

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Predikce fertilizační schopnosti inseminačních dávek býků
pomocí průtokové cytometrie a jiných laboratorních in
vitro analýz**

Bakalářská práce

Barbora Žáčková

Chov hospodářských zvířat

Ing. Filipp Georgijevič Savvulidi, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Predikce fertilizační schopnosti inseminačních dávek býků pomocí průtokové cytometrie a jiných laboratorních in vitro analýz " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 28. 4. 2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Filippu Georgijevičovi Savvulidimu, Ph.D. za trpělivost, cenné rady a odborné vedení mé práce. Dále bych také ráda poděkovala zaměstnancům Natural spol. s.r.o., kteří mi umožnili návštěvu jejich inseminační stanice býků v Hradištku pod Medníkem a možnost zhlédnout danou problematiku v praxi. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala celé své rodině a blízkým přátelům za veškerou podporu při studiu.

Predikce fertilizační schopnosti inseminačních dávek býků pomocí průtokové cytometrie a jiných laboratorních *in vitro* analýz

Souhrn

V práci jsou shrnuty *in vitro* analýzy kvality spermatu související se schopností predikce fertilizace inseminačních dávek (ID) býků. Zaměřila jsem se také na výrobu inseminačních dávek od odběru ejakulátu až po zamrazení do tekutého dusíku. Dodržení správnosti každého kroku je zásadní pro výslednou kvalitu ID.

Inseminace u skotu je jednou z nejvýznamnějších biotechnologických metod v živočišné výrobě. Základem pro inseminaci jsou inseminační dávky, které vykazují určité parametry kvality. K ověření kvality spermatu jsou využívány *in vitro* analýzy, které jsou schopné predikovat schopnost fertilizace.

V práci je představeno několik zásadních laboratorních *in vitro* analýz, které se pro analýzu spermatu využívají nejen v komerčních laboratořích pro výrobu ID. Oproti polním testům (*in vivo*) jsou laboratorní analýzy (*in vitro*) ekonomicky i časově výhodnější.

Průtoková cytometrie patří mezi klíčové metody při analýze kvality inseminačních dávek. Tato metoda umožňuje hodnocení více parametrů současně v krátkém časovém úseku. Mezi parametry kvality inseminačních dávek hodnocené na průtokovém cytometru patří například integrita plazmatické membrány, akrozomu, DNA a mitochondriální aktivita. Průtoková cytometrie je rychlá metoda s vysokou přesností a citlivostí.

Mezi další významné analýzy je řazena počítačem podporovaná analýza spermií, také nazývána jako systém CASA. Tato metoda je využívána pro hodnocení motility spermií. Systém CASA je schopen vyhodnotit více parametrů současně. Jednotlivé kinematické parametry spermií jsou extrahovány a následně rozděleny do skupin s obdobnými charakteristikami motility.

Pro hodnocení inseminačních dávek by bylo ideální nalezení takové *in vitro* metody, která by plně korelovala s polní plodností.

Nicméně fertilizační schopnost spermií závisí na mnoha faktorech, nejen na jediné vlastnosti, a hraje zde klíčovou roli i samotná samice.

Klíčová slova: Inseminace, ID býků, průtoková cytometrie, přežitelnost

Prediction of the fertilizing capacity of bull insemination doses by means of flow cytometry and other laboratory-based in vitro assays

Summary

In vitro semen quality analyses related to the ability to predict fertilization of insemination doses (ID) of bulls are summarized. I also focused on the production of insemination batches from ejaculate collection to freezing in liquid nitrogen. Getting each step right is critical to the resulting quality of ID.

Insemination in cattle is one of the most important biotechnological methods in animal production. The basis for insemination are insemination batches that exhibit certain quality parameters. In vitro analyses are used to verify semen quality and are able to predict fertilization ability.

In this paper, several essential laboratory in vitro assays are presented that are used for semen analysis not only in commercial laboratories for ID production. Compared to field tests (in vivo), laboratory analyses (in vitro) are more economical and time efficient.

Flow cytometry is one of the key methods in analyzing the quality of insemination batches. This method allows the evaluation of several parameters simultaneously in a short period of time. The quality parameters of insemination batches evaluated by flow cytometry include plasma membrane integrity, acrosome, DNA and mitochondrial activity. Flow cytometry is a rapid method with high accuracy and sensitivity.

Other important analyses include computer-assisted sperm analysis, also known as the CASA system. This method is used to assess sperm motility. The CASA system is capable of evaluating multiple parameters simultaneously. Individual sperm kinematic parameters are extracted and then grouped into groups with similar motility characteristics.

For the evaluation of insemination doses, it would be ideal to find an in vitro method that fully correlates with field fertility.

However, the fertilizing ability of sperm depends on many factors, not just a single characteristic, and the female herself plays a key role.

Keywords: Insemination, bull ID, flow cytometry, survivability

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce.....	3
3 Literární rešerše.....	4
3.1 Obecná fyziologie fertilizace u skotu	4
3.2 Inseminační dávky (ID) pro potřeby umělé inseminace.....	5
3.2.1 Inseminace	5
3.2.2 Činitelé ovlivňující kvalitu ejakulátu.....	5
3.3 Metody odběru ejakulátu	6
3.4 Makroskopické metody hodnocení odebraného ejakulátu	7
3.5 Mikroskopické metody hodnocení odebraného ejakulátu	7
3.5.1 Hodnocení motility odebraného ejakulátu	7
3.5.2 Hodnocení koncentrace a morfologie odebraného spermatu.....	8
3.6 Výroba a uchovávání inseminačních dávek.....	10
3.6.1 Rozmrazování ID.....	10
3.6.2 Poškození spermií v průběhu kryokonzervace	11
3.7 Ředění ID	11
3.7.1 Kryoprotektiva	12
3.7.1.1 Penetrující kryoprotektanty	12
3.7.1.2 Nepenetrující kryoprotektanty	12
3.7.2 Bezžloutková ředidla	13
3.7.3 Antibiotika	13
3.7.4 Alternativy antibiotik.....	13
3.7.5 Antioxidanty a aminokyseliny	14
3.8 Posouzení kvality ID pomocí <i>in vitro</i> analýz.....	15
3.8.1 Počítačem řízená analýza spermií (CASA)	15
3.8.1.1 Systémové komponenty	16
3.8.1.2 Princip funkce systému	17
3.8.1.3 Měřené parametry.....	17
3.8.1.4 Hromadný vířivý pohyb	19
3.8.2 Průtoková cytometrie.....	19
3.8.2.1 Systémové komponenty	21

3.8.2.2	Princip průtokové cytometrie	22
3.8.2.3	Barviva pro průtokovou cytometrii	23
3.8.2.4	Hodnocené parametry průtokové cytometrie	25
3.8.3	Fluorescenční mikroskopie.....	27
3.8.4	Zobrazovací průtoková cytometrie	27
3.8.5	Oxidační stres	27
3.8.6	Test penetrace spermií (SPA)	28
3.8.7	Test vazby spermie na zonu pellucidu (hemizonový test).....	28
3.8.8	Test akrozomální reakce	29
3.8.9	Test vazby hyaluronanu	29
3.8.10	Test hypoosmotického bobtnání	29
3.8.11	Hodnocení vitality spermií.....	30
3.8.12	Spermatická Proteomika	30
3.8.13	Spermatická transkriptomika	31
4	Diskuze	32
5	Závěr.....	34
6	Literatura.....	35

1 Úvod

Umělá inseminace (UI) patří mezi první biotechnologie, které byly využity ke zlepšení reprodukce a genetiky hospodářských zvířat (Foote 2002). UI byla poprvé úspěšně aplikována na dobytek na počátku 20. století (Moore & Hasler 2017). Měla obrovský dopad celosvětově u mnoha druhů zvířat, zejména u mléčného skotu. (Foote 2002). Rennerberg et al. (2017) trdí, že až 90 % dojného skotu ve vyspělých zemích je narozeno právě po umělé inseminaci. Následný vývoj umělé inseminace zahrnoval vývoj prvních ředidel, vynalezení elektroejakulátoru, přidávání antibiotik do spermatu během 30. a 40. let 20. století. K zásadní události došlo v roce 1949, kdy byla poprvé využita kryokonzervace spermatu pomocí glycerolu (Moore & Hasler 2017).

Přijetí technologie umělé inseminace ve světě bylo impulsem pro vývoj dalších technologií, jako je třídění spermií pro výběr pohlaví, embryotransfer a klonování (Foote 2002). UI je nejméně invazivní metodou asistované reprodukce v oblasti chovu zvířat. Smyslem umělé inseminace je urychlit genetické zlepšení zvířat, a tím zvýšit jejich užitkovost. Cíle je dosahováno prostřednictvím přísné selekce geneticky kvalitních plemenů jejichž sperma je používáno k oplodnění tisíců samic (Awan et al. 2021). Byly vyvinuty nové, vysoce účinné metody hodnocení plemenů (Foote 2002).

Predikce plodnosti spermií má prvořadý význam pro chovná stáda zvířat, kde je aplikována umělá inseminace (Gadea 2005).

Výsledek inseminace může být ovlivněn mnoha faktory. Mezi nejdůležitější faktory patří plodnost býků (Filipčík et al. 2023). Konkrétní býk může být využit i statisíckrát při umělém oplodnění (Kastelic 2013). Plodnost býka je definovaná jako schopnost spermií oplodnit oocyt a podporovat embryonální vývoj. Přesné hodnocení kvality spermatu jako prediktorů plodnosti u býků zůstává klíčovým výzkumným cílem pro další pokrok v genetickém výběru u skotu. (Bollwein & Malama 2023; Özbek et al. 2021).

Kvalita a kvantita spermatu býků je zodpovědná za reprodukční úspěch v chovu skotu (Tanga et al. 2021). Mezi parametry kvality spermatu býků patří objem, hustota, motilita, koncentrace spermií (Sankhi et al. 2019). Morrell (2014) uvádí, že mohou být zkoumány i další parametry jako například integrita plazmatické membrány, akrozomu, DNA a mitochondriální aktivita.

V posledních desetiletích bylo vyvinuto značné úsilí pro zlepšení opakovatelnosti a přesnosti metod, jejichž prostřednictvím hodnotíme kvalitu spermatu ve vzorcích čerstvě odebraných ejakulátů nebo zmrazených a rozmražených šarží spermatu (Bollwein & Malama 2023).

Každá chovatelská společnost má své vlastní standardy kontroly kvality pro dávky zmrazeného spermatu pro umělou inseminaci. Pro dosažení standardů je odebraný ejakulát hodnocen na koncentraci, pohyblivost spermií a na morfologii, v závislosti na interních standardech kvality společnosti. (Hurri et al. 2022).

Vzorky čerstvého spermatu, které splňují tyto prahové hodnoty, jsou zmrazeny jako inseminační dávky. K dalšímu hodnocení kvality spermií dochází až po rozmrazení a následně jsou uvolněny k prodeji pouze vzorky, které v této fázi dosahují přijatelných prahových hodnot. (Hurri et al. 2022).

Fertilizace je složitý proces a neexistuje žádná spolehlivá metoda, která by dokázala vyhodnotit komplikované interakce, ke kterým dochází od transportu spermií k oplodnění (Larsson & Rodriguez-Martinez 2000). Potvrzená březost je jediným nezvratným důkazem, že spermie je schopna oplodnění (Roldan 2007). Jen málo jednofunkčních testů skutečně odráží plodnost in vivo (Oh et al. 2010).

Hlavním cílem kontroly kvality spermatu je určit souvislost mezi kvalitou spermatu a plodností. (De Jarnette et al. 2022). V současné době existují desítky laboratorních metod, které jsou zaměřeny na predikci plodnosti. Tyto metody vykazují určitou míru korelace s fertilizační schopností (Larsson & Rodríguez-Martínez 2000), a proto je důležité pečlivě sledovat využívané in vitro analýzy, zhodnotit jejich schopnosti a posoudit jejich potenciál v predikci fertilizační schopnosti. (Amann & Waberski 2014).

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je podrobněji prozkoumat průtokovou cytometrii a další *in vitro* analýzy spermatu, které slouží k posouzení jeho kvality a predikci fertilizační schopnosti. Dále na základě získaných poznatků určit která analýza nejvíce souvisí s fertilizační schopností.

3 Literární rešerše

3.1 Obecná fyziologie fertilizace u skotu

Fertilizace je definována jako proces spojení dvou gamet, vajíčka a spermie. Po setkání vajíčka a spermie ve vejcovodu se spustí proces, který vede k oplození, vzniku a vývoji nových jedinců. Proces začíná druhově specifickou vazbou spermie na vajíčko a končí jejich splnutím (Wassarman et al. 2001).

Oplození je sekvence koordinovaných molekulárních událostí zahrnujících sloučení spermie s vajíčkem, fúzi pronukleí a promísení mateřských a otcovských chromozomů. První formou života je zygota (diploidní buňka) ze které vznikne nový organismus (Georgadaki et al. 2016).

Při oplození se do pochvy dostanou miliony spermií. Řada z nich v kyselém prostředí zemře. Spermie poté prochází skrz cervikálním hlen směrem k děloze a poté k vejcovodům. Děloha díky svým kontaktům usnadňuje spermiím průchod až k vejcovodům. K oplození dochází v horní třetině vejcovodu. (Georgadaki et al. 2016). Wassarman et al. (2001) uvádí, že nejde pouze o náhodné setkání spermie s vajíčkem, ale hraje zde roly tzv. Chemoantrakt. Jde o tepelně stabilní peptidy, které produkují folikulární buňky obklopující vajíčko (Wassarman et al. 2001).

Spermie musí zůstat ve vejcovodu přibližně 6 hodin, aby získaly schopnost oplození. Během této doby spermie procházejí řadou biochemických transformací, které se souhrnně nazývají kapacitací (Zoca et al. 2023). Kapacitace býčích spermií zahrnuje vyplavování cholesterolu (Štiavnická et al. 2023), přeměnu fosfolipidové plazmatické membrány (zejména expozici zbytků fosfatidylserinu) (Bollwein & Malama 2023), příliv vápníku, zvýšení intracelulárního pH (Štiavnická et al. 2023), migraci proteinů na povrchu plazmatické membrány, vznik oblastí bez proteinů (Ferrer et al. 2017), ztenčení plazmatické membrány a také odhalení receptorů pro fúzi s oocyty. Kapacitaci také doprovází změna vzorce motility z progresivní na hyperaktivovanou, což zvyšuje propulzi spermií, usnadňuje jejich uvolnění z rezervoáru spermií a také penetraci skrz zonu pellucidu obklopující oocyt. Kapacitace je dokončena teprve tehdy, když se spermie spojí se zónou pellucida a uvolní svůj akrozomální obsah (Štiavnická et al. 2023). Poté co se spermie setká s vajíčkem musí se nejprve navázat druhově specifickým způsobem k silnému extracelulárnímu povlaku zvanému zona pellucida. Jakmile se spermie naváže na zónu pellucidu, musí podstoupit akrozomovou reakci neboli buněčnou exocytózu (Wassarman et al. 2001). Což je exocytotický proces závislý na Ca^{2+} . (Yanagimachi 2011). Akrozomální reakce je charakterizována mnohočetnými fúzemí plazmatické membrány v přední oblasti hlavičky spermie s vnější akrozomální membránou přímo pod plazmatickou membránou (Yanagimachi 2011).

Spermie poté musí proniknout skrz zónu pellucidu do periviteliního prostoru kde se naváže na plazmatickou membránu se kterou bude probíhat fúze. Jakmile dojde k fúzi jedné spermie není již možná fúze s dalšími spermiemi (Wassarman et al. 2001). Jakmile spermie vstoupí do oocytu při oplození, hlavička spermie se dekonduzuje a vytvoří samčí pronukleus, což je zásadní událost směrem k vytvoření zygoty (Hossain et al. 2011). V tento okamžik se vytvoří jediná diploidní buňka, zygota, ze které se vyvine nový individuální organismus (Georgadaki et al. 2016).

3.2 Inseminační dávky (ID) pro potřeby umělé inseminace

3.2.1 Inseminace

Umělá inseminace (UI) je uznávána jako šlechtitelská metoda, která přispívá ke zlepšení populací hospodářských zvířat (Barszcz et. al. 2012).

U skotu hraje umělá inseminace zásadní roli nejen pro úspěšné založení březosti, která je předpokladem pro zahájení následné laktace, ale také pro urychlení genetického zlepšení a usnadnění distribuce semene od geneticky elitních samců (Diskin 2018). Umělá inseminace je základní technikou v chovných programech s testováním potomstva. Poskytuje příležitost vybrat si plemeníky, u kterých bylo prokázáno, že přenášejí požadované vlastnosti na další generaci a minimalizuje riziko šíření pohlavně přenosných chorob (brucelóza, listeróza, leptospiróza, trichomoníáza) a genetických vad. Inseminace také zvyšuje intenzitu selekce, protože je potřeba méně chovných býků (Tadesse 2010). Další z hlavních výhod umělé inseminace je eliminace nákladů a nebezpečí při udržování býka na farmě. Umožňuje páření zvířat s velkými rozdíly ve velikosti bez toho, aniž by došlo ke zranění kteréhokoli ze zvířat. Je možné inseminovat zvířata, která odmítají stát nebo přijímat samce i v době říje. Pomáhá v udržování přesných záznamů o chovu a otelení a zvyšuje míru zabřezávání (Johnson 2011).

