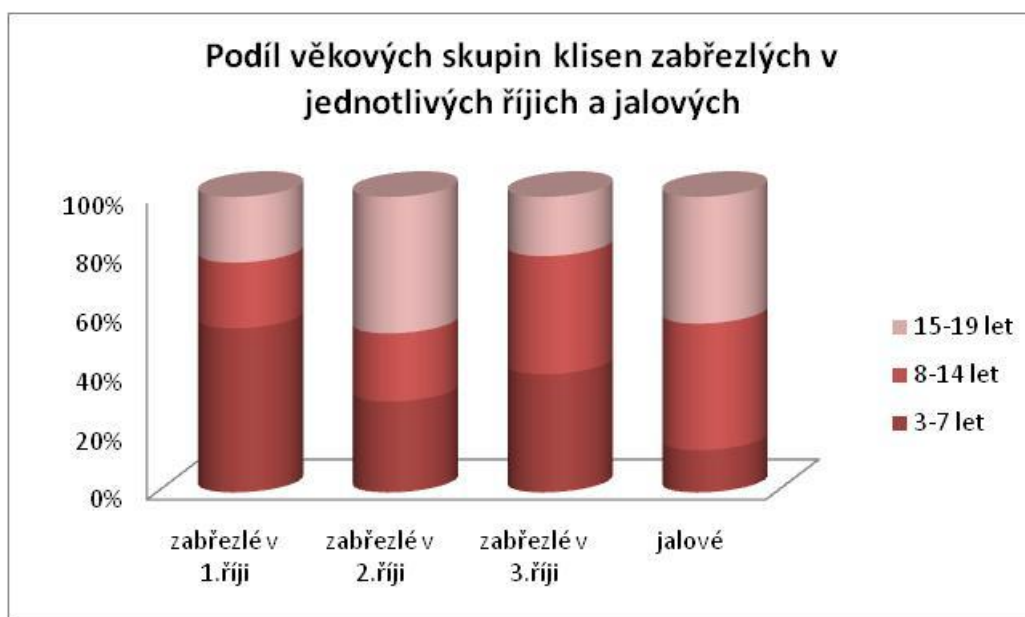
Podle **DOLEŽELA (2003)** se do reprodukce zařazují klisny ve stáří 3-4 roků (častěji teplokrevné) a zůstávají v ní do 16 – 20 let.

Graf č. 5



Klisny byly rozděleny do skupin podle věku, aby si zhruba odpovídaly počty klisen zastoupených v jednotlivých skupinách. Podle věku připouštěných klisen tak byly vytvořeny tři skupiny – ve věku 3-7 let, 8-14 let a 15 – 19 let. Graf č. 5 naznačuje, že klisny v první skupině zabřezávaly lépe ve srovnání se zbylými dvěma skupinami, které se od sebe nelišily.

Graf č. 6



Graf č. 6 řeší otázku vlivu věku podrobněji – je sledován podíl jednotlivých věkových skupin klisen, ve které říji zabřezly nebo zda vůbec nezabřezly. Lze pozorovat, že během první říje zabřezlo nejvíce klisen z věkové skupiny mezi 3 a 7 lety a v následujících říjích jejich podíl klesá. Ve skupině jalových tvoří nejmenší procento. Věková skupina mezi 8 a 14 lety tvoří kolem 20% ve skupině klisen zabřezlých během první a druhé říje, ale jejich podíl se zvyšuje ve skupině zabřezlých ve třetí říji a jalových. Skupina nejstarších klisen zaujímá největší díl u zabřezlých v druhé říji a jalových.

Statisticky byla ověřena hypotéza, zda skupina klisen ve věku 3-7 let zabřezává lépe než další dvě skupiny starších klisen. Pomocí analýzy variance byly porovnány tyto tři věkové skupiny z hlediska úspěšnosti zabřezávání. Legenda ke statistice je znázorněna v tabulce č. 13 a č. 14.

skupiny klisen podle věku	
3-7 let	1
8-14 let	2
15-19 let	3

Tab. č. 13

úspěšnost zabřezávání	
zabřezla v 1. říji	1
zabřezla v 2. říji	2
zabřezla v 3. říji	3
nezabřezla	4

Tab. č. 14

#### Testy normality

Data nesplňovala podmínku normálního rozdělení, tak bylo nutné je zlogaritmovat. Po této transformaci byla již normalita porovnávaných skupin splněna a bylo možné přistoupit ke statistickému hodnocení, neboť i podmínka homoskedasticity byla splněna.

Proměnná	log(úspěšnost zabřeznutí R)
Grupovací proměnná	věk klisen (1/2/3)
Rozdělení	normální
Velikost vzorku	18/15/17
Průměrná hodnota	0,18/0,36/0,34
Standartní odchylka	0,23/0,25/0,23

Tab. č. 15

Výsledky testu normality sledovaných dat pro skupinu klisen ve věku 3-7 let.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,385	0,7
Z hodnota nesouměrnosti	1,493	0,135

Tab. č. 16

Výsledky testu normality sledovaných dat pro skupinu klisen ve věku 8-14 let.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,705	0,48
Z hodnota nesouměrnosti	1,742	0,08

Tab. č. 17



Výsledky testu normality sledovaných dat pro skupinu klisen ve věku 15-19 let.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	1,588	0,112
Z hodnota nesouměrnosti	0,468	0,639

Tab. č. 18

Test homoskedasticity, že je shodný rozptyl hodnot úspěšnosti zabřezávání mezi třemi porovnávanými věkovými skupinami klisen.

Levene's test: 0,204354	P-Value
-------------------------	---------

Tab. č. 19

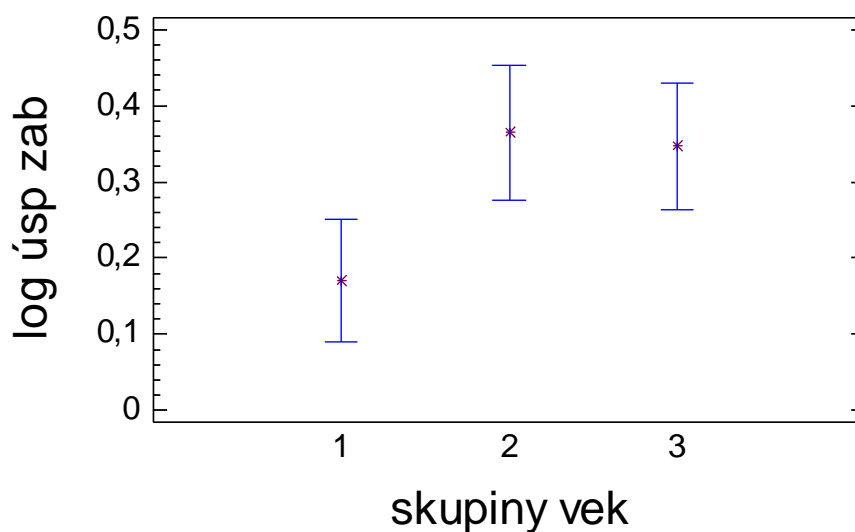
Výsledky analýzy rozptylu hodnotící rozdíl mezi třemi věkovými skupinami na základě úspěšnosti jejich zabřezávání ( $\log \text{úsp zab} = \log (\text{úspěšnost zabřeznutí})$ ).

ANOVA Table for log úsp zab by skupiny vek			
Analysis of Variance			
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square
Between groups	0,397178	2	0,198589
Within groups	2,74049	47	0,0583082
Total (Corr.)	3,13766	49	

Tab. č. 20

Graf č. 7

### Means and 95,0 Percent LSD Intervals



Z výsledků analýzy rozptylu, kdy p-hodnota je nižší, než 0,05 vyplývá, že na hladině 95% spolehlivosti je statisticky prokazatelný rozdíl v úspěšnosti připouštění mezi věkovými skupinami klisen. Na grafu č. 7 je zřetelně vidět, že se odlišuje skupina nejmladších klisen od ostatních.

