

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chovu hospodářských zvířat**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Srovnání komerčních ředidel a jejich kombinací za účelem  
zlepšení kryokonzervačních schopností u spermatu beranů  
valašské ovce  
Diplomová práce**

**Bc. Johana Uhlířová  
Reprodukční biotechnologie**

**Vedoucí práce: Ing. Martin Ptáček, Ph.D**

© 2023 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Srovnání komerčních ředidel a jejich kombinací za účelem zlepšení kryokonzervačních schopností u spermatu beranů valašské ovce" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2023

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Martinu Ptáčkovi, Ph.D. za odbornou pomoc při zpracování diplomové práce a cenné poznatky k danému tématu a čas věnovaný konzultacím. Také bych ráda poděkovala Ing. Filippu Georgijevičovi Savvulidimu, Ph.D. za odborné vedení v laboratoři při získávání dat pro experimentální část diplomové práce.

# Srovnání komerčních ředidel a jejich kombinací za účelem zlepšení kryokonzervačních schopností u spermatu beranů valašské ovce

## Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo srovnání komerčních ředidel za účelem zlepšení kryokonzervačních schopností u spermatu beranů valašské ovce. Během experimentu byly použity vzorky ejakulátu beranů plemene valašská ovce. Toto plemeno se řadí mezi genetické zdroje, kdy proces kryokonzervace hraje významnou roli v uchování genů tohoto plemene.

Předpokládalo se, že komerční ředidla použitá buď samostatně nebo smícháním v definovaném poměru ovlivňují in vitro ukazatele inseminačních dávek po rozmrazení. Měla jsem k dispozici 7 různých ředidel (1. AndroMed, 2. OviXcell, 3. OptiXcell, 4. AndroMed + OviXcell + OptiXcell (1:1:1), 5. Andromed + OviXcell (1:1), 6. Andromed + OptiXcell (1:1), 7. OviXcell a OptiXcell (1:1)). Hodnocení odebraného spermatu probíhalo za pomoci CASA softwaru a průtokové cytometrie. Jako oplození schopné spermie jsem brala ty, které měly vysokou celkovou a progresivní motilitu, neměly poškozený akrozom, poškozenou cytoplazmatickou membránu a měly zachovanou mitochondriální aktivitu. Vyhodnocení probíhalo po ekvilibraci a po rozmrazení.

Z našich výsledků vyplývá, že nejlepší celkové motility, progresivní motility a životaschopnosti spermií po rozmrazení bylo dosaženo v ředidle z AndroMedu a OptiXcellu, což přináší překvapivé zjištění. Zároveň z našich výsledků je patrné, že nejhorší variantou pro mrazení beraního spermatu je ředidlo OviXcell. Dosáhlo nejhorších výsledků v celkové motilitě, progresivní motilitě po rozmrazení, životaschopnosti spermií po ekvilibraci i rozmrazení a v ostatních sledovaných parametrech případně nebyly pozorovány signifikantní rozdíly s nejhoršími výsledky.

Získaná data poskytují slibné předpoklady pro zlepšení kvality kryokonzervovaného ejakulátu. Do budoucna by bylo vhodné ověřit kvalitu smíchaných ředidel v in vivo podmínkách a zhodnotit míru plodnosti, takto připravených inseminačních dávek. Případně lze vyzkoušet namíchat odlišné poměry námi zvolených kombinací ředidel.

**Klíčová slova:** průtoková cytometrie, CASA, kryokonzervace, sperma

# **Comparison of commercial extenders and their mixtures for improving cryoconservation abilities Wallachian rams sperm**

## **Summary**

The aim of this diploma thesis was to compare commercial extenders in order to improve the cryoconservation capabilities of Wallachian ram sperm. During the experiment, ejaculate samples from Wallachian sheep were used. This breed ranks among the genetic resources where the cryoconservation process plays a significant role in preserving the genes of this breed.

Commercial extenders used either alone or mixed in a defined ratio were hypothesized to affect in vitro parameters of insemination doses after thawing. I had 7 different extenders at my disposal (1. AndroMed, 2. OviXcell, 3. OptiXcell, 4. AndroMed + OviXcell + OptiXcell (1:1:1), 5. Andromed + OviXcell (1:1), 6. Andromed + OptiXcell (1:1), 7. OviXcell and OptiXcell (1:1)). The evaluation of the collected sperm was carried out with the help of CASA software and flow cytometry. As sperm capable of fertilization, I took those that had high overall and progressive motility, did not have a damaged acrosome, damaged cytoplasmic membrane and had preserved mitochondrial activity. The evaluation took place after equilibration and after thawing.

Our results show that the best total motility, progressive motility and viability of spermatozoa after thawing were achieved in the extender from AndroMed and OptiXcell, which is a surprising finding. At the same time, our results show that the worst variant for freezing ram sperm is the OviXcell extender. It achieved the worst results in total motility, progressive motility after thawing, sperm viability after equilibration and thawing, and in the other monitored parameters, possibly no significant differences were observed with the worst results.

The obtained data provide promising prerequisites for improving the quality of cryoconservation ejaculate. In the future, it would be advisable to verify the quality of the mixed extenders in in vivo conditions and to evaluate the fertility rate of insemination doses prepared in this way. Alternatively, you can try mixing different proportions of our chosen combination of thinners.

**Keywords:** flow cytometry, CASA, cryoconservation, sperm

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Valašská ovce.....</b>	<b>10</b>
3.1.1 Genový zdroj .....	10
<b>3.2 Ejakulát.....</b>	<b>11</b>
3.2.1 Získávání ejakulátu od beranů .....	12
3.2.2 Metody uchování spermatu.....	13
3.2.3 Hodnocení kvality ejakulátu .....	16
<b>3.3 Ředidla .....</b>	<b>18</b>
<b>3.4 CASA (Computer -assisted semen analysis).....</b>	<b>19</b>
3.4.1 Příprava vzorku.....	22
<b>3.5 Průtoková cytometrie .....</b>	<b>23</b>
3.5.1 Co je průtoková cytometrie?.....	23
3.5.2 Historie .....	24
3.5.3 Základní principy průtokové cytometrie .....	25
3.5.4 Úkoly a techniky cytometrie.....	28
3.5.5 Příprava vzorků a sběr dat v průtokové cytometrii.....	29
3.5.6 Průtoková cytometrie v reprodukční biologii .....	29
<b>4 Metodika .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Beraní .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Odběr ejakulátu .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3 Zpracování vzorku a použitá ředidla .....</b>	<b>33</b>
<b>4.4 Hodnocení vzorků před mrazením .....</b>	<b>33</b>
<b>4.5 Mrazení .....</b>	<b>35</b>
<b>4.6 Hodnocení po rozmrazení .....</b>	<b>35</b>
<b>5 Statistické zpracování dat .....</b>	<b>36</b>
<b>5.1 CASA.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2 Průtokový cytometr .....</b>	<b>37</b>
<b>6 Výsledky.....</b>	<b>38</b>
<b>6.1 Výsledky CASA .....</b>	<b>38</b>
6.1.1 Základní charakteristiky .....	38
6.1.2 Popis modelu .....	38
6.1.3 Vliv ředidla .....	39
<b>6.2 Výsledky průtokový cytometr.....</b>	<b>44</b>
6.2.1 Základní charakteristiky .....	44

6.2.2	Popis modelu .....	44
6.2.3	Vliv ředidla .....	45
<b>7</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>53</b>
<b>9</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>54</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>61</b>

.

# 1 Úvod

Ovčáctví u nás má dlouholetou tradici. V průběhu let se vyvíjela odlišná plemena zaměřena na jiné chovatelské cíle. Původní valašské ovce vychází z cápových ovcí, které jsou typické pro oblast Karpat a Balkánu. Do Česka se dostaly pravděpodobně vlivem kolonizace v 15. a 16. století. Ve 20. století se o záchranu tohoto plemene zasadil Doc.Ing. Bora Čumlivský CSc., který valašské ovce nakoupil a zařadil je do vzorníku plemen ovcí. Vynikaly svou odolností v horských vlhkých a náročných podmínkách, avšak v důsledku ekonomického zisku bylo postupně původní plemeno na pokraji vymření. V dnešní době patří mezi kombinovaná plemena a je zařazena do genofondu ohrožených druhů hospodářských zvířat a zároveň je součástí seznamu genových zdrojů ČR. Početní stavy valašské ovce jsou v posledních letech poměrně stálé, ale spíše dochází k mírnému úbytku. V roce 2022 bylo zapojeno v kontrole užítkovosti 1043 kusů bahnic. Předností jsou obstojné užitkové vlastnosti všech směrů (maso, mléko, vlna), z ekonomického hlediska největší výhodou je nenáročnost chovu a podpora ze strany státu ve formě dotací.

Chov ovcí musí v dnešní době odolávat tlaku ze strany chovu a produkce rozšířenějších domácích zvířat především drůbeže, skotu či prasat. Proto důležitou roli hrají reprodukční ukazatele. Výběr vhodných plemenů schopných produkovat kvalitní ejakulát je předpokladem pro udržení chovu. Pro zachování plemene je však podstatné dosahovat výborných výsledků i v rámci umělé inseminace, jejíž součástí je příprava co nejlepších inseminačních dávek. Je třeba optimalizovat proces kryokonzervace pro budoucí využití genových zdrojů. Proto tato práce je zaměřena na zjištění vhodného ředidla pro výrobu inseminačních dávek, které by se následně využívalo v chovatelské praxi. Cílem bylo vyzkoušet kombinace testovaných ředidel v definovaném poměru za účelem zjištění případného benefičního účinku smícháním účinných látek výchozích ředidel.



## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

**Hypotéza:** Předpokládáme, že komerční ředidla použitá buď samostatně nebo smícháním v definovaném poměru ovlivňují in vitro ukazatele inseminačních dávek po rozmrazení. Ředidla pro kryokonzervaci obsahují kryoprotektivní látky, které zabraňují poškození spermatických buněk v průběhu kryokonzervace. Každé ředidlo má jiné složení, tedy různou skladbu a poměry protektivních látek. Z důvodu omezeného využití biotechnologických metod u malých přežvýkavců jsou pro tento účel doporučována i ředidla, primárně typovaná pro skot.

**Cíl práce:** Cílem bylo vyzkoušet běžně dostupná ředidla pro kryokonzervaci malých a velkých přežvýkavců na spermatu beranů původních valašských ovcí. Dalším cílem bylo vyzkoušet kombinace testovaných ředidel v definovaném poměru za účelem zjištění případného benefičního účinku smícháním účinných látek výchozích ředidel.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Valašská ovce

Jedná se o původní hrubovlnné plemeno ovcí chovaných na území České republiky. Řadí se mezi plemena s kombinovanou užitkovostí zaměřených na produkci vlny, mléka i masa. Vlna je smíšeného splývavého charakteru, kdy sortiment odpovídá hodnocení D/E – E/F. Nejideálnější pro chov je salašnický způsob, kdy ovce se dokáží dobře adaptovat na několika měsíční zimní ustájení (Malá, 2011). V horských a podhorských oblastech je salašnictví typické. Což znamená, že sezónně ovce spásají vzdálenější trvalé travní porosty (Luick, 2004). Pozitiva salašnictví spočívají v dobré výživě ovcí, optimální produkci vlny, produkci jehněčího masa na pastvě a v neposlední řadě přispívá k intenzivnímu hnojení pastvin (Vejíček, 2007). Při chovu tímto způsobem je třeba dbát na volnou pastvu, což vyhovuje pouze oblastem v extrémních vysokohorských krajinách (Luick, 2004). Ovce dokážou vyžít i tzv. absolutní zdroje krmiv, čímž se rozumí pastva, která by jinak zůstala plně nevyužita (Horák, 2004).

Původ plemene vychází z čapových ovcí, které jsou typické pro oblast Karpat a Balkánu. Do Česka se dostaly pravděpodobně vlivem kolonizace v 15. a 16. století. Ve 20. století se o záchranu tohoto plemene zasadil Doc. Ing. Bora Čumlivský CSc., který valašské ovce nakoupil a zařadil je do vzorníku plemen ovcí. Po útoku vlků byl chov původní valašky ohrožen a za podpory nadace Speciae Rara byla část populace ovcí exportována do Německa. V roce 2004 došlo k mezinárodní výměně zvířat a reintrodukci 20 jehnic a 6 beránek (Milerski, 2016).

Ovce jsou menšího tělesného rámce, mají jemnou a harmonickou stavbu těla, konstitučně jsou pevné a vynikají živým temperamentem. Hlava má klínovitý tvar spolu s mírným klabonosem. Typická pro ně je dlouhověkost, kdy jsou schopné přežít v extrémních klimatických podmínkách a dobře se přizpůsobí. Berani jsou vždy rohatí, u ovcí jsou možné obě varianty, společně jsou krátké uši mířící do stran. Co se tvaru těla týká, tak nápadným znakem valašské ovce je poměrně široká pánev se sraženou zádí, mají rovný hřbet a dlouhý krk. Spěnky mají být pevné. Zbarveny jsou od bílé až po černou, kdy jsou běžné i strakaté a šedé varianty. Průměrná hmotnost ovcí je 40 – 50 kg, u beranů je to kolem 50 – 65 kg (“Šlechtitelský program plemene valašská ovce (V),” n.d.).

#### 3.1.1 Genový zdroj

Hlavním cílem vytvoření genových zdrojů je uchování původních ohrožených plemen, nikoli tvorba vysokoprodukčních jedinců (Oravcová et al., 2004). Musíme se naučit čelit hrozbě v podobě změn klimatu, výskytu chorob, sociálních změn, genetických problémů a problematické selekci. Musíme brát v potaz riziko neočekávaných katastrofických událostí, které mohou výrazně ovlivnit biologickou rozmanitost (Chrenek & Bulla, 2013). Genetické zdroje jsou nedílnou součástí politiky, která se u nás v průběhu let velice mění. Spolu s ekonomikou podléhaly vlivu státní správy a společnému plánování. Vývoj byl velice různorodý v rámci celé naší historie. V roce 1950 došlo k úpravě, byl uveden seznam povolených plemen se specifickými chovatelskými oblastmi. Na jeho základě bylo přistoupeno k přísným podmínkám importu. Bylo možné ho využít jen pro experimentální a vědecké účely, či na

testování. V roce 1995 byl schválen seznam čítající 29 národních plemen a spolu s ním byl i přijat jediný národní program na ochranu a využití genových zdrojů (Mátlová, 2013).

Plodnost na obahn. %	Odchov do 14 dnů %	Živá hmotnost v kg jehňat ve 100 dnech		Věk v měsících pro zařazení do plemen.		Živá hmot. v kg pro zařazení do plemen.	
		beránci	jehničky	berani	Jehnice	berani	jehnice
150	140	22	20	10-12	10-12	38	33

Tabulka 1 Chovní cíl dle SCHOK (Milerski, 2016)

Součástí Národního programu je evidence jedinců GZ spolu s genetickým a biologickým materiálem, který je uchovávaný v genobance (“154/2000 Sb. Plemenářský zákon,” 2000.). Byla vytvořena a Evropskou unií schválena chovatelská sdružení, která mají na starosti plemenné knihy a samotné šlechtitelské programy (Mátlová, 2013). Svaz chovatelů ovcí a koz v ČR je pověřen vedením a evidencí údajů o valašské ovci. Podmínkou pro zařazení do genových zdrojů je zapsání v hlavním oddílu plemenné knihy (Milerski, 2016). Systém je podporován, a především financován státem. Je přístupný pro všechny zemědělce za podmínek dohody se státem. Je třeba vést příslušné záznamy, poskytovat informace a dodržovat pravidla. Plemeno je podrobena kontrole užítkovosti a zároveň dochází k doplňování genetického materiálu do genové banky (Putnová et al., 2018). Zárodečné buňky a biologický materiál valašské ovce je uchovávan kryokonzervací. Jedná se o metodu, která slouží pro uchování neporušených živých buněk a tkání při velmi nízké teplotě (Borini & Coticchio, 2009). Účelem postupů kryokonzervace je snížit poškození a pomoci buňkám regenerovat. Protože oocyty a embrya jsou vystaveny morfologickým a funkčním poškozením. Hodnoty poranění se odvíjejí od faktorů jako je propustnost membrán, citlivost, velikost a tvar buněk (Vajta & Kuwayama, 2006)

Při výběru zvířat je třeba brát ohled na příbuznost, daný exteriér a je kladen důraz na perspektivu při zapojení do reprodukce, kde jde o získávání pokračujících linií plemenných beranů. Dále je třeba provádět kontrolu užítkovosti, a to za předpokladu, že jsou k dispozici informace o dvou předešlých generacích v plemenné knize. Pokud jedinec vykazuje příznaky vrozených či vývojových vad nemůže být veden jako genový zdroj. Výjimkou je možnost genotypizace genu odolnosti vůči klusavce (Milerski, 2016).

### 3.2 Ejakulát

Hodnocení spermatu je jediným nejdůležitějším laboratorním testem pro hodnocení samčí plodnosti. Metodika je však složitá a standardizace obtížná. Vzhledem ke své složitosti a subjektivitě je extrémně obtížné standardizovat hodnocení spermatu napříč laboratořemi (Brazil et al., 2004). V posledních letech došlo k podstatné změně v koncepčním paradigmatu ohledně toho, co je ejakulát. Donedávna se mělo za to, že reprezentativní populace (miliardy) spermií je tvořena „ekvivalentními“ buňkami se společným cílem: být tou, která by mohla konečně oplodnit oocyt. Nová data naznačující, že sada spermií je seskupena do odlišných subpopulací podle jejich kinematických a morfometrických charakteristik, otevřela cestu ke kooperativnějšímu vidění. Kromě toho bylo nedávno zjištěno, že distribuce subpopulací je u

jednotlivých zvířat odlišná, což zřejmě naznačuje, že existují různé strategie, které lze pochopit v rámci jiného paradigmatu: kompetice spermií mezi různými ejakuláty. Tyto heterogenní subpopulace spermií v ejakulátu, které vykazují kinematiku a morfometrické vzory, jsou již nějakou dobu široce známé, ale biologický význam těchto různých subpopulací spermií stále není jasný. Z tohoto důvodu je subjektivní hodnocení kvality semene nahrazováno objektivními hodnotícími technikami využívajícími technologii CASA (Valverde et al., 2019). Spermie jsou nejrozmanitějším známým buněčným typem a důležitost diverzity v morfologii spermií jako markeru plodnosti je uznávána již od počátku 50. let minulého století (Horst et al., 2018).

### 3.2.1 Získávání ejakulátu od beranů

Umělá inseminace (AI) u malých přežvýkavců se nejčastěji provádí za použití čerstvého spermatu vzhledem k nízkému % oplození mrazeným spermatem. Kryokonzervace spermatu je však důležitým nástrojem pro zlepšování plemenných hodnot nebo se využívá v programech na ochranu ohrožených druhů, včetně malých přežvýkavců. Z tohoto důvodu byla v posledních letech provedena řada studií s cílem optimalizovat protokoly kryokonzervace spermií. I když je často proces odběru přehlížen, je prvním důležitým krokem procesu kryokonzervace. U malých přežvýkavců jsou běžně používanými metodami odběru spermatu umělá vagína nebo elektroejakulace (Jiménez-Rabadán et al., 2016). Objem spermatu odebraného umělou vagínou je 0,5–1,8 ml a koncentrace spermií je  $2,5\text{--}6 \times 10^9$  / ml. Sperma získané elektroejakulací má obecně větší objem, ale nižší koncentraci (Larson, 2021).

#### 3.2.1.1 Odběr pomocí umělé vagíny

Odběr pomocí umělé vagíny je preferovanou metodou, ale vyžaduje poměrně dlouhé přípravné a tréninkové období. Doba potřebná k vycvičení plemeníků ztěžuje odběr spermatu od velkého počtu beranů. Doba výcviku může být v řádech několika dní nebo může trvat až 3 týdny, závisí to na jednotlivých beranech (Wulster-Radcliffe et al., 2001). Používané umělé vagíny jsou podobné těm, které se používají pro býky, ale mají jiné rozměry. Skládají se z vnějšího pouzdra vyrobeného z pryže a vložky. Vnější pouzdro je tvořeno dvěma částmi, kdy do meziprostoru se naplní voda. Vložka přesahuje alespoň 2–3 cm za konec vnějšího obalu a je přeložena dozadu, kdy je pomocí gumíček zajištěna na každém konci, aby vytvořila vodotěsný obal. Vložka by měla být mírně natažena a připevněna na vnější obal tak, aby vytvořila zcela hladkou plochu bez záhybů. Vnější obal je následně do poloviny naplněn vodou o teplotě 48–52 °C, což zajistí vhodnou teplotu pro odběr. Ta se pohybuje v rozmezí 40–42 °C v době odběru spermatu. Na druhém konci umělé vagíny je připevněn sběrný kužel či jiný jednorázový sběrač (Romano & Christians, 2009). Umělá vagína by měla připomínat pochvu samice, čehož lze dosáhnout i za pomoci vzduchového ventilu přidělaného na vnějším pouzdru, lze díky němu regulovat tlak uvnitř umělé vagíny. Při odběru pak dojde k podráždění VaterPacciniho a Ruffiniho receptorů, které se nacházejí na penisu (Kos et al., 2019). Konec umělé pochvy v kontaktu s koncem vložky je lehce lubrikován do hloubky ne větší než 3 cm pomocí skleněné tyčinky pokryté nespermicidním lubrikantem (Romano & Christians, 2009). Může být využita i vazelína nebo sonografický gel (Kos et al., 2019).