Navzdory dobře známým výhodám umělého oplodnění jsou zde stále i chovatelé kteří preferují přirozenou plemnitbu ve svých chovech. Hlavní argument odůvodňující jejich volbu jsou údajně vyšší náklady při využití inseminace ve srovnání s náklady na chov býků. (Thomas 2014). Zmiňují též zvýšené náklady vyplývající z prodloužených intervalů porodů z důvodu nízké míry detekce říje při použití umělé inseminace. UI je také více náchylná na lidské pochybení při načasování zapouštění i při samotném zákroku (Thomas 2014).

3.2.2 Činitelé ovlivňující kvalitu ejakulátu

Vzhledem k tomu, že umělá inseminace je u skotu široce používána, hodnocení spermatu hraje zásadní roli nejen při úspěšném zabřeznutí, ale také při usnadnění genetického zlepšení a a splnění produkčních cílů. U býků ovlivňují kvalitu spermatu vnější faktory jako věk, plemeno, genetické založení, zdraví a tělesná kondice. Dále pak vnější faktory jako jsou interval odběru, výživa, roční období (Tanga et al. 2021), stres (např. onemocnění nebo tepelný stres z prostředí) které mohou ovlivnit motilitu a morfologii spermií (Dalton 2019).

Plodnost samců je důležitým faktorem reprodukce skotu, protože jeden býk je využíván k oplození mnoha krav, zejména po zavedení technologie umělého inseminace. Hodnocení samčí plodnosti je založeno především na hodnocení spermatu po rozmrazení pomocí konvenčních parametrů, jako je pohyblivost spermií, morfologie, životaschopnost, integrita membrány a akrozomu (Kathiravan et al. 2011). Ačkoli se na výskytu neplodnosti podílejí samci i samice stejnou mírou, význam samčí neplodnosti je u skotu vyšší kvůli širokému využití umělé inseminace, kdy se sperma jednoho býka používá k zapouštění několika tisíc krav (Raval et al. 2024). Plodnost býka je definovaná jako schopnost spermie oplodnit oocyt a podporovat embryonální vývoj (Bollwein & Malama 2023; Özbek et al. 2021). Plemenní býci jsou vybíráni na základě jejich schopnosti projít testy, které zahrnují fyzické posouzení zdatnosti býků a

konvenční mikroskopické hodnocení kvality spermatu. Plodnost je však multifaktoriální vlastnost ovlivněná několika faktory a pro úspěšnou fertilizaci musí být spermie strukturálně a funkčně kompetentní. Hodnocení motility a morfologických parametrů spermií proto nepředpovídá schopnost oplodnění, protože spermie s normální pohyblivostí a morfologií mohou při procesu oplození selhat. (Raval et al. 2024).

Významné procento reprodukčních selhání u skotu je připisováno subfertilitě býků a subfertilní býci mohou vést k významným finančním ztrátám. Kromě toho se kvalita spermatu může v průběhu života býka lišit a dokonce i plodní býci mohou produkovat ejakuláty se špatnou schopností oplodnění v závislosti na jejich věku nebo prostředí. Protože nelze předpokládat plodnost býka, je nutné ji sledovat pravidelným zkoumáním chovných záznamů a posuzováním kvality semene (Sellem et al. 2015).

Jeden ejakulát obsahuje dostatečné množství spermií pro tisíce inseminací, avšak pouze 10 až 20 inseminací neřaděného spermatu. Od jedinců starších 18 měsíců by měl přijatý ejakulát obsahovat minimálně 70 % pohyblivých spermií (s přímočarým pohybem), 80 % spermií bez morfologických změn a 500 tisíc spermií v 1 mm³. (Barszcz et al. 2012).

3.3 Metody odběru ejakulátu

Pro odběr spermatu u býků lze využít více metod. Mezi nejčastěji využívané metody patří odběr pomocí umělé vagíny a elektroejakulace (EEJ). Alternativně lze využít i trasrektální masáže či aspirace spermatu přímo z pochvy krávy (Palmer 2005).

Odběr spermatu pomocí umělé vagíny je nejběžněji používaný v inseminačních stanicích a umožňuje také pozorování dalších aspektů včetně reprodukčního chování. (Rego et al. 2015) Odběr spermatu touto metodou vyžaduje aktivní účast býka a velmi se přibližuje přirozenému rozmnožování (Palmer 2005). Odběr spermatu do umělé vagíny, avšak vyžaduje dobrou fyzickou kondici býků, normální libido a v neposlední řadě také výcvik a dobrou manipulovatelnost (Rego et al. 2015).

Umělá vagína byla významným pokrokem v procesu odběru vzorků spermatu a byla vynalezena v roce 1914 a ve 30. letech 20. století ji vědci v Rusku upravili pro použití u býků. (Moore & Hasler 2017) Při této metodě je sperma odebráno pomocí jednorázové zkumavky připojené k předehřáté (38 °C) sterilní umělé vagíně (Bucher et al. 2019). Nespornou výhodou umělé vagíny je skutečnost, že můžeme odebírat čisté vzorky, které nejsou kontaminovány vaginálními sekrety. Narozdíl od předchozích pokusů odebírat ejakulované sperma ze skutečných vagín samic (Moore & Hasler 2017).

Při elektroejakulaci se do samčího rekta umístí transrektální sonda, která je vybavena elektrodami, které vysílají elektrické pulzy o nízkém napětí (Pernas et al. 2023).

Pro elektroejakulaci je nutná vhodná fixace býka a pokud je spravována vhodně vyškolenými osobami tak vzorky spermatu lze odebrat od velké většiny samců. Vzorky odebrané elektroejakulací mohou mít větší objem a nižší koncentraci spermií ve srovnání se vzorky získanými odběrem do umělé vagíny (Rego et al. 2015). Elektroejakulace domácích zvířat byla poprvé popsána v roce 1936. Většina moderních elektroejakulátorů využívá sinusový puls o frekvenci 20-30 cyklů/s. Nelze však popřít, že reakce zvířat při vědomí na EEJ

představuje problém v oblasti welfare. Intenzivní svalové kontrakce, zápasení, vokalizace a občasné převrácení do lehu spojené s EEJ u býků svědčí o jejich nepohodlí (Palmer 2015).

3.4 Makroskopické metody hodnocení odebraného ejakulátu

Odebraný ejakulát by měl mít relativně jednotný, neprůhledný vzhled, který svědčí o vysoké koncentraci spermií. Ejakulát se skládá ze spermií a tekuté části zvané semenná plazma. Konečné složení semene závisí na úrovni vývoje přídatných pohlavních žláz, podílu sekretů z reprodukčních orgánů a na celkovém objemu spermií. Vůně by měla připomínat kravské kravské mléko a textura by měla být mléčná nebo jako mléko se smetanou. (Ax et al. 2016).

Barva spermatu je prvním sledovaným parametrem viditelný pozorováním, který se provádí mezi ostatními charakteristikami spermatu (Kanchan & Matharoo 2015).

Barva by měla být bílá či krémová. Za patologické jsou považovány následující barvy ejakulátu (Ax et al. 2016):

- Růžová nebo červená – naznačují přítomnost krve, která se objevuje jako výsledek abraze penisu, močových kamenů
- Zelená – naznačuje přítomnost hnisu
- Žlutá – svědčí o přítomnosti moči
- Vodnatá bílá – naznačuje menší množství spermií nebo vody, která se dostala do spermatu při odběru (Ax et al. 2016).

3.5 Mikroskopické metody hodnocení odebraného ejakulátu

3.5.1 Hodnocení motility odebraného ejakulátu

Motilita je jedním z nejdůležitějších parametrů používaných pro hodnocení kvality spermií (Contri et al. 2010). Byly popsány nízké, ale významné vztahy mezi motilitou a fertilitou (Sellem et al. 2015). Motilita je nezbytná pro to, aby spermie dosáhly místa oplodnění ve vejcovodu. Byly však popsány velké rozdíly v subjektivním odhadu motility spermií, a to i při hodnocení stejných ejakulátů (Contri et al. 2010). Vysoký počet nepohyblivých a neživotaschopných spermií může být způsoben epididymální patologií. Vysoký počet nepohyblivých a životaschopných spermií může být způsoben strukturálními defekty bičíku. (Sunder & Leslie 2022).

Procento pohyblivých spermií bylo rutinně hodnoceno vizuálním odhadem pomocí mikroskopu ve světlém poli. Které zahrnovalo použití světelného mikroskopu a mikroskopu s fázovým kontrastem s použitím objektivů 20 a 40×. Mikroskop by měl být vybaven ohřívačem stolku, který lze nastavit na 37 °C, a úrovně zvětšení by měly umožnit jasnou vizualizaci vzorků spermií (Tanga et al. 2021).

Manuální hodnocení se však ukázalo jako pomalé, přibližné a základní. Navíc je vysoce citlivé na subjektivní chyby a je třeba školit techniky, aby se zvýšila opakovatelnost odhadu (Prete et al. 2022). Proto se Počítačově asistovaná analýza spermatu (CASA) v současnosti stává nejoblíbenější metodou hodnocení motility spermií. (Sellem et al. 2015).

3.5.2 Hodnocení koncentrace a morfologie odebraného spermatu

Stanovení koncentrace spermií spolu s hodnocením morfologie je důležitou metodou pro hodnocení plodnosti. Koncentraci spermií na ml spermatu lze určit spočítáním spermií v komoře hemocytometru (Tanga et al. 2021). Počty spočítaných buněk jsou však při této metodě nízké (několik stovek), a výsledky jsou proto statisticky nepřesné. Později byly zavedeny spektrofotometrické metody (miktobuňky a fotometry), potenciálně přesnější, ale trpící tím, že zbytky nespermatických částic ve vzorku by můžou rušit a zkreslovat výsledky (Petrukina & Harrison 2011). Existuje také možnost podhodnocení či nadhodnocení počtu spermií v závislosti na typech používaných přípravků. Kalibrace zařízení pro měření koncentrace je zásadní pro zajištění přesného počtu spermií na dávku. Kromě těchto metod lze koncentraci spermií stanovit také pomocí CASA a průtokového cytometru (Tanga et al. 2021). Čerstvě odebraný býčí ejakulát by měl dosahovat koncentrace spermií 0,6 až 1,5 x 10⁶ v mm³ a pH 6,2 až 6,8 (Ax et al. 2016). Při morfologickém hodnocení se zjišťuje také přítomnost dalších buněk, jako např. leukocytů, erytrocytů, epitelových buněk atd (Barszcz et al. 2012).

Morfologické abnormality vyplývající z poruch během spermatogeneze mohou mít nepříznivý vliv na funkci spermií a fertilitu (Sellem et al. 2015; Sunder & Leslie 2022) a vzhledem k místu vzniku defektu se rozlišují na dvě skupiny rozlišují:

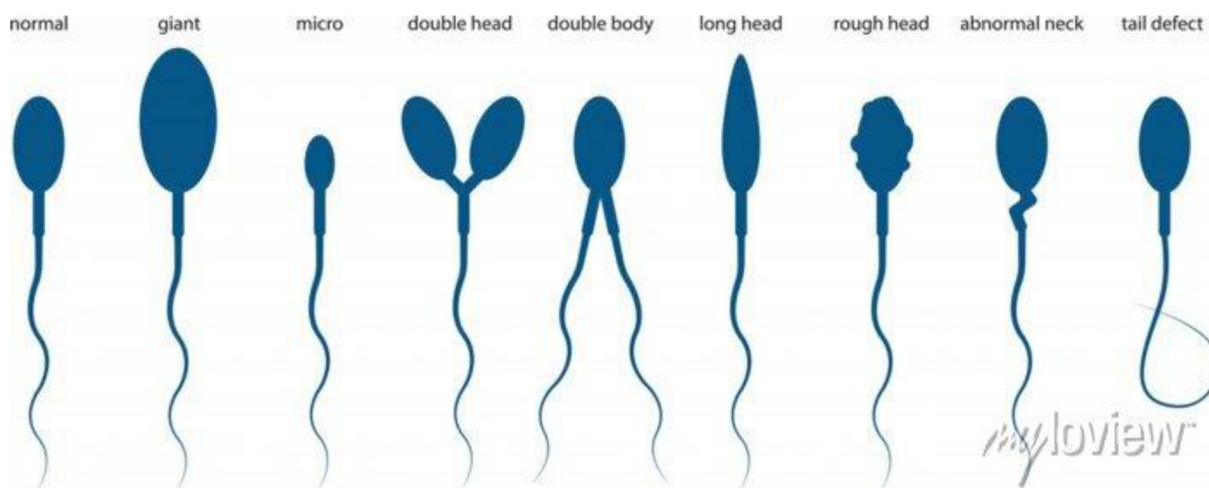
- I – Primární změny vzniklé během spermatogeneze a jsou výsledkem patologických procesů ve varlatech.
- II – Sekundární změny, které se objevují po definitivním vytvoření spermie a jejím opuštění varlat.

Mezi časté defekty hlavičky spermie u skotu patří: oddělená hlavička, defekty velikosti a tvaru hlavičky, jaderné vakuoly, akrozomální defekty, dvojitá hlavička. Mezi defekty střední části spermie patří distální reflex střední části, prohnutá střední část, proximální kapky, pseudokapky, abaxiální připojení ocasu, dvojitá střední část a segmentální aplazie. Mezi vady ocasu zahrnovaly ohnutý ocas a stočený ocas. (Menon et al. 2011).

Příčiny defektní struktury spermií mohou být environmentální, genetické nebo kombinace obou. Ačkoli environmentální příčiny jsou považovány za nejčastější, roste seznam příčin, které mohou spermie způsobit strukturálních defektů, které jsou považovány za genetického původu. Přestože je dědičnost plodnosti býků obecně považována za nízkou, určité aspekty plodnosti býků, včetně morfologických abnormalit spermií, jsou geneticky podmíněné (Chenoweth 2005).

Mezi časté geneticky podmíněné vady patří (Chenoweth 2005):

- Defekty akrozomu (knoflíkovitý, zvlněný a neúplný)
- Vady hlavy (abnormální kondenzace, dekapitace, kulatá hlava, srolovaná hlava, jaderný hřeben)
- Abnormality střední části (defekt „Dag“, defekt „vývrtka“)
- Vady ocasu („defekt pahýlu ocasu“, primární ciliární dyskineze) (Chenoweth 2005)



Obrázek 1 Vybrané morfologické abnormality spermií

(<https://myloview.com/poster-sperm-morphology-normal-and-abnormal-sperm-no-C8A0989>)

Perry (2021) ve své studii popsal abnormality spermií, které neměli žádný vliv na plodnost býka. Patří mezi ně spermie s abaxiálním ocasem, spermie s menší segmentální aplazií, distálními kapénky, mírně ohnutým středem či spermie mírně pyrifonní (Perry 2021).

Dle studie Enciso et al. (2011) existuje jasný vztah mezi morfologicky abnormálním býčím spermatem a špatnou kvalitou DNA. Zejména velké abnormality spermií, které by potenciálně mohly mít genetický původ nebo být výsledkem abortivního apoptotického mechanismu jsou úzce spojeny s přítomností vysoce poškozené molekuly DNA (Enciso et al. 2011).

Je prokázáno, že jakýkoli environmentální stres dostatečný k tomu, aby způsobil zvýšení cirkulujícího kortizolu je dostatečný k ovlivnění morfologie spermií. Analogické abnormality byly pozorovány po vystavení teplu, ať už v důsledku obezity, abnormality šourku, klimatu nebo zvýšené teploty. Ukázalo se, že nutriční nedostatky během vývoje, ať už prenatální, před odstavením nebo před prodejem ovlivňují zrání spermií. V dospělosti může mít omezení výživy nebo změna diety škodlivé účinky zejména u býků predisponovaných k rozvoji určitých abnormalit spermií (Tanga et al. 2021).

Morfometrické charakteristiky spermií jsou jedním z nejdůležitějších ukazatelů plodnosti. Je všeobecně uznáváno, že morfologie spermií má významný vliv na plodnost *in vivo* i *in vitro* a proto je nedílnou součástí funkčního testu spermií. Pro hodnocení morfologie spermií se používají různé metody fixace a přípravy nátěru. Pro žádný konkrétní živočišný druh však nebyla standardizována optimální metoda. V rámci laboratoří i mezi nimi existuje vysoká variabilita, pokud jde o přesné hodnocení morfologie spermií. Počítačová analýza morfologie spermií je známá jako automatizovaná morfometrická analýza spermií (ASMA). ASMA umožňuje morfologické hodnocení živých spermií. (Tanga et al. 2021).

3.6 Výroba a uchovávání inseminačních dávek

V současnosti se býčí semeno nejčastěji plní do francouzských pejet o objemu 0,25 nebo 0,50 ml. Kromě toho, že usnadňují balení spermatu, označování, skladování a přepravu, usnadňují pejety také jednodušší kontrolu zmrazování a rozmrazování, což v konečném důsledku vede k lepší obnově spermatu po rozmrazení. Velkou nevýhodou pejet je však jejich náchylnost k nesprávnému zacházení, zejména 0,25 ml brček, které jsou nejoblíbenější v Evropě a Kanadě. Pejety o objemu 0,25 ml mají velký poměr povrchu k objemu ve srovnání s brčky o objemu 0,5 ml, což je činí náchylnými k rychlým teplotním výkyvům (Diskin 2018).