DOLEŽEL (2003) se domnívá, že se klisny především teplokrevných plemen mohou reprodukovat až do stáří 24 – 28 let.

GRYGAROVÁ (2003) považuje za potenciálně vnímavé klisny náchylnější k perzistenci zánětlivé reakce po připouštění věkovou skupinu pluriparních klisen nad 14 let. To potvrzuje výsledek analýzy, že dvě skupiny starších klisen mají úspěšnost připouštění nižší, než skupina nejmladších klisen.

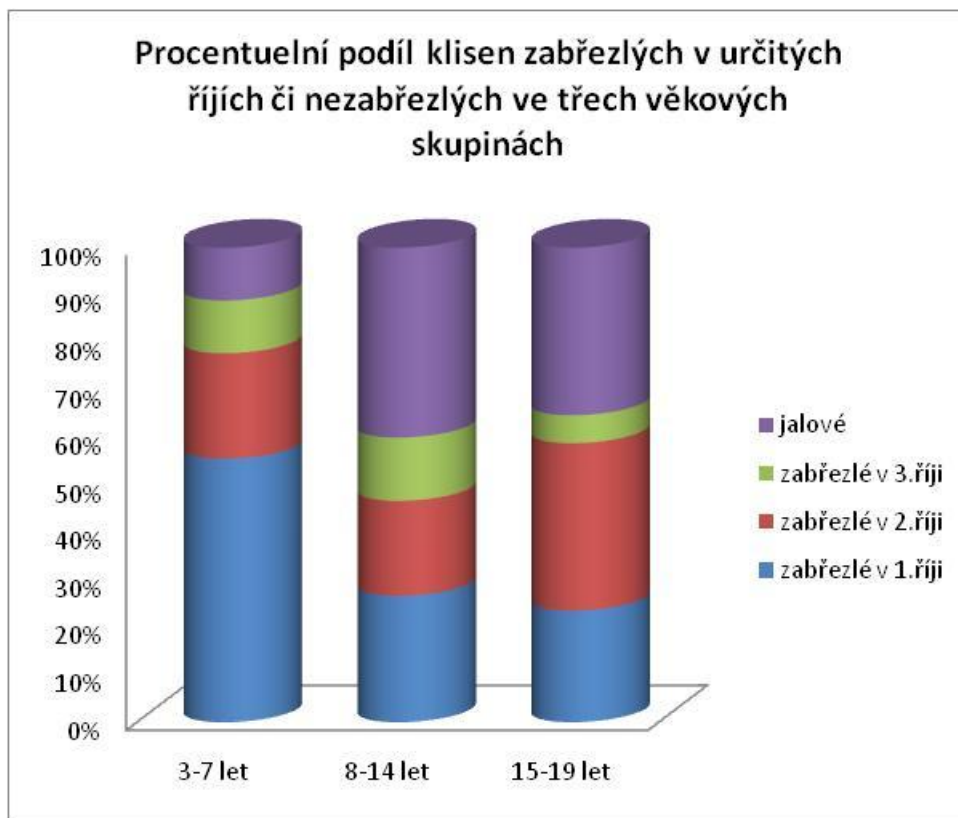
Multiple Range Tests for log úsp zab by skupiny vek				
-----				
Method: 95,0 percent LSD				
skupiny vek	Count	Mean	Homogeneous	Group
-----				
1	18	0,170081	X	
3	17	0,346804	X	
2	15	0,364646	X	

Tab. č. 21

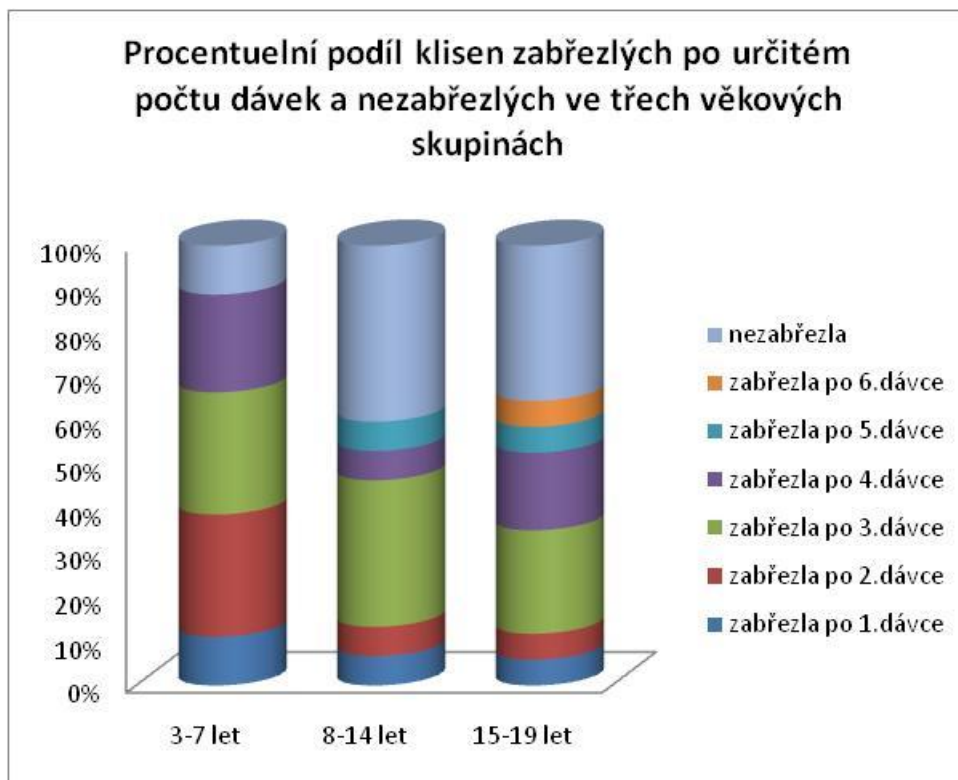
**Tabulka č. 21 ukazuje, že se statisticky prokazatelně liší skupina klisen ve věku 3 až 7 let od ostatních dvou starších skupin klisen.**

Stejnou otázku lze řešit i z pohledu dávek potřebných k zabřeznutí klisen. Během jednotlivých říjí byly při inseminaci použity různé počty dávek (od 1 do 4), což může způsobit rozdílné výsledky v porovnání s hodnocením z hlediska pořadí říjí, během kterých klisny zabřezly.

Graf č. 8



Graf č. 9



Při porovnávání grafů č. 8 a č. 9 je vidět, že poměr nezabřezlých klisen je logicky shodný. U zabřezlých klisen ve všech třech věkových skupinách převládají ty, co zabřezly během první a druhé říje, z hlediska počtu dávek jsou nejvíce zastoupeny ty, co zabřezly po 3 dávce. Ve skupině klisen ve věku 3-7 let převládají zabřezlé během první říje (60%) a po druhé (28%) a třetí (28%) dávce. Kisen zabřezlých po první dávce je nejvíc ve skupině 3-7letých (11%), ale rozdíl oproti 8-14letým (7%) a 15-19letým (6%) není tolik výrazný. Největší podíl tvoří klisny zabřezlé po třetí dávce ve věkové skupině 8-14 let a to 33%.