Existují různé typy umělých vagín, a to krátký a dlouhý. Krátká umělá vagína má délku pouzdra 110 mm a šířku 55 mm (IMV, Maple Grove, MN) a dlouhá umělá vagína má délku

pouzdra 200 mm a šířku 58 mm (NASCO, Fort Atkinson, WI) (Romano & Christians, 2009). (Kozumplík & Gamčík, 1984) uvádí, že délka vnějšího pouzdra je 200–210 mm a má průměr 50 – 55 mm, zatímco vnitřní vložka má délku 320 – 360 mm a průměr 30 – 35 mm. U krátké umělé vagíny je to pak 190 mm. V roce 1931 Milovanov navrhl původní model umělé vagíny, který se uchytil a s malými změnami se používá dodnes.

Ihned po odběru spermatu by měla být umělá vagína otočena směrem dolů a v této poloze minutu držena. Tlak se uvolní pomocí ventilu z vložky – s opatrností, aby se zabránilo rozlití vody do sběrače. Následně je vzorek přepipetován do zkumavky, ohodnocen objem a dopraví se do laboratoře k makroskopickému a mikroskopickému hodnocení (Romano & Christians, 2009).

### 3.2.1.2 Odběr pomocí elektroejakulace

Tato technika odběru spočívá v podávání nízkonapěťových, nízkoproudých elektrických impulzů do samčího rekta pomocí transrektální sondy vybavené elektrodami. Elektrické impulzy jsou obecně odděleny „klidovými“ obdobími (2–3 s). Díky impulzům je vyvolána erekce penisu, emise semene a nakonec ejakulace. Elektrické impulsy stimulují větve hypogastrického plexu obklopující semenný váček, prostatu a ductus deferens, dochází k uvolnění semene z ocasu nadvarlete do prostatické močové trubice. Zároveň vede ke stimulaci nervu, který inervuje proximální oblast močové trubice, což vyvolá kontrakci uretrálních svalů a ejakulaci (Silvia Abril-Sánchez et al., 2019). Tato varianta odběru je považována za přijatelnou alternativu pro bezpečný a opakovaný odběr ejakulátů, pokud plemeničí nebyli trénováni (Jiménez-Rabadán et al., 2016). Ejakuláty odebrané pomocí elektroejakulace mají ve srovnání s ejakuláty odebranými pomocí umělé vagíny zvýšený objem kvůli přítomnosti vyššího podílu seminální plazmy (Ledesma et al., 2015). Technika se často používá k odběru spermatu od zvířat sezónních chovných druhů, kdy se odebírá mimo normální období rozmnožování, též se uplatňuje při pokusu o odběr spermatu od prepubertálních beranů nebo u jedinců, kteří byli izolováni od samic. Elektroejakulace je snadno použitelná a účinná, zároveň je pro některé jedince stresující a bolestivá. K překonání negativních aspektů lze před zahájením použití techniky podat anestetika, sedativa a hormony, což však může ovlivnit kvalitu spermatu. Byly také vyvinuty alternativy jako je transrektální ultrazvukem řízená masáž přídatných pohlavních žláz (S. Abril-Sánchez et al., 2017). (Jiménez-Rabadán et al., 2016) ve své studii popisuje postup elektroejakulace takto: konečník je vyčištěn od výkalů a oblast předkožky je oholena a omyta fyziologickým roztokem. Následně byla použita tříelektrodová sonda připojená ke zdroji energie, který umožňoval řízení napětí a proudu. Průměr sondy, délka sondy a délka elektrody byly 3,2, 35,0 a 6,6 cm. Režim elektorejakulace sestával z po sobě jdoucích sérií 5sekundových pulzů podobného napětí, kdy mezi sériemi byly 5sekundové pauzy. Každá série se skládala celkem ze čtyř pulzů. Počáteční napětí bylo 1 V, které bylo zvýšeno v každé sérii až na maximum 5 V.

### 3.2.2 Metody uchování spermatu

Nutnost používat berany po delší dobu nebo v různých ročních obdobích podnítila výzkum skladování spermií v umělých podmínkách. Toho lze dosáhnout metodami, které snižují nebo

zastavují metabolismus spermií a tím prodlužují jejich oplozovací schopnost. Sperma lze uchovávat:

1. v kapalném (nezmrazeném) stavu za použití snížených teplot nebo jiných prostředků ke snížení metabolismu spermií;
2. ve zmrazeném stavu, který zahrnuje konzervaci při teplotách pod nulou (Salamon & Maxwell, 2000).

### 3.2.2.1 Chlazení

Hlavní způsoby skladování spermatu v kapalném stavu je skladování při snížené teplotě (0–5 nebo 10–15 °C) (Salamon & Maxwell, 2000). (Raffel et al., 1940) uvádí, že náhlé ochlazení má škodlivý vliv na následnou respirační aktivitu spermií. Teplotní šok se zvyšuje se snižováním teploty a zároveň se zvyšuje s dobou vystavení nižší teplotě. Při postupném ochlazování spermatu ve stupních po 5 °C se aklimatizace spermií zvyšuje s délkou intervalu. Pokud je interval mezi fázemi 2 hodiny, lze sperma zchladit na 1 °C a skladovat při této teplotě po dobu 24 hodin. aniž by to znatelně ovlivnilo následnou respirační aktivitu. Rychlé zahřátí nemá škodlivý vliv na následnou respirační aktivitu spermií. Teplotní šok a aklimatizace jsou faktory, které ovlivňují zdánlivě optimální teplotu pro skladování spermií. Při rychlém chlazení je optimum vyšší než při pomalém chlazení. Sperma postupně ochlazená na 1 °C a skladovaná při této teplotě po dobu 6 dnů si zachovala 74 % své počáteční respirační aktivity.

Předností této metody je fakt, že spermie jsou schopny si až po dobu 24 hodin udržet svou oplozovací schopnost (Louda, 2001). Dle (Larson, 2021) lze sperma berana skladovat až 24 hodin ochlazením ředěného spermatu na 2–5 °C (90–120 minut) a udržováním při této teplotě. Plodnost rychle klesá a je nízká do 48 hodin po odběru.

### 3.2.2.2 Mražení a ekvilibrace

První záznamy o zmrazení spermatu berana pocházejí od (Bernstein & Petropavlovsky, 1937), kteří úspěšně použili glycerolový roztok (1 M, 9,2 %) pro skladování spermií savců (králík, morče, beran, býk, kanec, hřebec) a ptáků (drůbež a kachna) spermie při -21 °C. (Salamon & Maxwell, 2000) píšou, že úspěch hlubokého zmrazení závisí do značné míry na rychlosti ředění spermatu. Původně se sperma ředilo, aby chránilo spermie během chlazení, zmrazování a rozmrazování, ale rychlost ředění se často měnila s odlišnou standardizací počtu spermií v každé dávce zmrazeného a rozmrazeného spermatu. Po naředění se sperma ochladí na teplotu blízkou 0 °C. Chlazení je obdobím adaptace spermií na snížený metabolismus.

Tradičně se ekvilibrace považuje za celkovou dobu, po kterou spermie zůstávají v kontaktu s glycerolem před zmrazením, aby se vytvořila vyvážená intracelulární a extracelulární koncentrace. Glycerol se podílí na některých nežádoucích jevech vyskytujících se během ekvilibrace, jako jsou změny ve struktuře a biochemické integritě spermií a zrychlení akrozomové reakce. Pro ekvilibraci je nutná perioda ochlazení na 2–5 °C, jejíž trvání se obecně pohybuje od 1 do 3 hodin. Rychlé ochlazení spermatu z 30 °C na asi 15 °C nemusí mít žádný vliv na přežití spermií, ale rychlé ochlazení z 30 °C na 10 °C, 5 °C nebo 0 °C snižuje motilitu spermií po rozmrazení (Fiser & Fairfull, 1984).

Zmrazování a skladování beraního spermatu probíhá v 0,25–0,3 ml třídávkových peletách nebo v 0,25 ml jednodávkových syntetických pejetách při teplotě kapalného dusíku -196 °C,

což vede k úspěšnému zachování životaschopnosti spermií. Může existovat určitý rozdíl mezi berany v pohyblivosti a plodnosti po rozmrazení nebo mezi jednotlivými šaržemi. Použitím zmrazeného a rozmraženého spermatu můžeme dosahovat 50% úspěšnosti při cervikální inseminaci a 50 %–80% úspěšnosti při intrauterinní inseminaci. Zmrazování a rozmrazování ale snižuje počet pohyblivých spermií (Larson, 2021).

#### 3.2.2.2.1 Postup

Standardní techniky kryokonzervace zahrnují chlazení spermií s kryoprotektivními ředidly v plastových pejetách v parách tekutého dusíku. Různé protokoly mají přesné údaje o zmrazení spermatu pomocí automatického mrazicího stroje. Kvalitu spermií po jejich rozmrazení ovlivňují techniky odběru, kategorie ředidel spermatu, zda má být semenná plazma oddělena před zmrazením, jak dlouho by mělo být sperma ekvilibrováno před zmrazením (2 h nebo 4 h), konečná koncentrace spermatu (v rozmezí od  $50 \times 10^6$  /ml až  $1000 \times 10^6$ /ml), objem pejety (0,25 ml, 0,5 ml) a způsoby zmrazování (suchý led pro pelety, zmrazování parami tekutého dusíku nebo řízené zmrazování semene).

Během zmrazování spermatu se vybrané vzorky spermatu smíchají s ředidlem a postupně se ochladí na 5 °C. Ředění a chlazení mají za cíl prodloužit životnost a zpomalit metabolickou aktivitu spermií. Ředění spermatu se provádí ve specifikovaných poměrech, aby bylo zajištěno, že objem spermatu použitého k inseminaci má dostatek spermií potřebných k úspěšnému oplození. Při přípravě inseminační dávky by měl být počet spermií standardizován a naředěn pomocí ředidla. Proces ochlazování by měl být prováděn postupně a pomalu, kdy cílem je dosažení 5 °C během několika hodin (1,5–2,0 h). Před vystavením buněk hyperosmotickým podmínkám způsobeným dehydratací musí být rychlost ochlazování dostatečně pomalá, aby umožnila dostatečnou buněčnou dehydrataci a zároveň dostatečně rychle zmrazila zbývající intracelulární tekutinu.

Účelem zmrazení spermatu je postupně snižovat teplotu z 5 °C na -196 °C, aby nedošlo k poškození spermií. Když teplota klesne pod 5 °C a přiblíží se -10 °C, intracelulární voda zamrzne, čímž se spermie vystaví riziku tvorby ledových krystalů (Saha et al., 2022). Vnější médium zamrzá mezi -5 a -10 °C, přesto obsah buňky zůstane nezamražený a podchlazený. Protože podchlazená voda uvnitř buněk má silnější chemický potenciál než voda v částečně zmrazeném extracelulárním roztoku, voda vytéká z buněk osmoticky a venku zamrzne. Sperma lze převést do kapalného dusíku při -15 °C/min od +5 °C do -100 °C (Salamon & Maxwell, 2000). Existují dvě možnosti mražení, a to manuální zmrazení nebo pomocí automaticky naprogramovaného mrazicího stroje. Při manuální mražení se pejety umístí vodorovně na chlazený stojan a zmrazí se po dobu 8–10 minut ve výšce 4–6 cm nad hladinou tekutého dusíku v parní fázi (mezi -75 °C a -125 °C) (Saha et al., 2022). Pro zmrazování pejet může být důležitý i tvar mrazicí křivky. Místo lineárního poklesu teploty je lepší ochlazovat podle parabolovité křivky, čehož lze dosáhnout zavěšením pejet 4–6 cm nad hladinou kapalného dusíku (Salamon & Maxwell, 2000).

#### 3.2.2.2.2 Účinek kryokonzervace

K namáhání plazmatické membrány při ochlazování spermií může dojít v důsledku změn v asymetrii fosfolipidové dvojvrstvy a změněného funkčního stavu membrány. Lipidy a proteiny v tekutém stavu tuhnou, čímž vzniká tuhá a křehká struktura, citlivější na poranění.

Kromě toho jsou spermie vystaveny hyperosmotickému prostředí, které indukuje prostup vody a iontů přes membránu, což vede k dehydrataci buněk. náchylnost k nízkým teplotám a rozdíly mezi druhy týkající se přežití spermií jsou spojeny s poměrem obsahu nenasycených a nasycených mastných kyselin, zejména s podílem cholesterolu v plazmatické membráně. Závěrem lze říci, že proces kryokonzervace může poškodit spermie v různých kompartmentech, jako jsou membrány (plazmatická a akrozom), mitochondrie, a dokonce může dojít k poškození chromatinu. Během tohoto procesu je kritický okamžik, kdy jsou spermie vystaveny teplotám pod bodem mrazu. (Castro et al., 2016).

### 3.2.2.3 Rozmrazení

V proceduře zmrazení-rozmrazení je fáze zahřívání stejně důležitá pro přežití spermií jako fáze chlazení. Spermie, které přežily ochlazení na  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , stále čelí fázi rozmrazování, a proto musí překonat dvakrát kritické teplotní zóny ( $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Salamon & Maxwell, 2000). Obecně po zmrazení a rozmrazení umírá zhruba 40–50 % spermií. Zatímco zmrazená a následně rozmražená ID berana může obsahovat velký podíl pohyblivých buněk (40–60 %), pouze asi 20–30 % z nich je fyziologicky aktivních (Saha et al., 2022). Účinek závisí na tom, zda rychlost ochlazování byla dostatečně vysoká, aby vyvolala intracelulární zmrazení, nebo dostatečně nízká, aby vyvolala dehydrataci buněk. V prvním případě je vyžadováno rychlé rozmrazení, aby se zabránilo rekrystalizaci jakéhokoli intracelulárního ledu přítomného ve spermiích. Spermie rozmrazené vysokou rychlostí mohou být také vystaveny na kratší dobu působení koncentrované rozpuštěné látky a kryoprotektantu (glycerolu) a obnovení intracelulární a extracelulární rovnováhy je rychlejší než u pomalého rozmrazování (Salamon & Maxwell, 2000). Dle (Salamon & Maxwell, 2000) většina vědců ve svých studiích rozmrazuje inseminační dávky při  $38\text{--}42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a zároveň při vysokých teplotách  $60\text{--}75\text{ }^{\circ}\text{C}$  je zachována stejná motilita po rozmrazení, integrita akrozomu a plodnost spermií. Rychlost rozmrazování spermatu musí být upravena rychlosti zmrazování, aby se dosáhlo nejlepší míry přežití spermií. Pomalé rozmrazování ( $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 12 sekund) vede k 63 % a 50 % pohyblivosti spermií po rozmrazení a integritě membrány. Rychlé rozmrazování ( $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 sekund) vede k vyšší pohyblivosti spermií po rozmrazení a integritě membrány (67 a 50 %). Pro rozmrazení se využívá nejčastěji vodní lázeň.

## 3.2.3 Hodnocení kvality ejakulátu

Vzorek spermatu by měl být vyšetřen do 1 hodiny od odběru. Některé parametry spermatu mohou totiž být ovlivněny zpožděním. Pohyblivost výrazně klesá po 2 hodinách a následně se postupně snižuje, zatímco hladina reaktivních forem kyslíku (ROS) stoupá. V ideálním případě je sperma umístěno do  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubátoru po dobu 30 minut. Charakteristiky analýzy spermatu lze rozdělit do tří skupin: makroskopické, mikroskopické a fyziologické (Agarwal et al., 2008).

### 3.2.3.1 Makroskopické parametry analýzy spermatu

#### 3.2.3.1.1 Vzhled, zkapalnění, pach

Vzorek by měl mít šedou až mléčnou barvu, bez viditelných příměsí. Neměl by být příliš tekutý a nesmí obsahovat příměsí krve. Pach by měl být nevýrazný, nemělo by být cítit po moči.



### 3.2.3.1.2 Objem

Stanovení objemu se provádí v pipetě, válci, či stříkačce. Norma je 0,1 – 2,2 ml.

### 3.2.3.1.3 Viskozita

Berání sperma má smetanovitou viskozitu.

### 3.2.3.1.4 Hodnota pH

Měla by se pohybovat v hodnotách 6,3 až 7,5. K měření se použije papírek s indikačním rozmezím (Kozumplík & Gamčík, 1984; Kubíček, 2010).

## 3.2.3.2 Mikroskopické parametry analýzy spermatu

Mikroskopické vyšetření spermatu v podstatě hodnotí spermatogenezi. Tato část analýzy spermatu podléhá technické chybě, a i spolehlivé laboratoře mohou zobrazovat proměnlivé výsledky. Hodnoty také podléhají určitým rozdílům mezi jednotlivými berany, s variabilitou od jednoho ejakulátu k dalšímu (Agarwal et al., 2008).

### 3.2.3.2.1 Aglutinace a pohyblivost spermií

Mikroskopické vyšetření začíná vytvořením vlhkého preparátu (kapka semene na podložním sklíčku překrytá krycím sklíčkem) vizualizovaného pod 1000násobným zvětšením, nutná je stabilizace asi jednu minutu a teplota 37 °C (Kubíček, 2010). Touto metodou lze hodnotit aglutinaci spermií, přítomnost spermií a subjektivní pohyblivost. Když spermie přilnou k nespermálním elementům (nespecifická aglutinace), může to znamenat infekci přídatných žláz. Je třeba mít na paměti, že malý stupeň aglutinace je normální (Agarwal et al., 2008).

### 3.2.3.2.2 Počet a koncentrace spermií

Stanovení koncentrace spermií (počet spermií na mililitr) a počet spermií (počet spermií/ejakulát) se provádí po zkapalnění (Agarwal et al., 2008). Bürkerova komůrka slouží pro stanovení počtu spermií, případně lze využít spektrofotometrickou metodu. Hustota ejakulátu se pohybuje okolo 2–5 milionů spermií na 1 mm<sup>3</sup> a dělí se na 6 stupňů (velmi hustý až velmi řídký). Když je sperma určeno pro krátkodobé uchování, tak je ideální koncentrace  $2 \times 10^6 / 1 \text{ mm}^3$ , u dlouhodobé konzervaci je to  $2,8 \times 10^6 / 1 \text{ mm}^3$  (Johansson et al., 2008; Kubíček, 2010).

### 3.2.3.2.3 Morfologie

Mezi parametry spermatu je to nejsubjektivnější a nejobtížněji standardizovatelný parametr. Přesné posouzení morfologie je rozhodující při hodnocení neplodnosti. Lze využít počítačových metod. Některé CASA přístroje nabízí možnost hodnotit morfologii spermií. V jiných případech se využívá barvení podle Papanicolaua (Kubíček, 2010).

### 3.2.3.2.4 Motilita

Pohyblivost spermií je odrazem normálního vývoje axonémy a zrání spermií v nadvarleti. Toto je parametr, který je vystaven značnému potenciálu technických chyb v laboratoři.

Nejběžnější metodou používanou v laboratořích je jednoduchý odhad motility spermií na několika polích. Jedná se o subjektivní metodu náchylnou k nepřesnosti. Další metodou je hodnocení pomocí počítačové analýzy (CASA, viz kapitola 3.4) (Kos et al., 2019; Kubíček, 2010).

### 3.3 Ředidla

Ředidla se přidávají do ejakulátu s cílem vytvořit optimální podmínky pro mražení a skladování inseminační dávky, zároveň dojde ke zvýšení objemu a tím i k počtu použitelných ID, což sebou nese i značné výhody s ohledem na ekonomiku chovu. Složení ředidel je založeno na několika bázích. Společné pro všechny komerčně dostupné produkty je obsah bi-destilované vody. V té jsou rozpuštěny ostatní komponenty ředidel jako jsou pufrý, kryoprotektiva, sacharidy, antibiotika, aminokyseliny a mastné kyseliny. Pufrý pomáhají udržovat stálé pH, jelikož při dýchání spermií vzniká kyselina mléčná a ta okyseluje prostředí, čímž zpomaluje spermie, a nakonec dojde k anabióze a úmrtí spermií (Stádník et al., 2015).

Pro efektivní využití inseminace u ovcí je třeba provést mnoho výzkumů týkajících se metod ředění a zmrazování spermatu beranů. Sperma se obvykle ředí Trisem a vaječným žloutkem, roztokem fosforečnanu glukózy, roztokem vaječného žloutku a citrátu, homogenizovaným plnotučným mlékem, čerstvým a sušeným odstředěným mlékem, roztokem laktózy a komerčními ředidly (Rekha et al., 2016). Úspěšné skladování spermatu beranů jak v chlazeném, tak i v zmrzlém stavu závisí na složení použitého ředidla. Doporučené maximální doba skladování bez zhoršení plodnosti po inseminaci je tradičně uváděna jako krátká, a to 6 až 12 h. Ředidla byla vyvinuta a upravena s cílem zlepšit schopnost kryokonzervace spermatu beranů. Bohužel plodnost po cervikální inseminaci se zmrazeným, a poté rozmrazeným spermatem zůstává i nadále výrazně nižší než při použití čerstvých inseminačních dávek (Kulaksiz et al., 2012).

Některé faktory, které přispívají ke snížení životaschopnosti kryokonzervovaného spermatu beranů patří: složení ředidla, koncentrace kryoprotektantu, vaječný žloutek od různých druhů ptáků, rychlost chlazení, zmrazování a rozmrazování a také kvalita použitého spermatu (Kulaksiz et al., 2012). Mnoho studií se zaměřilo na snížení metabolické aktivity, protože se ukázalo, že přežití spermií je nepřímě úměrné s jejich metabolickou aktivitou (Murphy et al., 2017). Ředidla jsou používána během zpracování a skladování spermatu, což má za následek zvýšení objemu ejakulátu a ochranu spermií před špatnými skladovacími podmínkami, které by teoreticky mohly nastat. Dobré ředidlo musí mít stejný osmotický tlak jako semenná plazma, zároveň musí chránit spermie před chladovým šokem, mrazem a rozmrazováním a současně zachovává jejich životaschopnost, součástí jsou i živiny potřebné pro metabolismus spermií a kontrolují mikrobiální kontaminaci (Albiaty et al., 2016).