Ejakulát naplněný v pejetách lze uchovávat krátkodobě (zhruba 3 dny při teplotě okolo 5 °C) či dlouhodobě (po neomezeně dlouhou dobu při uložení při -196 °C v kapalném dusíku) (Gillespie & Flanders 2010; Murphy et al. 2016).

Inseminační dávky jsou nejprve ekvilibrovány při 4 °C po dobu 24 hodin. A poté dochází k zmrazování pomocí počítačem podporované mrazicí komory s rychlostí poklesu teploty 4,7 °C/min až -10 °C, 29 °C/min až -68 °C a 10 °C/min až -140 °C. A hned poté je zmrazené sperma skladováno v kapalném dusíku (-196 °C) (Bucher et al. 2019). Seidel ve své studii (2011) doporučil, aby 3 s byly maximální dobou pro přesun 0,25 ml brček z jedné nádrže s tekutým dusíkem do druhé bez poškození spermatu a podobně pro přesun z nádrže do rozmrazovací baňky (Seidel 2011).

Optimální metoda zmrazení musí zaručit uspokojivou životaschopnost spermií i po rozmrazení. Nemělo by docházet k poškození plazmatické membrány, akrozomu ani ke zhoršení mitochondriální aktivity. Pro úspěšnou kryokonzervaci spermií má rychlost zmrazování zásadní význam. Rychlost zmrazení dostatečně pomalá, aby mohla voda opustit buňky spermií. Tím se zabrání krystalizaci intracelulární vody a následnému kryopoškození během zmrazování. Na druhou stranu optimální rychlost zmrazování musí být dostatečně rychlá, aby buňky během zmrazování rychle prošly kritickým teplotním rozsahem (-10 °C až -25 °C) (Savullidi et al. 2021).

3.6.1 Rozmrazování ID

Rozmrazování zmrazeného spermatu by mělo probíhat maximální rychlostí. Rychlé rozmrazování snižuje škodlivé účinky rekrystalizace a rehydratace vody, a tím zabraňuje poškození membrány spermií a cytoplazmy. Kritická teplotní zóna pro tvorbu ledových krystalů je mezi -50 °C a 0 °C. Rychlá progresse touto teplotní zónou znamená, že sperma přechází ze skelného do tekutého stavu a ledové krystaly nemají dostatek času na vytvoření (Diskin 2018). Nejčastěji praktikovaná je teplota rozmrazování 35 °C po dobu 45 sekund, jelikož zvyšuje pohyblivost spermií ve srovnání se spermatem rozmrazovaným při jiných teplotách. (Moore & Hasler 2017). Manipulace se spermatem, je kriticky důležitá. Rozmrazené sperma je třeba chránit před chladem a tepelnými šoky a inseminovat do 6 až 8 minut po rozmrazení (Diskin 2018).

3.6.2 Poškození spermií v průběhu kryokonzervace

Chladový šok při zmrazování a rozmrazování snižuje kvalitu spermií. Proto byla vyvinuta řada ředidel, aby se snížilo poškození způsobené mrazem a zlepšila se životaschopnost po rozmrazení (Ugur et al. 2019).

Ve srovnání s čerstvým ejakulátem je životaschopnost zmrazených – rozmražených spermií stále v průměru relativně nízká a mezi plemennými býky se významně liší. Kryokonzervace býčích (a lidských) spermií předstihla ostatní druhy, přesto stále existuje prostor pro zlepšení, protože velké části spermií jsou stále značně poškozeny (Madeja et al. 2022). Proces kryokonzervace obecně snižuje životaschopnost spermatu a poškozuje všechny struktury spermií, čímž narušuje schopnost oplodnění (Ugur et al. 2019). Při výrobě inseminačních dávek je funkční stav spermií je ovlivněn mnoha faktory, jako je pH, osmotický tlak a stres spojený se změnami teploty (Vodička et al. 2022). Tyto stresové faktory zasahují do struktury membrán spermií, mění funkce membránových proteinů a iontových kanálů, způsobují předčasnou kapacitaci, předčasnou akrozomovou reakci a vytváří nadměrné reaktivní formy kyslíku. Kromě toho kryokonzervace snižuje jak metabolismus spermií, tak mitochondriální aktivitu a mění strukturu chromatinu spermií. Všechny tyto účinky mají za následek nižší motilitu a fertilizační schopnost zmrazených a rozmražených spermií (Gomes et al. 2020). Januskauskas et al. (2003) je své studii tvrdí, že kryokonzervace primárně ovlivňuje membrány spermií. Rozsah poškození membrány se může lišit od změn v organizaci, fluiditě, permeabilitě a lipidovém složení membránové dvojvrstvy až po celkové narušení membrány. Mezi membrány spermií ovlivněné kryokonzervací patří plazmatická membrána, vnější akrozomální membrána a mitochondriální membrány (Januskauskas et al. 2003).

Kryokonzervace také snižuje funkční a strukturální integritu býčích spermií a je spojena s produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS). Oxidační stres během zmrazování spermatu savců může způsobit funkční a strukturální poškození spermií (Baumber et al. 2005). Přestože býčí sperma má přirozený obranný systém proti ROS, je považován za nedostatečný v ochraně spermií při stresu zprostředkovaném kryokonzervací (Nichi et al. 2016). Pomocí přidání vhodných kryoprotektivních látek eliminujeme vznik těchto negativních účinků. Proces chlazení a zmrazování je třeba vést pomocí optimálních křivek (Vodička et al. 2022).

3.7 Ředění ID

Ředění spermatu je běžně používaný postup, který umožňuje přesnější hodnocení kvality spermatu a zlepšuje jeho životnost. Ředění je obzvláště důležité pro skladování spermatu, jelikož se komerční účely využívá hlavně zmrazené sperma (Hayden et al. 2015).

Úspěšná kryokonzervace spermií závisí na několika vzájemně propojených faktorech, včetně počáteční kvality spermatu, složení ředidla, použitých kryoprotektivech, chladicím protokolu, balení, rychlosti rozmrazování a také na vzájemném působení těchto složek, jakož i na individuálních rozdílech u jednotlivých zvířat (Layek et al. 2016).

Zdokonalování výroby inseminačních dávek je proto stále nepřetržitým procesem mimořádného významu, protože po rozmrazení se obnoví přibližně jen 50 % spermií, a to i při nejrafinovanějších a nejkontrolovanějších podmínkách a úpravách zmrazování (Layek et al. 2016).

3.7.1 Kryoprotektiva

K ochraně spermií před fyzikálními a chemickými stresory jsou využívána kryoprotektiva které se přidávají do ID. Kryoprotektivní látky nemohou zabránit změnám v membránové fázi, ale mohou snížit rychlost dehydratace během zmrazování, což pak snižuje tvorbu ledových krystalů v buňce. (Ugur 2019) Vhodně zvolená kryoprotektiva jsou důležitým faktorem v procesu kryokonzervace. Měli by vykazovat vlastnosti jako je adekvátní pH, dobrá pufrovací kapacita, vhodná osmolalita a schopnost chránit spermie před kryogenní lézí (Patel et al. 2016).

3.7.1.1 Penetrující kryoprotektanty

Glycerol

Penetrační kryoprotektivní látky, jako je glycerol, procházejí buněčnou membránou a chrání buňku před poškozením způsobeným pomalým zmrazením. Glycerol je nejrozšířenějším kryoprotektantem pro býčí spermie, protože snižuje mechanické poškození spermií během procesu zmrazování (Fernandez-novo et al. 2021). Pokud je glycerol použit ve vyšších než stanovených koncentracích, může však způsobit velké osmotické poškození spermií, protože prochází membránou spermií mnohem pomaleji než jiná kryoprotektiva (Guthrie et al. 2002). Některé studie poukázali na to, že nízkomolekulární kryoprotektivum, jako je ethylenglykol (EG), může způsobit menší poškození spermií, než když se použije glycerol, protože jeho nízká molekulová hmotnost mu umožňuje snadněji procházet plazmatickou membránou (Fernandez-novo et al. 2021). V posledních letech se glycerol nebo ethylenglykol běžně používají jako kryoprotektivum u býků (Taşdemir et al. 2013).

Jednoduché cukry

Cukr udržuje osmotický tlak ředidel tím, že indukuje dehydrataci buněk a menší tvorbu ledových krystalů. (Purdy 2006). Cukr je také využíván spermii jako zdroj energie prostřednictvím glykolýzy a mitochondriální oxidační fosforylace k podpoře motility a pohybu spermií (Naing et al. 2010).

3.7.1.2 Nepenetrující kryoprotektanty

Nepenetrující kryoprotektanty jsou obecně velké molekuly, jako jsou polymery, disacharidy, proteiny nebo aminokyseliny. Mezi disacharidy používanými jako kryoprotektiva vykazuje nejlepší kryoprotektivní účinek sacharóza. (Iaffaldano et al. 2014).

Nepenetrující kryoprotektivní činidla, včetně dextrózy, dextranu a polyethylenglykolu, mimo jiné, podporují rychlou dehydrataci buněk, aby se zabránilo tvorbě ledových krystalů; často se používají společně s penetračními kryoprotektivními činidly (Fernandez-novo et al. 2021).

Vaječný žloutek

Vaječný žloutek patří mezi nepenetrující kryoprotektanty jelikož obsahuje velké molekuly. Vaječný žloutek je široce používán v ředidlech pro zmrazování spermatu a osvědčil se jako účinný pro ochranu savčích spermií před chladovým šokem během procesu zmrazování a rozmrazování. (Holt 2000).

Standartně se pro kryokonzervaci spermatu skotu používají ředidla na bázi 20% vaječného žloutku. Ačkoli je známo, že vaječný žloutek zabraňuje poškození buněk během kryokonzervace, přítomnost látek v granulích žloutku včetně lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL) a minerálů inhibuje dýchání spermií a snižuje jejich pohyblivost (Ugur et al. 2019). Avšak lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL) vaječného žloutku chrání spermie před poškozením tím, že pokrývají membránu spermií během zmrazování a rozmrazování (Laffaldano et al. 2014). Ačkoli většina ředidel obsahuje samotný vaječný žloutek jako kryoprotektant, některé mohou být doplněny glycerolem. Ohledně využití vaječného žloutku jako ředidla však existují i určité obavy ohledně biologické bezpečnosti a možnosti, že obsah vajec může změnit strukturu a fyziologii spermií. (Ugur et al. 2019).

3.7.2 Bezžloutková ředidla

Většina konvenčních ředidel spermatu je na bázi vaječného žloutku, zatímco relativně nově vyvinutá ředidla se skládají výhradně z rostlinných složek (Murphy et al. 2018). Rostlinná ředidla by měla poskytovat srovnatelnou kvalitu zmrazených inseminačních dávek a zároveň eradikovat možné nevýhody ředidel na bázi vaječného žloutku, jako je přenos nemocí, mikrobiální riziko a potíže se standardizací. Stále však přetrvávají obavy ze snížení plodnosti, když se při kryokonzervaci býčího semene používají kryoprotektiva na rostlinné bázi (Layek et al. 2016). Zatímco některé studie potvrdily srovnatelnou kvalitu *in vitro* nebo míru plodnosti inseminační dávky, která byla ředěna kryoprotektantem bez vaječného žloutku. (Vodička et al. 2022). Fernandez-novo et al. (2021) tvrdí, že komerčně dostupná ředidla na bázi sójového lecitinu mohou ovlivnit některé faktory spermatu jako například motilitu spermií.

3.7.3 Antibiotika

Použití antibiotik v ředidlech spermatu přispívá k zachování kvality a bezpečnosti samčích zárodečných buněk, zejména proto, že většina mikroorganismů vzniklých při zpracování spermatu dokáže přežít teploty tekutého dusíku (-196°C). (Moreira et al. 2022). Bakterie se mohou dostat do ejakulátu během jeho odběru a zpracování. Některé typy bakterií mají škodlivý vliv na kvalitu spermatu během skladování a některé mohou způsobit onemocnění u inseminovaných samic (Morrell et al. 2014). Pokud by došlo k bakteriální kontaminaci inseminační dávky mohlo by to také ovlivnit některé morfologické a funkční parametry spermií (Moreira et al. 2022). Nejčastěji se využívají antibiotika jako gentamicin, tylosin, linkomycin-spektinomycin, penicilin, streptomycin, amikacin a popřípadě lze využít i jejich kombinace (Morrell et al. 2014).

3.7.4 Alternativy antibiotik

Moreira et al. (2022) uvádějí, že nesespecifické užívání antibiotik může přispět k rozvoji bakteriální rezistence a naznačují, že některá antibiotika mohou negativně ovlivňovat kvalitu spermatu. Z toho důvodu se diskutují o možnosti vyhnout se používání antibiotik v ředidlech pro kryokonzervaci spermatu, a to především proto, že samotný proces kryokonzervace také způsobuje snížení bakteriální zátěže (Moreira et al. 2022).

Alternativní metody inhibice bakterií ve spermatu jsou založeny na přidání nekonvenčních antimikrobiálních látek, jako jsou rostlinné extrakty, antimikrobiální peptidy,

nanočástic oxidu železitého nebo využití metod centrifugace při které dochází k separaci bakterií od spermií (Morrell et al. 2014).

3.7.5 Antioxidanty a aminokyseliny

Aminokyseliny hrají důležitou roli v prevenci oxidačního poškození spermií během konzervace (Patel et al. 2016). Antioxidanty jsou molekuly, které inhibují tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) a peroxidaci lipidů. Superoxiddismutáza, glutathionperoxidáza a kataláza patří mezi antioxidanty, které jsou významné pro funkci spermií, protože chrání spermie před oxidačním stresem. Glutathion (GSH) je silný antioxidant, který chrání býčí spermie před volnými kyslíkovými radikály. Dalším významným antioxidantem pro integritu spermií je Resveratrol, který hasí superoxidové, hydroxylové a kovy indukované radikály. Proto chrání chromatin spermií a membrány před poškozením ROS. Endogenní antioxidanty přítomné ve spermatu skotu nejsou dostatečné k zajištění integrity spermií proti oxidativnímu stresu při kryokonzervaci. Ke zlepšení životaschopnosti rozmražených spermií je zapotřebí suplementace antioxidantů (Ugur et al. 2019).

Vitamin E také hraje důležitou roli při ochraně spermií jako antioxidant. Suplementace spermatu vitaminem E pozitivně ovlivňuje motilitu spermií, integritu membrány a membránový potenciál (Ugur et al. 2019).

Methionin, který je prekurzorem glutathionu chrání spermie před oxidačním poškozením a podílí se na detoxikaci buňky. Přidání methioninu do spermatu se napomáhá udržení normální morfologie spermií (Ugur et al. 2019).

Karnitin a inositol mají ochranný vliv na integritu akrozomu, zlepšují motilitu spermií a snižují poškození DNA (Ugur et al. 2019).

Cystein je neesenciální aminokyselina, lapač volných radikálů a prekurzorová molekula glutathionu která zvyšuje intracelulární produkci glutathionu *in vivo* i *in vitro*. (Tuncer et al. 2010). Cystein má kryoprotektivní účinek na funkční integritu akrosomu a mitochondrií, což zlepšuje motilitu spermií po rozmražení. (Patel et al. 2016)

3.8 Posouzení kvality ID pomocí *in vitro* analýz

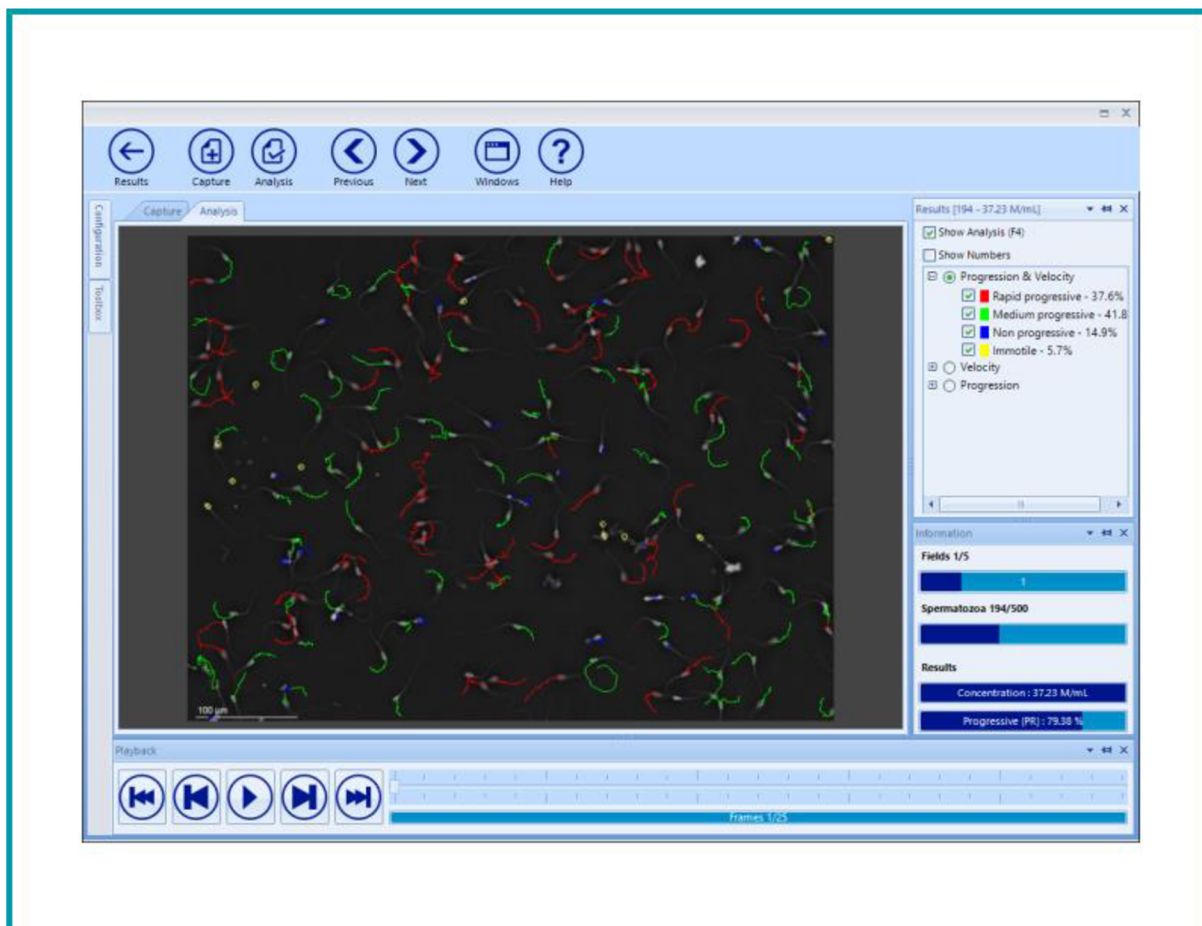
Tradiční hodnocení kvality spermatu *in vitro* zahrnuje subjektivní hodnocení motility, odhad podílu spermií s normální morfologií a odhad koncentrace spermií. I když tyto testy stanoví minimální standardy pro sperma používané pro inseminaci, mají omezenou hodnotu pro predikci následné plodnosti vzorku (Rodriguez-Martinez 2003). V důsledku toho byla pozornost zaměřena na hodnocení dalších aspektů kvality spermatu jako prediktorů plodnosti, jako je životaschopnost, akrozomální integrita, mitochondriální aktivita a integrita plazmatické membrány. I když bylo dosaženo určitého úspěchu, jen málo jednotlivých parametrů spermií *in vitro* vykazuje spolehlivou a opakovatelnou korelaci s fertilizací (Rodriguez-Martinez 2003). Obecně korelace mezi testy *in vitro* a fertilitou prokázaly vysokou variabilitu mezi různými studii (Gliozzi et al. 2017).