**KATILA (2003)** zaznamenal při inseminaci čerstvým spermatem zasílaným k chovateli březost po první říji 51,7 % a při inseminaci přímo na stanici, kde byl odběr spermatu proveden 56,1 %. **SGUIRES (1996)** zjistil 64,0 % úroveň březosti po první říji. **MÜLLER (2003)** při hodnocení úrovně březosti vzhledem k počtu klisen inseminovaných v jednotlivých říjích uvádí 47,4 % březost po první říji, 43,8 % březost po druhé říji 51,9 po třetí říji a 46,0 % po čtvrté říji.

Pomocí statistiky bylo testováno, zda je prokazatelný rozdíl mezi třemi věkovými skupinami v úspěšnosti zabřezávání z hlediska počtu dávek. Všechny potřebné předpoklady data po zlogaritmování splňovala.

Testy normality

Proměnná	log(úspěšnost zabřeznutí D)
Grupovací proměnná	věk klisen (1/2/3)
Rozdělení	normální
Velikost vzorku	18/15/17
Průměrná hodnota	0,44/0,603/0,621
Standartní odchylka	0,233/0,252/0,237

Tab. č. 22

Výsledky testu normality sledovaných dat pro skupinu klisen ve věku 3-7 let.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,923	0,154
Z hodnota nesouměrnosti	0,322	0,747

Tab. č. 23

Výsledky testu normality sledovaných dat pro skupinu klisen ve věku 8-14 let

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,842	0,632
Z hodnota nesouměrnosti	1,092	0,275

Tab. č. 24

Výsledky testu normality sledovaných dat pro skupinu klisen ve věku 15-19 let.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,852	0,062
Z hodnota nesouměrnosti	1,421	0,155

Tab. č. 25

Test homoskedasticity, že je shodný rozptyl hodnot úspěšnosti zabřezávání mezi třemi porovnávanými věkovými skupinami klisen.

Levene's test: 0,0807385 P-Value

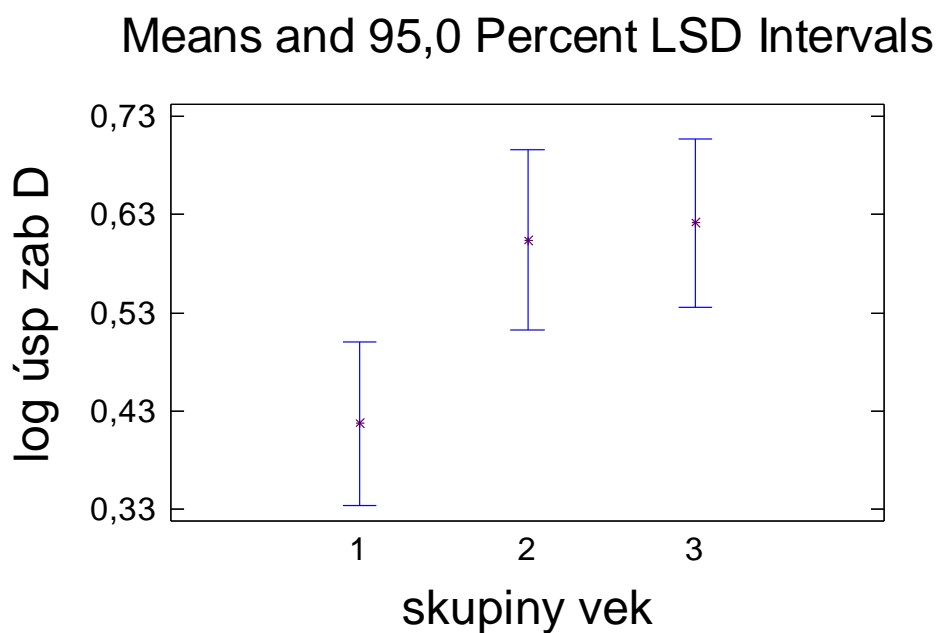
Tab. č. 26

Výsledky analýzy rozptylu hodnotící rozdíl mezi třemi věkovými skupinami na základě úspěšnosti jejich zabřezávání ( $\log \text{úsp zab D} = \log(\text{úspěšnost zabřeznutí z hlediska počtu dávek})$ ).

ANOVA Table for log úsp zab D by skupiny vek			
Analysis of Variance			
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square
Between groups	0,444267	2	0,222133
Within groups	2,90578	47	0,0618251
Total (Corr.)	3,35005	49	

Tab. č. 27

Graf č. 10



Výsledek této analýzy potvrzuje statisticky významný rozdíl mezi třemi věkovými skupinami klisen z hlediska úspěšnosti zabřezávání a ohledem na počet potřebných dávek, protože p-hodnota je nižší než 0,05 (0,0353). **Potvrzuje se tak výsledek z předchozí analýzy s ohledem na pořadí říje, ve které klisna zabřezla. Klisny ve věkové skupině 3-7 let potřebují prokazatelně nejméně dávek úspěšnému zabřeznutí.**

### 6.3. Porovnání dvou věkových skupin z hlediska zabřezávání a aplikace plazmy

Výše byla řešena otázka úspěšnosti zabřezávání pouze z hlediska věku klisen. V následujícím grafu č. 11 se přidává další faktor a to aplikace plazmy.

Graf č. 11



Aby bylo možno data statisticky vyhodnotit, byly klisny rozděleny do dvou věkových skupin, a to do 14 let stáří a do skupiny klisen ve věku 15 až 19 let. Z grafu č. 11 vyplývá, že aplikace plazmy byla efektivnější u mladších klisen, neboť v rámci této skupiny jich zabřezl po podání plazmy větší podíl. Tato hypotéza byla ověřena pomocí analýzy rozptylu.

Nejprve byla testována hypotéza, že je statisticky průkazný rozdíl mezi klisnami s aplikovanou plazmou a bez její aplikace ve skupině mladších klisen do 14 let věku. Byly splněny všechny předpoklady k provedení analýzy variance.

Testy normality

Proměnná	log(úspěšnost zabřeznutí)
Grupovací proměnná	plazma(0/1)
Rozdělení	normální
Velikost vzorku	17/16
Průměrná hodnota	0,339/0,19
Standartní odchylka	0,25/0,24

Tab. č. 28

Výsledky testu normality sledovaných dat pro skupinu klisen, u kterých nebyla aplikována plazma.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	2,328	0,19
Z hodnota nesouměrnosti	0,477	0,632

Tab. č. 29

Výsledky testu normality sledovaných dat pro skupinu klisen, u kterých byla aplikována plazma.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,892	0,372
Z hodnota nesouměrnosti	1,475	0,14

Tab. č. 30

Potvrzení homoskedasticity dat.

Levene's test: 0,691707	P-Value
-------------------------	---------

Tab. č. 31

Výsledky analýzy rozptylu hodnotící rozdíl úspěšnosti zabřezávání mezi skupinou klisen, u kterých byla aplikována plazma a skupinou bez její aplikace. Porovnání bylo provedeno ve skupině klisen ve věku do 14 let. Kvůli dosažení normálního rozdělení dat, bylo nutno provést jejich transformaci pomocí funkce logaritmus ( $\log \text{úsp zab} = \log (\text{úspěšnost zabřeznutí})$ ).