Existují značné rozdíly v používání ředidel, liší se v závislosti na cílené délce konzervace. Ředidla vhodná pro krátkodobou konzervaci beraního spermatu jsou stejná jako u skotu, obsahují zpravidla citrát sodný, vaječný žloutek, plnotučné či odstředěné mléko, Tris a další. Ideální délka konzervace se pohybuje v rozmezí 8 – 12 h od odběru ejakulátu. U dlouhodobé konzervace se někdy využívá kryoprotektivní protein nebo roztoky obsahující oboustranně působící (obojetné) pufrý TES, HEPES, PIPES, upravené NaOH na pH 7 (Louda et Hegedušová, 2009).

Po objevu kryoprotektivních vlastností vaječného žloutku se běžně začal využívat v přípravcích pro kryokonzervaci spermatu u téměř všech druhů hospodářských zvířat. Vaječný žloutek chrání spermie před poškozením způsobeným kryoindukcí během chlazení, zmrazování a rozmrazování přímou interakcí s plazmatickou membránou. Navzdory jeho příznivým účinkům je jeho použití spojeno s rizikem mikrobiální kontaminace. Zároveň obsahuje některé nežádoucí složky jako jsou steroidní hormony a jejich prekurzorové molekuly, ty jsou považovány za škodlivé pro integritu spermií. Komerčně dostupná ředidla obsahující sójový lecitin jsou potenciálními alternativami (Ansari et al., 2017).

Sójový lecitin se používá jako zdroj fosfolipidů pro komerční ředidla dostupná pro zmrazování semene, což umožňuje nahradit tradiční membránovou ochranu živočišného původu (vaječný žloutek) (de Paz et al., 2010). Komerční ředidla na bázi sójového lecitinu jsou například Biochiphos plus®, Bioxcell® (IMV, Francie) a AndroMed® (Minitub, Německo). Dalším komerčně dostupným ředidlem je OptiXcell, což je bezbílkovinné médium podobné složením vaječnému žloutku (Murphy et al., 2017). OviXcell byl vyvinut pro zlepšení konzervace spermatu při 4 °C po dobu 24 hodin a obsahuje antibiotika (imv technologies, 2022). Dle (Arando et al., 2019) lze říct, že vhodnou alternativou pro skladování spermií by mohlo být chlazení při 5 °C, přičemž nejzajímavější možností pro ředění je OptiXcell. Vzhledem k tomu, že poskytuje podobnou účinnost v in vitro i in vivo podmínkách jako ostatní ředidla, je možné jej brát za vhodnou náhradu ředidel živočišného původu, protože tím by se zabránilo možnému šíření chorob.

(Khalifa & Lymberopoulos, 2013) vedli experiment, který ukázal následující výsledky: OviXcell byl lepší než ředidlo z mléka a vaječného žloutku v zachování stability chromatinu spermií a celkové motility, zároveň nebyl žádný významný rozdíl ve fertilitě a defekty chromatinu byly negativně spojeny s pohyblivostí a fertilitou konzervovaných spermií berana. Navíc spermie konzervované v přípravku na bázi mléka měly větší pravděpodobnost, že budou mít destabilizovanou chromatinovou strukturu než ty, které jsou konzervované v produktu na bázi sójového lecitinu (Ovixcell). Vyplývá z toho tedy, že Ovixcell® je lepší než ředidlo z mléka a vaječného žloutku v zachování stability a motility chromatinu.

### **3.4 CASA (Computer -assisted semen analysis)**

Stanovení koncentrace spermií je kritickou součástí analýzy spermatu. Systém počítačové analýzy spermií (CASA) byl dostupný v roce 1985, následně byl přijat a je běžně používán jako rutinní nástroj pro analýzu spermatu (Lu et al., 2014). Jedním z prvních systémů byl tehdy známý CellSoft. Zatímco mnoho publikací bylo vytvořeno pomocí CellSoft, byla to v podstatě černá skříňka bez ověřovacích nebo přehrávacích funkcí a snímková frekvence omezená na 30 snímků za sekundu. Během počátku 90. let se staly komerčně dostupné sofistikovanější systémy CASA se snímkovými frekvencemi 50 a 60 Hz. Mezi ně patřily například Hamilton-Thorne and Motion Analysis (USA), Sperm Class Analyzer od Microptic SL (Španělsko), Hobson Tracker (UK), Sperm Motility Quantifier (Jižní Afrika), SpermVision (Německo) a Proiser / ISAS (Španělsko) a mnoho dalších. Za posledních 20 let prošly systémy CASA revolucí především díky pokroku ve vývoji hardwaru i softwaru, přičemž většina systémů poskytuje vysokou úroveň kontroly a ověřování kvality (Horst, 2020). Jedná se o systém, který je navržen tak, aby poskytoval přesné a smysluplné informace o koncentraci spermií, jejich

životaschopnosti, dynamice nebo morfologii a prováděl statistickou analýzu populace spermií na základě vývoje kontinuálních obrazů spermií. Pomocí videokamery dochází k digitálnímu zpracování a analýze informací a následně výsledky vyhodnotí počítač. První a současné systémy CASA stále vyžadují odbornou obsluhu, ale ideální systém CASA potřebuje člověka pouze k udržení normální funkce (Amann & Katz, 2004). Přestože v systému CASA bylo použito mnoho principů automatizace, je stále zapotřebí manuální zásah k nápravě chybného zachycení nebo ztraceného zachycení spermií. S dalším rozvojem počítačových technologií a elektronických technologií bude budoucí systém CASA vyvinut tak, aby poskytoval jasnější snímky spermií a aby se zobrazovaná trajektorie pohybu spermií více přibližovala skutečné dráze pohybu. Předpokládá se, že budoucí systém CASA může sledovat a analyzovat spermie čím dál přesněji (Lu et al., 2014). Schopnost CASA generovat velké soubory dat obsahující údaje o motilitě z tisíců spermií byla přehlížena. Na druhé straně byla větší pozornost věnována souhrnným statistikám poskytovaným softwarem, které neukazují vnitřní variabilitu samotného spermatu (Valverde et al., 2019).

Tradičně byl hemacytometr standardem pro kalibraci dalších technologií používaných k odhadu koncentrace spermií, včetně fotometrie, Coulterových počítačů, průtokové cytometrie a počítačově automatizované analýzy spermatu (CASA). Jednorázová kapilárně plněná sklíčka se běžně používají ve spojení s většinou aktuálně používaných systémů CASA. Byly vzneseny otázky týkající se rozdílů v měření koncentrace spermií mezi systémy CASA (s použitím 20  $\mu\text{m}$  jednorázová sklíčka) a hemacytometrie. Rozdíly jsou z velké části způsobeny Segre-Silberbergovým (SS) efektem, ke kterému dochází během Poiseuilleho toku v tenkých, kapilárami zatížených sklíčkách. Efekt SS může vést k chybám v odhadu koncentrace částic (Kuster, 2005). Přestože manuál ("WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen," 2010) doporučoval systém CASA jako selektivní prostředek k analýze vzorků spermatu, někteří odborníci zpochybňují přesnost klinické aplikace CASA (Lu et al., 2014).

Klíčem k fungování systému CASA je, že snímky spermií mohou být jasně zachyceny kamerou a převedeny na digitální snímky. Nejběžnějším a nejjednodušším způsobem, jak přístroj CASA vnímá spermie, je použití tmavého pole nebo negativních snímků s vysokým fázovým kontrastem, takže bílé hlavičky spermií mohou být zobrazeny na černém pozadí. Obecně platí, že souřadnice spermie se určí buď jako jádro hlavičky spermie nebo nejjasnější bod hlavičky spermie, souřadnice se stanou referenčním bodem a poté počítačový program hledá souvislý obraz hlavičky spermie ve vybrané oblasti. Poté, co jsou lokalizovány spojitě obrazy hlavičky spermie, lze určit souřadnice trajektorie spermie (Akashi et al., 2005).

Parametry pohybu spermií se skládají hlavně ze tří hodnot rychlosti pohybu spermií, tři hodnot poměru rychlosti a tří odrážejících charakteristiky kývání spermií. Tři hodnoty rychlosti pohybu spermií jsou křivočará rychlost (VCL), přímočará rychlost (VSL) a průměrná rychlost dráhy (VAP). VCL označuje časově zprůměrovanou rychlost hlavičky spermie podél její skutečné křivočaré dráhy, která je vždy nejvyšší mezi hodnotami VCL, VSL a VAP. VSL se vztahuje k časově zprůměrované rychlosti hlavičky spermie podél přímky mezi její první detekovanou polohou a její poslední, která odráží čistý prostor dopředné motility spermie během období pozorování a je vždy nejnižší z hodnot VCL, VSL a VAP. VAP se týká časově zprůměrované rychlosti hlavičky spermie podél její průměrné dráhy, což je koncept nejobtížněji pochopitelný mezi VCL, VSL a VAP. Průměrná dráha je určena vyhlazením křivočaré

trajektorie podle algoritmů v přístroji CASA. Pokud je trajektorie pohybu spermií velmi pravidelná a lineární, pak VAP je téměř identická s VSL. Nicméně pro nepravidelnou dráhu pohybu spermií je pak VAP mnohem vyšší než VSL. Vzhledem k rozdílu v algoritmech mezi nástroji CASA nemusí být VAP mezi systémy CASA srovnatelná (“WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen,” 2010). Navíc to může vést k významným rozdílům v kolísání (WOB), přímosti (STR), amplitudě bočního posunu hlavy (ALH,lm) a křížovou frekvencí (BCF, Hz). Tři poměry rychlosti jsou linearita (LIN), STR a WOB. LIN odkazuje na linearitu křivočaré cesty, konkrétně VSL/VCL. STR odkazuje na linearitu průměrné cesty, konkrétně VSL/VAP. WOB se týká oscilace skutečné dráhy kolem průměrné dráhy, vyjádřené jako VAP/ VCL. Tři parametry odrážející charakteristiky kolísání spermií jsou ALH, BCF a střední úhlový posun (MAD, stupně). ALH se týká velikosti laterálního posunutí hlavičky spermie kolem její průměrné dráhy, kterou lze vyjádřit jako maximum nebo průměr takových posunů. Technici pracující v laboratořích by měli znát způsob vyjádření ALH pro přístroj CASA, který používali. Protože různé přístroje CASA počítají ALH pomocí různých algoritmů, nemusí být hodnoty ALH mezi systémy CASA obvykle srovnatelné. BCF označuje průměrnou rychlost, kterou křivočará dráha protíná průměrnou dráhu, což je užitečný parametr hodnotící změny v kolísání bičiku spermií. Může se však změnit pomocí FR v systému CASA (Owen & Katz, 1993).

(Davis et al., 1992) analyzovali 30 vzorků standardní manuální metodou, poté nahráli na video a znovu analyzovali pomocí dvou různých přístrojů CASA (systém HTM, Hamilton-Thorn Research, Danvers a systém CTS, Motion Analysis Corp., Santa Rosa). Vzorky nahrané na videozáznam byly analyzovány pomocí CASA pro 5 snímků na koncentraci spermií (CON) a procento motility (MOT) a pro 15 snímků na kinematické proměnné (přímá rychlost, VSL; křivočará rychlost, VCL; linearita, LIN; a amplituda laterální posunutí hlavy, ALH). Nastavení parametrů stroje pro oba přístroje bylo co nejpřesněji sladěno. Hodnoty CASA byly porovnány mezi sebou pro všechna měření a s manuálními výsledky pro počet spermií a procento pohyblivých spermií. Výsledky ukázaly, že: 1) Průměrné hodnoty HTM a CTS pro CON se neliší od manuálních měření pro 5- nebo 15-snímkovou analýzu, ale mezi CTS a HTM jsou vidět nepatrné rozdíly; 2) průměrné hodnoty MOT pro 5-snímkovou analýzu jsou vyšší než pro 15-snímkovou analýzu pro oba přístroje, ale průměrné manuální měření procenta motility je mnohem vyšší než jakákoliv hodnota CASA; 3) průměrné VSL a LIN jsou mírně vyšší pro HTM než CTS, ale párové srovnání ukazuje vysoký stupeň shody mezi nástroji; a 4) střední hodnoty pro VCL a ALH jsou stejné pro oba přístroje a existuje shoda pro srovnání VCL; párové srovnání ALH však odhaluje významné rozdíly mezi nástroji.

Ruční hodnocení morfologie zůstává problematické kvůli lidské subjektivitě a také vlivem nejednotnosti využívané techniky. Tyto diagnostické chyby ztěžují interpretaci výsledků a mohou ovlivnit možnosti hledání řešení problému. Vývoj softwaru pro automatizovanou analýzu morfologie spermií (ASMA) pro zpracování vzorků morfologie spermií má výhody oproti manuální mikroskopické analýze, protože poskytuje rychlejší, kvantifikovatelná a přesná morfometrická měření. Hodnocení morfologie a morfometrie pomocí CASA, v minulosti také běžně označované jako počítačově podporovaná morfologická analýza spermií (CASMA), ale nyní označované jako CASA-Morph, je složitý proces, ale technologický vývoj v oblasti zpracování obrazu a analytických nástrojů v současnosti umožňuje odvození morfometrických parametrů a přesné i objektivní určení tvaru spermií (Horst et al., 2018).

Výkonnost přístrojů CASA ovlivňuje mnoho faktorů, např. příprava vzorku, počet snímků, koncentrace spermií a hloubka počítací komory. Nicméně lze získat spolehlivé a reprodukovatelné výsledky, pokud jsou dodržovány vhodné postupy. Při použití CASA k získání pohybových parametrů je třeba sledovat stopy nejméně 200 pohyblivých spermií na vzorek. Pokud mají být spermie kategorizovány podle typu pohybu, nebo pokud se plánují další analýzy variability v rámci jednoho vzorku, je zapotřebí sledovat nejméně 200, ideálně 400 pohyblivých spermií. Počet analyzovaných spermií v každém vzorku by měl být standardizován (“WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen,” 2010). Počítače mají schopnost rychle spočítat stovky spermií během několika sekund a analyzovat motilitu, kinematiku, morfometrii, koncentraci a následně optimalizovat počet a spolehlivost konečných vyprodukovaných inseminačních dávek (Valverde et al., 2019). Je velmi obtížné standardizovat a kontrolovat kvalitu systémů CASA. I tak je možné předložit minimálně čtyři požadavky, které mají stávající systémy CASA splňovat:

1. Hloubka komor pro počítání spermií připojených k systému CASA by měla být velmi přesná a měla by být pravidelně testována. Použití nekvalifikovaných komor je nepřípustné
2. Frekvence by měla dosahovat až 60 Hz pro analýzu koncentrace spermií, motility a obecné dynamiky, ale pro analýzu kapacity spermií by měla být alespoň 80–100 Hz
3. Nastavení parametrů přístroje a prahových hodnot by mělo být standardizováno, aby byla zajištěna srovnatelnost výsledků mezi přístroji CASA
4. Míra zachycování ztrát a chyb by měla být co nejnižší. Pokud každý ze systému CASA dokáže přesně lokalizovat spermie v každém poli, srovnatelnost výsledků se výrazně zlepší (Lu et al., 2014).

CASA se využívá pro zlepšení hodnocení kvality spermií savců, hodnocení funkčnosti spermií a vlivu různých chemických látek nebo patologií na schopnost oplodnění spermií. Je zřejmé, že tento systém se významně vyvinul a v současné době je lepší než mnoho manuálních technik ve výzkumu a klinickém prostředí (Horst et al., 2018).

### 3.4.1 Příprava vzorku

Za prvé, vzorky spermatu pro CASA by měly být řádně odebrány a správně připraveny. Alikvotní podíl rovnoměrně promíchaných vzorků spermatu je umístěn do komory pro sperma a je předem analyzován systémem CASA. Pokud je koncentrace spermií vysoká, je třeba vzorek spermatu odstředit a zředit vlastní semennou plazmou, aby byla koncentrace spermií nižší a poté se znovu analyzuje (Lu et al., 2014). Systém CASA musí udržovat vzorek při teplotě okolo 37 °C, protože ejakulát je citlivý na teplotu. Charakteristiky motility a koncentrace spermií lze hodnotit v neředěném spermatu. Pohyblivost spermií lze hodnotit na vzorcích s ideální koncentrací spermií (“WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen,” 2010). Koncentrace spermií ve spermatu je typicky velmi koncentrovaná u beranů ( $> 3 \times 10^9$  / ml), kozlů a býků ( $> 2 \times 10^9$  / ml) a méně koncentrovaná u hřebců ( $> 6 \times 10^8$  / ml). Bohužel ne všechny hodnoty motility spermií různých plemen jsou srovnatelné kvůli mnoha proměnným. Hlavními proměnnými jsou rozdíly v médiích, různé velikosti sklíček/komor, systémy CASA s různými algoritmy, různé kamery s různými rozlišeními a různými snímkovými frekvencemi a mnoho dalších aspektů. Kinematické parametry mezi různými

plemeny beranů a kozlů jsou velmi podobné (Horst, 2020). Ve vzorcích s vysokou koncentrací spermií může docházet ke srážkám s vysokou frekvencí a je pravděpodobné, že budou způsobovat chyby. Takové vzorky by měly být ředěny, nejlépe spermatickou plazmou nebo vhodným ředidlem. Vzorky lze analyzovat buď přímo nebo z videozáznamu. Analýza videozáznamů umožňuje lepší standardizaci a zajištění kvality. Výrobce obvykle doporučí potřebné nastavení osvětlení pro maximální kontrast mezi hlavičkami spermií a pozadím. Existují určité neshody ohledně doby, po kterou by měly být spermie analyzovány, ale pro základní měření CASA by měla stačit minimálně 1 sekunda (“WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen,” 2010).

### 3.5 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je technologie, která poskytuje rychlou multiparametrickou analýzu jednotlivých buněk v roztoku (McKinnon, 2018). Cytometr je sofistikovaný přístroj měřící více fyzikálních vlastností jedné buňky, například velikost a zrnitost (Adan et al., 2016). Průtokové cytometry využívají lasery jako zdroje světla k produkci signálů rozptýleného i fluorescenčního světla. Ty jsou čteny detektory, což jsou především fotodiody nebo fotonásobiče. Tyto světelné signály jsou převedeny na elektronické signály, které jsou analyzovány počítačem a zapsány do datového souboru ve standardizovaném formátu (.fcs). Populace buněk mohou být analyzovány na základě jejich fluorescenčních charakteristik nebo charakteristik rozptylu světla. V průtokové cytometrii se používá řada fluorescenčních činidel. Ty zahrnují fluorescenčně konjugované protilátky, barviva vázající nukleové kyseliny, barviva pro životaschopnost, iontová indikátorová barviva a fluorescenční expresní proteiny (McKinnon, 2018). Tento přístup dělá z průtokové cytometrie mocný nástroj pro detailní analýzu komplexních populací v krátkém časovém období (Adan et al., 2016). Má využití v imunologii, molekulární biologii, bakteriologii, virologii, biologii rakoviny a monitorování infekčních chorob. Za posledních 30 let zaznamenala dramatický pokrok, který umožnil bezprecedentní podrobnosti ve studiích imunitního systému a dalších oblastí buněčné biologie (McKinnon, 2018). Technologie FCM dosáhla úrovně vyspělosti, která umožňuje její zařazení na seznam dostupných a rutinních metod využívaných v reprodukčních studiích jak u lidí, tak i u zvířat (Spanò & Evenson, 1993).

#### 3.5.1 Co je průtoková cytometrie?

Cytometrie je proces, při kterém se měří fyzikální a/nebo chemické vlastnosti jednotlivých buněk, případně dalších biologických nebo nebiologických částic v přibližně stejné velikosti. V průtokové cytometrii se měření provádějí, když buňky nebo částice procházejí měřicím zařízením v tekutině. Buněčné nebo průtokové třídění má na starosti průtokový cytometr. Ten používá elektrické a mechanické prostředky k odvádění a sběru buněk (nebo jiných malých částic) s naměřenými charakteristikami, které spadají do rozsahu hodnot, které si sám zvolí uživatel. Ani buňky, ani aparát nejsou schopny uvést do pohybu samotný proces. Nezbytným kritickým prvkem je proto člověk, jehož cílem je získat interpretaci informací o vzorku buněk a v případě třídění je extrahovat ze vzorku. Na nejzákladnější úrovni lze cytometr považovat za „černou skříňku“ s buňkami jako vstupy a čísly jako výstupy. Kdy výstupy zahrnují, jak čísla, tak samotné vytržené buňky. Nicméně, zatímco některé moderní cytometry mohou získat

požadované výsledky při procesu bez dozoru, je nutné podotknout, že většina aplikací cytometrie vyžaduje určité porozumění a intelektuální úsilí ze strany uživatele (Shapiro, 2005).