3.8.1 Počítačem řízená analýza spermií (CASA)

Systém CASA, poprvé založený v roce 1980, se vyvinul v přesnou počítačovou techniku a software, který poskytuje kvantitativní měření pro objektivní a přesné posouzení pohyblivosti spermií a kinematiky. Tato technika využívá principu zachycování kontinuálních obrazů pohyblivých spermií z mikroskopického pole a převádí obrazy na video obrazy s různou akviziční frekvencí (snímky s-1, Hz) (Ugur et al. 2019).

CASA přinesla zlepšení v kvantitativní analýze kvality spermií z hlediska přesnosti a preciznosti ve srovnání s konvenčními metodami měření motility (Tanga et al. 2021). Na rozdíl od subjektivního hodnocení motility poskytují systémy CASA konzistentní a spolehlivé výsledky analýzou více než 500 spermií v jednom vzorku a sledováním pohybu každé spermie. Její systém může extrahovat jednotlivé kinematické parametry pohybu a rozdělit celkovou populaci spermií do subpopulací spermií s podobnými charakteristikami motility (obvykle rychlá, středně rychlá, pomalá a nepohyblivá). Hodnocení motility pomocí systému CASA se tak rychle stalo standardem při hodnocení spermatu mnoha druhů (Prete et al. 2022). Moderní systémy CASA dokážou automaticky zobrazit více polí v mělké komoře na vzorky a zachytit tak stroboskopické snímky 500 až >2000 spermií, při 50 nebo 60 snímcích za sekundu (Amann & Waberski 2014).

Systém CASA má však určitá omezení, ovlivněná vyšší koncentrací spermií, která narušuje progresivní motilitu. Během analýzy spermatu mohou nedostatky, jako jsou záběry s nízkým kontrastem a artefakty nečistot, negativně ovlivnit přesnost softwaru CASA. V takových případech je koncentrace spermií značně nadhodnocena a procento motility spermií je podhodnoceno (Tanga et al. 2021).



Obrázek 2 Analýza motility spermií v systému CASA

(<https://www.micropticsl.com/portfolio-items/sca-production-motility-concentration-analysis-window/>)

3.8.1.1 Systémové komponenty

Systém CASA se běžně skládá z mikroskopu připojeného k videokameře pro snímání videosekvencí a počítače. Nedávno byl pro systém CASA vyzkoušen světelný mikroskop s vylepšením obrazu a speciálním algoritmem pro sledování spermií (Ugur et al. 2019). Videokamera zachycuje mikroskopické snímky spermií, které jsou následně digitalizovány počítačem na základě počtu obrazových prvků (pixelů) pokrytých hlavičkou spermie. Uživatel může definovat rozsah pixelů pokrytých hlavičkami spermií pro různé druhy. Ke snížení množství chyb v důsledku nečistot v daném rozsahu pixelů používají různé systémy CASA různé přístupy. Některé vyžadují připojený ocásek s identifikovanou hlavičkou spermie, zatímco jiné používají barvení IDENT, při němž je fluorescenční barvivo vázané na DNA v hlavičce spermie rozpoznáno počítačem. Hlavním omezením použití fluorescenčního barviva k odlišení hlavičky spermie od zbytků je však to, že spermie musí být během analýzy ve statické poloze. Ačkoliv je velmi užitečné pro odhad koncentrace spermií, pro odhad parametrů pohyblivosti využít nelze. (Kathiravan et al. 2011)

3.8.1.2 Princip funkce systému

V dnešní době se trhu nachází více než 12 systémů CASA pro vyhodnocování spermií zvířat. Většina z nich stanoví centroid pro každou spermii, vyhodnotí pohyb buněk a na základě toho stanoví trajektorii. Některé se zaměřují na hromadný pohyb populace spermií spíše než na jednotlivé spermie (Amann & Waberski 2014). Zachycené obrazy jsou skenována vizualizovány pomocí tmavého pole nebo negativního vysokofázového kontrastu, aby bylo možné sledovat pohyb každé jednotlivé spermie s ohledem na intenzitu snímku (Ugur et al. 2019). V mikroskopu s tmavým polem a negativním fázovým kontrastem se bílé hlavičky spermií vizualizují na tmavém pozadí a jas hlaviček spermií se využívá ke stanovení polohy centroidů v po sobě jdoucích polích. U fluorescenčního optického mikroskopu se hlavička spermie identifikuje pomocí barvení fluorescenčním barvivem, které se váže na DNA spermie (Kathiravan et al. 2011).

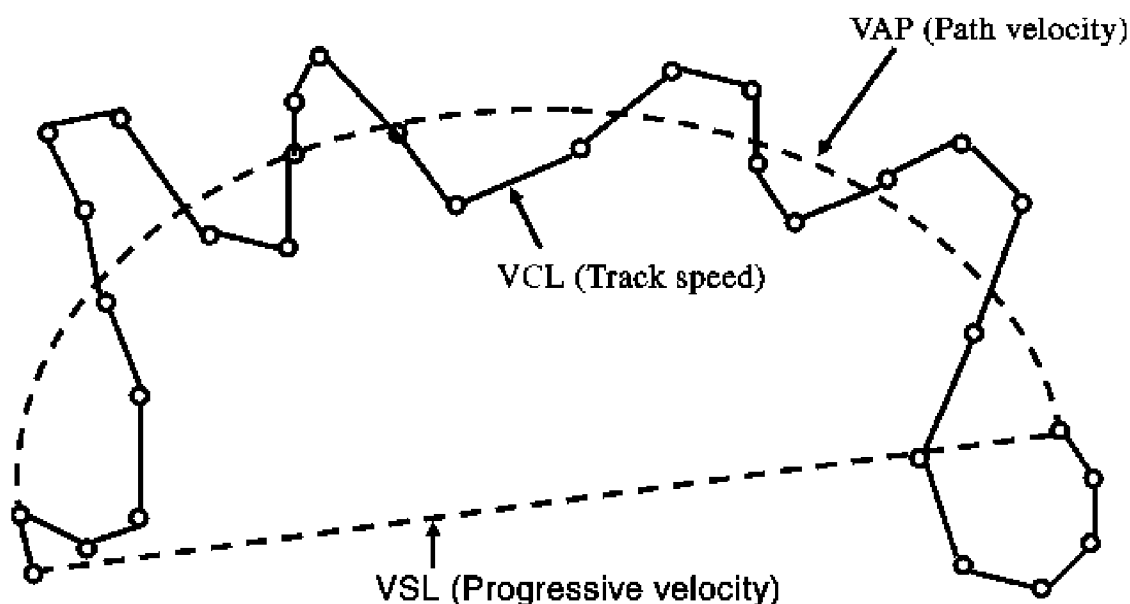
Použitý algoritmus se u různých systémů CASA liší, ale základní princip příslušných kroků je následující. První krok zahrnuje stanovení polohy centroidu hlavičky spermie v po sobě jdoucích polích pomocí odhadu pravděpodobnosti, kterou by spermie mohla projít (Mortimer 2000). Druhý krok algoritmu stanoví počet centroidů, které se mají analyzovat pro trajektorii spermie, na základě minimálního přiděleného časového intervalu. Třetí krok určuje minimální průměrnou vzdálenost mezi po sobě jdoucími videopolemi, kterou musí spermie překonat, aby byla nadále považována za pohybující se. V posledním kroku algoritmus určuje počet dopředných videopolí, která se mají hledat pro obnovení kontaktu s dráhou chybějícího centroidu. Takto se rekonstruuje trajektorie pohybu spermie a odhaduje se řada kinematických parametrů (Kathiravan et al. 2011).

3.8.1.3 Měřené parametry

CASA poskytuje parametry motility [progresivní motilita (%), celková motilita (%)] a kinematické charakteristiky pro hodnocení spermií, jako je rychlost, linearita a laterální posun, který definuje trajektorii. Toto široce používané měření pohybu spermií zahrnuje rychlosti, jako je přímá (VSL), křivočará (VCL), průměrná dráha (VAP), linearita dopředné progresse (LIN, poměr VSL k VCL) a amplituda laterálního posunu hlavy (ALH). Díky vysoce kvalitnímu hardwaru a softwaru s otevřeným zdrojovým kódem jsou současné systémy CASA také užitečnější pro měření morfometrie (rozměru) spermií a zároveň umožňují posouzení koncentrace a morfologie (Ugur et al. 2019).

Tyto parametry CASA byly modelovány a matematicky zpřesněny tak, aby popisovaly parametry pohybu každé spermie při jejím průchodu mikroskopickým polem. Celková pohyblivost je poměr pohyblivých buněk k celkové koncentraci buněk vyjádřený v procentech. Progresivní pohyblivost je počet buněk vyjádřený v procentech, které se pohybují rychlostí dráhy větší než střední mezní hodnota VAP a mají STR větší než standardizovaný práh. Progresivní rychlost (VSL) je přímá vzdálenost mezi začátkem a koncem dráhy dělená uplynulým časem. Dráhová rychlost (VAP) je definována jako celková vzdálenost podél vyhlazené průměrné dráhy pro každou buňku dělená uplynulým časem. Z těchto parametrů rychlosti je VCL vždy nejvyšší ze tří hodnot, zatímco VSL je nejnižší hodnotou. Při

pravidelných a lineárních trajektoriích pohybu spermií se VAP téměř rovná VSL. Pokud je dráha spermie nelineární s vysokým stupněm bočního pohybu hlavičky, pak bude VAP mnohem vyšší než VSL. Přímost měří odchylku dráhy buňky od přímky. Je to poměr VSL/VAP . Linearita měří odchylku dráhy buňky od přímky. Je to poměr VSL/VCL . ALH odpovídá střední šířce kmitání hlavy při pohybu spermie. Křížová frekvence rytmu se určuje měřením frekvence, s jakou dráha spermie kříží dráhu buňky v obou směrech. BCF je užitečná hodnota při odhadu hrubých změn v bičíkovém rytmu a závisí na snímkové frekvenci přístroje. Nejdůležitější aspekt analýzy údajů ze systémů CASA spočívá do značné míry v pochopení skutečnosti, že odhad průměrů kinematických parametrů nemůže být vhodným přístupem. Základním důvodem je, že u většiny kinematických parametrů populace analyzovaných spermií neodpovídá statistickému normálnímu rozdělení, a proto parametrická statistika není vhodnou metodou pro analýzu dat (Holt et al. 2007). Průměrné hodnoty neposkytují mnoho informací o skutečné struktuře populace spermií, a proto je nezbytné odhadnout podíl subpopulací spermií s různými kinematickými vzorci (Kathiravan et al. 2011).



Obrázek 3 Trajektorie pohybu spermií zobrazující různé charakteristiky pohybu vyhodnocené pomocí CASA (<https://www.semanticscholar.org/paper/Objective-sperm-motion-analysis-to-assess-dairy-Kathiravan-Kalatharan/f6f692deb170e090143af80d06b2c39e711d8496>).

Při výpočtu hodnoty korelace mezi fertilizační schopností a parametry měřené CASA byla nalezena významná korelace s VSL (přímou rychlostí) kde byla určena hodnota $r^2 = -0,12$ (Sellem et al. 2015).

Jako nejvýznamnější hodnocený parametr nejvíce korelující s fertilizační schopností se však jeví celková a progresivní motilita, kdy Prete et al. (2022) konstatoval $r = 0,848$ pro celkovou motilitu a $r = 0,84$ pro progresivní motilitu.

Farrell et al. (1998) ve své studii zaznamenali velmi vysokou korelaci mezi kombinovanými parametry motility měřenými pomocí CASA a plodností býků s dobrou prediktivní hodnotou ($r^2 = 0,63-0,98$). Stejně tak Januskauskas et al. (2000) zaznamenali

významnou korelaci mezi procentem lineárně pohyblivých spermií s fertilizační schopností. Mezi různými proměnnými CASA se progresivní motilita podílela na 62,6 % a spolu s integritou membrány přispěla k 64,1 % variability procenta oplození. Měření rychlosti (VAP a VSL) mělo významný vliv na oplození *in vitro*, ale přispělo pouze 41,2 % k jeho variabilitě (Kathiravan et al. 2011).

Dle studie Filipčík et al. (2023) vykazují některé parametry mezi sebou významnou vzájemnou korelaci. Korelace mezi progresivní a celkovou motilitou byla určena 0,99 tudíž mezi těmito dvěma znaky je silný vztah. Byla také zjištěna vysoká korelace mezi celkovým počtem spermií a koncentrací ($r=0,71$). Celkový počet spermií měl střední korelaci s objemem ($r=0,54$). Mapel et al. (2022) zjistili, že motilita spermií negativně korelovala s anomáliemi hlavičky ($r = -0,7083 \pm 0,0002$) a bičíku: ($r = -0,7739 \pm 0,0002$).

3.8.1.4 Hromadný vířivý pohyb

Hromadný vířivý pohyb (hrubá motilita neboli množství víření) v neřaděném vzorku spermatu udává skóre motility mass score (MMS) (Nagata et al. 2019). Tyto víry a vlny jsou způsobeny rychlým pohybem životaschopných spermií, což napomáhá počátečnímu třídění ejakulátu (Ramu & Jeyendran 2012). MMS je vyjádřena jako procento pohyblivých (životaschopných) buněk a motility. Procento pohyblivých buněk (%) se odhaduje vizuálním měřením, přičemž počet spermií ve všech zorných polích se bere jako 100 (Nagata et al. 2019).

Hromadný vířivý pohyb je hodnocen v neřaděné kapce spermatu umístěné na podložním sklíčku bez krycího sklíčka. Intenzitu pohybu vln lze rozdělit do čtyř kategorií (Nagata et al. 2019):

- velmi dobrá – intenzivní víření, rychlé tmavé a světlé vlny
- dobrá – pomalejší víření, vlny ne tak intenzivní
- uspokojivá — pomalý pohyb s menším počtem vln
- špatná – velmi malá nebo žádná vířivá aktivita

(Nagata et al. 2019)

3.8.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je technologie, která poskytuje rychlou multiparametrickou analýzu jednotlivých buněk v roztoku. Při průtokové cytometrii se využívají lasery (McKinnon 2018) nebo u starších přístrojů rtuťové obloukové lampy (Hossain et al. 2011) jako zdroje světla k produkci signálů rozptýleného i fluorescenčního světla, které jsou čteny detektory, jako jsou fotodiody nebo fotonásobiče. Tyto signály jsou převedeny na elektronické signály, které jsou analyzovány počítačem a zapsány do datového souboru ve standardizovaném formátu (.fcs) (McKinnon 2018).

Pomocí FC lze současně hodnotit více parametrů spermií, což zvyšuje schopnost korelovat tyto atributy například s potenciální fertilizační kapacitou. Navíc umožňuje získat data z různých subpopulací v rámci vzorku, a tak vyhodnotit heterogenní populace v různých stavech aktivace. Analýza se tak stává objektivní, má vysokou úroveň opakovatelnosti experimentu a má výhodu, že je možné pracovat s malými i velkými vzorky (Hossain et al.