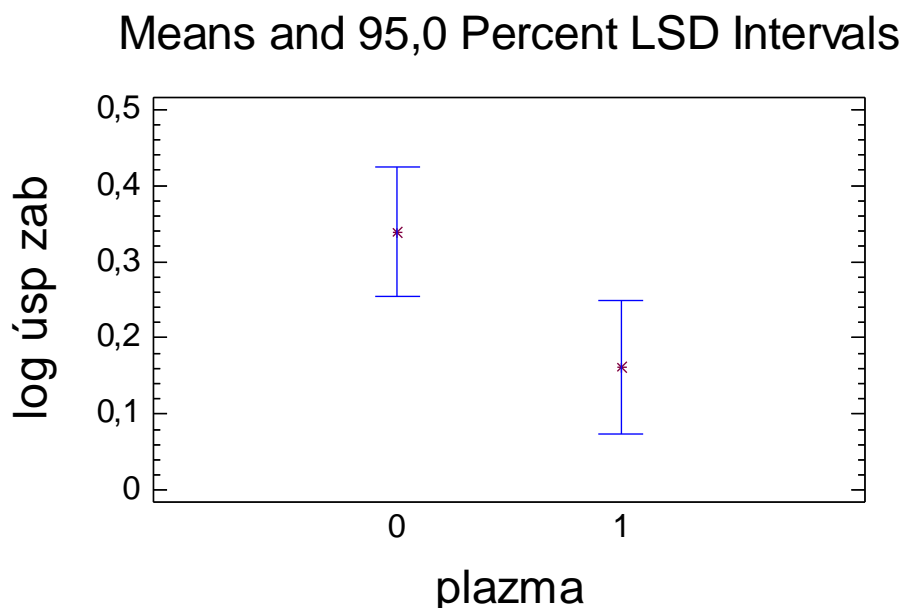
ANOVA Table for log úsp zab by plazma			
Analysis of Variance			
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square
Between groups	0,260958	1	0,260958
Within groups	1,84076	31	0,0593793
Total (Corr.)	2,10172	32	

Tab. č. 32

Porovnání skupiny klisen s aplikovanou plazmou (1) a bez její aplikace (0) z hlediska úspěšnosti zabřezávání. Tato analýza byla provedena v rámci skupiny klisen ve věku do 14 let.



Graf č. 12



**Na 95% hladině spolehlivosti byl prokázán statisticky významný rozdíl v úspěšnosti zabřezávání u klisen ve věku do 14 let mezi skupinami s aplikovanou plazmou a bez její aplikace, neboť p-hodnota 0,0443 je nižší než hodnota 0,05. Tedy byl statisticky potvrzen vliv aplikace plazmy na úspěšnost zabřeznutí u klisen ve věku do 14 let.**

Dále bylo statisticky testováno, zda je průkazný rozdíl mezi klisnami s aplikovanou plazmou a bez její aplikace ve skupině ve věku 15-19 let. Byly ověřeny všechny předpoklady k provedení analýzy variance, jejichž výsledky jsou v následujících tabulkách. Pro dosažení normálního rozdělení dat byla použita transformace pomocí funkce logaritmus.

Ověření normálního rozdělení dat

Proměnná	log(úspěšnost zabřeznutí)
Grupovací proměnná	plazma(0/1)
Rozdělení	normální
Velikost vzorku	8/9
Průměrná hodnota	0,376/0,320
Standartní odchylka	0,21/0,26

Tab. č. 33

Výsledky testu normality sledovaných dat pro skupinu klisen, u kterých nebyla aplikována plazma.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,827	0,0576
Z hodnota nesouměrnosti	0,385	0,699

Tab. č. 34

Výsledky testu normality sledovaných dat pro skupinu klisen, u kterých byla aplikována plazma.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,828	0,077
Z hodnota nesouměrnosti	0,24	0,81

Tab. č. 35

Potvrzení homoskedasticity dat.

Levene's test: 0,967441	P-Value
-------------------------	---------

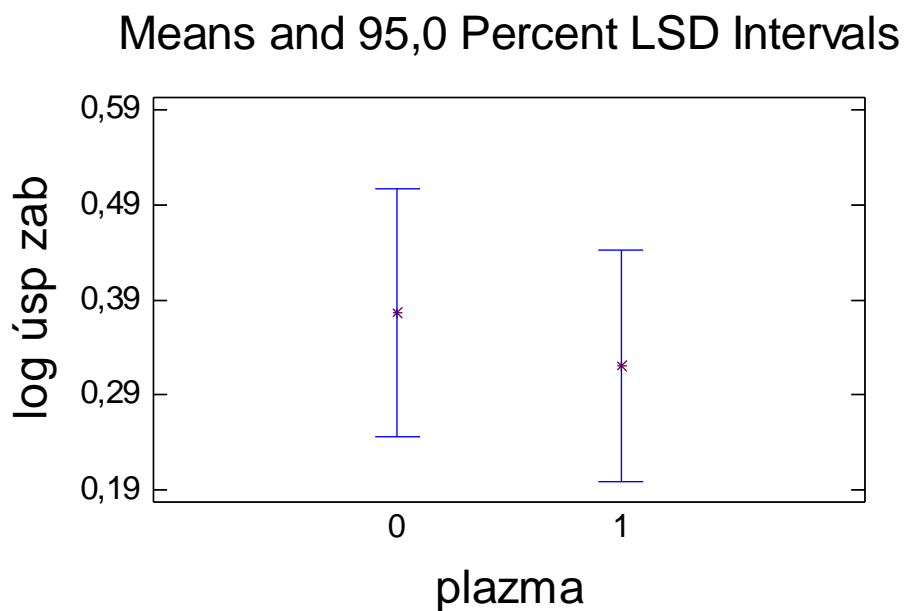
Tab. 36

Výsledky analýzy rozptylu hodnotící rozdíl úspěšnosti zabřezávání mezi skupinou klisen, u kterých byla aplikována plazma a skupinou bez její aplikace. Porovnání bylo provedeno ve skupině klisen ve věku 15-19 let.

ANOVA Table for log úspěš. zab. by plazma			
Analysis of Variance			
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square
Between groups	0,0131361	1	0,0131361
Within groups	0,888444	15	0,0592296
Total (Corr.)	0,90158	16	

Tab. č. 37

Graf. č. 13



Na 95% hladině spolehlivosti nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v úspěšnosti zabřezávání u klisen ve věku 15-19 let mezi skupinami s aplikovanou plazmou a bez její aplikace, neboť p-hodnota 0,6445 je vyšší než hodnota 0,05. Tedy nebyl statisticky potvrzen vliv aplikace plazmy na úspěšnost zabřeznutí u klisen ve věku do 15-19.

#### 6.4. Sledování počtu dávek potřebných k zabřeznutí u klisen s aplikovanou plazmou a bez její aplikace

Graf č. 14



V grafu č. 14 se porovnávají počty klisen po aplikaci plazmy a bez její aplikace z hlediska počtu dávek potřebných k zabřeznutí. Sledován je tedy pouze soubor zabřezlých klisen a z výsledku vyplývá, že v případě, kdy bylo k zabřeznutí potřeba jedné, dvou nebo tří dávek, je vyšší počet klisen s aplikovanou plazmou. V případě, kdy klisny zabřezly až po čtyřech dávkách, naopak převažovaly klisny, u kterých nebyla plazma aplikována. Příklad pěti a šesti dávek nelze do hodnocení zahrnout, z důvodu malého počtu sledovaných klisen.

Dále byla pomocí statistiky hodnocena otázka, zda má aplikace plazmy vliv na počet dávek potřebných k úspěšnému zabřeznutí klisen. Tedy nulová hypotéza je, že se neliší soubor klisen s aplikovanou plazmou a bez její aplikace v počtu dávek potřebných k zabřeznutí. Vzhledem k tomu, že sledovaná data vykazovala normální rozdělení a splňovala podmínku homoskedasticity, bylo v tomto případě možné využít jednorozměrnou ANOVu.

## Test na homoskedasticitu

Levene's test: 0,298246 P-Value

Tab. č. 38

Testy normálního rozdělení březích klisen, u kterých byla (plazma=1) či nebyla (plazma=0) aplikována plazma.