### 3.5.2 Historie

60. léta minulého století přinesly mimořádné souhry událostí, které zahrnovaly vývoj v oblasti výpočetní techniky a laserových zdrojů světla. S objevem technologie monoklonálních protilátek a specifických fluorochromů DNA se také zvyšovala politická vůle bojovat (a financovat) "válku proti rakovině". V šedesátých a na počátku sedmdesátých let 20. století byl již uznán význam Pap testu<sup>1</sup>, ale tato technika nebyla ještě široce zavedena kvůli nedostatku vyškolených cytotechnologů. Dřívější práce dávaly naději, že pracný screeningový proces na sklíčku by mohl být proveden pomocí automatického mikroskopu analyzujícího obraz, což by zmírnilo nedostatek kvalifikovaných cytotechnologů. Velké úsilí o vývoj takového přístroje vyvinul Národní onkologický ústav (National Cancer Institute) v 70. letech 20. století. Na vývoji se také spolupodílely některé technologicky orientované soukromé společnosti, vláda a průmysl v Japonsku a Evropě. První přístroje, a dokonce i pozdější, lépe konstruované mikroskopy pro skenování buněk a analýzu obrazu však byly velmi pomalé a trpěly řadou tehdy nepřekonatelných fyzikálních omezení. Laserové zdroje světla ještě nebyly vyvinuty, počítačové systémy analýzy dat byly příliš pomalé pro obrovské množství dat, které bylo třeba analyzovat z každého obrazu buněk, a konvenčně připravené preparáty poskytovaly matoucí obraz překrývající se buněk. Průtoková cytometrie mohla překonat alespoň některé z těchto problémů globálním měřením omezeného počtu klíčových znaků na každé buňce a rychlostí měření v řádu stovek buněk za sekundu. První pokus o počítání nebo měření buněk proudících v suspenzi je obecně připisován Moldvanovi (Melamed, 2001). Moldvan se v roce 1934 poprvé pokusil změřit buňky v suspenzi. Použili fotoelektrickou metodu k identifikaci buněk suspendovaných ve vodě (Dey, 2021). První praktický, klinicky úspěšný přístroj pro počítání (a později i pro analýzu) krevních buněk v suspenzi navrhl a přihlásil k patentování Walter Coulter v roce 1949 (Melamed, 2001). Cornwell a Davidson vyvinuli vylepšenou verzi přístroje v roce 1950 pomocí buněk zbarvených trypanovou modří. Buňky však byly často agregovány a ucpaly kapiláru. Crosland-Taylor překonal ucpání pomalým vstříkáváním proudu vzorku do středu rychlejšího proudu tekutiny procházejícího stejným směrem skrz trubku (Dey, 2021). V 60. letech 20. století Louis Kamensky navrhl a sestrojil první multiparametrový průtokový cytometr. Tento přístroj, původně určený k identifikaci nádorových buněk v děložních cytologických vzorcích, měřil současně obsah DNA a celkového proteinu v jedné buňce, a to rychlostí až tisíc buněk za sekundu (Melamed, 2001). Všechny moderní průtokové cytometry přijaly tento základní princip laminárního proudění. První průtokové cytometry měly křemenný průtokový kanál ve tvaru motýlka, který byl v osvětlen úzce zaostřeným rtuťovým obloukem nebo halogenovým světelným paprskem s excitačními vlnovými délkami v UV i viditelném spektru. Průtokový kanál byl umístěn na stolku běžného výzkumného mikroskopu. Absorpce

---

<sup>1</sup> Stěr onkologické cytologie neboli Pap stěr je bezbolestné vyšetření, při kterém se vyhledávají známky rakoviny děložního čípku a také buňky, které by se mohly na rakovinové změnit ("ThinPrep Pap test | Vyšetření | GynHelp," n.d.).



světla v požadovaných vlnových délkách a rozptyl světla byly měřeny filtrovanými fotonásobiči a senzory rozptylu.

Ačkoli cíl vyvinout přístroj, který by mohl vyšetřovat Pap testy a nahradit cytotechnologa, nebyl nikdy realizován, vyvinuté přístroje průtokové cytometrie měly mnohem širší a mnohem větší dopad na biologii a medicínu, než se kdy předpokládalo (Melamed, 2001). Curbelo a kol. v Block Engineering, Cambridge, Massachusetts, navrhli průtokový cytometr s laserovým excitačním paprskem o více vlnových délkách. Tento stroj byl schopen zaznamenat osm optických měření jedné buňky. Následně skupina vyvinula multiparametrový průtokový cytometr s více zdroji laseru (Dey, 2021).

Průtoková cytometrie se za posledních 60 let vyvinula z jednoparametrových přístrojů, které detekovaly pouze velikost buněk, až po vysoce sofistikované přístroje schopné detekovat 13 parametrů současně (Macey, 2007). V současné době je obtížné najít jedinou klinickou nebo biomedicínskou laboratoř, která by tuto technologii nevyužívala. V 80. a 90. letech 20. století došlo k dramatickému pokroku, který je důsledkem zdokonalení přístrojového vybavení. Došlo k zvýšení přesnosti měření a počtu současně měřitelných parametrů, včetně nejnovější kombinace průtokové cytometrie s obrazovou cytometrií, zároveň byly objevené nové protilátky a další sondy buněčných složek s novými technikami měření různých vlastností buněk a buněčných funkcí, to vše přímo souvisí s aplikací přístroje v klinické a výzkumné praxi. Pokrok v každé z těchto oblastí závisí na ostatních a ovlivňuje je (Melamed, 2001). V roce 2003 byly zavedeny vysokorychlostní třídiče využívající digitální technologii (Macey, 2007).

### 3.5.3 Základní principy průtokové cytometrie

Popis průtokové cytometrie zahrnuje kombinaci několika disciplín: elektroniky, výpočetní analýzy dat, optiky a fluidiky (proudění v proudu kapaliny) (Givan, 2001). Průtokové cytometry jsou multiparametrové, zaznamenávají několik měření na každé buňce; proto je možné v rámci heterogenní populace identifikovat homogenní subpopulaci. Toto je jedna z nejužitečnějších vlastností a činí ji vhodnějšími před jinými přístroji, jako jsou třeba spektrofluorimetry, ve kterých jsou měření založena na analýze celé populace. Většina komerčních průtokových cytometrů má kapacitu provádět pět nebo více současných měření na každé buňce, ale některé specializované výzkumné přístroje mají podstatně větší kapacitu a pomocí tří laserů je možné analyzovat až 11 parametrů.

Typický průtokový cytometr se skládá ze tří funkčních jednotek: jeden či více zdrojů laserového světla a snímací systém, který obsahuje vzorek/průtokovou komoru a optickou sestavu; hydraulický systém, který řídí průchod buněk snímacím systémem a počítačový systém, který shromažďuje data plus provádí analytické postupy na elektrických signálech přenášených ze snímacího systému (Macey, 2007)

Základní principy průtokové cytometrie jsou následující:

- Jednotlivé disociované buňky v kapalném médiu.
- Buňky jsou obarveny jedním nebo více fluorochromy označenými markery.
- Laserový paprsek světla dopadá na jednotlivé buňky.
- Buňky označené fluorochromovým barvivem absorbují fotony světla a emitují fluorescenci.

- Dopředné světlo se rozptyluje a emitovaná fluorescence z jednotlivých buněk je detekována vícenásobnými fotonásobiči.
- Elektronický impuls je převeden na elektrický proud a poté převeden na digitální data (analogová na digitální) a je zaznamenán počítačem.
- Počítač interpretuje zaznamenaná data (Dey, 2021).

### 3.5.3.1 Osvětlení částice

Ačkoli některé průtokové cytometry stále používají obloukové lampy (a jejich výhodou je flexibilita vlnové délky osvětlení), většina současných přístrojů vyžaduje jako zdroj osvětlení laser (Givan, 2001). Nejběžnější lasery používané v průtokové cytometrii jsou argonové lasery, které produkují světlo o vlnových délkách 351 až 528 nm. Mezi další používané lasery patří UV lasery, které produkují světlo mezi 325 a 363 nm; kryptonové lasery, které produkují světlo mezi 350 a 799 nm; helium-neonové lasery, které produkují světlo při 543, 594, 611 a 633 nm; a helium-kadmiové lasery, které produkují světlo při 325 a 441 nm (Macey, 2007). Důvodem pro použití laserů je jejich schopnost poskytovat intenzivní osvětlení, které lze zaměřit do malého bodu (analytický bod). Částice v proudu kapaliny se mohou tímto analytickým bodem pohybovat rychle, ale během krátké doby v laserovém paprsku jsou dostatečně osvětleny, aby se vytvořila fluorescence nebo rozptýlené světlo detekovatelné intenzity (Givan, 2001). Rozptyl světla a fluorescence se měří pro každou jednotlivou částici, která projde zdrojem excitace (Radcliff & Jaroszeski, 1998). Světlo je rozptýleno ve všech směrech a rozptýlení v malých úhlech (0,5–10°) od osy je úměrné druhé mocnině poloměru koule. Pro měření fluorescence a rozptylu světla lze použít vodou chlazené laserové zdroje s výstupním výkonem v rozsahu 50 mW–5 W. Vzduchem chlazené lasery mají maximální výkon 100 mW a nyní se častěji používají společně s laserovými diodami v komerčních přístrojích (Macey, 2007).

Jedním z klíčů k porozumění je správné pochopení principů imunofluorescenčních technik, protože ty se používají téměř ve všech testech průtokové cytometrie. Imunofluorescence je technika, která umožňuje vizualizaci buněčných rysů nebo struktur jejich spojením s molekulou, která emituje světlo, když je stimulována světlem o samostatné vlnové délce (McCoy, 2002). Je to zároveň biologický test kombinující použití protilátek a fluorescenčních molekul pro detekci specifických cílů v buňkách a tkáních. Tato technika je velmi citlivá a všestranná a nachází četné uplatnění v oblasti imunologie, buněčné morfologie, genetiky, diagnostiky a histopatologie (Fritschy & Härtig, 2001). Buňky nebo částice se připravují jako jednobuněčné suspenze pro průtokovou cytometrickou analýzu. Díky tomu mohou protékat jednotlivě v proudu kapaliny kolem laserového paprsku. Když laserový paprsek dopadá na jednotlivé buňky, dochází ke dvěma typům fyzikálních jevů, které poskytují informace o buňkách. Za prvé dochází k rozptylu světla, který přímo souvisí se strukturálními a morfologickými vlastnostmi buněk. Za druhé dochází k fluorescenci, pokud jsou buňky připojeny k fluorescenční sondě (Givan, 2001). Pro přesné měření optických vlastností buněk musí buňky projít rovnoměrně jasným středem zaostřených laserových paprsků. Optika pro sběr světla je zaměřena na průsečík buněk s laserovými paprsky, aby zachytila fluorescenci a rozptýlené světlo z buněk. Ve snímací zóně průtokového cytometru se provádějí měření parametrů buněk. U buněčných třídičů typu stream-in-air je snímací zóna umístěna asi 0,3 mm

pod špičkou trysky, u jiných cytometrů je umístěna uvnitř kyvety (Cossarizza et al., 2019). Buňky mohou být značeny protilátkami spojenými s fluorochromem nebo obarveny fluorescenčními membránovými, cytoplazmatickými nebo jadernými barvivy. Tak může být usnadněna diferenciací buněčných typů, přítomnost membránových receptorů a antigenů, membránový potenciál, pH, enzymová aktivita a obsah DNA (Macey, 2007). Fluorescenční sondy jsou obvykle monoklonální protilátky, které byly navázány s fluorochromy; mohou to být také fluorescenční barviva/reagencie, které nejsou konjugovány s protilátkami. Fluorescenční sondy reagují s buňkami nebo částicemi (Givan, 2001).

Fluorescence je excitována, když buňky procházejí laserovým excitačním paprskem, a tato fluorescence je sbírána optikou v pravém úhlu k dopadajícímu paprsku. Bariérový filtr blokuje laserové excitační osvětlení, zatímco dichroická zrcadla a příslušné filtry slouží k výběru požadovaných vlnových délek fluorescence pro měření. Fotony světla dopadající na detektory jsou převáděny pomocí fotonásobičů na elektrický impuls a tento signál je zpracováván analogově-digitálním převodníkem, který mění elektrický impuls na numerický signál. Množství a intenzita fluorescence jsou zaznamenávány počítačem a zobrazovány na vizuální zobrazovací jednotce jako frekvenční rozdělení, které může být jednoparametrové, dvouparametrové nebo víceparametrové. Částice jsou analyzovány jednotlivě, ale interpretovány společně. Souhrnný obrázek je znázorněn jako histogram. Jednoparametrové histogramy obvykle poskytují informace o intenzitě fluorescence a počtu buněk dané fluorescence, takže slabě fluoreskující buňky jsou odlišeny od těch, které jsou silně fluoreskující. Dvouparametrové histogramy dopředného úhlu rozptylu a 90° rozptylu světla (90° LS) umožňují identifikaci různých typů buněk v preparátu na základě velikosti a granularity. Pravý úhel a boční rozptyl jsou alternativní názvy pro 90° LS (Macey, 2007).

### 3.5.3.2 Fluidní systém

Název „průtokový cytometr“ je odvozen od „toku“ buněk. Primárním cílem fluidního systému je udržovat stabilní tok buněk jedné po druhé, aniž by docházelo k jakékoli turbulenci v místě zásahu laseru (Dey, 2021). Jedním účelem fluidního systému je pohybovat buňkami jednu po druhé přesně skrz snímací oblast v proudu kapaliny takovým způsobem, že každá buňka je osvětlena stejným množstvím světla z laserů. V cytometrech s třídícími schopnostmi musí fluidní systém zajistit stabilní oddělování malých kapiček od proudu kapaliny, kdy kapky obsahují buňky určené k vyřízení. Buňky jsou nabíjeny a vychylovány v elektrickém poli (Cossarizza et al., 2019). Koaxiální povaha proudu buněk se používá k udržení stálého toku buněk v bodě styku s laserem. „Koaxiální proud“ znamená dva proudy tekutiny, jeden vnější a druhý vnitřní. Vnější tekutina slouží jako proud tekutiny obklopující vnitřní vzorek obsahující buňky. Tekutina vnějšího pláště tedy snižuje jakékoli turbulence. Tlak v tekutině se vzorkem je vždy udržován mnohem vyšší než ve vnější tekutině. Takže vysoký tlak, rozdíl v hustotě a rychlosti tekutiny se vzorkem jsou zodpovědné za zabránění smíchání dvou proudů. Koaxiální proudění pomáhá při rovnoměrném osvětlení buněk laserovým paprskem. Je také známé jako hydrodynamické zaostřování. Rychlost toku kyvet lze ovlivňovat změnou tlaku vzduchu v průtokové komoře. Pokud je tlak vzorku nižší, pak se průtok kyvet v průtokové komoře sníží. Snížený tlak vzorku zužuje paprsek (Dey, 2021).

### 3.5.3.3 Počítačový systém

Každá jednotlivá událost v průtokovém cytometru je digitalizována analogově digitální konverzí. Každé události je přiděleno číslo kanálu a je vygenerována číselná hodnota pro výšku, šířku pulzu atd. Číslo kanálu se přeneso do počítače a zaznamená se pro analýzu. Když kapičky projdou bodem laserového dotazování, analyzují se fluorescenční data. Podle nastavených kritérií jsou vyhodnocovány jednotlivé kapky okamžitě destičkou nabíjecí elektrody. Nabité kapky jsou pak vychylovány pomocí vychylovací desky. Kladně nabitá kapka jde směrem k záporně nabitě desce a záporně nabitě kapky jsou vychylovány směrem ke kladně nabitým deskám. Tím jsou buňky, které jsou předmětem zájmu, odděleny od hlavního proudu toku.

Výroba histogramu se opírá o měření pulzů dané hodnoty a jejich přiřazení ke kanálům, které představují různé napěťové úrovně. Tento typ analýzy se nazývá „pulzní zpracování“. Pokaždé, když impuls spadne do jednoho z těchto kanálů, čítač zvýší kanál. Proces počítání každého pulzu v příslušném kanálu je známý jako A-to-D konverze. Většina systémů má 256 nebo 1024 kanálů pro histogramy s jedním parametrem a mohou být generovány na základě fluorescence, FALS nebo 90° LS. Pulsy mohou být zesilovány lineárním nebo logaritmickým způsobem. Graf může zahrnovat všechny impulsy, malé pulsy budou rozloženy do více kanálů a větší pulsy do menšího počtu kanálů. Tímto způsobem jsou všechny pulsy přeneseny na stupnici histogramu (Macey, 2007).

### 3.5.4 Úkoly a techniky cytometrie

Kořeny průtokové cytometrie lze vysledovat až k inovacím na počátek dvacátého století, široké využití začalo v sedmdesátých letech 20. století se zavedením prvních komerčně dostupných cytometrů (McCoy, 2002). Od dob van Leeuwenhoek a Hooka do poloviny 20. století se soustředíme na otázky:

- 1) zda byly ve vzorku přítomny buňky
- 2) kolik jich tam bylo
- 3) jaké druhy buněk byly zastoupeny
- 4) jaké mohou být jejich funkční vlastnosti

Odpovědi se hledaly za pomoci mikroskopického obrazu. Stejně úkoly však zůstávají v dnešní době pro moderní cytometrii.

Přestože elektrické a akustické vlastnosti plus emise jaderného záření z jednotlivých buněk lze měřit, jsou optická měření v cytometrii nejběžnější (Shapiro, 2005). Je mocným nástrojem pro zkoumání fenotypu a vlastností buněk (Macey, 2007). Můžeme říct, že typickým cytometrem je tedy speciální mikroskop; stupeň podobnosti je dán požadavky na měření, která mají být provedena. Ty jsou zase diktovány tím, co uživatel potřebuje vědět o vzorku. V úspěšných aplikacích cytometrických pokusů se využívá elektrooptika, elektronika a počítače (Shapiro, 2005).

Průtoková cytometrie je zvláště důležitá pro biologická zkoumání, protože umožňuje kvalitativní a kvantitativní zkoumání celých buněk, které byly označeny širokou škálou komerčně dostupných činidel (Givan, 2001). V současné době se používá k získání počtu pomocných T lymfocytů potřebných ke sledování průběhu a léčby infekce HIV a ke stanovení obsahu DNA v buňkách, která může pomoci při hodnocení prognózy a stanovení léčby u

pacientů s rakovinou prsu a jinými maligními onemocněními. Tato technologie byla také použita k vyhodnocení vhodnosti orgánů pro transplantaci, k izolaci lidských chromozomů pro genetické výzkumy, k oddělení spermií nesoucích X–a Y-chromozomy pro selekci pohlaví při chovu zvířat a in vitro fertilizaci u lidí, k identifikaci hematopoetické kmenové buňky a pomohla odhalit několik široce rozšířených, ale dříve neznámých rodů mořských mikroorganismů(Melamed, 2001).

### 3.5.5 Příprava vzorků a sběr dat v průtokové cytometrii

Rozhodující součástí postupu je řádná příprava vzorku. Optimálního výsledku z průtokové cytometrie je dosaženo pouze v adekvátně připraveném vzorku.

Základní cíle přípravy:

1. Zhotovení jednobuněčného preparátu.
2. Suspendovat buňky ve vhodném médiu, které je obvykle izotonické a má pH 7,3.
3. Mít v přípravku dostatečné množství buněk, obvykle v koncentraci  $10^5$  buněk na ml.
4. Označit požadované buňky vhodným fluorochromovým barvivem nebo obarvit jádra fluorochromovým barvivem pro DNA průtokovou cytometrii.

Příprava jednotlivých buněk je jedním z nejkritičtějších kroků průtokové cytometrie. Pokud nejsou buňky adekvátně disociovány, není možné získat data. Buněčné spoje mohou být narušeny za pomoci enzymů. Enzymy jsou citlivé na teplotu a při nižší teplotě nemusí fungovat. Běžně používané enzymy pro buněčnou disociaci jsou trypsin a papain. Obvykle stačí 1 až 2 hodiny inkubace enzymu k vytvoření jednobuněčného přípravku. Enzymatická metoda je nevhodná pro imunofenotypizaci. V postupu FCM je třeba pamatovat na následující body: zpracování čerstvého vzorku vždy poskytuje lepší výsledky než zmrazený vzorek; objem a koncentrace primární protilátky by měly být vždy předem titrovány; správný výběr protilátky značené fluorochromem je nezbytný v případě vícebarevného FCM (Dey, 2021).

### 3.5.6 Průtoková cytometrie v reprodukční biologii

Studie spermatogeneze byly podpořeny potřebou rychlého, citlivého, objektivního a multiparametrického měření reprodukčních účinků, zároveň bylo potřeba hodnocení fertilitního potenciálu lidských a zvířecích spermií spolu s identifikací subpopulací zárodečných buněk, které procházejí proliferačními i maturačními procesy za normálních i narušených podmínek. Významná zlepšení byla zavedena za účelem zkoumání diferenciační dráhy spermatogenního komplexu a zjevné uniformity zralých spermií. FCM byla použita k měření buněk varlat a spermií u různých druhů, včetně člověka. Konečnými body zvažovanými v toxikologických studiích jsou: změněné poměry zárodečných buněk varlat, obsah DNA a RNA, zvýšení koeficientu variace, indukce diploidních prodloužených spermatid a diploidních spermií, změněná jaderná morfologie, životaschopnost spermií, mitochondriální funkce a struktura chromatinu spermatu. Přesná měření obsahu DNA umožňuje podrobnou analýzu pro určení podílu spermií nesoucích chromozom X a Y a třídění těchto subpopulací pro určení pohlaví(Spanò & Evenson, 1993).

Dle (Martínez-Pastor et al., 2010) patří mezi nejoblíbenější barviva značící životaschopnost membránově nepropustné sondy propidium jodid (PI) a ethidium homodimer

(EH). Snadno se používají, jsou rychlé a lze je excitovat laserem o vlnové délce 488 nm, který je součástí většiny cytometrů. Tato barviva vstupují do buněk s porušenou plazmalemou a po navázání na nukleové kyseliny emitují červenou fluorescenci (PI: 636 nm; EH: 617 nm). Jiné sondy viability emitují zelenou fluorescenci při vstupu do metabolicky aktivních buněk (např. karboxyfluorescein diacetát). Kombinace PI a sondy vázající nukleové kyseliny SYBR-14 je pravděpodobně nejpoužívanější. SYBR-14 je propustná pro membrány a barví všechny hlavičky spermií zeleně. Když PI pronikne do spermií s poškozenou membránou (PM), vytěsni nebo zhasne fluorescenci SYBR-14.

Akrozomální stav byl hodnocen pomocí sond, které rozpoznávají cíle uvnitř akrozomu, a proto označují ty spermie s poškozenými nebo zreagovanými akrozomy (PA). Lektiny, které se vážou na glykosidické zbytky v různých částech akrozomální membrány, byly použity u široké řady druhů. *Pisum sativum* agglutinin (PSA) a *Arachis hypogaea* agglutinin (PNA) byly nejpoužívanějšími lektiny kvůli jejich specifitě. PNA poskytuje největší citlivost a specifitu při rozlišování akrozomů. Spermie značené lektinem nebo protilátkou mohou být fixovány, což v případě potřeby umožňuje pozdější analýzu. Akrozomální sondy jsou obecně konjugovány se zeleným fluorochromem fluorescein isothiokyanátem (FITC) a kombinovány s životaschopnými barvivy PI nebo EH. V tomto případě pak můžeme rozlišovat buňky s poškozenou plazmatickou membránou a současně i poškozeným akrozomem (PMA) (Martínez-Pastor et al., 2010; Tao et al., 1993).