2011). V průtokové cytometrii se používá řada fluorescenčních barviv. Mezi ně patří barviva vázající DNA, barviva pro životaschopnost, iontová indikátorová barviva a fluorescenční expresní proteiny. Průtoková cytometrie je výkonný nástroj, který má aplikace v imunologii, molekulární biologii, bakteriologii, virologii, biologii rakoviny a monitorování infekčních onemocnění. (McKinnon 2018).

Průtoková cytometrie v oblasti reprodukce

Průtoková cytometrie má široké využití při studiu spermií v oblastech reprodukční toxikologie (pro sledování účinků z environmentálních, pracovních a terapeutických expozií), veterinární vědě (předvolba pohlaví potomstva) a klinické andrologii (k posouzení individuálního potenciálu plodnosti) (Cordelli et al. 2005). Zavedení průtokové cytometrie pro hodnocení kvality spermatu bylo důležitým mezníkem ve veterinární andrologii. Jedná se o vynikající systém, který umožňuje analyzovat tisíce jednotlivých buněk v krátkém čase (Ugur et al. 2019). Za necelou jednu minutu umožňuje FC vyhodnotit 50 000 spermií (Graham 2001). V současné době používáme průtokovou cytometrii pro hodnocení parametrů jako integrity akrozomu, plazmatické membrány, DNA a mitochondriální funkci. Objev různých fluorochromů a fluorescenčních sond umožnil širší analýzu kvality spermií na biochemické, ultrastrukturální a funkční úrovni (Gillan et al. 2005). Kromě toho lze pomocí průtokové cytometrie měřit chromozomální integritu spermií a schopnost spermií podstoupit kapacitaci a akrozomální reakci (Graham 2001).

Pro hodnocení funkčního stavu spermií byla popsána široká škála fluorochromů s dobře definovanými excitačními a emisními spektry, které jsou běžně označovány jako „barvy“. (Bucher et al. 2019). Většina aplikací průtokové cytometrie v reprodukční medicíně a zejména ve veterinární andrologii stále používá pouze dvě nebo v nejlepším případě tři barvy, opticky konfigurované nanejvýš dvěma lasery (Petrukina & Harrison 2011). Testy využívající 3 nebo více barev mají několik výhod oproti jejich jednobarevným analogům. Umožňují identifikaci dílčích populací spermií, které současně demonstrují soubor různých atributů nabízejících podrobnější pohled na funkční heterogenitu spermií (Bucher et al. 2019).

Sellem et al. (2015) zjistili, že nejsilnější pozitivní korelace s fertilizační schopností byla pozorována s mitochondriální aktivitou ($r^2=0.073$) a akrozomální integritou ($r^2=0.104$). Nejsilnější negativní korelace byla spojena s fragmentací DNA ($r^2=0.082$). Tyto korelace byly příliš nízké na to, aby bylo možné předpovědět fertilizační schopnost pouze na základě pouze jediného parametru. Proto ve studii bylo použito několik kombinací a byly posouzeny pomocí vícenásobných regresí, aby se získaly modely pro predikci plodnosti (Sellem et al. 2015).



Obrázek 4 Průtokový cytometr NovoCytel® 3000 (archiv autorky)

3.8.2.1 Systémové komponenty

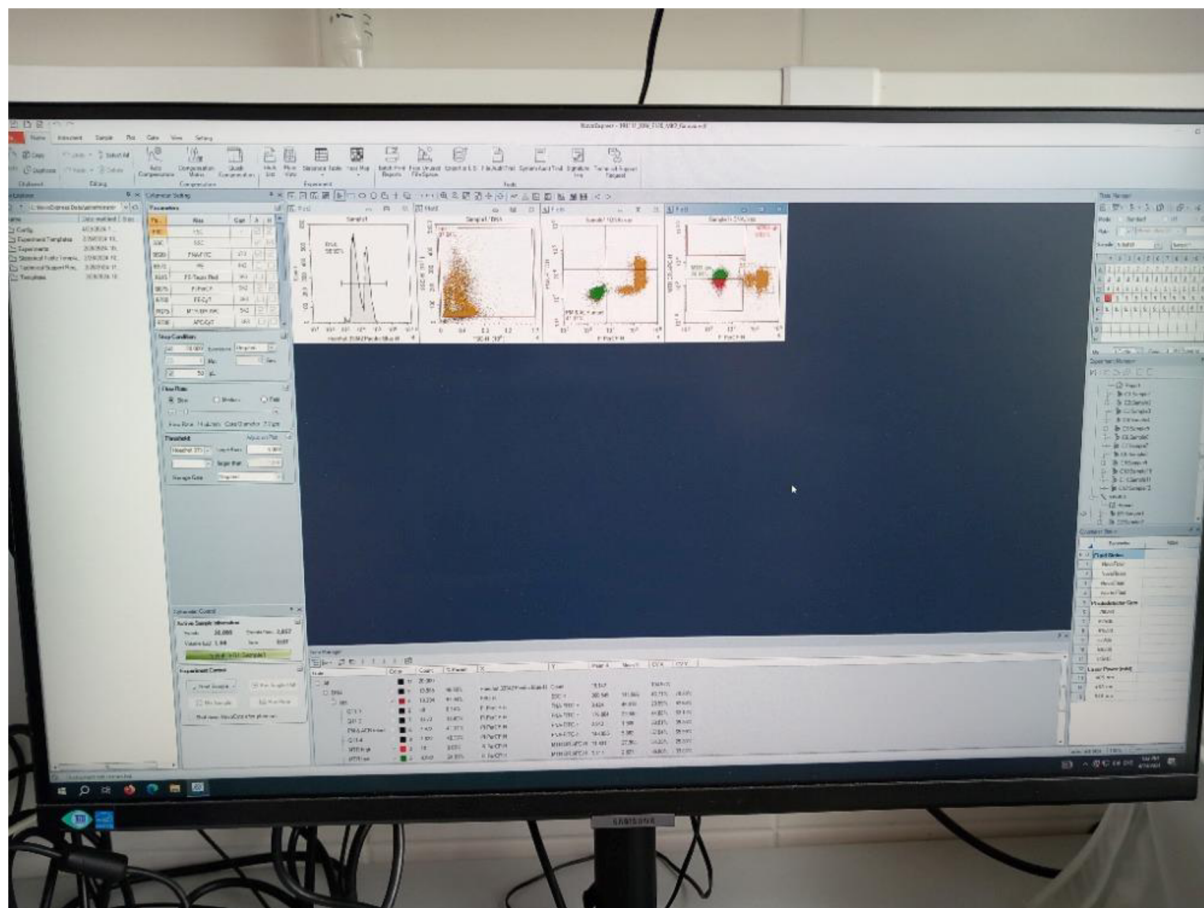
Tradiční průtokové cytometry se skládají ze tří systémů (Ugur et.al. 2019):

- fluidika
- optika
- elektronika

Tyto systémy využívají měření fyzikální optiky a chemických fluorescenčních charakteristik částic v tekutině, když prochází laserovým zdrojem. (Ugur et.al. 2019)

Fluidní systém řídí průtok buněk nebo částic přístrojem (Robinson et al. 2023). Skládá z kapaliny v plášti (obvykle pufrovaný fyziologický roztok), která je pod tlakem, aby dodala a zaostřila vzorek detekční bod, kde je vzorek analyzován (McKinnon 2018). Optický systém se skládá z excitační optiky (lasery) a sběrné optiky (fotonásobiče nebo PMT a fotodiody), které generují viditelné a fluorescenční světelné signály používané k analýze vzorku (Robinson et al. 2023). Řada dichroických filtrů směřuje fluorescenční světlo ke specifickým detektorům a pásmové filtry určují vlnové délky světla, které jsou čteny, aby bylo možné detekovat a měřit každý jednotlivý fluorochrom. Dichroické filtry propouštějí světlo s kratší nebo delší vlnovou délkou a odrážejí zbývající světlo pod úhlem. Například filtr 450 Dichroic Long Pass (DLP) propouští světlo, které má delší vlnovou délku než 450 nm, přes filtr a odráží kratší vlnové délky světla pod úhlem, aby bylo odesláno do jiného detektoru. Pásmové filtry detekují malé okénko specifické vlnové délky světla. Například pásmový filtr 450/50 propouští fluorescenční

světlo, které má vlnovou délku 450 nm +/- 25 nm, přes filtr, který je čten detektorem (McKinnon 2018). Systém elektroniky a sběru dat je obvykle integrován do softwaru pro analýzu dat (Robinson et al. 2023).



Obrázek 5 Analýza na průtokovém cytometru (archiv autorky)

3.8.2.2 Princip průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie zaznamenává jednotlivé buňky v suspenzi, které prochází detekčním bodem. Následně průtokový cytometr získává data o všech subpopulacích vzorku (Rosa et al. 2023). FC vyžaduje malé množství spermií značených fluorescenčními markery, které se vstříkují do průtokové kyvety v přístroji. V oblasti detekčního bodu laserový paprsek dopadá na vzorek (Ugur et al. 2019). Když laser dopadne na buňku světlo je rozptýleno kolem okrajů buňky a vzniká difrakční obrazec podél dráhy laserového paprsku. Protože se jedná o velmi silný signál, jednoduchá fotodioda může převést rozptýlené světlo na elektrický signál (Bakke 2024).

K dispozici jsou dva typy systémů průtokové cytometrie, z nichž jeden má třídící schopnosti (fluorescenčně aktivovaná průtoková cytometrie-FACS) umožňuje fyzickou separaci a purifikaci buněk. Druhý systém třídící schopnosti nemá a měří fluorescenční emise vysoce opakovatelným a přesným způsobem (Ugur et al. 2019).

3.8.2.3 Barviva pro průtokovou cytometrii

Pro hodnocení funkčního stavu spermií byla popsána široká škála fluorochromů s dobře definovanými excitačními a emisními spektry, která jsou běžně označována jako barviva. (Bucher et al. 2019).

Barviva pro plazmatickou membránu

Kombinace SYBR-14 a Propidium jodidu pro hodnocení plazmatické membrány spermií byla poprvé použita už v roce 1994 pro hodnocení životaschopnosti spermií (Robles & Martínez-Pastor 2013). V tomto kombinovaném barvení jádra životaschopných spermií fluoreskují zeleně, zatímco ty s erodovaným plasmalemem jsou kontrastně zbarveny červeně (Hossain et al. 2011). SYBR-14 je zelené barvivo, které snadno obarví všechna jádra bez ohledu na to zda je plazmatická membrána spermií intaktní či poškozená. Propidium jodid je interkalační činidlo červené barvy, které může barvit jádro pouze v případě, že je poškozena plazmatická membrána (Robles & Martínez-Pastor 2013). Jako alternativa propidium jodidu může být použit ethidium homodimer-1 (EthD-1) nebo Yo-Pro-1 (Gillan et al. 2005). Toto duální barvení je vhodné jak pro fluorescenční mikroskopii, tak pro průtokovou cytometrii (Robles & Martínez-Pastor 2013).

Barviva pro akrozom

Pro zjištění integrity akrozomu spermií se nejčastěji používá metoda založená na barvení fluorescenčním rostlinným lektin (Martínez-Pastor et al. 2010). *Pisum sativum agglutinin* (PSA) je hrachový lektin, který se váže na manosové a galaktózové skupiny v akrozomální matrici. Jelikož PSA nemůže projít intaktní akrozomální membránou obarví pouze akrozomy poškozených spermií (Nagy et al. 2003). Jeho nevýhodou je příbuznost s vaječným žloutkem, který se používá jako součást ředidel spermií a nespecificky se váže na spermie. V důsledku toho může být akrozomální stav vyhodnocen nesprávně (Lybaert et al. 2009).

Nejoblíbenější lektin používaný k posouzení integrity akrozomu je *agglutinin Arachis hypogaea* (PNA). Je to lecitin z arašídových semen, který se váže na galaktózové skupiny na vnější akrozomální membráně a vykazuje nízkou nespecifickou vazebnou sílu k jiným částem spermií (Yi et al. 2012). Lektiny cílené na akrozomy lze kombinovat s jinými barvivy na vícebarevných panelech průtokové cytometrie které umožňují posouzení stavu akrozomů ve vztahu k dalším buněčným funkcím, jako je mitochondriální funkce, esterázová aktivita a především intracelulární hladiny Ca²⁺ (Bollwein a Malama 2023). Při výzkumu může být též použita protilátka anti-CD46, která je zaměřena na akrozomální matrix (Robles & Martínez-Pastor 2013). Několik studií také uvádí použití metody barvení pomocí Comassie Blue G-25 (Bollwein a Malama 2023).

Barviva pro mitochondrie

Mitochondriální funkci lze stanovit pomocí rhodaminu 123 (R123) a MitoTracker Green FM (MITO) a 5,5',6,6'-tetrachlor-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl- karbocyanin jodidu (JC-1) (Gillan et al. 2005). Nejrozšířenější je rhodamin 123 (R123), jedná se o kationtovou sloučeninu, která se akumuluje v mitochondriích a fluoreskuje zeleně, intenzita fluorescence

závisí na celkovém množství funkčních mitochondrií (Hossain et al. 2011). Mitochondriální sonda MitoTracker Green je ve vodném roztoku nefluorescenční, ale po akumulaci v mitochondriích fluoreskuje zeleně bez ohledu na potenciál mitochondriální membrány (Gillan et al. 2005). JC-1 je monomer který v nízké koncentraci umožňuje zelené zbarvení a umožňuje rozlišovat spermie se špatně či vysoce funkčními mitochondriemi. Byl pozorován určitý vztah mezi barvením JC-1 a motilitou, i když korelace s motilitou je regulována mnoha faktory. Ve vysoce funkčních mitochondriích se koncentrace JC-1 uvnitř mitochondrií zvyšuje a barvivo tvoří agregáty, které fluoreskují oranžově. Když byly spermie rozděleny do skupin s vysokým, středním a nízkým mitochondriálním potenciálem na základě fluorescence JC-1, byly míry *in vitro* fertilizace vyšší ve skupině s vysokým potenciálem než ve skupině s nízkým potenciálem. JC-1 byl také úspěšně použit k měření mitochondriální funkce pomocí fluorometrie. Hlavní slabinou JC-1 je, že k vyhodnocení jednoho atributu spermie jsou potřeba dva fluorescenční detektory, a proto je méně použitelný ve vícebarevných FC experimentech (Hossain et al. 2011).

Barviva pro DNA

Buněčná DNA může být obarvena fluorochromem buď v nefixovaných, obvykle ještě živých buňkách, nebo v buňkách po jejich fixaci. Barvení živých buněk (supravitální barvení) vyžaduje použití fluorochromu, který proniká plazmatickou membránou a stechiometricky barví DNA. Bohužel výběr takových fluorochromů je omezený. Hoechst 33342 je jedním z takových barviv a při použití v kombinaci s barvivem pro snímání membránového potenciálu DiOC5 nabízí relativně dobré rozlišení při měření obsahu DNA v živých buňkách. Barvivo je excitováno při vlnové délce UV (350 nm) a fluoreskuje modře (460 nm). Dalším fluorochromem, který se používá k supravitálnímu barvení DNA, je DRAQ5 (Darzynkiewicz et al. 2011).

Kombinace barviv pro průtokovou cytometrii

Většina aplikací průtokové cytometrie v reprodukční medicíně a zejména ve veterinární andrologii stále používá pouze dvě nebo v nejlepším případě tři barvy, opticky konfigurované nanejvýš dvěma lasery. Vzhledem k technickým možnostem stávajícího vybavení a pečlivému plánování fluorescenčních barviv je snadno možné zkoumat složitou sekvenci procesů měřících šest nebo více parametrů současně ve stejném vzorku, přičemž všechny parametry řeší různé funkční vlastnosti spermií (Petrunkina & Harrison 2011). Bucher et al. (2019) ve své studii poprvé zkombinoval 5 fluorescenčních sond v jediném testu průtokové cytometrie, aby se současně vyhodnotili životaschopnost, akrozomální stav, intracelulární hladiny vápníku a mitochondriální funkci kryokonzervovaných býčích spermií. Analýza dat odhalila funkční heterogenitu populace rodičovských spermií i podřadných skupin spermií v každém vzorku spermatu. Změny funkčního stavu spermií byly dále zvýrazněny podrobením spermií krátkodobé inkubaci při 38 °C. Zjištění odhalila část funkční heterogenity kryokonzervovaných spermií, jinak nedetekovatelných pomocí 1- nebo 2- barevných testů. Ještě důležitější je, že multiparametrická charakterizace funkčnosti spermií pomocí průtokové cytometrie umožnila spolehlivější predikci schopnosti oplodnění býků (Bucher et al. 2019).

3.8.2.4 Hodnocené parametry průtokové cytometrie

Poškození plazmatické membrány

Integrita plazmatické membrány je nezbytná pro přežití spermií uvnitř samičího reprodukčního traktu. Při intaktní plazmatické membráně by měla zůstat zachovaná schopnost oplození a osmotická rovnováha buňky. Plazmatická membrána také působí jako bariéra mezi intra a extracelulárním prostorem (Flesch & Gadella 2000). Poškození plazmatické membrány spermií vede k nevratné ztrátě jejích funkcí. Vzhledem k vysokému obsahu nenasycených mastných kyselin v plazmatické membráně jsou savčí spermie citlivé na oxidační stres. Nadměrná peroxidace poškodí plazmatickou membránu a vede ke ztrátě motility a plodnosti (Aurich 2005). Dokonce i v samičím genitálním traktu jsou spermie vystaveny mnoha faktorům které způsobují poškození plazmatické membrány nebo indukujícím buněčnou smrt. Do vejcovodu se tedy dostane pouze několik set až tisíc buněk z miliard ejakulovaných (Morris et al. 2000). Funkční integritu plazmatické membrány spermatu lze stanovit funkčními testy (stanovení motility, rezistence vůči hypoosmotickému médiu) nebo různými metodami barvení. Dnes jsou preferována fluorescenční barviva, která umožňují hodnocení membránově neporušených buněk. Použití průtokové cytometrie výrazně zlepšilo přesnost těchto metod (Aurich 2005).