Proměnná	počet dávek
Grupovací proměnná	plazma (0/1)
Rozdělení	normální
Velikost vzorku	16/20
Průměrná hodnota	3,125/2,94
Standartní odchylka	1,024/1,311

Tab. č. 39

Výsledky testu normality sledovaných dat pro skupinu březích klisen, u kterých nebyla aplikována plazma.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,925	0,208
Z hodnota nesouměrnosti	0,368	0,712

Tab. č. 40

Výsledky testu normality sledovaných dat pro skupinu březích klisen, u kterých byla aplikována plazma.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,917	0,107
Z hodnota nesouměrnosti	0,618	0,536

Tab. č. 41

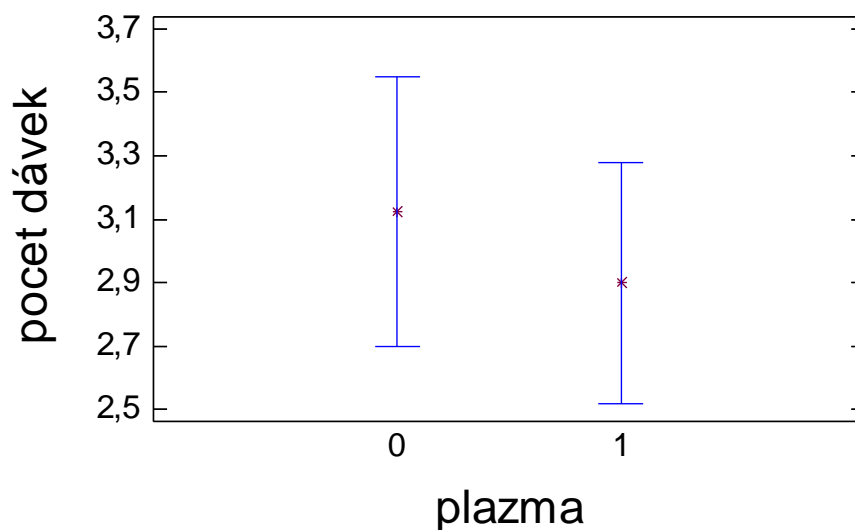
Výsledky jednorozměrné analýzy rozptylu, která porovnávala počet dávek potřebných k zabřeznutí u klisen s aplikovanou plazmou a bez její aplikace.

ANOVA Table for pocet dávek by plazma			
Analysis of Variance			
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square
Between groups	0,45	1	0,45
Within groups	47,55	34	1,39853
Total (Corr.)	48,0	35	

Tab. č. 42

Graf č. 14

### Means and 95,0 Percent LSD Intervals



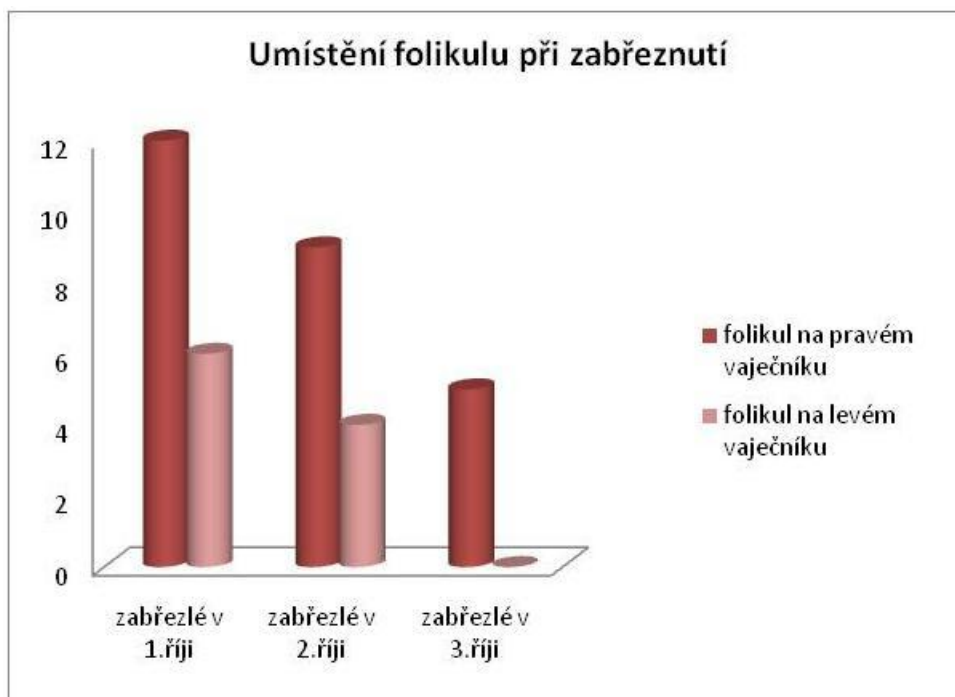
**Nulová hypotéza byla potvrzena, protože p-hodnota je 0,436 (tedy vyšší než 0,05), tedy nebyl potvrzen statisticky významný rozdíl v počtu dávek nutných k zabřeznutí mezi skupinou klisen, u kterých byla aplikována plazma a bez její aplikace.**

## 6.5. Velikost a umístění folikulů

Podle **BUBENÍČKA (2005)** je velikost preovulačního folikulu 3,5 cm a více. Velikost a umístění folikulu bylo vyhodnoceno u zabřezlých klisen. Celkově byl folikul při zabřeznutí častěji umístěn na pravém vaječniku než na levém, jak lze pozorovat na grafu č. 15.

Folikuly měly při zabřeznutí velikost od 4 do 6,8 cm. Pro porovnání velikosti folikulů během jednotlivých říjí byla stanovena jejich průměrná velikost. Z grafu č. 16 vyplývá, že folikuly sledované během této studie byly největší u klisen, které zabřezly až při třetím zapouštění (tedy zabřezlé až ve třetí říji) v porovnání s folikuly u klisen zabřezlých během první a druhé říje. U klisen zabřezlých během první říje byla průměrná velikost folikulů 5,22cm, u zabřezlých během druhé říje 5,13cm a u zabřezlých až během třetí říje v průměru 5,64cm.

Graf č. 15



Graf č. 16



## 6.6. Přehled zapouštění během jednotlivých měsíců

Dalším faktorem, který byl hodnocen, bylo zabřeznutí klisen ve vztahu k měsíci v roce. Jak je již výše uvedeno klisny patří mezi sezónně polyedrická zvířata, to znamená, že během zimy se u nich plnohodnotné říje nevyskytují. U jalových klisen, kde není první připuštění podmíněno předchozím porodem, je u chovatelů patrná snaha posunout první plnohodnotnou říji co nejvíce k začátku připouštěcí sezóny.