Mitochondrie jsou hlavní organelou s klíčovou rolí ve funkci spermií za fyziologických i biotechnologických podmínek (F. J. Peña et al., 2009). Barviva MitoTracker® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornie, USA) jsou barviva, která akumulují a barví aktivní mitochondrie. Výhodou je, že jsou vysoce specifické, dostupné v širokém rozsahu emisní fluorescence a několik z nich je fixovatelných, což umožňuje kombinaci se sondami vyžadujícími fixaci (např. protilátky) nebo najdou využití při pozdější analýze (Martínez-Pastor et al., 2010).

(Fernando J. Peña, 2007) uvádí, že u spermií byly detekovány změny podobné apoptóze a použití FCM velmi pomohlo jejímu studiu. Jedním z časných kroků apoptózy je translokace fosfatidylserinu z vnitřní vrstvy plazmatické membrány na vnější, což lze detekovat značením anexinem V. Tento marker, konjugovaný s FITC, byl analyzován průtokovou cytometrií k detekci jemných membránových změn souvisejících se zpracováním spermií. V současné době je anexin V dostupný konjugovaný s širokou škálou fluorochromů, což umožňuje jeho kombinaci s širší škálou sond (Martínez-Pastor et al., 2010).

Test Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) slouží jako nástroj pro měření klinicky důležitých vlastností integrity jaderného chromatinu spermatu. Test využívá metachromatické vlastnosti akridinové oranže (AO), DNA sondy a principů průtokové cytometrie. Poškozený chromatin spermií může zhoršit oplodňovací schopnost spermií, snížit úspěšnost oplodnění in vitro nebo inseminace, způsobit potrat nebo abnormality plodu, a dokonce snížit životaschopnost potomků. AO je metachromatický fluorochrom, který se snadno vkládá do DNA. Při spojení s dvouvláknovou DNA (dsDNA) fluoreskuje zeleně, zatímco při spojení s jednovláknovou DNA (ssDNA) fluoreskuje červeně (Evenson & Jost, 2000; Martínez-Pastor et al., 2010).

(Gillan et al., 2005) ve shrnutí uvádí, že většina laboratorních metod používaných k hodnocení kvality spermatu příliš nekoreluje s fertilizační kapacitou. Objev různých

fluorochromů a sloučenin konjugovaných s fluorescenčními sondami umožnil širší analýzu vlastností spermií a ve spojení s průtokovým cytometrem umožnil hodnocení velkého počtu spermií. Lze hodnotit řadu charakteristik integrity, životaschopnosti a funkce spermií. Stav DNA spermií byl stanoven pomocí metachromatických vlastností akridinové oranže (AO). Barvení AO, pokud se použije v testu chromatinové struktury spermií (SCSA®), koreluje s plodností u řady druhů. Fragmentaci DNA lze také hodnotit pomocí testu TUNEL (transferase-mediated dUTP nick-end labeling), který identifikuje zlomy řetězce DNA pomocí značení volných 3'-OH konců modifikovanými nukleotidy. Stav akrozomu spermie lze určit pomocí fluorescenčně značených lektinů a fluorescenční acidotropní sondy LysoTracker Green DND-26. Stav kapacity byl pozorován prostřednictvím změn zprostředkovaných vápníkem pomocí chlortetracyklinu (CTC) nebo změnami ve fluiditě membrány sledovanými vazbou fluorescenční amfifilní sondy, Merocyaninu 540. Fluorescenčně značený annexin-V, C6NBD a Ro-09-0198 se používá k detekci změn v distribuci membránových fosfolipidů. Životaschopnost buněk může být stanovena pomocí náchylnosti propidium jodidu (PI), ethidium homodimer-1 (EthD-1) nebo Yo-Pro-1 k pronikání poškozenými membránami. Tyto látky jsou obecně lépe přizpůsobitelné klinické průtokové cytometrii než barvivo Hoechst 33258, které nepropouští bisbenzimidové membrány a které excituje v ultrafialové oblasti a vyžaduje UV laserové zařízení. 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). Průtoková cytometrie je nástroj, který může být v budoucnu použit k monitorování mnoha nových potenciálních markerů funkce spermií.

## 4 Metodika

Výzkumná část této diplomové práce probíhala v období od 12.10.2021 do 4.4.2022 a práce v laboratoři byla ukončena 25.5.2022. Bylo provedeno celkově 9 odběrových dnů, kdy pro potřeby této práce se vychází z výsledků 7 uniformě provedených odběrů.

### 4.1 Berani

Vzorky ejakulátu byly získávány od beranů plemene valašské ovce, kteří byli chováni na pozemku Demonstrační a pokusné stáje České zemědělské univerzity v Praze (50°07'47.6"N 14°22'07.0"E). První beran, který byl pro výzkum nejvíce podstatný, se narodil 31.3.2016, ušní známka byla 74801/081 a patřil do linie Juras. Druhý beran se účastnil pouze prvních dvou odběrových dní, a to kvůli špatnému zdravotnímu stavu, který souvisel s vyšším věkem. Byl narozen 14.1.2014, ušní známku měl 77808/072 a patřil do linie Beskyd. V prvních dvou odběrových dnech se podařilo získat vzorky od obou beranů a ty následně byly v laboratoři smíchány, ostatní odběrové dny se použil pouze ejakulát od prvního berana.

V Demonstrační a pokusné stáji byli berani chováni spolu se dvěma kozly. Ustájení bylo celoročně formou zastřešených dřevěných kotců s možností trvalého venkovního výběhu. Zvířata byla minimálně vystavována umělému osvětlení. Výběh sousedil s vedlejším prostorem, kde byly chované ovce, kozy a alpaky. Podle zákona č. 208/2004 Sb. ustájení odpovídalo nařízeným stanovám.

Výživa beranů byla založena na neomezeném přístupu k lučnímu senu a pastevnímu porostu. Každodenním doplňkem krmné dávky bylo 300–500 g/ks granulovaného krmiva ENERGYS OVCE UNI od výrobce De Heus a.s., Bučovice, které obsahovalo tento podíl látek: hrubý protein 16.20 %, hrubá vláknina 10.50 %, hrubý popel 8.70 %, hrubé oleje a tuky 2.90 %, vápník 1.50 %, fosfor 0.44 %, sodík 0.35 %, hořčík 0.20 % ("Krmení, krmné směsi a doplňky | ENERGYS Ovce Uni 25kg 1580 | RM HOBBY CENTRUM," n.d.). Berani měli permanentní přístup k miskovým jazykovým plastovým napaječkám a solnému lizu. Beranům byl zajištěn pravidelný veterinární dohled, bez prokázaných problémů.

### 4.2 Odběr ejakulátu

Odběry byly prováděny prostřednictvím umělé vagíny od výrobce Minitüb GmbH, Tiefenbach, Německo. Příprava byla provedena dle postupů popisovaných v metodikách od (Kos et al., 2019; Romano & Christians, 2009). Jako jednorázový sběrač se využívala suchá nespermicidní ochrana vaginální sondy z přírodního latexu. Bylo zapotřebí cca 1 hodinu před odběrem v laboratoři nachystat potřebné vybavení pro odběr, což obnášelo přípravu vagíny, teplé vody do termosky, vazelíny, sběračů, pipety, zkumavek na odebrané vzorky a papírových utěrek spolu s lihem, na průběžnou dezinfekci. Vše bylo uloženo do polystyrenového boxu s vytemperovanými mrazicími bloky na 38 °C.

Ve stáji byla jako atrapa využívána Koza bílá krátkosrstá, která byla v kotci fixována a byl k ní připuštěn vždy jeden z plemeníků, následoval odběr.



### 4.3 Zpracování vzorku a použitá ředidla

Po úspěšném odběru byl vzorek přepipetován do zkumavky, uložen do termoboxu a přepraven do laboratoře. V laboratoři se nejprve vzorek zhodnotil na přístroji CASA po nařazení pomocí PBS, pokud byla motilita nulová, vzorek se do výzkumu nezapočítával. V případě, že vzorek vykazoval aktivitu spermií, tak se realizovalo měření koncentrace na předkalibrovaném spektrofotometru (Genesys 10S Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a následovalo ředění za pomoci již připravených vytemperovaných ředidel (38 °C). Ředidlo číslo 1 obsahovalo AndroMed s obsahem glycerolu 6-7 % (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Germany), bylo připraveno smícháním s destilovanou vodou v poměru 1:4 (destilovaná voda:AndroMed). Ředidlo číslo 2 obsahovalo OviXcell® (IMV Technologies, L'Aigle, Francie) na bázi sójového lecitinu, které se používá bez předchozího ředění. Ředidlo číslo 3 OptiXcell® (IMV Technologies, L'Aigle, Francie) na bázi lipozomů bylo připraveno smícháním s destilovanou vodou v poměru 1:2. Ředidla 4-7 kombinovala již vyjmenovaná připravená ředidla, a to následovně: ředidlo číslo 4 kombinovalo AndroMed, OviXcell® a OptiXcell® v poměru 1:1:1, ředidlo číslo 5 bylo připraveno z AndroMedu a OviXcellu® (1:1), ředidlo č. 6 obsahovalo AndroMed a OptiXcell® (1:1) a poslední ředidlo číslo 7 kombinovalo OviXcell® a OptiXcell® (1:1).

Smíchání spermatu s ředidly č. 1-7 bylo uskutečněno v poměru 1:4 a následně bylo přidáno PBS pro získání požadované koncentrace spermií v ID (cca 200 mil. spermií/ ml). Z eppendorfek se v dalším kroku plnily pejety o objemu 0,25 ml. Pro každou variantu ředidla jsme připravili 3 pejety. Ty jsme uzavírali polyvinyl alkoholem – PVA (IMV Technologies, L'Aigle, Francie). Následovala fáze ekvibrace, kdy pejety byly uloženy na nerezovém nosiči a ponechány cca 2 hodiny v lednici při teplotě v rozmezí 4 - 8 °C.

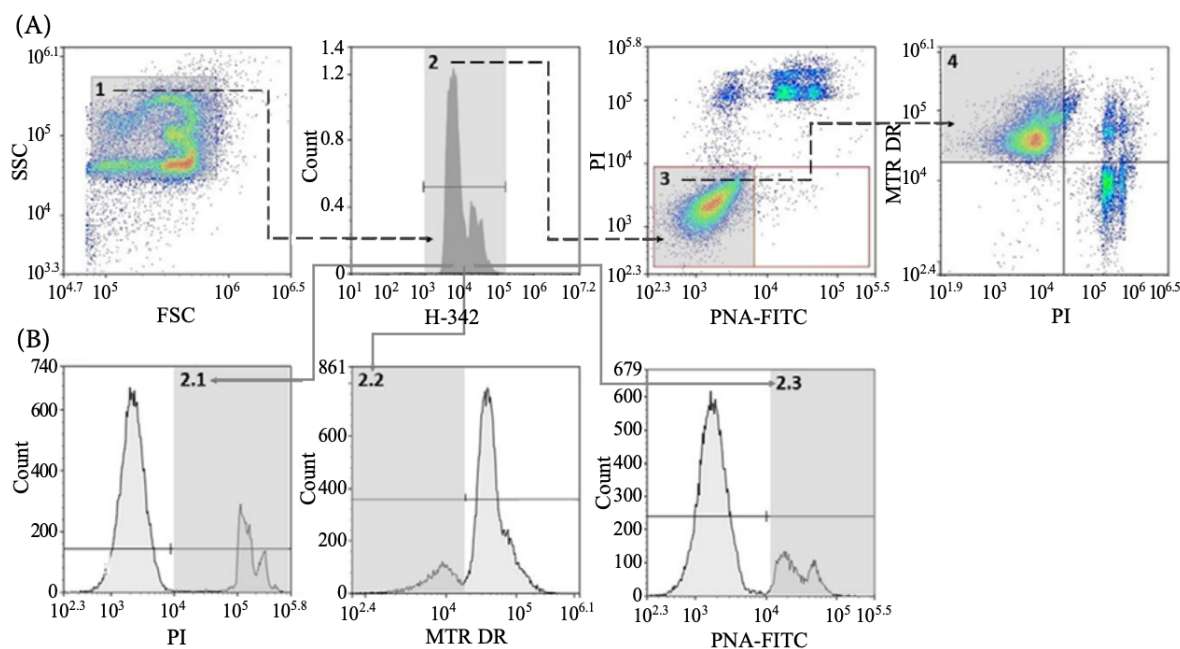
### 4.4 Hodnocení vzorků před mrazením

Po ekvibraci byla vždy jedna připravená pejeta od každé varianty hodnocena pomocí přístroje CASA (model iSperm, Aidmics Biotechnology Co., LTD, Taipei City, Taiwan) a průtokového cytometru (Novocyte 3000, Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, California, USA).

Cílem hodnocení pomocí CASA bylo zjištění celkové a progresivní motility spermií v daném ředidle. Vzorky byly ředěny přibližně 10× s PBS z důvodu vysoké koncentrace spermií pro analýzu. 7 µl vzorku se pipetou nanoslo na jednorázovou analyzační komůrku, která byla následně upevněna na vyhřátou (38 °C) optickou čočku v přístroji a proběhlo vyhodnocení za pomoci softwaru.

Součástí cytometru byly lasery emitující fialové (405 nm), modré (488 nm) a červené (640 nm) záření. Vzorky byly nanoseny na analyzační destičku spolu s namíchaným Master Mixem. Ten obsahoval fluorescenční barviva PNA-FITC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) v koncentraci 0,5 µg/mL; Hoechst-33342 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) v konc. 10 µg/mL; MitoTracker Deep Red (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) s koncentrací 80 nM a PI (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o koncentraci 8 µg/ mL. Master Mix jsme připravili smícháním: 1 µL Hoechst-33342, 1 µL PI,

1  $\mu\text{L}$  PNA-FITC a 2  $\mu\text{L}$  MitoTracker Deep Red. Na desku jsme nanесли 100  $\mu\text{L}$  PBS, 5  $\mu\text{L}$  Master Mixu a 10  $\mu\text{L}$  vzorku. Přidáním PBS jsme získali cca koncentraci 20 mil. spermii/ ml. Analyzační destička se inkubovala při 38 °C 10 minut. Pro vyhodnocování vzorků v průtokovém cytometru byla nastavena nízká rychlost, a to kolem 20 000 částic. Následovalo vyhodnocení softwarem NovoExpress 1.3.0 (Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, California, USA). Cílem vyhodnocení bylo získání celkové viability buněk (Hoechst-33342+/PI-/PNA-FITC-/MitoTracker Deep Red+, %) spolu s podílem spermii, které měly poškozený akrozom (PNA-FITC), poškozenou plazmatickou membránu (PI) a dvojí poškození – akrozomu a plazmatické membrány, dalším ukazatelem byla mitochondriální aktivita (MitoTracker Deep Red+) a intenzita signálu MitoTrackeru. Abychom oddělili nespermatické částice, využili jsme parametry side scatter, forward scatter a barvivo Hoechst-33342. Životaschopné spermie byly definovány jako buňky s neporušenou plazmatickou membránou, neporušeným akrozomem a vysokým mitochondriálním potenciálem.



Obrázek 1 Gatovací strategie a hierarchie průtokové cytometrie (Savvulidi et al., 2021)

**Zkratky:** (A) Shluk událostí byl nejprve identifikován pomocí bivariačního histogramu bočního rozptylu (SSC) versus předního rozptylu (FSC) (1). Spermie byly identifikovány na základě sady gatingu s barvivem Hoechst-33342 (H-342; DNA) (2). Spermie s neporušenou plazmatickou membránou a akrozomem byly identifikovány na základě propidiumjodidu (PI) a intenzity signálu PNA (PNA-FITC) (3). Nakonec byly životaschopné spermie hodnoceny kombinací výše uvedených fluorescenčních markerů s pozitivními buňkami Mito Tracker Deep Red (MTR DR) (H-342+/PNAFITC-/PI-/MTR DR+) (4); (B) Skupiny spermii obsahujících DNA s poškozenou plazmatickou membránou (2.1), zhoršenou mitochondriální aktivitou (2.2) a poškozeným akrozomem (2.3) (Savvulidi et al., 2021).

## 4.5 Mrazení

Zbývající dvě pejety od každé varianty byly ihned po ekvilibraci mrazeny v parách tekutého dusíku. Využívali jsme vyrobený polystyrenový termobox (upravený podle Animal Reproduction Systems, Inc., Chino, CA, USA), kde byla kontrolována výška vzorků nad hladinou tekutého dusíku. Dle (Ptáček et al., 2019) 1. fáze probíhá ve výšce 15 cm po dobu 4 min; 2. fáze probíhá ve vzdálenosti 9,5 cm, 5 min; 3. fáze je ve výšce 5 cm po dobu 6 min a poslední 4. fáze je výšce 1,5 cm, 8 min. Pro naše účely ale byl použit pozměněný postup dle (Savvulidi et al., 2021) a to následovný: 15 cm nad povrchem hladiny tekutého dusíku po dobu 3 min; 9,5 cm nad povrchem po dobu 2 min, pak ve výšce 5 cm nad hladinou po dobu 1 min, a nakonec ve výšce 0,5 cm, pár vteřin a pak se v dalším kroku vzorky přenesly do kontejneru s kapalným dusíkem. Tímto postupem jsme dosáhli poklesu teploty okolo 17 °C/min.

## 4.6 Hodnocení po rozmrazení

Pro vyhodnocení zmrazených vzorků bylo zapotřebí nejprve vzorky vhodným způsobem rozmrazit. K tomuto účelu jsme využívali vodní lázeň vytemperovanou na 38 °C, kdy se pejety se vzorky na 30 vteřin ponořili do vody a následně se analyzovaly stejným způsobem, jaký je popsán v kapitole 4.4 Hodnocení vzorků před mrazením.

## 5 Statistické zpracování dat

Pro statistické vyhodnocení získaných dat ze softwaru CASA a průtokového cytometru byl použit program SAS (Verze 9.4; SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA), analýza byla provedena procedurami UNIVARIATE a MIXED. V modelové rovnici byl zohledněn vliv odběrového dne a pleménika jako sdružený náhodný efekt, vliv ředidla jako fixní efekt. U ukazatelů po rozmrazení byl zohledněn výchozí stav po ekvilibraci formou jako kovariáty. Mezi závislé proměnné jsme zvolili data z CASA (celková motilita spermií, progresivní motilita spermií a VAP, VCL, VSL, LIN a STR) a průtokového cytometru (viabilitu buněk, poměr buněk s poškozeným akrozomem, počet spermií s poškozeným akrozomem a současně poškozenou plazmatickou membránou, počet buněk s poškozenou plazmatickou membránou, podíl spermií s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem a intenzitu signálu MitoTrackeru). Podrobné vyhodnocení rozdílů mezi jednotlivými proměnnými bylo realizováno pomocí Tukeyho – Kramerova testu.

### 5.1 CASA

Popis modelu rovnic pro konkrétní závislé proměnné po ekvilibraci pro CASA jsou následující:

$$1. Y_{eqij} = \mu + DEN * BER + \check{R}ED_i + e_{ij}$$

kde  $Y_{eqijk}$  = hodnoty celkové motility, progresivní motility, VAP, VCL, VSL, LIN a STR, vše po ekvilibraci

$\mu$  = obecný průměr znaku

$DEN * BER$  = znáhodněný sdružený efekt dne a pleménika

$\check{R}ED_i$  = fixní efekt i-té varianty ředidla ( $i = \text{AndroMed}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{OviXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{OptiXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{AndroMed} + \text{OviXcell} + \text{OptiXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{AndroMed} + \text{OviXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{AndroMed} + \text{OptiXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{OviXcell} + \text{OptiXcell}$ ,  $n = 22$ )

$e_{ij}$  = residuální chyba

Popis modelu rovnic pro konkrétní závislé proměnné po rozmrazení pro CASA jsou následující:

$$1. Y_{thwij} = \mu + DEN * BER + \check{R}ED_i + b_{1-7} \times EQ + e_{ij}$$

kde  $Y_{thwijk}$  = hodnoty celkové motility, progresivní motility, VAP, VCL, VSL, LIN a STR, vše po rozmrazení

$\mu$  = obecný průměr znaku

$DEN * BER$  = znáhodněný sdružený efekt dne a pleménika

$\check{R}ED_i$  = fixní efekt i-té varianty ředidla ( $i = \text{AndroMed}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{OviXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{OptiXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{AndroMed} + \text{OviXcell} + \text{OptiXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{AndroMed} + \text{OviXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{AndroMed} + \text{OptiXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{OviXcell} + \text{OptiXcell}$ ,  $n = 22$ )

$b_{1-7} \times EQ$  = hodnoty pro dílčí závislé proměnné po ekvilibraci formou jako kovariáty (celková motilita, progresivní motilita, VAP, VCL, VSL, LIN a STR)

$e_{ij}$  = residuální chyba

Rozdíly ve sledovaných ukazatelích v závislosti na zvolených faktorech byly hodnoceny na hladinách statistické průkaznosti  $P < 0,05$ .