Poškození akrozomu

Akrozom je membránou uzavřená struktura pokrývající přední část hlavičky spermie. Akrozom obsahuje enzymy nezbytné pro proniknutí do obalů vajíčka (Martínez-Pastor et al. 2010). Proces chlazení a zmrazování spermatu může akrozomální membránu poškodit a způsobit neplodnost spermií, protože dojde ke ztrátě nitrobuněčných molekul nebo k předčasnému uvolnění akrozomálního obsahu (Glazar & McCue 2021). Integrita akrozomu může být analyzována řadou metod (Martínez-Pastor et al. 2010). K přesnému zjištění integrity akrozomu však lze použít fluorescenční mikroskopii. Některé lektiny, rostlinné proteiny, se vážou pouze na enzymatický obsah akrozomu. Tyto proteiny jsou velké a nemohou projít neporušenou membránou. Tyto lektiny lze označit fluorescenčními sondami, a pokud došlo k poškození membrány, dostanou se do kontaktu s akrozomálními enzymy ulpívajícími na hlavičce spermie a naváží se na ně, což způsobí fluorescenci akrozomální oblasti. Spermie, které mají nepoškozené akrozomy, však neumožní vazbu lektinů a nebudou fluoreskovat (Glazar & McCue 2021).

Poškození DNA

DNA spermie je pevně zabalena, aby chránila genom během epididymálního tranzitu, ejakulace a interakce se samičím pohlavním traktem před oplodněním. Většina DNA je obalena protaminy, menší množství zůstává jako chromatin vázaný na histon a DNA je připojena k jaderné matrixi (Petrunina & Harrison 2011). DNA spermií je organizováno specifickým způsobem, který zachovává chromatin v jádře kompaktní a stabilní, v téměř krystalickém stavu. Zrání v nadvarletí ve vývoji spermie zahrnuje konečnou fázi organizace chromatinu, ve které se mezi cysteinovými zbytky tvoří intra- a intermolekulární disulfidové můstky s vysokým obsahem protaminů. Celý tento proces přináší organizaci DNA, která neumožňuje pouze ochranu genetické informace před vnějšími vlivy při přenosu do vajíčka, ale také obsahuje

konkrétní plán přepisu DNA po oplodnění (Cordelli et al. 2005). Integrita DNA spermie je nezbytná pro dodání neporušené DNA do oocyty pro úspěšné oplodnění a embryonální vývoj. Spermie s poškozenou DNA mohou oplodnit oocyt, ale neudrží březost, což má za následek předčasnou embryonální smrt nebo potrat (Raval et al. 2024). Aberace během spermiogeneze nebo během zrání spermií mohou vést ke strukturálním defektům v chromatinu. Pro analýzu lze použít metody průtokové cytometrie (Petrunkina & Harrison 2011). Vzhledem k důležitosti přesného přenosu genetické informace k potomkům bylo vyvinuto několik metod založených na FC pro detekci DNA a pro detekci ve změn chromatinu ve spermiích (Cordelli et al. 2005). Abnormality chromatinu spermií a poškození DNA mohou pramenit z poškození premeiotického kompartmentu testikulárních buněk (Cordelli et al. 2005). Alternativně se může jednat i o důsledek apoptózy během spermatogeneze, přerušení řetězce DNA během remodelace chromatinu spermií během spermiogeneze, fragmentace DNA indukované ROS v genitálním traktu nebo v důsledku toxinů z prostředí. (Talwar & Hayatnagarkar 2015).

Dle studie Enciso et al. (2011) existuje jasný vztah mezi morfologicky abnormálním býčím spermatem a špatnou kvalitou DNA. Zejména velké abnormality spermií, které by potenciálně mohly mít genetický původ nebo být výsledkem abortivního apoptotického mechanismu jsou úzce spojeny s přítomností vysoce poškozené molekuly DNA (Enciso et al. 2011).

V tzv. sperm chromatin structure assay (SCSA) je chromatin spermií částečně denaturován *in situ* a poté obarven akridinovým oranžovým barvivem, které interkaluje s DNA. Vyjadřuje však různé fluorescenční vlastnosti v závislosti na tom, zda je DNA jednovláknová nebo dvouvláknová: červená v prvním případě a zelená v druhém. V některých případech je postup SCSA kombinován s počítáním buněk a umožňuje současné stanovení počtu a koncentrace spermií (Petrunkina & Harrison 2011).

V testu TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) jsou spermie fixovány a denaturovány, aby došlo k rozpletení DNA a umožnění přístupu transferázy. Pomocí této transferázy se na 3'-hydroxylové konce všech volných zlomů ve vláknech DNA naváže deoxyribonukleotid konjugovaný s fluorochromem. Úroveň značení v každé spermií může být kvantifikována průtokovou cytometrií pro indikaci stupně přerušení vlákna v hlavičce spermie (Petrunkina & Harrison 2011).

Nedávno byla zavedena jednodušší technika pro sledování fragmentace DNA ve spermiích, Sperm Chromatin Dispersion Assay. Hlavní výhodou této metody oproti jiným je, že každý test vyžaduje velmi malý počet spermií. Navíc je test velmi nákladově efektivní. To umožnilo vývoj nového přístupu ke studiím fragmentace DNA, kdy se vzorky spermatu inkubují po dobu 24–48 hodin a dynamika fragmentace DNA se vypočítává z opakovaných testů spíše než z jediného jednorázového (Petrunkina & Harrison 2011).

Mitochondriální aktivita

Mitochondrie jsou velmi náchylné k poškození během zmrazování a jakékoli abnormality v jejich morfologii nebo funkci se projeví poklesem kvality spermií. Nedávný výzkum fyziologie spermií klade stále větší zájem o mitochondrie jako biomarker zdraví a plodnosti spermií. Jako energetické „elektárny“ buňky je úloha mitochondrií pro samčí plodnost přímo spojena s motilitou, ale tyto orgány jsou také klíčové pro hyperaktivaci spermií, kapacitaci, akrozomální reakci a integritu DNA. Mitochondrie produkují fyziologické

hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS), které se zabývají buněčnými signálními cestami souvisejícími s redox. Avšak zvýšená produkce ROS může mitochondrie poškodit. Mitochondriální DNA (mtDNA) je také náchylná k oxidativnímu poškození a mutace v mtDNA mohou ohrozit funkci spermií (Madeja et al. 2021).

Mitochondriální oxidoreduktivní enzymový aparát lze testovat pomocí indikátorů, jako je nitrotetrazolium, které produkuje modrý nerozpustný pigment ve středu a kolem něj. Vyhodnocení lze provést v nátěrech kde spermie se správnou mitochondriální aktivitou mají obarvený střed. Jsou také vyvinuty nepřímé semikvantitativní testy, které mohou poskytnout nepřímý důkaz mitochondriální aktivity v závislosti na množství vyvinuté barvy. Bylo zjištěno, že test má významnou korelaci s parametry motility spermií (Talwar & Hayatnagarkar 2015). Sellem et. al. 2015 ve své studii určil, že hodnota korelace mezi mitochondriální aktivitou kryokonzervovaného spermatu skotu a fertilizační schopností nabývá 0.271.

3.8.3 Fluorescenční mikroskopie

Většina funkčních testů využívajících fluorochromy byla vyvinuta barvením spermií požadovaným fluorochromem a zkoumáním buněk fluorescenční mikroskopií, aby se ověřila přesnost hodnoceného parametru. Mikroskopická analýza však měří pouze malý počet spermií v populaci, je časově náročná, může být subjektivní a obecně měří vlastnosti spermií individuálně. Přizpůsobením těchto hodnocení pro použití s průtokovým cytometrem lze fluorescenční markery přesně a rychle použít k měření vlastností spermií ve velkém měřítku (Gillan et al. 2005). Použití fluorochromů a sloučenin konjugovaných s fluorochromy umožnilo zkoumání plazmatické membrány, integrity chromatinu a DNA, akrozomu, mitochondriální aktivity a oxidačního stresu. Spojení těchto proměnných se považuje za pokročilé a zajišťuje konzistentní analýzu kvality spermatu a lepší posouzení fertilního potenciálu (Rosa et al. 2023).

3.8.4 Zobrazovací průtoková cytometrie

První zobrazovací průtoková cytometrie byla představena již v roce 2005. Zobrazovací průtokové cytometrie (IFC) kombinuje vlastnosti průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie s pokroky v algoritmech zpracování dat. IFC umožňuje multiparametrickou fluorescenční a morfologickou analýzu tisíců buněk a má jedinečnou schopnost identifikovat shromážděné buňky podle jejich skutečných obrazů (Barteneva et al. 2012). Vícekanálové digitální snímky stovek tisíc jednotlivých buněk lze pořídit během několika minut a zahrnují několik fluorescenčních kanálů a také světlé pole (procházející světlo) a tmavé pole (rozptýlené světlo) (Doan et al. 2018).

3.8.5 Oxidační stres

Oxidační stres je popisován jako poškození spermií vycházející z oxidace v důsledku reaktivních forem kyslíku. Předpokládá se, že stres z kryokonzervace a následného rozmrazování může produkovat reaktivní formy kyslíku, které mohou působit na citlivá místa ve strukturách spermií a enzymových polích (Petrunina & Harrison 2011). Oxidační stres

může být definován jako nerovnováha mezi produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a schopností antioxidantů je vychytávat. Určitá hladina ROS je nezbytná pro funkce spermií, jako je kapacitace, akrozomová reakce, fúze spermie-oocyt a fosforylace proteinového tyrosinu. Vysoké hladiny ROS však mají nepříznivý vliv na funkčnost spermií, což vede k vysoké míře (20–40 %) neplodnosti (Hossain et al. 2011). Spermie jako každá jiná buňka neustále vyžadují O₂ pro metabolismus, ale produkované škodlivé metabolity, jako je ROS, mohou modifikovat buněčnou funkci nebo buňku poškodit a ohrozit její přežití. Seminální plazma přirozeně obsahuje různé antioxidanty, které pomáhají chránit spermie proti takovým oxidantům (Talwar & Hayatnagarkar 2015). Bylo prokázáno, že reaktivní formy kyslíku (ROS) negativně ovlivňují přežití spermií a jejich plodnost prostřednictvím svého působení na struktury lipidové membrány (Sellem et al. 2015). Oxidační stres u spermií zhoršuje jejich plodnost. To je způsobeno produkcí ROS včetně radikálů, jako je hydroxylový radikál (OH), superoxidový anion (O₂) a neradikálový peroxid vodíku (H₂O₂). Během kryokonzervace a rozmrazování procházejí spermie chladovým šokem, který pak vede k nadměrné ROS a peroxidaci lipidů. ROS a oxidační druhy lze nejlépe detekovat pomocí průtokové cytometrie (Ugur et al. 2019). Při tomto testu jsou spermie vystaveny působení H₂O₂. Spermie, které na H₂O₂ reagují, jsou považovány za ROS pozitivní a spermie, které na tuto nereagují, jsou považovány za ROS negativní (Zoca et al. 2023).

3.8.6 Test penetrace spermií (SPA)

SPA hodnotí funkční kapacitu spermií zkoumáním jejich způsobilosti v různých biologických procesech nezbytných pro oplození: kapacitace, akrozomální reakce, splynutí s vitelinní membránou až po konečný bod dekondezace chromatinu (Vogiatzi 2013). K předpovědi plodnosti rozmražených býčích spermií je optimalizován test penetrace spermií (SPA) s použitím oocytů křečka a výsledky testu jsou porovnány s polní plodností. Pro zvýšení penetrace spermií jsou spermie předem inkubovány a koinkubovány s oocyty v médiu obsahujícím různé koncentrace heparinu (0 až 50 µg/ml). Koinkubace s 10 µg/ml heparinu vykazuje nejvyšší penetraci spermií ($P < 0,05$) a je považována za optimalizovanou metodu SPA. (Park et al. 2012).

3.8.7 Test vazby spermie na zonu pellucidu (hemizonový test)

Hemizonový test je funkční homologní model interakce gamet, který využívá neživé, rozříznuté oocyty ke zkoumání schopnosti spermií vázat se na glykoproteinové receptory ZP3/ZP4 na povrchu zóny pellucidy a zahájit akrozomální reakci v příslušném časovém rozmezí. Hlavním principem tohoto testu je hodnocení vazby spermií na zonu pellucidu (ZP) a její číselná interpretace pomocí výpočtu hodnoty hemizona assay indexu. (Vogiatzi et al. 2013) Panda et al. 2022 ve své popisují významou pozitivní korelaci Hemizona assay indexu ($r = 0,83$) s fertilizační schopností.

Během testu jsou spermie in vitro inkubovány s uměle vyrobenými oocyty nebo jinými buňkami obsahujícími zonu pellucidu. Po inkubaci se sleduje, zda dochází k navázání spermií na ZP a následnému proniknutí spermie skrz tuto vrstvu, což je nezbytný krok k

oplození v přirozeném procesu. Sledování tohoto procesu umožňuje získat informace o kvalitě spermií a jejich fertilizační schopnosti (Panda et al. 2022).

3.8.8 Test akrozomální reakce

Během testu akrozomální reakce je populace kapacitovaných spermií stimulována k akrozomové reakci a uvolnění akrosinu v kultivačním médiu. Jednotlivé spermie, které reagovaly akrozomy, mohou být detekovány řadou metod včetně značení fluorescenčními lektiny, monoklonálními protilátkami proti specifickým proteinům nebo histochemickým barvením. Průtoková cytometrie může být také použita k detekci akrozomální reakce spermií pomocí specifického barvení fluorochromem (Talwar & Hayatnagar 2015). V posledních letech byla vyvinuta řada FC testů, které se zaměřují se na schopnost spermií kapacitovat. Tyto testy zahrnují detekci časných změn v plazmatické membráně spermií prostřednictvím vazby merocyaninu, zvýšené vychytávání vápníku pomocí Fluo-3, fosforylaci povrchového tyrosinu pomocí antifosfotyrosinových protilátek konjugovaných s fluorochromem a indukci akrozomové reakce pomocí lektinů konjugovaných s fluorochromem (Petrunina & Harrison 2011).

3.8.9 Test vazby hyaluronanu

Test vazby hyaluronanu (HBA) hodnotí zralost spermií v čerstvém vzorku spermatu. HBA je jednoduchá technika navržená jako součást standardní analýzy spermatu, která umožňuje předpovědět kvalitu spermií a oplozovací potenciál. Diagnostické využití HBA je však stále předmětem zkoumání (Lazarevic et al. 2010). Kyselina hyaluronová (HA) neboli hyaluronan je glykosaminoglykan přítomný ve vejcovodu, děloze a děložním hrdle. Je hlavní složkou kumulární matrix obklopující oocyt a zonu pellucidu, kde usnadňuje vazbu zralých spermií, které si během přestavby své plazmatické membrány vyvinuly receptory vázající HA umístěné na povrchu. (Awan et al. 2021). Interakce spermií s hyaluronanem byla využita k vývoji testu pro hodnocení spermií in vitro, který je známý jako Hyaluronan Binding Assay (HBA®) (Huszar et al. 2006). V testu se používají sklička/misky potažené HA, a předpokládá se, že pouze zralé spermie exprimující receptory HA se navážou na sklička/misky potažené HA. Na základě toho můžeme rozlišit zralé a nezralé buňky (Huszar et al. 2006; Lazarevic et al. 2010). Misky potažené HA se používají také pro selekci a/nebo separaci zralých spermií pro techniky asistované reprodukce. Mezi HBA a plodností byla nalezena silně pozitivní korelace ($r = 0,824$, $p < 0,01$), která predikuje 67,9% variabilitu ($r^2 = 0,679$, $p < 0,01$) v plodnosti. HBA také silně pozitivně korelovala s životaschopností spermií ($r = 0,679$, $p < 0,01$), motilitou ($r = 0,434$, $p < 0,01$), vysokou integritou plazmatické membrány ($r = 0,316$, $p < 0,01$) a hladinou nefragmentované DNA ($r = 0,236$, $p < 0,05$) (Awan et al. 2021).