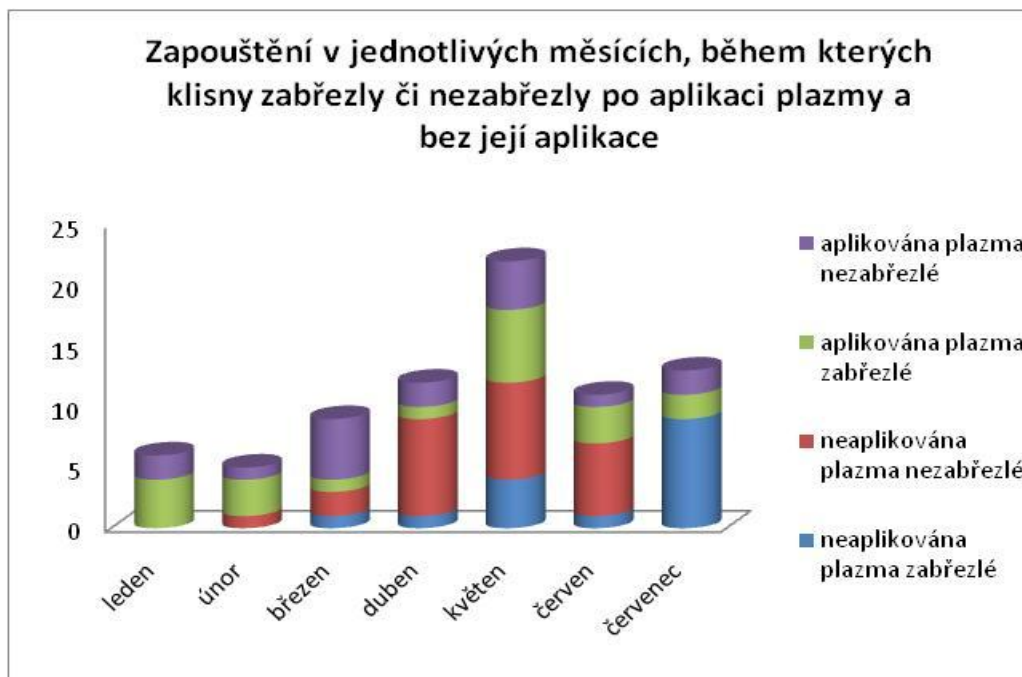
Podle **GAMČÍKA a kol. (1988)** je častou chybou, že se připouštění uskutečňuje v takovém ročním období, kdy je třeba počítat s nepravidelným průběhem říje, nebo klisny nejsou v chovné kondici. Je to především v zimě a v prvních jarních měsících (nepravidelný pohlavní cyklus), krátce před výměnou srsti na jarní, případně v jejím průběhu, před obdobím pasení (nedostatek esenciálních živin, metabolická zátěž), jako také po několikátýdenní intenzivní laktaci (endokrinní respektive metabolická blokáda pohlavních funkcí).

Na grafu č. 17 je porovnáno zapouštění klisen během jednotlivých měsíců, kdy jsou každý měsíc říje klisen rozděleny na ty, při kterých zabřezly a na ty při



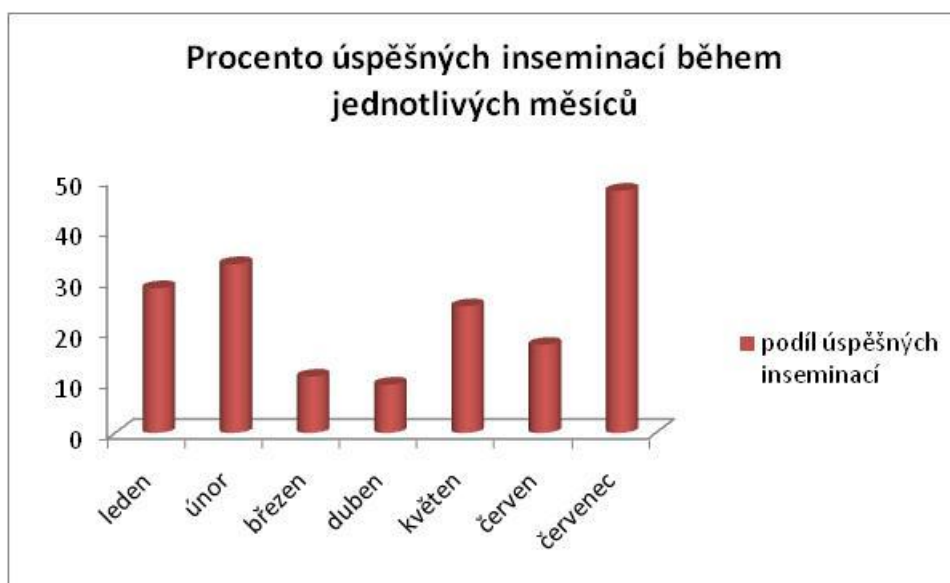
kterých nezabřezly. Navíc je přidán vliv aplikace plazmy. Lze pozorovat, že nejvíce se pouštělo během května, ale více jak polovina klisen nezabřezla. Aplikace plazmy byla využívána hlavně během ledna, února, března a května, oproti dubnu a červnu.

Graf č. 17



V grafu č. 18 jsou uvedena procenta úspěšných inseminací během jednotlivých dávek (tedy poměr úspěšných inseminací k neúspěšným). Mezi úspěšnější měsíce patří leden, únor a červenec. Naopak v březnu, dubnu, květnu a červnu bylo větší množství inseminací neúspěšných.

Graf č. 18



Následující graf č. 19 pracuje s otázkou úspěšných inseminací během jednotlivých měsíců podrobněji, protože zahrnuje faktor aplikace plazmy. Ve všech měsících kromě března a července převládají podíly úspěšných inseminací po aplikaci plazmy nad těmi, kdy plazma aplikována nebyla (do hodnocení nelze zahrnout leden, kdy byly inseminovány pouze klisny po aplikaci plazmy).

Graf č. 19



### 6.7. Porovnání klisen po hříběti a zapouštěných poprvé

Tato kapitola se zabývá otázkou porovnání klisen, které již rodily a klisen poprvé zapouštěných. V souboru sledovaných klisen byly klisny po jednom až šesti hříbotech. Všechny klisny, které již rodily, sloučeny do jedné skupiny, bez ohledu na to kolik již hříbat měly, aby bylo možné je porovnat s poprvé zapouštěnými.

Graf č. 20



Na grafu č. 20 je vidět, že v zabřezávání nebyl žádný rozdíl mezi klisnami poprvé zapouštěnými a klisnami po hříběti.

Graf č. 21



Pokud se do předchozího hodnocení přidá faktor aplikace plazmy, již lze malé rozdíly pozorovat. Je vidět větší efekt aplikace plazmy u klisen bez hříběte v porovnání s klisnami po hříběti.

Graf č. 22



Na grafu lze pozorovat rozdíl v podílu klisen zabřezlých během první říje, kdy větší procento jich zabřezlo po aplikaci plazmy jak ve skupině bez hříběte, tak ve skupině klisen po hříběti. Stejně tak je výrazný rozdíl v poměru klisen nezabřezlých, kdy v obou sledovaných skupinách klisen (po hříběti a bez hříběte) převyšuje poměr nezabřezlých ve skupině bez aplikace plazmy v porovnání se skupinou s aplikovanou plazmou. V rámci sledovaných skupin byla ověřena hypotéza rozdílu úspěšnosti zabřezávání pod vlivem aplikace plazmy statisticky.

Nejprve byl sledován vliv plazmy ve skupině klisen bez hříběte.

Testy normality

Proměnná	úspěšnost zabřeznutí R
Grupovací proměnná	aplikace plazmy (0/1)
Rozdělení	normální
Velikost vzorku	(8/8)
Průměrná hodnota	2,62/1,87
Standartní odchylka	1,3/1,12

Tab. č. 43

Test normality pro sledovaná data u klisen bez hříběte bez aplikované plazmy.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,848	0,094
Z hodnota nesouměrnosti	0,1	0,92

Tab. č. 44

Test normality pro sledovaná data u klisen bez hříběte s aplikovanou plazmou.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,809	0,137
Z hodnota nesouměrnosti	1,05	0,293