## 5.2 Průtokový cytometr

Popis modelu rovnic pro konkrétní závislé proměnné po ekvilibraci pro průtokovou cytometrii jsou následující:

$$1. Y_{eqij} = \mu + DEN * BER + \check{R}ED_i + e_{ij}$$

kde  $Y_{eqijk}$  = celková viabilita buněk, podíl buněk s poškozenou plazmatickou membránou, podíl buněk s poškozením akrozomu, podíl buněk s poškozenou plazmatickou membránou a poškozeným akrozomem, intenzita signálu MitoTrackeru, vše po ekvilibraci

$\mu$  = obecný průměr znaku

$DEN * BER$  = znáhodněný sdružený efekt dne a plemeníka

$\check{R}ED_i$  = fixní efekt i-té varianty ředidla ( $i = \text{AndroMed}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{OviXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{OptiXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{AndroMed} + \text{OviXcell} + \text{OptiXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{AndroMed} + \text{OviXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{AndroMed} + \text{OptiXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{OviXcell} + \text{OptiXcell}$ ,  $n = 22$ )

$e_{ij}$  = residuální chyba

Popis modelu rovnic pro konkrétní závislé proměnné po rozmazení pro průtokovou cytometrii jsou následující:

$$1. Y_{thwij} = \mu + DEN * BER + \check{R}ED_i + b_{1-7} \times EQ + e_{ij}$$

kde  $Y_{thwijk}$  = celková viabilita buněk, podíl buněk s poškozenou plazmatickou membránou, podíl buněk s poškozením akrozomu, podíl buněk s poškozenou plazmatickou membránou a poškozeným akrozomem, spermie s mitochondriálním membránovým potenciálem a intenzita signálu MitoTrackeru, vše po rozmrazení

$\mu$  = obecný průměr znaku

$DEN * BER$  = znáhodněný sdružený efekt dne a plemeníka

$\check{R}ED_i$  = fixní efekt i-té varianty ředidla ( $i = \text{AndroMed}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{OviXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{OptiXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{AndroMed} + \text{OviXcell} + \text{OptiXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{AndroMed} + \text{OviXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{AndroMed} + \text{OptiXcell}$ ,  $n = 26$ ;  $i = \text{OviXcell} + \text{OptiXcell}$ ,  $n = 22$ )

$b_{1-7} \times EQ$  = hodnoty pro dílčí závislé proměnné po ekvilibraci formou jako kovariáty (celková viabilita buněk, podíl buněk s poškozenou plazmatickou membránou, podíl buněk s poškozením akrozomu, podíl buněk s poškozenou plazmatickou membránou a poškozeným akrozomem, spermie s mitochondriálním membránovým potenciálem a intenzita signálu MitoTrackeru)

$e_{ij}$  = residuální chyba

Rozdíly ve sledovaných ukazatelích v závislosti na zvolených faktorech byly hodnoceny na hladinách statistické průkaznosti  $P < 0,05$ .

## 6 Výsledky

### 6.1 Výsledky CASA

#### 6.1.1 Základní charakteristiky

V tabulce č. 2 jsou uvedeny veškeré základní statistické charakteristiky závisle proměnných. Vzorky byly hodnoceny po ekvilibraci a po rozmrazení, celkem byly analyzovány vzorky spermatu ze sedmi odběrových dní. Byla sledována celková motilita spermií, progresivní motilita spermií a kinematické ukazatele (VAP, VCL, VSL, LIN a STR).

	Proměnná	Četnost	Ar. průměr	Směrodatná odchylka	Minimum	Maximum
<b>Po ekvilibraci</b>	MOT	171	48,40	22,969	0	93,63
	PROG	171	32,39	17,476	0	73,91
	VAP	171	114,79	39,253	0	189,31
	VCL	171	142,41	44,183	0	218,67
	VSL	171	94,71	37,388	0	185,25
	LIN	171	78,84	12,965	0	97,68
	STR	171	64,77	16,521	0	92,45
<b>Po rozmrazení</b>	MOT	178	12,32	10,265	0	44,68
	PROG	178	5,60	5,962	0	29,54
	VAP	178	73,02	40,696	0	205,12
	VCL	178	103,82	52,179	0	217,36
	VSL	178	52,84	35,902	0	199,28
	LIN	178	58,52	28,949	0	100
	STR	178	43,20	24,696	0	100

Tabulka 2 Základní statistické charakteristiky CASA

**Zkratky:** Ar. průměr – aritmetický průměr; MOT – celková motilita (%); PROG –progresivní motilita spermií (%); VCL – křivočará rychlost (um/s); VSL – přímočará rychlost (um/s); VAP – průměrná rychlost dráhy (um/s); LIN – linearita křivočaré dráhy (%); STR – přímočarost průměrné dráhy (%)

#### 6.1.2 Popis modelu

Použitý model byl statisticky významný pro faktory  $P < 0,05$ . Statistická průkaznost jednotlivých faktorů v modelové rovnici je uvedena v tabulce č. 3 a 4. Z tabulek vyplývá, že všechny faktory po ekvilibraci byly statisticky významné.

Efekt	MOT	PROG	VAP	VCL	VSL	LIN	STR
<b>DEN * BER</b>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
<b>ŘED</b>	<.0001	0.0029	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

Tabulka 3 Vliv fixních faktorů po ekvilibraci pro hodnoty CASA

**Zkratky:** MOT – celková motilita (%); PROG –progresivní motilita spermií (%); VCL – křivočará rychlost (um/s); VSL – přímočará rychlost (um/s); VAP – průměrná rychlost dráhy (um/s); LIN – linearita křivočaré dráhy (%); STR – přímočarost průměrné dráhy (%); ŘED – ředidlo; DEN \* BER= znáhodněný sdružený efekt dne a plemeníka

Co se hodnot po rozmrazení týká, tak v použitém statistickém modelu byl statisticky průkazný sdružený efekt dne a berana a fixní efekt ředidla u všech sledovaných znaků kromě progresivní motility. Hodnoty dílčích závisle proměnných po ekvibraci zohedněných formou kovariát nebyly průkazné v námi zvolených statistický modelech odhadnutých pro ukazatele po rozmrazení. Vliv byl zjištěn pouze na celkovou motilitu.

Efekt	MOT	PROG	VAP	VCL	VSL	LIN	STR
<b>DEN * BER</b>	<.0001	<.0001	0.0002	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
<b>ŘED</b>	<.0001	0.0858	0.0018	0.0415	<.0001	0.0114	<.0001
<b>b<sub>1-7</sub> × EQ</b>	<.0001	0.9498	0.3744	0.3937	0.5680	0.5061	0.1204

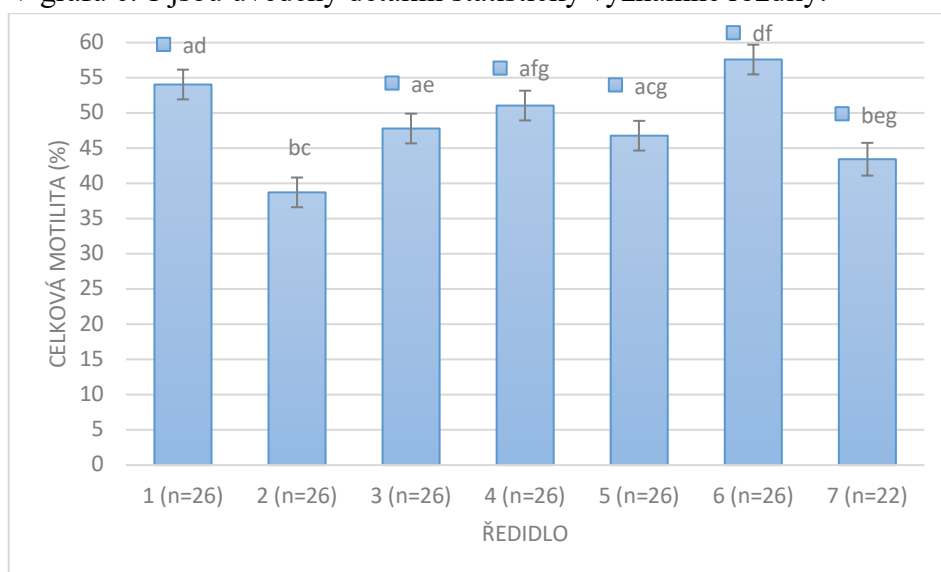
Tabulka 4 Vliv fixních faktorů po rozmrazení pro hodnoty CASA

**Zkratky:** MOT – celková motilita (%); PROG –progresivní motilita spermií (%); VCL – křivočará rychlost (um/s); VSL – přímočará rychlost (um/s); VAP – průměrná rychlost dráhy (um/s); LIN – linearita křivočaré dráhy (%); STR – přímočarost průměrné dráhy (%); ŘED – ředidlo; DEN \* BER= znáhodněný sdružený efekt dne a plemeníka; b<sub>1-7</sub> × EQ = hodnoty pro dílčí závisle proměnné po ekvibraci formou jako kovariáty (celková motilita, progresivní motilita, VAP, VCL, VSL, LIN a STR) po rozmrazení

### 6.1.3 Vliv ředidla

#### 6.1.3.1 Motilita po ekvibraci a po rozmrazení

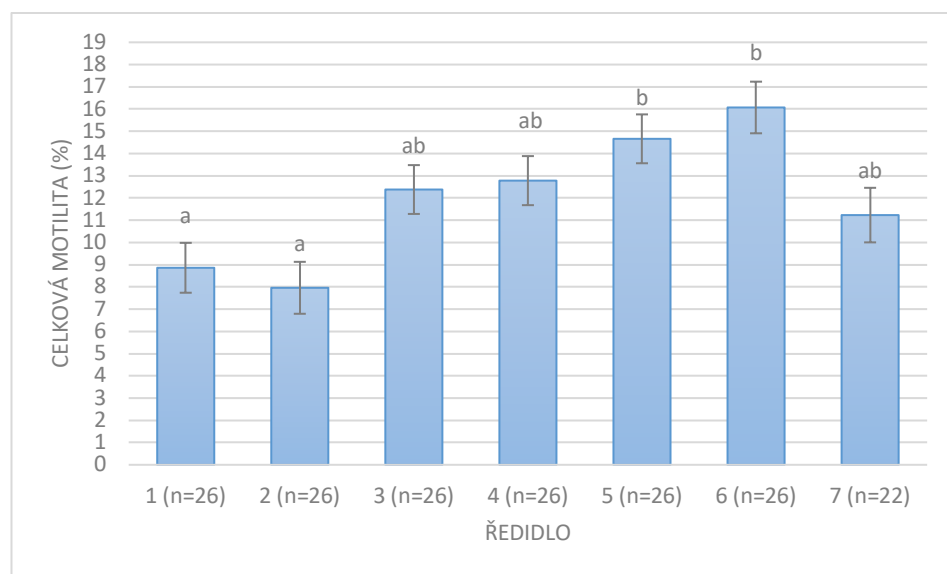
Z grafu č. 1 je patrné, že nejnižších hodnot celkové motility dosahovaly vzorky ředěné v OviXcellu (řed č. 2) a to 38,73±2,111 %. Současně byl prokázán rozdíl mezi tímto ředidlem a č. 1 (AndroMed), 3 (OptiXcell), 4 (AndroMed + OviXcell) a 6 (AndroMed + OptiXcell). Nejvyšších hodnot (57,6±2,111 %) celkové motility dosahovaly vzorky ředěny v řed. č. 6, zde byl shledán rozdíl mezi ředidlem č. 2, 3, 5 (AndroMed + OviXcell) a 7 (OviXcell a OptiXcell). Je patrné, že i ředidlo č. 1 a č. 4 dosahovaly dobrých výsledků (54,05±2,111 a 51,06±2,111 %). V grafu č. 1 jsou uvedeny detailní statisticky významné rozdíly.



Graf 1 Procentuální zastoupení motilních spermií po ekvibraci

**Zkratky:** 1 – AndroMed; 2 – OviXcell; 3 – OptiXcell; 4 – AndroMed + OviXcell + OptiXcell (1:1:1); 5 – AndroMed + OviXcell (1:1); 6 – AndroMed + OptiXcell (1:1); 7 – OviXcell a OptiXcell (1:1); a-g = odlišná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly jsou mezi jednotlivými ředidly

Hodnoty po rozmrazení jsou zapsány a zobrazeny na grafu č. 2. Zde je patrné, že nejvyšších hodnot celkové motility bylo dosaženo v ředidle č. 6 (AndroMed + OviXcell) a č. 5 (AndroMed + OviXcell). Jejich hodnoty  $16,07 \pm 1,099$  % a  $14,66 \pm 1,099$  % se statisticky významně lišily od ředidel č. 1 a 2, kde byly hodnoty výrazně nižší ( $8,86 \pm 1,122$  % a  $7,96 \pm 1,168$  %).



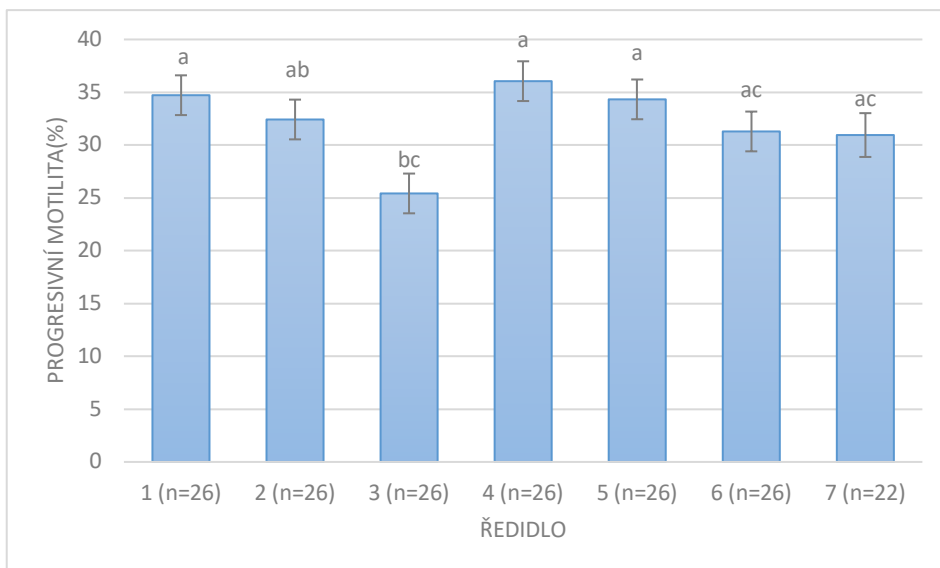
Graf 2 Procentuální zastoupení motilních spermií po rozmrazení

**Zkratky:** 1 – AndroMed; 2 – OviXcell; 3 – OptiXcell; 4 – AndroMed + OviXcell + OptiXcell (1:1:1); 5 – AndroMed + OviXcell (1:1); 6 – AndroMed + OptiXcell (1:1); 7 – OviXcell a OptiXcell (1:1); a-b = odlišná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly jsou mezi jednotlivými ředidly

### 6.1.3.2 Celková progresivní motilita po ekvilibraci a po rozmrazení

Jak je patrné z grafu č. 3 nejnížší progresivitu po ekvilibraci vykazovaly spermie v ředidle č. 3, a to  $25,42 \pm 1,882$  %. Současně byl prokázán statistický rozdíl mezi OptiXcellem (č.3) a ředidly č. 1, 4 a 5. Ostatní ředidla byla bez průkazného statistického rozdílu a hodnoty se pohybovaly v podobných rozmezech od  $30,95 \pm 2,074$  % do  $36,05 \pm 1,882$  %.

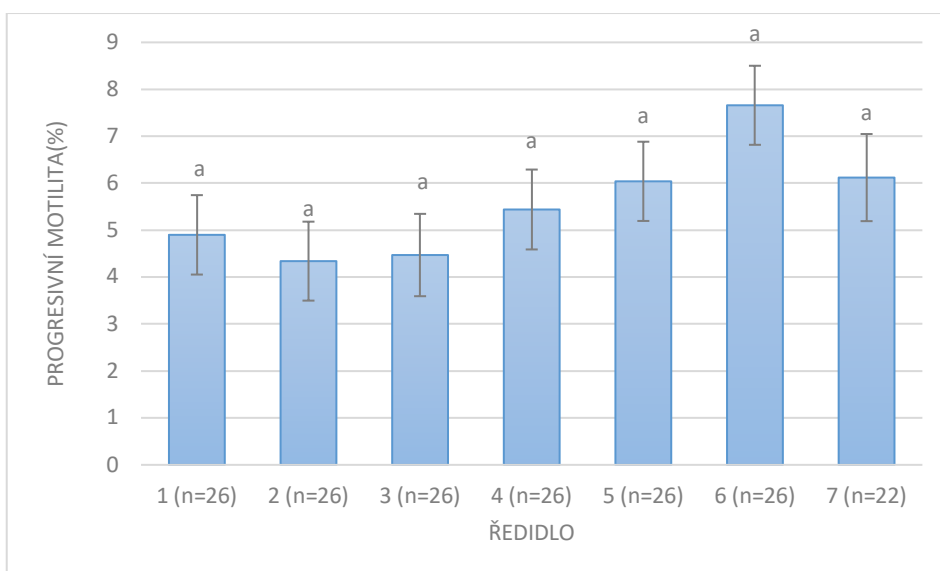




Graf 3 Procentuální vyjádření progresivní motility po ekvilibraci

**Zkratky:** 1 – AndroMed; 2 – OviXcell; 3 – OptiXcell; 4 – AndroMed + OviXcell + OptiXcell (1:1:1); 5 – AndroMed + OviXcell (1:1); 6 – AndroMed + OptiXcell (1:1); 7 – OviXcell a OptiXcell (1:1); a-c = odlišná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly jsou mezi jednotlivými ředidly

Graf č. 4 znázorňuje procento spermií s progresivní motilitou po rozmrazení. Statisticky průkazný rozdíl po rozmrazení nebyl ani mezi jedním ředidlem. Přesto je zde vidět, že vzorky v ředidle číslo 6 ( $7,66 \pm 0,842$  %) mírně procentuálně převyšovaly ostatní ředidla, např. nejmenší progresivitu měly vzorky v OviXcellu a OptiXcellu ( $4,34 \pm 0,841$  % a  $4,47 \pm 0,877$  %).



Graf 4 Procentuální vyjádření progresivní motility po rozmrazení

**Zkratky:** 1 – AndroMed; 2 – OviXcell; 3 – OptiXcell; 4 – AndroMed + OviXcell + OptiXcell (1:1:1); 5 – AndroMed + OviXcell (1:1); 6 – AndroMed + OptiXcell (1:1); 7 – OviXcell a OptiXcell (1:1); a = písmeno ve sloupcích potvrzuje, že nejsou žádné statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly nejsou mezi jednotlivými ředidly

### 6.1.3.3 Další kinematické ukazatele po ekvilibraci a po rozmrazení

Výsledky VAP, VCL a VSL po ekvilibraci jsou zobrazeny v následující tabulce (č. 5). Všechny tyto hodnoty jsou udávány v um/s. Co se VAP týká, tak zde byly mezi výsledky významné statistické rozdíly. Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo v ředidle č. 2 (134,65±2,771 um/s) a toto bylo signifikantní v porovnání s ředidly č. 1, 3, 4, 6 a 7. Z toho i současně vyplývá, že ředidlo č. 5 mělo vysokou rychlost dráhy (124,56±2,771 um/s) a vykazovalo průkazné rozdíly oproti ředidlům č. 1, 3, 6 a 7. Nejnižší rychlost byla naproti tomu zaznamenána v ředidle č. 3 (92,43±2,77 um/s), které se signifikantně lišilo s ředidly č. 1, 2, 4, 5 a 7. U VCL je situace obdobná, kdy nejvyšší hodnota byla naměřena u ředidla č. 5 (150,55±3,665 um/s) a u ředidla č. 2 (148,57±3,665 um/s). Průkazné rozdíly však byly dokumentovány pouze s ředidlem č. 3. Shodně nejhorší křivočarou rychlost mělo ředidlo č. 3 (127,61±3,665 um/s) a to bylo průkazné s č. 2, 4 a 5. Hodnota VSL byla též s četnými statistickými rozdíly, nejvyšší přímočará rychlost byla u ředidla č. 2 (125,01±2,876 um/s). Zde byl průkazný rozdíl v porovnání se všemi ostatními ředidly. Taktéž nejhorší rychlost byla u ředidla č. 3 (67,28±2,876 um/s), což bylo statisticky významné se všemi ředidly (kromě č. 6).

U obou hodnot LIN a STR bylo dosaženo nejvyšších čísel v ředidle č. 2 (90,34±1,935 %; 81,98±1,795%) a současně tyto hodnoty vykazovaly signifikantní rozdíly oproti ostatním ředidlům. Nejnižší hodnoty byly shodně v ředidle č. 6 (65,01±1,935 %; 48,94±1,795 %) a i zde byly shodně signifikantní rozdíly s ostatními ředidly (kromě č. 3) (Tabulka č. 5).