3.8.10 Test hypoosmotického bobtnání

Test hypoosmotického bobtnání (HOS) hodnotí funkční integritu plazmatické membrány spermií a slouží také jako užitečný indikátor fertilního potenciálu. Funkční integritu

Lze demonstrovat umožněním reakce spermií v hypoosmotickém médiu (Agarwal et al. 2022). Je založen na skutečnosti, že transport tekutiny probíhá přes intaktní buněčnou membránu za hypoosmotických podmínek, dokud není dosaženo rovnováhy. V důsledku přílivu tekutiny se buňka roztáhne a vyboolí, zejména v ocasu, a tuto změnu lze snadno pozorovat mikroskopem s fázovým kontrastem (Ramu & Jeyendran 2012). Membrána v živých buňkách je polopropustná, proto buňky s neporušenými membránami (živé buňky) budou v hypotonických roztocích bobtnat. Test HOS má vysokou reprodukovatelnost a přesnost a úzce koreluje se schopností spermií in vitro fertilizovat (Agarwal et al. 2022). Pro testování HOS se hypoosmotický roztok připraví přidáním 0,735 g dehydrátu citrátu sodného a 1,351 g D-fruktózy ve 100 ml destilované vody. Dobře promíchaný 0,1 ml alikvot spermatu se smíchá s 1 ml roztoku HOS. Vzorek se jemně promíchá kontinuálním odsáváním a uvolněním pipety a inkubuje se při 37 °C po dobu 30 minut. Po inkubaci se 1 kapka směsi spermatu umístí na podložní sklíčko a následně překryje krycím sklíčkem. Tento test se provádí jako duplikát. Procento spermií vykazujících otok ocasu se počítají pod čočkou s fázovým kontrastem 40× (Agarwal et al. 2022).

3.8.11 Hodnocení vitality spermií

Nejčastěji používanou metodou pro hodnocení vitality spermií je kombinované barvení EosinNigrosin (EN). V této metodě je eosin supravitální barvivo a nigrosin je purpurové barvivo, které slouží jako kontrastní barvivo (Agarwal et al. 2022). Padesát mikrolitrů dobře promíchaného spermatu se umístí do jamky Boernerova podložního sklíčka. Přidá se stejný objem barviva EN. Vzorek se dobře promíchá dřevěným míchadlem a nechá se 30 sekund odležet. Bezprostředně poté se deset mikrolitrů směsi umístí na označené matné sklíčko a vytvoří se tenký nátěr. Tento krok se provede duplicitně. Po zaschnutí nátěru na vzduchu se na montážní médium umístí krycí sklíčko (Moskovtsev et al. 2013). Kapka imerzního oleje se umístí na každé z namontovaných sklíček a každé z nich je pozorováno pod mikroskopem ve světlém poli s 1000násobným zvětšením. Tento krok se provádí dvakrát na každém snímku. Spočítají se vitální (nezabarvené) a nevitální (zabarvené) spermie (Agarwal et al. 2022).

3.8.12 Spermatická Proteomika

Proteomika je slibná technologie pro pochopení faktorů podílejících se na samčí plodnosti. (Astwitha et al. 2023). Analýza bovinní semenné plazmy prováděná ve studii Gomes et al. (2020) se opírala o vícerozměrnou technologii identifikace proteinů a nástroje bioinformatiky. Tento přístup umožnil identifikaci 1 445 proteinů, což v současnosti představuje největší soubor údajů o proteinech v seminální plazmě od býků nebo jakéhokoli druhu přežvýkavců (Gomes et al. 2020).

V posledních letech přibývá studií, které kombinují metody tradičně používané ve spermatologii, jako je počítačově asistovaná analýza spermií (CASA), průtoková cytometrie a mikroskopické hodnocení spermií, s technikami molekulární biologie, které se zaměřují na RNA nebo proteinový profil spermií. Tento přístup se odráží od hlubšího porozumění

molekulárních mechanismům, které jsou základem fenotypových charakteristik spermií, a efektivnější prognózu plodnosti býků (Bollwein & Malama 2023).

Ve své nedávné práci Talluri et. al. (2022) sledovali vysoce výkonnou multiomickou analýzu, aby charakterizovali transkriptom, proteom a metabolom v kryokonzervovaných spermiích býků s vysokou a nízkou plodností. V integrované analýze cytometricky hodnocených funkčních vlastností spermií a omických dat autoři odhalili korelaci životaschopnosti spermií, akrozomální integrity a mitochondriální funkce s několika biomolekulami, včetně transkriptů, které se účastní signálních drah prolaktinu a syntézy mitochondriálních proteinů (Talluri et al. 2022).

3.8.13 Spermatická transkriptomika

Během oplodnění skotu samec přenáší na potomka nejen genomovou DNA spermie, ale také celou řadu RNA, včetně kódujících a nekódujících RNA, jako je například messengerová RNA (mRNA), transferová RNA (tRNA), malá nukleolární RNA, malá nekódující RNA, dlouhá nekódující RNA (lncRNA), malá jaderná RNA, ribozomální RNA (rRNA) a další. Vzhledem k tomu, že množství RNA na spermatickou buňku (spRNA) je velmi nízké (30 až 200 fg), je použití přímého vysokokapacitního sekvenování pro spermatické buňky nevhodné (Li et al. 2023). RNA ze spermií jsou extrahovány pomocí speciálního roztoku a úspěšně profilovány s využitím různých platform sekvenování RNA (Selvaraju et al. 2022). Existuje několik transkriptomických studií na býčím spermatu za použití různých technik (Özbek et al. 2021). Wang et al. (2019) použili ve své studii sekvenování RNA specifické pro vlákno k profilování transkriptomu spermatu (lncRNA a mRNA) a ke zjištění funkcí lncRNA a mRNA v pohyblivosti býčích spermií. Detekovali 20 875 transkriptů genů kódujících proteiny ve spermatu a našli 19 různých mRNA mezi spermiemi s vysokou a nízkou motilitou. V roce 2002 byla provedena analýza mikročipů pro lidské spermie a bylo zjištěno 3 000 jedinečných spRNA. RNA-seq poskytla mnohem úplnější profil transkriptů lidských spermií, což umožnilo identifikovat, kvantifikovat a charakterizovat známé i dříve neznámé RNA. Několik studií se zaměřilo na charakterizaci spRNA skotu. Bylo zjištěno, že několik mRNA, lncRNA a miRNA koreluje s kvalitativními znaky spermatu býků. Tradičně se však mělo za to, že tyto spRNA jsou transkripčními zbytky po spermatogenezi, protože v cytoplazmě a jaderném genomu chybí 28S rRNA a 18S rRNA během transkripčního dormance. V nedávné době byly v některých studiích nalezeny transkripty, které se podílejí na pohyblivosti spermií. (Li et al. 2023). Nové důkazy naznačují, že RNA spermií mohou být potenciálními markery pro hodnocení spermatogenních dějů a úspěšnosti procesu oplodnění. RNA spermií jsou také potenciálními kandidáty pro předpověď úspěšného embryonálního vývoje, udržení březosti a také zdraví potomků. Profilování RNA spermií tak může být neinvazivní metodou pro předpověď plodnosti býků. V budoucnu se může stát počátečním krokem pro screening býků pro šlechtitelský program (Selvaraju et al. 2022).

4 Diskuze

Umělá inseminace s použitím spermatu geneticky nadřazených plemeníků zůstává jednou z neúčinnějších biotechnologií, které byly komerčně využity pro účely chovu zvířat. Genetický pokrok však nemůže nastat, pokud nedojde k fertilizaci. Inseminační stanice, které poskytují kryokonzervované býčí sperma pro komerční využití, jsou závislé na in vitro testech kvality spermatu. Hlavním účelem hodnocení spermií je studovat vztah mezi kvalitou spermatu a jeho schopností fertilizovat. Ačkoliv toto odvětví bylo založeno na subjektivním hodnocení pohyblivosti. Průtoková cytometrie a Počítačová analýza spermatu (CASA) nabízejí objektivnější a opakovatelnější měření kvalitativních znaků u spermatu. (De Jarnette et al. 2022)

Gliozzi et al. (2017) uvádí, že korelace mezi testy in vitro a fertilizační schopností prokazuje vysokou variabilitu napříč různými studii.

Během mého vlastního studia a čtení odborných článků o dané problematice. Vidím největší potenciál ve spojitosti s fertilizací v průtokové cytometrii. Průtoková cytometrie přináší možnost posouzení integrity plazmatické membrány spermií, stavu akrozomu a integrity DNA, a také funkčnosti mitochondrií. Jednou z hlavních výhod této metody je schopnost analyzovat velké množství spermií během krátké doby (až několik tisíc buněk za vteřinu) a hodnotit najednou více parametřů spermatu.

Zhang et al. (1999) pozorovali, že jednotlivé parametry FC u býčích spermií významně nekorelovaly s polní plodností. Avšak u kombinovaných parametrů byla korelace významná.

Sellem et al. (2015) také tvrdí, že korelace jednotlivých parametrů FC jsou příliš nízké na to, aby bylo možné předpovědět fertilizační schopnost pouze na základě jediného parametru. A v jejich studii nejvyšší korelaci s fertilizační schopností u jednotlivých parametrů vykazovala mitochondriální aktivita ($r^2=0.073$) a akrozomální integrita ($r^2=0.104$) (Sellem et al. 2015).

Za další vysoce predikce schopnou analýzu bych označila systém CASA, která je schopna posoudit motilitu a morfologii spermií. A stejně jako průtoková cytometrie dokáže posoudit najednou více parametrů.

Nagy et al. (2015) tvrdí, že motilita je jednou z nejdůležitějších charakteristik spojených s fertilizační schopností spermií a došli k závěru, že VAP je nejužitečnější charakteristika motility spermatu, která má klinický význam při predikci plodnosti.

Kathiravan et al. (2011) ve své práci zmiňují, že pro predikci fertilizace u býčího spermatu hodnocených pomocí systému CASA mohou být užitečné parametry progresivní pohyblivosti a rychlosti, jako jsou VCL, VSL a dráhová rychlost VAP. Avšak též uvádí, že parametry jako STR, LIN, BCF, ALH nemají u býků naráz od lidského spermatu téměř žádnou pozitivní korelaci s fertilizací (Kathiravan et al. 2011).

Mapel et al. (2022) je své studiu u hnědých švýcarských býků zjistili, že pohyblivost spermií pozitivně korelovala s plodností býků ($r = 0,1598 \pm 0,0002$).

Avšak Raval et al. (2024) tvrdí, že hodnocení motility a morfologických parametrů spermií nepředpovídá schopnost oplodnění, protože i spermie s normální pohyblivostí a morfologií mohou při procesu oplodnění selhat.

Amann a Waberski (2014) uvádějí, že stále není zcela jasné, které parametry pohybu spermií, získané pomocí systému CASA, jsou schopny spolehlivě předpovídat jejich fertilizační schopnost.

I přes vysokou přesnost, spolehlivost a rychlost zařízení CASA (Amann & Waberski 2014), je pozorován nesoulad v počtu narozených zvířat, pokud je tato analýza prováděna samostatně. Důvodem je, že pohyblivost spermií je pouze jedním ze základních a nezbytných předpokladů pro úspěšné dokončení biologické funkce spermie a oplodnění oocyty (Graham & Mocé 2005). Amann & Waberski (2014) souhlasí, že zatím není jasné, které charakteristiky pohybu spermií, stanovené systémem CASA, jsou schopny předpovědět jejich fertilizační schopnost.

5 Závěr

Všechny zde uvedené in vitro analýzy jsou schopny do určité míry predikovat schopnost fertilizace. Avšak jak již bylo zmíněno nejvýznamnějšími metodami korelující s fertilizací jsou beze sporu průtoková cytometrie a systém CASA. A také jejich těsná vzájemná korelace přispívá k uvědomění, že se jedná o celkem spolehlivé prektory fertilizace. Avšak je třeba konstatovat, že oplození velmi komplikovaný proces na to, aby mohl být kompletně testován během in vitro podmínek, které máme v současné době k dispozici. Stále nemáme k dispozici žádnou 100% spolehlivou metodu, která by napodobovala složité a důležité interakce mezi spermii a samičím pohlavním ústrojím, k nimž dochází během transportu spermií do místa oplození. I přes to, s využitím kombinací nejvýznamnějších analýz jako CASA a průtoková cytometrie jsme schopni fertilizační schopnosti spermií do vysoké míry predikovat.

Díky svým mimořádným možnostem analýzy a třídění jednotlivých buněk se průtoková cytometrie široce používá v mnoha oblastech. Navzdory svému významnému dopadu mají současné komerční systémy průtokové cytometrie následující nevýhody: vysoká cena, rozměr přístroje a neustálé požadavky na údržbu vyškoleným personálem. Z ekonomických důvodů jsou průtokové cytometry jsou obvykle k dispozici pouze v laboratořích s dostatečnými finančními prostředky.

Avšak v současné době roste potřeba přenosných, levných a bezúdržbových platform průtokové cytometrie. Jako jedním z řešení se jeví integrovat průtokovou cytometrii do čipových zařízení. Díky čipům by se snížila pořizovací cena i cena za údržbu tudíž by analýza na průtokovém cytometru byla mnohem dostupnější pro více pracovišť. Přestože průtoková cytometrie na čipu zatím není široce dostupná, stále pokračuje výzkum a vývoj v této oblasti. Proto věřím, že s pokračujícím pokrokem v technologii budou laboratoře na čipu stále více využívány v praxi.

A jak jsem již popsala, za další vysoce predikce schopnou analýzu bych označila systém CASA. Jako hlavní úskalí systému CASA shledávám v tom, že ne všechny pohyblivé spermie lze definovat jako fertilizace schopné. I přes to, že motilita spermií je považována za důležitý prediktivní parametr fertilizace dle mého samostatné posouzení motility není dostatečné k predikci fertilizace u spermatu. Jelikož CASA nedokáže odhalit skryté defekty buněk, které mohou mít za následek horší nebo špatnou kvalitu rozmražených vzorků ejakulátu. Proto bych vždy analýzu CASA doplnila vyšetřením na průtokovém cytometru. Popřípadě i s jinými analýzami uvedenými v této práci.

Myslím, že volba této problematiky je opodstatněná, protože otázka vývoje laboratorních testů, které by dokázaly přesně předpovědět oplodňovací schopnost vzorku býčího semene, není ve světě dosud vyřešena. I proto bych se jí chtěla nadále zabývat i v následujícím studiu a diplomové práci.

6 Literatura

Agarwal A, et. al. 2022. Sperm Vitality and Necrozoospermia: Diagnosis, Management, and Results of a Global Survey of Clinical Practice. *The World Journal of Men's Health* **40**: 228.

Amann RP, Waberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* **81**:5-17.

Ashwitha A. et. al. 2023. Quantitative proteomics profiling of spermatozoa and seminal plasma reveals proteins associated with semen quality in *Bos indicus* bulls. *Journal of Proteomics* **273**:104794.

Aurich Ch. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **89**:65-75.

Awan MA, Arshad J, Rakha BA, Ansari MS, Waseem M, Fouladi-Nashta A, Miller D, Akhter S. 2021. Sperm binding to hyaluronan is an excellent predictor of Nili-Ravi buffalo bull fertility. *Andrologia* (e13991) DOI: 10.1111/and.13991.

Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. 2000. Semen Evaluation. Pages 365-375 in Hafez B, Hafez ESE, editors. *Reproduction in farm animals seventh edition*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Barszcz K, Wiesetek D, Wasowicz M, Kupczynska M. 2011. Bull Semen Collection and Analysis for Artificial Insemination. *Journal of Agricultural Science* **4**.

Barteneva NS, Fasler-Kan E, Vorobjev IA. 2012. Imaging Flow Cytometry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **60**:723-733

Baumer J, Ball BA, Linfor JJ. 2005. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American Journal of Veterinary Research* **66**:772-779.

Bollwein H, Malama, E. 2023. Review: Evaluation of bull fertility. Functional and molecular approaches. *Animal* **17**:100795.

Bucher K, Malama E, Siuda M, Jannett F, Bollwein, H. 2019. Multicolor flow cytometric analysis of cryopreserved bovine sperm. A tool for the evaluation of bull fertility. *Journal of Dairy Science* **102**:11652-11669.

Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A. 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* **74**:424-435.

Cordelli E, Eleuteri P, Leter G, Rescia M, Spanò M. 2005. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception* **72**:273-279.

Dalton JC. 2019. Predicting and promoting fertility in bulls. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle* 20-21.

Darzynkiewicz Z, Halicka HD, Zhao H. 2010. Analysis of Cellular DNA Content by Flow and Laser Scanning Cytometry. *Polyploidization and Cancer* **676**:137-147.

DeJarnette JM, Harstine BR, McDonald K, Marshall CE. 2022. Commercial application of flow cytometry for evaluating bull sperm. *Animal Reproduction Science* **246**:106838.

DeJarnette JM, Harstine BR, McDonald K, Marshall CE. 2022. Commercial application of flow cytometry for evaluating bull sperm. *Animal Reproduction Science* **246**:106838.

Diskin MG. 2018. Review: Semen handling, time of insemination and insemination technique in cattle. *Animal* **12**:75-84.

Doan M, Vorobjev I, Reed P, Filby A, Wolkenhauer O, Goldfeld AE, Lieberman J, Barteneva N, Carpenter AE, Hennig H. 2018. Diagnostic Potential of Imaging Flow Cytometry. *Trends in Biotechnology* **36**:649-652.

Enciso M, Cisale, H, Johnston SD, Sarasa J, Fernández JL, Gosálvez J. 2011. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. *Theriogenology* **76**:23-32.

Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* **49**:871-879.

Fernandez-Novo A. et. al. 2021. Effects of Extender Type, Storage Time, and Temperature on Bull Semen Parameters. *Biology* **10**:630.

Ferrer MS, Klabnik-Bradford J, Anderson DE, Bullington AC, Palomares RA, Miller LMJ, Stawicki R, Miesner M. 2017. Sperm-bound antisperm antibodies prevent capacitation of bovine spermatozoa. *Theriogenology* **89**:58-67.

Filipčík R, Rečková Z, Pešan V, Konoval O, Kopec T. 2023. Evaluation of semen parameters from Fleckvieh–Simmental bulls and the influence of age and season of collection. *Archives Animal Breeding* **66**:133-120.