Tab. č. 45

Test homoskedaticity

Levene's test: 0,608696	P-Value
-------------------------	---------

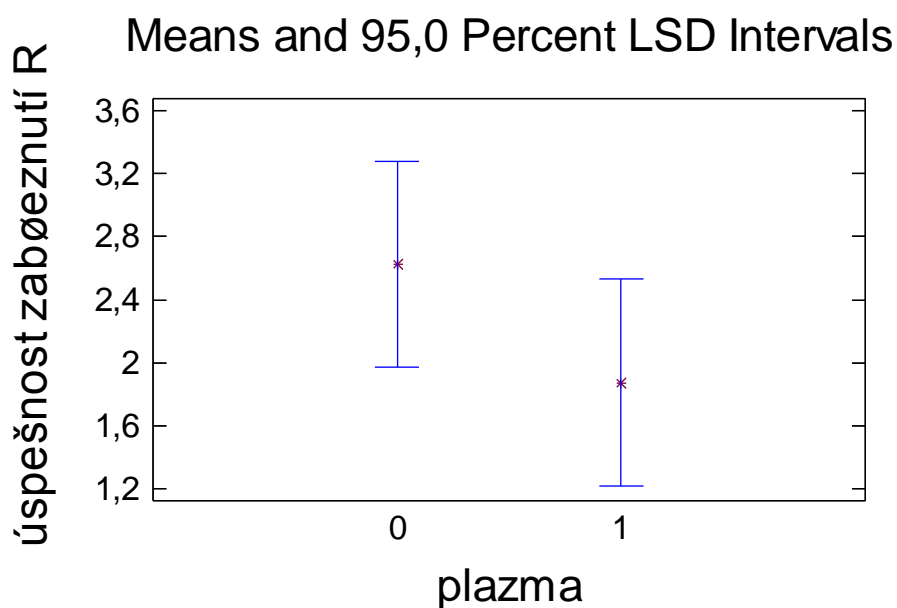
Tab. č. 46

Výsledky analýzy variance s nulovou hypotézou, že se neliší soubor klisen po aplikaci plazmy a bez její aplikace v úspěšnosti zabřezávání ve skupině klisen bez hříběte.

ANOVA Table for úspěšnost zabřeznutí R by plazma			
Analysis of Variance			
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square
Between groups	2,25	1	2,25
Within groups	20,75	14	1,48214
Total (Corr.)	23,0	15	

Tab. č. 47

Graf č. 23



**Nulová hypotéza nebyla na 95% hladině spolehlivosti vyvrácena, neboť p-hodnota 0,2382 je vyšší než 0,05. Není tedy statisticky prokazatelný rozdíl v úspěšnosti zabřezávání mezi klisnami po aplikaci plazmy a bez její aplikace ve skupině klisen bez hříběte.**

Stejná hypotéza byla ověřena i ve skupině klisen, které již minimálně jedno hříbě měly.

### Testy normality

Proměnná	úspěšnost zabřeznutí R
Grupovací proměnná	aplikace plazmy (0/1)
Rozdělení	normální
Velikost vzorku	17/17
Průměrná hodnota	2,52/2,11
Standartní odchylka	1,23/1,26

Tab. č. 48

Test normality pro sledovaná data u klisen po hříběti bez aplikované plazmy.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,811	0,123
Z hodnota nesouměrnosti	0,206	0,836

Tab. č. 49

Test normality pro sledovaná data u klisen po hříběti po aplikaci plazmy.

Test normality	hodnota	p-hodnota
Shapiro-Wilksův test	0,775	0,166
Z hodnota nesouměrnosti	0,779	0,435

Tab. č. 50

### Test homoskedasticity

Levene's test: 0,0496894	P-Value
--------------------------	---------

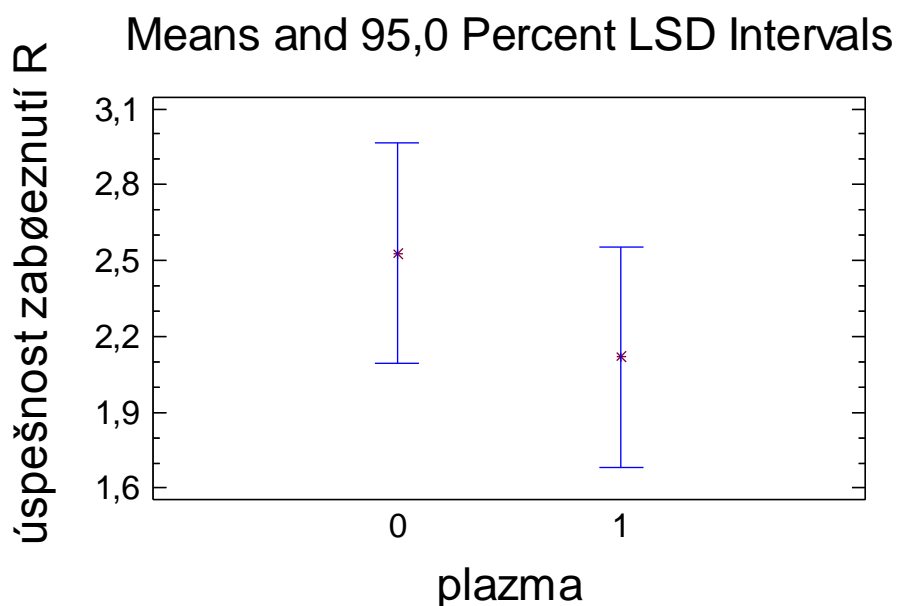
Tab. č. 51

Výsledky analýzy variance s nulovou hypotézou, že se neliší soubor klisen po aplikaci plazmy a bez její aplikace v úspěšnosti zabřezávání ve skupině klisen s minimálně jedním hříbětem.

ANOVA Table for úspěšnost zabřeznutí R by plazma				
Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	
Between groups	1,44118	1	1,44118	
Within groups	50,0	32	1,5625	
Total (Corr.)	51,4412	33		

Tab. č. 52

Graf č. 24



Nulová hypotéza nebyla na 95% hladině spolehlivosti vyvrácena, neboť p-hodnota 0,3441 je vyšší než 0,05. Není tedy statisticky prokazatelný rozdíl v úspěšnosti zabřezávání mezi klisnami po aplikaci plazmy a bez její aplikace ve skupině klisen po minimálně jednom hřiběti.

**Neprokázal se tedy statisticky prokazatelný vliv plazmy na úspěšnost zabřezávání ani ve skupině klisen po hřiběti, ani ve skupině, která ještě hřibě neměla.**

## 7. ZÁVĚR

Hlavní náplní diplomové práce bylo ohodnotit pozitivní vliv inrauterinní aplikace autoplazmy na plodnost klisen.

Z výsledků analýz vyplývají následující zjištění:

- Nebyl prokázán statisticky významný vliv aplikace plazmy na úspěšnost zabřezávání.
- Pokud byl k aplikaci připojen ještě faktor věku, byl statisticky potvrzen vliv aplikace plazmy na úspěšnost zabřeznutí u klisen ve věku do 14 let. To potvrdilo již výše uvedený názor, že aplikace autoplazmy má význam u klisen bez problému se samočisticí schopností dělohy, což bývá často dáváno do souvislosti např. s věkem a uvolněním zavěšení dělohy u starších klisen.
- Při sledování úspěšnosti zapouštění z hlediska jednotlivých měsíců bylo zjištěno, že nejvíce se pouštělo během května, ale více jak polovina klisen nezabřezla. Mezi úspěšnější měsíce z hlediska zabřezávání patřil leden, únor a červenec. Naopak v březnu, dubnu, květnu a červenu bylo větší množství inseminací neúspěšných.
- Velikost a umístění folikulu bylo vyhodnoceno u zabřezlých klisen. Celkově byl folikul při zabřeznutí častěji umístěn na pravém vaječniku než na levém. Folikuly měly při zabřeznutí velikost od 4 do 6,8 cm
- Nebyl zjištěn statisticky prokazatelný vliv plazmy na úspěšnost zabřezávání ani ve skupině klisen po hříběti, ani ve skupině, která ještě hříbě neměla.
- Závěrem lze konstatovat, že se určitý pozitivní vliv aplikace autoplazmy podařilo potvrdit u pokusné skupiny mladších klisen. Pro svou jednoduchost by si tato metoda jistě zasloužila testování ve větším měřítku a v podniku s lepšími výsledky reprodukce klisen.



## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ALLEN, W. R. (1977): Artificial control of the mare's oestrus cycle. Vet. Rec. 100. s. 68–71
- BACK, D.G., PICKET, B.W., VOSS, J.L., SEIDEL G.E. (1974): Observations on the sexual behavior of nonlacting mares. Journal of the American Veterinary Medical Association. 165. 4. 8. s. 717-720
- BÍLEK, F. (1955): Speciální zootechnika. Chov koní. SZN. Praha.
- BOWEN, J. M. (1969): Artificial insemination in the horse. Equine Vet J. 1. s. 98 – 110
- COLQUHOUN, K. M., ECKERSALL, P.D., RENTON, J.P., DOUGLAS, T.A. (1987): Control of breeding in the mare. Equine Vet. J. 19. s. 138–142
- DOLEŽEL, R. (2003) : Vybrané kapitoly z gynekologie a porodnictví pro výuku porodnictví. České Budějovice. s. 13 – 35
- DOUBEK, J. a kol. (2003): Vetreinání hematologie. NOVIKO a. s. Brno. 89 s. ISBN: 80 – 86542 – 02 – 5
- DUŠEK, J. a kol. (1999): Chov koní. Nakladatelství Brázda. Praha. s. 150 – 157. ISBN 80-209-0282- 1
- FERENČÍK, M., ROVENSKÝ, J, SHOENFELD Y. (2005). Imunitní systém: informace pro každého. Grada Publishing. Praha.
- GINTHER, O.J. (1974): Occurrence of anestrus, estrus, diestrus and ovulation over a 12 – month period in mares. Am. J. Vet. Res. 35. s.1173–1179
- GINTHER, O.J. (1992): Reproductive biology of the mare. Basic and applied aspects. Cross Plains. Equiservices Publishing. 642 s.
- GRYGAR, I., KUDLÁČ, E. (1997): Ultrasonografie ve veterinárním porodnictví a gynekologii. Slezan. Hlučín. ISBN 80-901948-6-9.
- HAJIČ, F., KOŠVANEC, K. (1998): Obecná zootechnika (cvičení). Jihočeská univerzita. 194 s.
- HAJIČ, F., KOŠVANEC, K., ČÍTEK, J. (1995): Obecná zootechnika. Jihočeská univerzita. 165 s.
- HUGHES, J. P., STABENFELD, G.H., EVANS, J.W. (1972): Estrus cycle and ovulation in the mare. J. Am. Vet. Med. Ass. 161. s. 1367–1374

- JELÍNEK, P. a kol. (2003): Fyziologie hospodářských zvířat MZLU v Brně
- KOOISTRA, L. H., GINTHER O. J. (1975): Effect of artificial light on the oestrus cycle of the mare. J. Reprod. Fert. Suppl. 23. s. 231–246
- KRESAN, J. a kol. (1979): Morfológia hospodářských zvierat. Príroda Bratislava
- KUDLÁČ, E. a kol. (1987): Veterinární porodnictví a gynekologie. SZN. Praha
- LOUDA, F. a kol. (2001): Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnologických metod. Česká zemědělská univerzita. 225 s. ISBN 80-213-0702-1
- MÉSZÁROŠ, I. (1958): Rozmnožovanie: ruja u kobyly. In Všeobecná zootechnika. Bratislava. SAV. s. 301 – 303
- MAJZLÍK, I. (1993): Vliv příbuzenské plemenitby na plodnost kladrubských klisen. Sborník referátů: XVI Dni genetiky hospodářských zvířat. s. 222 – 223
- MARŠÁLEK, M. (2008). Chov koní – popis, posuzování, šlechtění. Jihočeská univerzita. 109 s.
- MÜLLER, Z. (2006): Nové reprodukční metody v Plemenitbě koní. Sborník referátů ze semináře: Chov koní v současných ekonomických podmínkách. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. NH Kladruby nad Labem. s. 43 – 51. ISBN 80-7357-006-6.
- MÜLLER, J. (2003) Vliv vybraných faktorů na zabřezávání klisen po inseminaci čerstvým spermatem. Brno.
- NAGY, P., GUILLAME, D., DAELS, P. (2000): Sesonality in mares. Animal reproduction Science. 60, 2, s. 245-262.
- NOVOHRDSKÁ, V., JISKROVÁ, I. (2008): The factor influencing the number of inseminations necessary to fertilit a mare. Mendelova zemědělská a lesnická universita. Brno.
- PALMER, E., DRIANCOURT, M.A., ORTAVANT, R. (1982). Photoperiod stimulation of the mare during winter anoestrus. J. Reprod. Fertil. Suppl. 32. s. 275–282
- POLANSKÝ, J., VĚŘÍŠ, J., ŠILHA, J., NAVRÁTIL, J. (1983): Chov koní. Vysoká škola zemědělská v Praze. 77 s.

- REECE, W. O. (1998): Fyziologie domácích zvířat. Grada Publishing. s. 346 – 355. ISBN 80-7169-547-5
- SHARP, D. C. (1980): Environmental influences on reproduction in horses. Vet. Clin. North Am. 2. s. 207–223
- SOVA, Z. (1978): Biologické základy živočišné výroby. Státní zemědělské nakladatelství. Praha.
- ŠTRUPL, J. a kol. (1983): Chov koní. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. s. 293 – 295
- VĚŽNÍK, Z. a kol. (2008): Současné problémy v reprodukci koní v ČR. Sborník referátů ze semináře: Aktuální problémy chovu a šlechtění koní v ČR. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. NH Kladruhy nad Labem – hřebčín Slatiňany. ISBN 80-978-80-7375-241-5
- ZAVADILOVÁ, L. (2006): Ultrasonografická diagnostika gravidity u klisen. Mendelova zemědělská a lesnická universita. Brno.
- [http://www.agroweb.cz/V-Ceske-republice-mame-vickoni\\_s45x30284.html?Lang=cs](http://www.agroweb.cz/V-Ceske-republice-mame-vickoni_s45x30284.html?Lang=cs), cit. 12. 3. 2010
- <http://www.zootechnika.estranky.cz/clanky/inseminace-a-biotechnologie-hz/inseminace-koni>, cit. 12. 10. 2009
- [http://www.ifauna.cz/rubriky/clan\\_show.php?id=4519&r=13](http://www.ifauna.cz/rubriky/clan_show.php?id=4519&r=13), cit. 20. 12. 2009
- [http://www.ifauna.cz/rubriky/clan\\_show.php?id=4519&r=13](http://www.ifauna.cz/rubriky/clan_show.php?id=4519&r=13), cit. 13. 1. 2010
- [https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141\\_23975.html](https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_23975.html), cit. 20. 1. 2010
- <http://www.bubenicek.cz/clanky/?id=36>, cit. 16. 1. 2010
- <http://www.muller-equine.cz/reprodukce-koni-1/inseminace.htm>, cit. 12. 3. 2010
- <http://pycock.co.uk/italy3.htm>, cit. 12. 1. 2010
- <http://www.pycock.co.uk/article1>, cit. 16. 1. 2010
- <http://pycock.co.uk/article5.htm>, cit. 16. 1. 2010
- [http://www.buiatrie.cz/attachements/037\\_Sonografie\\_v\\_buiatr\\_praxi\\_0840-2006.pdf](http://www.buiatrie.cz/attachements/037_Sonografie_v_buiatr_praxi_0840-2006.pdf), cit. 12. 10. 2009
- <http://www.vetweb.cz/projekt/clanek.asp?cid=2780&pid=2>, cit. 13. 1. 2010
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2917906>, cit. 16. 1. 2010

- <http://www.vet.purdue.edu/vcs/>, cit. 28. 2. 2010