ŘED	VAP (um/s)	VCL (um/s)	VSL (um/s)	LIN (%)	STR(%)
<b>1</b> (n=26)	105±2,771 <sup>a</sup>	138,12±3,665 <sup>a</sup> <sub>b</sub>	85,56±2,876 <sup>af</sup>	79,13±1,935 <sup>a</sup> <sub>d</sub>	61,32±1,795 <sup>a</sup> <sub>d</sub>
<b>2</b> (n=26)	134,65±2,771 <sup>b</sup>	148,57±3,665 <sup>a</sup>	125,01±2,876 <sub>g</sub>	90,34±1,935 <sup>b</sup>	81,98±1,795 <sup>c</sup>
<b>3</b> (n=26)	92,43±2,771 <sup>c</sup>	127,61±3,665 <sup>b</sup>	67,28±2,876 <sup>b</sup>	72,4±1,935 <sup>ac</sup>	55,37±1,795 <sup>d</sup> <sub>e</sub>
<b>4</b> (n=26)	120,88±2,771 <sup>de</sup> <sub>g</sub>	147,63±3,665 <sup>a</sup>	100,8±2,876 <sup>ce</sup>	81,03±1,935 <sup>d</sup> <sub>e</sub>	66,67±1,795 <sup>a</sup>
<b>5</b> (n=26)	124,56±2,771 <sup>bc</sup>	150,55±3,665 <sup>a</sup>	105,08±2,876 <sub>c</sub>	81,78±1,935 <sup>d</sup> <sub>e</sub>	67,33±1,795 <sup>a</sup>
<b>6</b> (n=26)	101,79±2,771 <sup>ac</sup>	140,98±3,665 <sup>a</sup> <sub>b</sub>	73,83±2,876 <sup>ab</sup>	65,01±1,935 <sup>c</sup>	48,94±1,795 <sup>b</sup> <sub>e</sub>
<b>7</b> (n=22)	109,43±3,055 <sup>ag</sup>	134,6±4,039 <sup>ab</sup>	90,69±3,17 <sup>fe</sup>	80,26±2,133 <sup>a</sup> <sub>e</sub>	65,81±1,978 <sup>a</sup>

Tabulka 5 Kinematické hodnoty CASA pro jednotlivá ředidla po ekvilibraci; ESM ± SE

**Zkratky:** VAP – průměrná rychlost dráhy (um/s); VCL – křivočará rychlost (um/s); VSL – přímočará rychlost (um/s); LIN – linearita křivočaré dráhy (%); STR – přímočarost průměrné dráhy (%); ŘED – ředidlo; 1 – AndroMed; 2 – OviXcell; 3 – OptiXcell; 4 – AndroMed + OviXcell + OptiXcell (1:1:1); 5 – AndroMed + OviXcell (1:1); 6 – AndroMed + OptiXcell

(1:1); 7 – OviXcell a OptiXcell (1:1); a-f = odlišná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly jsou mezi jednotlivými ředidly

Po rozmrazení byly výsledky mírně odlišné ve srovnání s výsledky zjišťované po ekvilibraci (tabulka č. 6). Obecně bylo dosaženo jen mála průkazných rozdílů napříč jednotlivými variantami ředidel. Nejnižší hodnoty VAP, VCL a VSL byly shodně pozorovány v AndroMedu ( $51,64 \pm 6,323$  um/s;  $78,76 \pm 7,307$  um/s a  $35,41 \pm 5,669$  um/s). Průkazné rozdíly byly detekovány pouze v porovnání s ředidlem č. 7. V ředidle č. 7 totiž bylo dosaženo vysokých hodnot VAP, VCL a VSL ( $86,63 \pm 6,774$  um/s;  $111,6 \pm 8,114$  um/s;  $64,75 \pm 6,088$  um/s). Výsledky VAP a VSL byly současně vysoké u ředidla č. 2 ( $84,92 \pm 7,006$  um/s a  $79,55 \pm 7,169$  um/s), což bylo doloženo statistickou signifikancí. U hodnoty LIN byl sledován pouze jeden statisticky významný rozdíl a to mezi ředidlem č. 2 a 4 (rozdíl  $69,56 \pm 4,993$  % a  $45,3 \pm 4,532$  %). Ostatní hodnoty LIN byly v rámci statistické analýzy srovnatelné ( $52,25 \pm 4,547$  -  $63,74 \pm 4,983$  %). Podobně u STR byly průkazné rozdíly mezi ředidlem č. 2 a ředidly č. 1, 3, 4, 5, 6. Podrobněji jsou výsledky zapsány v následující tabulce č. 6.

ŘED	VAP (um/s)	VCL (um/s)	VSL (um/s)	LIN (%)	STR (%)
1 (n=26)	$51,64 \pm 6,323^a$	$78,76 \pm 7,307^a$	$35,41 \pm 5,669^a$	$59,65 \pm 4,515^{ab}$	$38,29 \pm 4,026^{ac}$
2 (n=26)	$84,92 \pm 7,006^b$	$97,85 \pm 7,34^{ab}$	$79,55 \pm 7,169^b$	$69,56 \pm 4,993^a$	$64,45 \pm 5,005^b$
3 (n=26)	$75,68 \pm 7,233^a$ b	$108,27 \pm 7,642^{ab}$	$48,62 \pm 6,899^{ab}$	$57,67 \pm 4,67^{ab}$	$41,07 \pm 4,312^{ac}$
4 (n=26)	$66,24 \pm 6,179^a$ b	$101,76 \pm 7,322^{ab}$	$43,38 \pm 5,573^{ac}$	$45,3 \pm 4,532^b$	$31,64 \pm 3,994^c$
5 (n=26)	$66 \pm 6,321^{ab}$	$106,46 \pm 7,388^{ab}$	$45,28 \pm 5,717^{ac}$	$52,25 \pm 4,547^{ab}$	$36,89 \pm 4,005^{ac}$
6 (n=26)	$72,21 \pm 6,498^a$ b	$106,89 \pm 7,28^{ab}$	$47,63 \pm 6,347^{ab}$	$53,34 \pm 5,194^{ab}$	$33,19 \pm 4,861^{ac}$
7 (n=22)	$86,63 \pm 6,774^b$	$111,6 \pm 8,114^b$	$64,75 \pm 6,088^{bc}$	$63,74 \pm 4,983^{ab}$	$50,56 \pm 4,39^{ab}$

Tabulka 6 Hodnoty CASA pro jednotlivá ředidla po rozmrazení;  $ESM \pm SE$

**Zkratky:** VAP – průměrná rychlost dráhy (um/s); VCL – křivočará rychlost (um/s); VSL – přímočará rychlost (um/s); LIN – linearita křivočaré dráhy (%); STR – přímočarost průměrné dráhy (%); ŘED – ředidlo; 1 – AndroMed; 2 – OviXcell; 3 – OptiXcell; 4 – AndroMed + OviXcell + OptiXcell (1:1:1); 5 – AndroMed + OviXcell (1:1); 6 – AndroMed + OptiXcell (1:1); 7 – OviXcell a OptiXcell (1:1); a-c = odlišná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly jsou mezi jednotlivými ředidly

## 6.2 Výsledky průtokový cytometr

### 6.2.1 Základní charakteristiky

Tabulka č. 7 nám ukazuje základní statistické charakteristiky pro průtokovou cytometrii. Jako životaschopné spermie jsme brali spermie bez poškozené plazmatické membrány, bez poškozeného akrozomu a s mitochondriální aktivitou. Po ekvilibraci jsme hodnotili 137 vzorků pro každou námi zvolenou proměnnou (životaschopné spermie; s poškozenou plazmatickou membránou; s poškozenou plazmatickou membránou a poškozeným akrozomem; s poškozeným akrozomem; buňky s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem, intenzita signálu MitoTrackeru). V tabulce je možné si všimnout, že aritmetický průměr viability byl po ekvilibraci  $48,50 \pm 19,336$  %, ale po rozmrazení došlo k výraznému poklesu na  $11,22 \pm 8,176$  %, což představuje 4× méně životaschopných spermií. U hodnot značící poškození je trend opačný, kdy se zvyšovalo procento poškození, např. u PM z  $22,32 \pm 8,837$  % na  $40,34 \pm 12,789$  atd. (viz tabulka č. 7)

	Proměnná	Četnost	Ar. průměr (%)	Směrodatná odchylka (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
Po ekvilibraci	VIA	137	48,50	19,336	6,57	73,96
	PM	137	22,32	8,837	9,42	47,83
	PMA	137	28,91	12,08	14,56	58,99
	PA	137	0,25	0,186	0,03	0,97
	MMP	137	44,77	20,405	3,5	73,19
	ISM	137	5,83	2,55	0,84	14,26
Po rozmrazení	VIA	144	11,22	8,176	0,81	36,23
	PM	144	40,34	12,788	13,55	62,15
	PMA	144	47,95	14,976	24,15	83,95
	PA	144	0,48	0,398	0	1,5
	MMP	144	8,04	8,042	0,08	33,35
	ISM	144	4,01	1,943	0,66	9,12

Tabulka 7 Základní statistické charakteristiky - průtokový cytometr

**Zkratky:** Ar. průměr – aritmetický průměr; VIA – životaschopné spermie; PM – s poškozenou plazmatickou membránou; PMA – s poškozenou plazmatickou membránou a poškozeným akrozomem; PA – s poškozeným akrozomem; MMP – buňky s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem, IMT – intenzita signálu MitoTrackeru;

### 6.2.2 Popis modelu

Použitý model byl statisticky významný pro faktory  $P < 0,05$ . Statistická průkaznost jednotlivých faktorů v modelové rovnici je uvedena v tabulce č. 8 a 9. Z tabulek vyplývá, že všechny faktory po ekvilibraci byly statisticky významné.

Efekt	VIA	PM	PMA	PA	MMP	ISM
<b>DEN * BER</b>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
<b>ŘED</b>	<.0001	<.0001	<.0001	0.1061	<.0001	<.0001

Tabulka 8 Vliv fixních faktorů po ekvilibraci pro hodnoty průtokového cytometru

**Zkratky:** VIA – životaschopné spermie; PM – s poškozenou plazmatickou membránou; PMA – s poškozenou plazmatickou membránou a poškozeným akrozomem; PA – s poškozeným akrozomem; MMP – buňky s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem, IMT – intenzita signálu MitoTrackeru; ŘED – ředidlo; DEN \* BER = znáhodněný sdružený efekt dne a pleménika

V použitém statistickém modelu pro zhodnocení cytometrických údajů po rozmrazení byl statisticky průkazný sdružený efekt dne a berana a fixní efekt ředidla u všech sledovaných znaků. Hodnoty dílčích závisle proměnných po ekvilibraci zohledněných formou kovariát nebyly průkazné pro námi zvolené statistické modely, kromě jediného faktoru, a to na spermie s poškozenou plazmatickou membránou a poškozeným akrozomem. Vše je detailně uvedeno v tabulce č. 9

Efekt	VIA	PM	PMA	PA	MMP	ISM
<b>DEN * BER</b>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
<b>ŘED</b>	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
<b>b<sub>1-7</sub> × EQ</b>	0.6411	0.8143	0.0123	0.5581	0.3298	0.8406

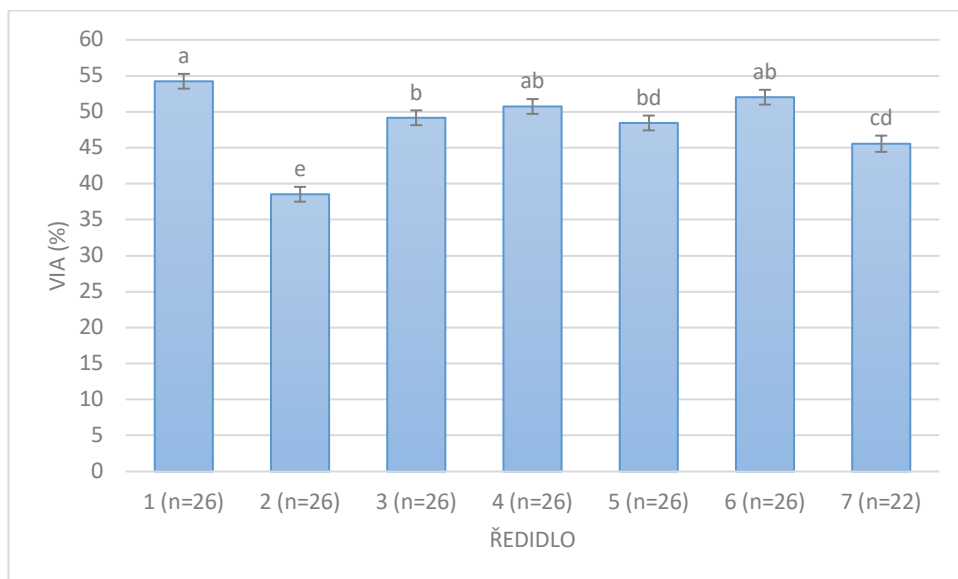
Tabulka 9 Vliv fixních faktorů po rozmrazení pro hodnoty průtokového cytometru

**Zkratky:** VIA – životaschopné spermie; PM – s poškozenou plazmatickou membránou; PMA – s poškozenou plazmatickou membránou a poškozeným akrozomem; PA – s poškozeným akrozomem; MMP – buňky s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem, ISM – intenzita signálu MitoTrackeru; ŘED – ředidlo; DEN \* BER = znáhodněný sdružený efekt dne a pleménika; b<sub>1-7</sub> × EQ = hodnoty pro dílčí závisle proměnné po ekvilibraci formou jako kovariáty (celková viabilita buněk, podíl buněk s poškozenou plazmatickou membránou, podíl buněk s poškozenou plazmatickou membránou a poškozeným akrozomem, podíl buněk s poškozením akrozomu, spermie s mitochondriálním membránovým potenciálem a intenzita signálu MitoTrackeru) po rozmrazení

## 6.2.3 Vliv ředidla

### 6.2.3.1 Procentuální zastoupení životaschopných spermií po ekvilibraci a po rozmrazení

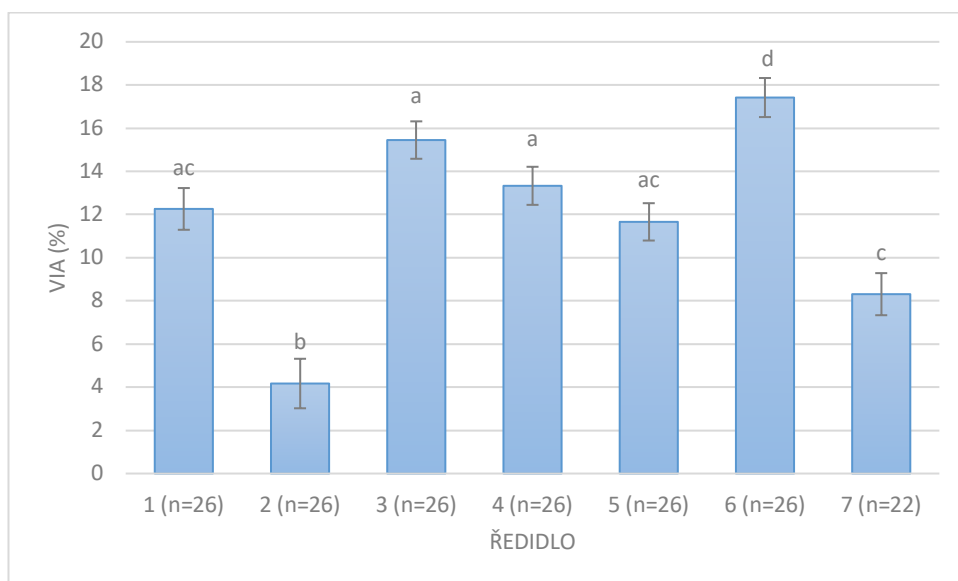
Když se podíváme na graf č. 5, můžeme si všimnout velkého množství statisticky významných rozdílů po ekvilibraci vzorků. Např. ředidlo č. 2 (OviXcell) se významně liší se všemi porovnávanými ředidly a potvrzuje tím obsah nejnižšího procenta životaschopných spermií (38,53±1,029 %). Naproti tomu se i významně liší ředidlo č. 1 s č. 2, 3, 5 a 7, zároveň vede nad nimi svým obsahem životaschopných spermií (54,23±1,029 %). Můžeme také říci, že ředidla č. 4 (50,73±1,029 %) a č. 6 (52,02±1,029 %) dopadly lépe jak průměrně, protože se statisticky nelišily od ředidla č. 1 a zároveň byl prokázán rozdíl s ředidlem č. 2 a 7.



Graf 5 Procento životaschopných spermií po ekvilibraci

**Zkratky:** VIA – životaschopné spermie (%); 1 – AndroMed; 2 – OviXcell; 3 – OptiXcell; 4 – AndroMed + OviXcell + OptiXcell (1:1:1); 5 – AndroMed + OviXcell (1:1); 6 – AndroMed + OptiXcell (1:1); 7 – OviXcell a OptiXcell (1:1); a-e = odlišná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly jsou mezi jednotlivými ředidly

Z grafu č. 6 vyplývá, že nejhorší viabilitu po rozmrazení vykazovaly spermie ředěné v OviXcellu ( $4,17 \pm 1,147$  %), stejně jako tomu bylo u ekvilibrovaných vzorků. V tomto ředidle byly shledány signifikantní rozdíly v porovnání se všemi ředidly kromě č. 7, které mělo též malý obsah viabilních buněk ( $8,31 \pm 0,98$  %). Důležitým výsledkem je, že signifikantně byl prokázán nejlepší výsledek u ředidla č. 6. Tento výsledek je dokumentován průkaznými rozdíly, a to se všemi ostatními hodnocenými ředidly.



Graf 6 Procento životaschopných spermií po rozmrazení

**Zkratky:** VIA – životaschopné spermie (%); 1 – AndroMed; 2 – OviXcell; 3 – OptiXcell; 4 – AndroMed + OviXcell + OptiXcell (1:1:1); 5 – AndroMed + OviXcell (1:1); 6 – AndroMed + OptiXcell (1:1); 7 – OviXcell a OptiXcell (1:1); a-d = odlišná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly jsou mezi jednotlivými ředidly

6.2.3.2 Podíl buněk s poškozenou plazmatickou membránou, podíl buněk s poškozenou plazmatickou membránou a poškozeným akrozomem, podíl buněk s poškozením akrozomu, buňky s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem, intenzita signálu MitoTrackeru po ekvilibraci a po rozmrazení

Průměrné hodnoty naměřené po ekvilibraci jsou uvedené v tabulce č. 10. Největší procento spermií s poškozenou plazmatickou membránou a procento buněk s poškozenou plazmatickou membránou a poškozeným akrozomem se nacházelo v ředidle č. 2 ( $28,56 \pm 0,832\%$  a  $32,67 \pm 0,743\%$ ). Statisticky významný rozdíl byl pozorován mezi tímto ředidlem a všemi ostatními ředidly. V případě buněk s poškozenou plazmatickou membránou a poškozeným akrozomem byl průkazný rozdíl v porovnání s ostatními ředidly kromě ředidla č. 7, protože to obsahovalo podobně  $32,55 \pm 0,815\%$  poškozených spermií. Ostatní hodnoty PM a PA nevykazovaly statisticky významné rozdíly. Můžeme tedy říci, že se ředidla statisticky nelišila a procento poškození bylo podobné. Podrobnější popis je uveden v tabulce č. 10.

Procento buněk s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem bylo nejvyšší v ředidle č. 6 ( $49,06 \pm 1,443\%$ ) a č. 4 ( $48,32 \pm 1,443\%$ ). Tyto ředidla nevykazovala signifikantní rozdíl jen v porovnání mezi sebou. Nejméně buněk MMP pak bylo v ředidle č. 2 ( $37,12 \pm 1,443\%$ ), kde byl i pozorován průkazný rozdíl s ostatními ředidly (mimo č. 1).

Intenzita signálu MitoTrackeru byla nejvyšší u ředidla č. 2 ( $8,41 \pm 0,251$ ), což bylo výrazně více než u ostatních ředidel a je zde signifikantní rozdíl se všemi ředidly. Nejhorší výsledek byl u ředidla č. 1 ( $4,49 \pm 0,251$ ), zde nebyl průkazný rozdíl akorát s ředidly č. 3 a 6.

ŘED	PM	PMA	PA	MMP	ISM
1 (n=26)	$19,8 \pm 0,832^a$	$25,66 \pm 0,743^a$	$0,31 \pm 0,024^a$	$41,73 \pm 1,443^{ac}$	$4,49 \pm 0,251^a$
2 (n=26)	$28,56 \pm 0,832^b$	$32,67 \pm 0,743^c$	$0,23 \pm 0,024^a$	$37,12 \pm 1,443^c$	$8,41 \pm 0,251^c$
3 (n=26)	$22,41 \pm 0,832^a$	$28,21 \pm 0,743^{ad}$	$0,2 \pm 0,024^a$	$47,41 \pm 1,443^a$	$5,15 \pm 0,251^{ac}$
4 (n=26)	$20,89 \pm 0,832^a$	$28,13 \pm 0,743^{ab}$	$0,25 \pm 0,024^a$	$48,32 \pm 1,443^b$	$6,12 \pm 0,251^{bcd}$
5 (n=26)	$22,37 \pm 0,832^a$	$28,91 \pm 0,743^{bd}$	$0,27 \pm 0,024^a$	$45,80 \pm 1,443^a$	$6,03 \pm 0,251^{bcd}$
6 (n=26)	$20,39 \pm 0,832^a$	$27,31 \pm 0,743^{ab}$	$0,27 \pm 0,024^a$	$49,06 \pm 1,443^b$	$5,49 \pm 0,251^{ad}$
7 (n=22)	$21,64 \pm 0,912^a$	$32,55 \pm 0,815^c$	$0,25 \pm 0,026^a$	$44,70 \pm 1,571^a$	$6,98 \pm 0,274^b$

Tabulka 10 Hodnoty z průtokového cytometru pro jednotlivá ředidla po ekvilibraci; ESM  $\pm$  SE

**Zkratky:** PM – s poškozenou plazmatickou membránou; PMA – s poškozenou plazmatickou membránou a poškozeným akrozomem; PA – s poškozeným akrozomem; MMP – buňky s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem, ISM – intenzita signálu MitoTrackeru; ŘED – ředidlo; 1 – AndroMed; 2 – OviXcell; 3 – OptiXcell; 4 – AndroMed + OviXcell + OptiXcell (1:1:1); 5 – AndroMed + OviXcell (1:1); 6 – AndroMed + OptiXcell

(1:1); 7 – OviXcell a OptiXcell (1:1); a-e = odlišná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly jsou mezi jednotlivými ředidly

Průměrné hodnoty naměřené po rozmrazení jsou uvedené v tabulce č. 11. Největší procento spermií s poškozenou plazmatickou membránou se nacházelo v ředidle č. 1 ( $51,97 \pm 0,977$  %), což je přesně opačná situace než po ekvilibraci. Statisticky významný rozdíl byl pozorován mezi tímto ředidlem a všemi ostatními ředidly. Jako druhé nejhorší bylo ředidlo č. 5 ( $47,61 \pm 0,943$  %), kde byl zjištěn statistický rozdíl s porovnávanými ředidly, kromě ředidla č. 2, protože obsah PM byl téměř stejný, a to  $47,14 \pm 1,136$  %. Současně toto ředidlo mělo nejvíce spermií s poškozením akrozomu ( $0,72 \pm 0,054$  %), stejně jako ředidlo č. 1 ( $0,61 \pm 0,055$  %), 5 ( $0,62 \pm 0,054$  %) a 4 ( $0,55 \pm 0,054$  %). Tyto trendy byly doprovázeny signifikantními rozdíly. Podíl buněk s poškozenou plazmatickou membránou a poškozeným akrozomem byl nejvyšší v ředidle č. 7, a to  $58,38 \pm 1,294$  %, kde byl i průkazný rozdíl v porovnání s ostatními ředidly kromě ředidla č. 3. Nejlepších výsledků v tomto ukazateli vykazovala ředidla č. 1 ( $36,51 \pm 1,177$  %) a 5 ( $40,15 \pm 1,095$  %), zde byl pozorován rozdíl oproti ředidlům č. 2, 3, 4, 6 a 7.