Flesch FM, Gadella BM. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1469**:197-235.

Foote RH. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science* **80**:1-10.

Gadea J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology* **63**:431–444.

Georgadaki K, Khoury N, Spandidos DA, Zoumpourlis V. 2016. The molecular basis of fertilization (Review). *International Journal of Molecular Medicine* **38**:979-986.

Gillan L, Evans G, Maxwell WM 2005: Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* **63**:445-457.

Gillan L, Kroetsch T, Chis Maxwell WM, Evans G. 2008. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science* **103**:201-214.

Gillespie JR, Flanders FB. 2010. Modern livestock and poultry production. Delmar Publications. Clifton Park.

Glazar AI, McCue PM. 2021. Assessment of Sperm Acrosomal Status. *Equine Reproductive Procedures* **635–636**.

Gliozzi TM, Turri F, Manes S, Cassinelli C, Pizzi F. 2017. The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal* **11**:1975-1982.

Gomes, Fabio P., Park R, Viana AG, Fernandez-Costa C, Topper E, Kaya A, Memili E, Yates JR, Moura AA. 2020. Protein signatures of seminal plasma from bulls with contrasting frozen-thawed sperm viability. *Scientific Reports* **10**:1466.

- Graham JK, Mocé E. 2005. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* **64**:492-504.
- Graham JK. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*. **68**:239-247.
- Guthrie HD, Liu J, Critser JK. 2002. Osmotic Tolerance Limits and Effects of Cryoprotectants on Motility of Bovine Spermatozoa. *Biology of Reproduction* **67**:1811-1816
- Hayden SS, Blanchard TL, Brinsko SP, Varner DD, Hinrichs K, Love ChC. 2015. The “dilution effect” in stallion sperm. *Theriogenology* **83**:772-777.
- Holt WV, O'Brien J, Abaigar T. 2007. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reproduction, Fertility and Development* **19**:709.
- Holt WV. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* **53**:47-58.
- Hossain MdS, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP, Rodriguez-Martinez H. 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian Journal of Andrology* **13**:406-419.
- Hossain MDS, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP, Rodriguez-Martinez H. 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian Journal of Andrology* **13**:406-419.
- Hurri E, Lima-Verde, Johannisson A, Stålhammar H, Ntallaris T, Morrell J. 2022. Post-thaw semen quality in young bull ejaculates before being accepted for commercial semen doses. *Veterinary Record* **191**:1386.
- Huszar, G, Ozkavukcu S, Jakab A, Celik-Ozenci C, Sati GL, Cayli S. 2006. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: Selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **18**:260–267.
- Chenoweth PJ. 2005. Genetic sperm defects. *Theriogenology* **64**:457–468.
- Iaffaldano N, Di Iorio M, Rosato MP, Manchisi A. 2014. Cryopreservation of rabbit semen using non-permeable cryoprotectants: Effectiveness of different concentrations of low-density lipoproteins (LDL) from egg yolk versus egg yolk or sucrose. *Animal Reproduction Science* **151**:220-228.
- Januskauskas A, Johannisson, A, Rodriguez-Martinez H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* **60**:743–758.
- Johnson SK., Funston, R.N, Hall JB, Kesler DJ, Lamb GC, Lauderdale JW, Patterson DJ, Perry GA, Strohhahn DR. 2011. Multi-state Beef Reproduction Task Force provides science-based recommendations for the application of reproductive technologies. *Journal of Animal Science* **89**:2950-2954.
- Kanchan, Matharoo JS. 2015. Effect of semen colour on seminal characteristics in cattle bulls. *Indian Journal of Animal Research* **49**:146.
- Kastelic JP. 2013. Male involvement in fertility and factors affecting semen quality in bulls, *Animal Frontiers*, Volume **3**: 20–25.

Kathiravan P, Kalatharan, J, Karthikeya G, Rengarajan K, Kadirvel G. 2011. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System - A Review. *Reproduction in Domestic Animals* **46**:165–172.

Larsson B, Rodríguez-Martínez H. 2000. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility?. *Animal Reproduction Science*, **60-61**:327–336.

Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Parks JE. 2016. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science* **172**:1–9.

Lazarevic J, Wikarczuk M, Somkuti SG, Barmat LI, Schinfeld JS, Smith SE. 2010. Hyaluronan binding assay (HBA) vs. sperm penetration assay (SPA): Can HBA replace the SPA test in male partner screening before in vitro fertilization?. *Journal of experimental & clinical assisted reproduction* **7**:2.

Li W et. al. 2023. Integrating sperm cell transcriptome and seminal plasma metabolome to analyze the molecular regulatory mechanism of sperm motility in Holstein stud bulls. *Journal of Animal Science* **101**:214.

Lybaert P, Danguy A, Leleux F, Meuris S, Lebrun P. 2009. Improved methodology for the detection and quantification of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Histol Histopathol* **24**:999-1007.

Madeja ZE, Podralska M, Nadel A, Pszczola M, Pawlak P, Rozwadowska N. 2021. Mitochondria Content and Activity Are Crucial Parameters for Bull Sperm Quality Evaluation. *Antioxidants* **10**:1204.

Mapel XM, Hiltbold M, Kadri NK, Witschi U, Pausch H. Bull fertility and semen quality are not correlated with dairy and production traits in Brown Swiss cattle. *JDS Communications* **3**:120-125.

Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Anel L, De Paz P. 2010. Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. *Reproduction in Domestic Animals* **45**:67-78.

McKinnon KM. 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology* **120**:5.1.1-5.1.11.

Menon AG, Barkema HW, Wilde R, Kastelic JP, Thundathil JC. 2011. Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* **75**:241-7.

Moore SG, Hasler JF. 2017. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*, **100**:10314–10331.

Moreira SSJ, Santos CS, Castelo TS, Bezerra LGP, Praxedes ECG, Matos TM, Souza-Junior JBF, Feijó FMC. 2022. Investigating the need for antibiotic supplementation to the extender used for semen cryopreservation in collared peccaries. *Frontiers in Veterinary Science* **9**:954921.

Morrell JM, Wallgren M. 2014. Alternatives to antibiotics in semen extenders: a review. *Pathogens*. **3**:934-946.

Morris, LHA, Hunter, RHF, & Allen, WR. 2000. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *Journal of Reproduction and Fertility* **118**: 95-100.

Mortimer ST. 2000. CASA-practical aspects. *Journal of Andrology* **21**:515–524.

- Moskovtsev SI, Librach CL. 2013. Methods of Sperm Vitality Assessment. *Spermatogenesis* **927**:13–19.
- Murphy C, Holden S, Murphy E, Cromie AR, Lonergan P, Fair S. 2016. The impact of storage temperature and sperm number on the fertility of liquid-stored bull semen. *Reproduction Fertility and Development* **28**:1349-1359.
- Murphy EM, O'Meara C, Eivers B, Lonergan P, Fair S. 2018. Comparison of plant- and egg yolk-based semen dilutents on in vitro sperm kinematic and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen. *Anim Reprod Sci* **191**:70-75.
- Nagata MPB, Egashira J, Katafuchi N, Endo K, Ogata K, Yamanaka K. 2019. Bovine sperm selection procedure prior to cryopreservation for improvement of post-thawed semen quality and fertility. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **10**:91.
- Nagy Á, Polichronopoulos T, Gáspárdy A, Solti L, Cseh S. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. *Acta Veterinaria Hungarica* **63**:370-381.
- Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM. 2003. A Triple-Stain Flow Cytometric Method to Assess Plasma – and Acrosome-Membrane Integrity of Cryopreserved Bovine Sperm Immediately after Thawing in Presence of Egg-Yolk Particles. *Biology of Reproduction* **68**:1828-1835.
- Naing SW, Wahid H, Mohd AK, Rosnina Y, Zuki AB, Kazhal S, Bukar MM, Thein M, Kyaw T, San MM. 2010. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Animal Reproduction Science* **122**:23-28.
- Nichi M, Bols PEJ, Züge RM, Barnabe VH, Goovaets IGF, Barnabe RC, Cortada CNM. 2006. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology* **66**:822-828.
- Oh SA, You YA, Park YJ, Pang MG. 2010. The sperm penetration assay predicts the litter size in pigs. *International Journal of Andrology* **33**:604-612.
- Özbek M, Hitit M, Kaya A, Jousen FD, Memili E. 2021. Sperm Functional Genome Associated With Bull Fertility. *Frontiers in Veterinary Science* **8**:610888.
- Palacín, I, Vicente-Fiel S, Santolaria P, Yániz JL. 2013. Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small Ruminant Research* **112**:128-135.
- Palmer CW. 2005. Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls. *Theriogenology* **64**:469–479.
- Panda S, Saha A, Chauhan MS, Singla SK. 2022. Development of homologous hemizona assay as a potential predictor of fertility in buffalo bulls: A preliminary approach. *Reproduction in Domestic Animals* **57**:1336-1343.
- Park YJ, Mohamed ESA, Oh SA, Yoon SJ, Kwon WS, Kim HR, Lee MS, Lee K, Pang MG. 2012. Sperm Penetration Assay as an Indicator of Bull Fertility. *The Journal of reproduction and development*. **58**:461-466.
- Patel HA, Siddiquee GM, Chaudhari-Dinesh V, Suthar-Vishal S. 2016. Effect of different antioxidant additives in semen diluent on cryopreservability (–196°C) of buffalo semen. *Veterinary World* **9**:299-303.
- Pernas, S, Fernandez-Novo, A, Barrajon-Masa, C, Mozas, P, Pérez-Villalobos, N, Martín-Maldonado, B, Oliet, A, Astiz, S, Pérez-Garnelo, Sonia S. 2023. Bull Semen Obtained

on Beef Farms by Electroejaculation: Sperm Quality in the First Two Hours of Storing with Different Extenders and Holding Temperatures. *Animals*. **13**:1561.

Perry VEA. 2021. The Role of Sperm Morphology Standards in the Laboratory Assessment of Bull Fertility in Australia. *Frontiers in Veterinary Science* **8**:672058.

Petrunkina AM, Harrison RA. 2011. Cytometric solutions in veterinary andrology. developments, advantages, and limitations. *Cytometry A* **79**:338-348.

Prete CD, Prieto OB, Mislei B, Iacono E, Mari G, Cocchia N, Gasparrini B, Merlo B, Bucci D. 2022. Assessment of an open-access CASA software for bovine and buffalo sperm motility analysis. *Animal Reproduction Science* **247**:107089.

Prete CD, Prieto OB, Mislei B, Iacono E, Mari G, Cocchia N, Gasparrini B, Merlo B, Bucci D. 2022. Assessment of an open-access CASA software for bovine and buffalo sperm motility analysis. *Animal Reproduction Science* (e107089) DOI: 10.1016/j.anireprosci.2022.107089.

Purdy PH. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* **63**:215-225.

Ramu S, Jeyendran R. 2012. The Hypo-osmotic Swelling Test for Evaluation of Sperm Membrane Integrity. *Spermatogenesis* **927**:21-25.

Raval K, Kumaresan A, Sinha MK, Elango K, Peter Ebenezer Samuel King J, Nag P, Paul N, Talluri TR, Patil S. 2024. Sperm proteomic landscape is altered in breeding bulls with greater sperm DNA fragmentation index. *Theriogenology* **216**:82-92.

Rego JPA, Moura AA, Nouwens AS, McGowan MR, Boe-Hansen GB. 2015. Seminal plasma protein profiles of ejaculates obtained by internal artificial vagina and electroejaculation in Brahman bulls. *Animal Reproduction Science* **160**:126-137.

Rego JPA, Moura AA, Nouwens, AS, McGowan MR, Boe-Hansen GB. 2015. Seminal plasma protein profiles of ejaculates obtained by internal artificial vagina and electroejaculation in Brahman bulls. *Animal Reproduction Science* **160**:126-137.

Renneberg R, Berkling V, Loroche V. 2017. *Biotechnology for Beginners*. Academic Press, Cambridge.

Robinson JP, Ostafe R, Iyengar SN, Rajwa B, Fischer R. 2023. Flow Cytometry: The Next Revolution. *Cells* **12**:1875.

Robles V, Martínez-Pastor F. 2013. Flow Cytometric Methods for Sperm Assessment. *Spermatogenesis* **927**:175–186.

Rodríguez-Martínez H. 2003. Laboratory Semen Assessment and Prediction of Fertility: still Utopia?. *Reproduction in Domestic Animal* **38**:312-318.

Roldan ERS. 2007. Focus on determinants of male fertility. *Reproduction* **134**:1–2.

Rosa JL, Freitas Dell'Aqua CP, Ferreira de Souza F, Missassi G, Kempinas WG. 2023. Multiple flow cytometry analysis for assessing human sperm functional characteristics. *Reproductive toxicology* **117**:108353.

Sankhi S, Sapkota KR, Regmi B. 2019. Effect of Age and Frequency of Collection on Quality of Jersey Bulls Semen at National Livestock Breeding Center (NLBC), Nepal. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology* **7**:88-95.

Savvulidi FG, Ptáček M, Málková A, Beránek J, Stádník L. 2021. Optimizing the conventional method of sperm freezing in liquid nitrogen vapour for Wallachian sheep conservation program. *Czech Journal of Animal Science* **66**:55-64.

Seidel GE. 2011. Profitable uses of sex-sorted semen. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle* 349–352.

Sellem E, Broekhuijse MLWJ, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, Koenen EPC. 2015. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology* **84**:1447–1454.

Selvaju S, Ramya L, Swathi D, Parthipan S. 2022. Sperm Transcriptome Sequencing for Predicting Bull Fertility: Concepts, Facts and Future Directions. Pages 133-146 in Kumaresan A, Srivastava AK. *Frontier Technologies in Bovine Reproduction*. Springer.

Sunder M, Leslie SW. 2022. Semen Analysis. *StatPearls*.

Štiavnická M, Hošek P, Abril-Parreño L, Kenny, DA, Lonergan P, Fair S. 2023. Membrane remodeling and hyperactivation are impaired in frozen-thawed sperm of low-fertility bulls. *Theriogenology* **195**:115-121.

Tadesse M, Thiengtham J, Pinyopummin A, Prasanpanich S. 2010. Productive and reproductive performance of Holstein Friesian dairy cows in Ethiopia. *Livestock Research for Rural Development*. Volume **22**:34.

Talluri TR, Kumaresan A, Sinha MK, Paul N, Ebenezer Samuler King JP, Datta TK. 2022. Integrated multi-omics analyses reveals molecules governing sperm metabolism potentially influence bull fertility. *Scientific Reports* **12**:10692.

Talwar P, Hayatnagarkar S. 2015. Sperm function test. *Journal of Human Reproductive Sciences*. **8**:61.

Tanga BM, Qamar AY, Raza S, Bang S, Fang X, Yoon K, Cho J. 2021. Semen evaluation: methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment — A review. *Animal Bioscience* **34**:1253-1270.

Taşdemir U, Büyükleblebici S, Tunce PB, Coşkun E, Özgürtaş T, Aydın FN, Büyükleblebici O, Gürcan İS. 2013. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology* **66**:38-42.

Thomas, J. M., Poock, S. E., Ellersieck, M. R., Smith, M. F., Patterson, D. J. 2014. Delayed insemination of non-estrous heifers and cows when using conventional semen in timed artificial insemination. *Journal of Animal Science* **92**:4189-4197.

Tuncer PB et al. 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology* **61**:303-307.

Ugur MR, Saber AA, Evans HC, Gilmore AA, Hitit M, Arifiantini R, Purwantara B, Kaya A, Memili E. 2019. Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Science* **6**:268.

Vodička J, Pytlík J, Stádníková M, Stádník L, Ducháček J, Codl R, Binoivá . 2022. The effects of egg yolk-based and egg yolk-free diluents on the post-thaw quality of bull spermatozoa. *Acta Veterinaria Brno* **91**:339-346.

Vogiatzi P, Chrelias Ch, Cahill DJ, Creatsa M, Vrachnis N, Iliodromiti Z, Kassanos D, Siristatidis Ch. 2013. Hemizona Assay and Sperm Penetration Assay in the Prediction of IVF Outcome: A Systematic Review. *BioMed Research International* 1-10.

Wang X et al. 2019. Integrated analysis of mRNAs and long noncoding RNAs in the semen from Holstein bulls with high and low sperm motility. *Scientific Reports*. **9**:2092.

Wassarman P, Jovine L, Litscher E. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biology* **3**:59–64.

Yanagimachi R. 2011. Mammalian Sperm Acrosome Reaction: Where Does It Begin Before Fertilization?. *Biology of Reproduction* **85**:4-5.

Yi Y, Zimmerman SW, Manandhar G, Oddhiambo JF, Kennedy C, Jonáková V, Maňásková-Postlerová P, Sutovský M, Park CS, Sutovsky P. 2012. Ubiquitin-activating enzyme (UBA1) is required for sperm capacitation, acrosomal exocytosis and sperm–egg coat penetration during porcine fertilization. *Int J Androl* **35**:196-210.

Zhang, Larsson, Lundeheim, Håård, Rodriguez-Martinez. 1999. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen–thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. *International Journal of Andrology* **22**:253-260.

Zoca SM et al. 2023. Bull field fertility differences can be estimated with in vitro sperm capacitation and flow cytometry. *Frontiers in Animal Science* **4**:1180975.