Procento buněk s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem bylo nejvyšší v ředidle č. 6 ( $13,54 \pm 0,861$  %), nejméně pak v ředidle č. 2 ( $2,36 \pm 0,922$  %), kde byl i pozorován průkazný rozdíl s ostatními ředidly (mimo č. 1). Podrobnější výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 10

Intenzita signálu MitoTrackeru byla nejvyšší u ředidla č. 7 ( $6,02 \pm 0,266$ ), což bylo dokumentováno signifikantními rozdíly ve srovnání se všemi ostatními hodnocenými ředidly. Nejhorší výsledek byl naproti tomu zaznamenán u ředidla č. 1 ( $2,03 \pm 0,252$ ). Také toto tvrzení lze dokumentovat signifikantními rozdíly se všemi ostatními ředidly.

ŘED	PM	PMA	PA	MMP	ISM
1 (n=26)	$51,97 \pm 0,977^a$	$36,51 \pm 1,177^a$	$0,61 \pm 0,055^a$	$5,14 \pm 0,846^{ac}$	$2,03 \pm 0,252^a$
2 (n=26)	$47,14 \pm 1,136^b$	$46,18 \pm 1,203^b$	$0,72 \pm 0,054^a$	$2,36 \pm 0,922^c$	$4,34 \pm 0,309^b$
3 (n=26)	$34,34 \pm 0,943^c$	$53,28 \pm 1,099^{cde}$	$0,17 \pm 0,055^b$	$10,67 \pm 0,843^{bde}$	$4,45 \pm 0,234^b$
4 (n=26)	$35,34 \pm 0,954^c$	$51,14 \pm 1,101^{bd}$	$0,55 \pm 0,054^{ac}$	$10,38 \pm 0,852^{be}$	$4,04 \pm 0,228^b$
5 (n=26)	$47,61 \pm 0,943^b$	$40,15 \pm 1,095^a$	$0,62 \pm 0,054^a$	$8,54 \pm 0,833^{abd}$	$3,98 \pm 0,228^b$
6 (n=26)	$33,05 \pm 0,963^c$	$49,86 \pm 1,116^{bd}$	$0,36 \pm 0,054^{bc}$	$13,54 \pm 0,861^e$	$3,68 \pm 0,229^b$
7 (n=22)	$31,69 \pm 1,036^c$	$58,38 \pm 1,294^e$	$0,3 \pm 0,059^b$	$7,27 \pm 0,912^{abd}$	$6,02 \pm 0,266^c$

Tabulka 11 Průměrné procentuální zastoupení spermií po rozmrazení;  $ESM \pm SE$

**Zkratky:** PM – s poškozenou plazmatickou membránou; PMA – s poškozenou plazmatickou membránou a poškozeným akrozomem; PA – s poškozeným akrozomem; MMP – buňky s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem, ISM – intenzita signálu MitoTrackeru; ŘED – ředidlo; 1 – AndroMed; 2 – OviXcell; 3 – OptiXcell; 4 – AndroMed + OviXcell + OptiXcell (1:1:1); 5 – AndroMed + OviXcell (1:1); 6 – AndroMed + OptiXcell (1:1); 7 – OviXcell a OptiXcell (1:1); a-e = odlišná písmena ve sloupcích potvrzují statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ); průkazné rozdíly jsou mezi jednotlivými ředidly



## 7 Diskuze

Proces kryokonzervace je jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují kvalitu zmrazeného beraního spermatu (Matshaba et al., 2014). Vede k poškození způsobeným především chladovým šokem, tvorbou intracelulárních ledových krystalů, oxidačním stresem, roztokovým efektem a reorganizací lipidů a proteinů v membránách (Castro et al., 2016). Přesněji řečeno, ejakulát berana se ukázal jako obtížnější ke kryokonzervaci, než sperma jiných hospodářských zvířat (Abdelhakeam et al., 1991).

Pro kryokonzervaci semene berana byla vyvinuta různá ředidla a kryoprotektivní látky (Nur et al., 2010). Ředidla spermatu jsou obecně obohaceny vaječným žloutkem. Vaječný žloutek je hlavní složkou ředidel pro skladování a kryokonzervaci spermatu většiny druhů savců včetně býků, beranů, koz, prasat a dokonce i lidí (Forouzanfar et al., 2010). Hlavní nevýhodou použití materiálu živočišného původu ve struktuře kryokonzervačního média je hygienické riziko, přenos nemocí a mikrobiální kontaminace, která následně umožňuje produkci endotoxinů. Dále bylo zjištěno, že vaječný žloutek je antigenní hmota a vyvolává tvorbu protilátek v systémové cirkulaci a reprodukčním traktu. Vědci zkoumali, jak najít náhradu za hlavní složku ředidel spermatu. Sójový lecitin rostlinného původu by mohl být lepší alternativou. Účinnou složkou vaječného žloutku je lipoproteinová frakce s nízkou hustotou, (jako je lecitin), která chrání membrány před porušením během kryokonzervace. Fosfatidylcholin, lipoproteiny o nízké hustotě vaječného žloutku, jsou velmi významné pro ochranu membrán spermií v procesu zmrazování a rozmrazování. Podobná složka, jako je sójový lecitin, může být náhradou za vaječný žloutek v kryokonzervačních ředidlech spermatu (Toker et al., 2016). Proto námi zvolená ředidla byla na bázi sójového lecitinu a OptiXcell je bezbílkovinné ředidlo vyvinuté na bázi vaječného žloutku.

(Khatun et al., 2021) se ve své studii zabývali nahrazením vaječného žloutku alternativním sójovým lecitem získaným z rostlin. Cílem bylo zhodnotit vliv ředidel na bázi vaječného žloutku a sójového lecitinu na kvalitu kryokonzervovaného semene beranů. Ve srovnání mezi dvěma ředidly přípravek OviXcell vykazoval lepší kvalitu spermií jak ve fázi před zmrazením (motilita spermií), tak ve fázi po rozmrazení. Ředidlo spermatu AndroMed® na bázi sójového lecitinu (Minitübe GmbH) bylo původně vyvinuté pro kryokonzervaci spermií skotu. Toto komerčně dostupné ředidlo spermatu obsahuje vysoký podíl fosfolipidů podobných vaječnému žloutku (hlavně fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin a fosfatidylinositol), jak uvádí (Fukui et al., 2008). Obecně platí, že sójový lecitin se skládá nejen ze směsi fosfolipidů, ale také triglyceridů, mastných kyselin, sterolů, sterolglykosidů, aesterů, tokoferolů a sacharidů (Scholfield, 1981) Sojový lecitin byl nedávno rozpoznán jako chemicky definovaná alternativa vaječného žloutku bez patogenů pro úspěšné skladování beraního semene při nízké teplotě (de Paz et al., 2010; Fukui et al., 2008; Khalifa & Lymberopoulos, 2013) Navzdory zjištěným úspěchům v aplikaci komerčních ředidel spermatu na bázi sójového lecitinu pro kryokonzervaci spermií berana (ve smyslu in vitro a in vivo), někteří vědci zaznamenali výrazné snížení tvorby blastocyst in vitro, snížení oplození a embryonální ztráty po zpracování spermií berana v komerčním ředidle na bázi sójového lecitinu (Ptáček et al., 2019).

Další přístup k náhradě LDL z vaječného žloutku a lecitinu je použití definovaných lipidů, jako jsou liposomy. Ochranné vlastnosti liposomů jsou přisuzovány přenosu lipidů a cholesterolu mezi lipozomální a buněčnou membránou. Optixcel® je ředidlo na bázi liposomů

určený pro konzervaci býčího spermatu. Výsledky (Moula et al., 2018) neprokázaly žádnou výhodu přípravku Optixcel® oproti ostatním ředidlům testovaných v zachování pohyblivosti spermií beranů. Motilita byla považována za jednu z nejdůležitějších charakteristik spojených s oplodňovací schopností spermií. CASA poskytuje objektivní hodnocení pohyblivosti spermií. Tento přístup byl použit v mnoha studiích k hodnocení účinku několika ředidel (Duragen®, Andromed®, Triladyl®, Optixcel®, INRA96®, a Ovipro®) na celkovou motilitu, progresivní motilitu, VCL, VSL a VAP. Celkové parametry CASA byly u obou plemen beranů významně ovlivněny typem použitého ředidla, a to bez ohledu na teplotu skladování (5 nebo 15 °C) (Moula et al., 2018). V této diplomové práci byl pozorován rozdíl v celkové motilitě spermií s různými použitými ředidly. Rozdíly byly pozorovány, když se vzala v úvahu interakce mezi nimi. Nejvyšší celková motilita spermií byla pozorována v ředidle č. 6 (AndroMed + OptiXcell) (57,6±2,111 %) po ekvilibraci, kde byl sledován rozdíl mezi ředidlem č. 2, 3, 5 a 7. Ředidlo č. 1 a č. 4 dosahovaly také dobrých výsledků (54,05±2,111 a 51,06±2,111 %). Po rozmrazení nejvyšších hodnot celkové motility bylo taktéž dosaženo v ředidle č. 6 (AndroMed + OptiXcell) a č. 5 (AndroMed + OviXcell). Jejich hodnoty 16,07±1,099 % a 14,66±1,099 % se statisticky významně lišily od ředidel č. 1 (AndroMed) a 2 (OviXcell), kde byly hodnoty výrazně nižší (8,86±1,122 % a 7,96±1,168 %). Z toho můžeme usuzovat, že samotné ředidlo AndroMed nemusí být zcela optimální pro proces kryokonzervace valašských beranů. S ohledem na to, že motilita spermií klesla během procesu z 54,05±2,111 % na 8,86±1,122 %. Kulaksiz et al. (2012) zaznamenali lepší uchování spermií v ředidle na bázi mléka a vajec než v ředidle na bázi sojových bobů (přípravek Andromed®). Snížení motility v přípravku Andromed® je pravděpodobně způsobeno vysokou viskozitou sójového lecitinu.

Ve studii Matshaba et al. (2014) bylo zjištěno, že procento progresivní motility spermií bylo sníženo po procesu zmrazování a rozmrazování, bez ohledu na typ použitého ředidla. Ředidlo BioXcell® a OviXcell® se ukázaly jako lepší pro účely kryokonzervace semene. V porovnání s našimi výsledky je shodně dokázáno, že progresivní motilita se po kryokonzervaci snížila, např. u ředidla č. 5 z 16,07±1,099 % na 6,04±0,844 % a u ředidla č. 6 z 31,28±1,882 % na 7,66±0,842 %. Odlišně však OviXcell v našich výsledcích dosahoval nejhorších hodnot, kdy progresivní motilita klesla z 32,4224±1,882 % po ekvilibraci na 4,34±0,841 % po rozmrazení.

Průtoková cytometrie byla úspěšná jako nástroj pro studium několika fyziologických vlastností spermií. Ve studii (del Olmo et al., 2013) bylo zjištěno, že existuje přímý vztah mezi parametry motility a plodností, a mitochondrie byly považovány za základní organelu ve fyziologii spermií. Mitochondrie mají také klíčovou roli v různých buněčných funkcích jako je modulace redoxní rovnováhy, osmotická regulace a homeostáza  $Ca^{++}$  (F. J. Peňa et al., 2009). (Hammadeh et al., 2001) uvádějí, že poškození DNA spermií bylo spojeno s neplodností, embryonální ztrátou v raném stádiu a genetickými abnormalitami u potomků. Příčinou by mohl být nedostatek protaminu, který souvisí s poškozením DNA. Povaha a stupeň interakce mezi protaminou prostřednictvím disulfidických vazeb je zásadní pro udržení stavu chromatinu v kondenzovaném stavu. V oplodněném vajíčku dochází k opačnému procesu dekondezace, protože se štěpí protaminové disulfidové vazby a zprostředkovávají tvorbu pronuklea. Pro pozitivní výsledek reprodukce je tedy nezbytná správná kondenzace a dekondezace DNA spermií (Kasimanickam et al., 2007). (Khalifa & Lymberopoulos, 2013) studovali vliv ředidla spermatu na strukturu chromatinu a zjišťovali korelaci mezi integritou chromatinu a plodností

semene. Ani ředidlo ani doba skladování neměly žádný vliv na výskyt dekonduvaného chromatinu. Na rozdíl od ředidla OviXcell® bylo detekováno zhoršení motility spermií ( $P < 0,01$ ) a stability chromatinu ( $P < 0,005$ ) po 48 hodinách skladování v ředidle milk-egg yolk. Z této studie vyplývá, že OviXcell® je lepší než ředidlo z mléka a vaječného žloutku v zachování stability a motility chromatinu. Rozdíly v použitém ředidle, míře ředění spermatu, plemeni nebo věku beranů mohou být zodpovědné za nesoulad ve výsledcích. V této diplomové práci však nejhorší viabilitu po rozmrazení vykazovaly spermie ředěné právě v OviXcellu ( $4,17 \pm 1,147\%$ ), stejně jako tomu bylo u ekvilibrovaných vzorků ( $38,53 \pm 1,029\%$ ). Ve studii (Ansari et al., 2016) byla vyslovena hypotéza, že OptiXcell bude účinný při zachování kvality po rozmrazení a in vivo plodnosti srovnávaného spermatu. V této studii se míra plodnosti zlepšila, když byly inseminace prováděny pomocí spermatu kryokonzervovaného v ředidle OptiXcell ve srovnání s rutinně používaným ředidlem Tris – kyselina citronová – vaječný žloutek v polních podmínkách. Podle dostupných informací to bylo poprvé, co byla hodnocena míra plodnosti v OptiXcellu in vivo napříč druhy. Z našich výsledků můžeme konstatovat, že hodnoty životaschopnosti spermií v OptiXcellu byly průměrné, kdy po rozmrazení bylo zjištěno  $15,45 \pm 0,867\%$  viabilních buněk. V porovnání s OviXcellem se však jedná o značné zlepšení. Kromě toho má chemicky definovaný OptiXcell výhody v tom, že neobsahuje živočišné bílkoviny, je sterilizovaný, čirý a připraven k použití. (Ansari et al., 2016) dospěli k závěru, že OptiXcell obsahující lipozomy je účinnější pro zachování kvality po rozmrazení a vede k vyšší plodnosti.

(Khalifa et al., 2013) provedli výzkum, kde vzali dva po sobě jdoucí polní experimenty plodnosti v průběhu 4 měsíců a jejich cílem bylo vyhodnotit využití dvou komerčních ředidel na bázi sójového lecitinu (AndroMed a BioXcell), hodnocena byla míra březosti pro chlazený a zmrazený (následně rozmrazený) ejakulát berana. Zjistili, že sperma skladované v BioXcellu mělo vyšší míru plodnosti než sperma skladované v AndroMedu. BioXcell a AndroMed jsou stejně účinné při zachování fertilizačního potenciálu zralého semene berana. Studie (Pytlík et al., 2022) hodnotila některé parametry spermií, které určují kvalitu a v konečném důsledku i fertilizační kapacitu kryokonzervovaných spermií, kdy se shodně předpokládalo, že pouze intaktní spermie mohou proniknout přes zónu pellucidu a oplodnit oocyt. Důležité ukazatele, včetně životaschopnosti, stavu mitochondriální aktivity, integrity plazmatické membrány a integrity akrozomů, byly hodnoceny u spermatu ve třech ředidlech: AndroMed®, BullXcell® a Optidyl®. Výsledkem bylo, že ředidla na bázi vaječného žloutku poskytují větší ochranu spermii (menší poškození membrány), než při použití ředidel na bázi lecitinu. Námi zvolený OptiXcell však toto tvrzení příliš nepotvrzoval, vrámci všech námi hodnocených ukazatelů vykazoval velice průměrné až podprůměrné výsledky.

Dle (Varela et al., 2020) spermie s nižším MMP vykazují vyšší úroveň kryokapacity a existuje významná souvislost mezi mitochondriální aktivitou, stabilitou a integritou plazmatické membrány. Proto mitochondriální integrita, vyjádřená v parametru MMP, je kriticky důležitá pro funkci buňky a životaschopnost a je také zodpovědná za správný metabolismus a motilitu spermií. Ve studii (Pytlík et al., 2022) měl vaječný žloutek vyšší procento spermií s MMP než spermie ředěné v ředidlech na bázi sójového lecitinu. V předkládané diplomové práci bylo procento buněk s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem nejvyšší v ředidle č. 6 ( $13,54 \pm 0,861\%$  po rozmrazení). Z čehož

vyplývá, že kombinace ředidla na bázi sojového lecitinu a ředidla na bázi vaječného žloutku se jeví jako vhodná alternativa.

(Khalifa et al., 2013) zmiňuje, že ani věk berana, ani interakce mezi beranem a věkem neměly žádný významný vliv na kvalitativní znaky ejakulátů spermatu ( $P = 0,11$  až  $0,27$ ). Ve spermatu ředěném v AndroMedu však berani ve věku 1,5 až 2,5 roku měli míru březosti nižší než berani ve věku 4,5 až 5,5 let. (Ptáček et al., 2019) doplňuje, že to může být způsobeno neidentickým biochemickým složením mezi dvěma komerčními ředidly na bázi sójového lecitinu. Pracovníci, kteří chtějí přizpůsobit komerční ředidla spermatu býků na bázi sójového lecitinu pro zpracování spermií beranů, si musí být této skutečnosti vědomi. (Salamon & Maxwell, 2000) potvrdili, že odezva na konzervační ošetření spermatu, se může lišit mezi jednotlivými plemeny a mezi berany stejného plemene. To může být způsobeno především rozdíly v biochemickém složení ejakulátu. Dle (Kasimanickam et al., 2007) může být kvalita spermatu ovlivněna plemenem, okolní teplotou, četností odběru spermatu a věkem. Tyto faktory mohou ovlivnit spermatogenezi nebo funkci přídatných žláz. Také teplota skladování může ovlivnit kvalitu spermií v závislosti na ředidle použitém během procesu.

## 8 Závěr

- Cílem této práce bylo ověřit efekt běžně dostupných ředidel a jejich kombinací pro kryokonzervaci spermatu beranů původních valašských ovcí. Výsledky této práce potvrzují, že smícháním ředidel lze dosahovat lepších výsledků.
- Pro kryokonzervaci semene berana byla vyvinuta různá ředidla a kryoprotektivní látky. Avšak v porovnání s dostupnými zdroji nebylo prokázáno, že běžně využívaná komerčně dostupná ředidla jsou nejlepší variantou. Z našich výsledků vyplývá, že nejlepší celkové motility, progresivní motility a životaschopnosti spermií po rozmrazení bylo dosaženo v ředidle z AndroMedu a OptiXcellu, což přináší překvapivé zjištění.
- Z našich výsledků je patrné, že nejhorší variantou pro mrazení beraního spermatu je ředidlo OviXcell. Dosáhlo nejhorších výsledků v celkové motilitě, progresivní motilitě po rozmrazení, životaschopnosti spermií po ekvilibraci i rozmrazení a v ostatních sledovaných parametrech případně nebyly pozorovány signifikantní rozdíly s nejhoršími výsledky.
- Nový metodický přístup je hodnocení nejen samostatných komerčních ředidel, ale také jejich kombinací v definovaném poměru. Tato strategie ukazuje zajímavou perspektivu, neboť tímto způsobem lze dosahovat lepších výsledků než u výchozích ředidel. Například ředidlo č. 4 vzniklé smícháním AndroMedu, OviXcellu a OptiXcellu (1:1:1) dosáhlo nadprůměrných výsledků v progresivní motilitě a zároveň dobrého počtu životaschopných spermií. U ostatních kombinací je situace podobná.
- Do budoucna by bylo vhodné ověřit kvalitu smíchaných ředidel v in vivo podmínkách a zhodnotit míru plodnosti, takto připravených inseminačních dávek. Případně lze vyzkoušet namíchat odlišné poměry námi zvolených kombinací ředidel.

## 9 Literatura

- 154/2000 Sb. Plemenářský zákon. (2000). Retrieved February 27, 2023, from <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2000-154>
- Krmení, krmné směsi a doplňky ENERGYS Ovce Uni 25kg 1580 RM HOBBY CENTRUM. (2021). Retrieved March 7, 2023, from <https://www.rmcentrum.cz/ENERGYS-Ovce-Uni-25kg-1580-d4988.htm>
- Šlechtitelský program plemene valašská ovce (V). (n.d.).
- ThinPrep Pap test | Vyšetření | GynHelp. (n.d.). Retrieved October 30, 2022, from <https://www.gynhelp.cz/vysetreni/thinprep-pap-test.php>
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010. . Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/343208>
- Abdelhakeam, A. A., Graham, E. F., Vazquez, I. A. 1991. Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology*. 28 (1). 36–42. doi: 10.1016/0011-2240(91)90005-9.
- Abril-Sánchez, S., Freitas-de-Melo, A., Damián, J. P., Giriboni, J., Villagrà-García, A., Ungerfeld, R. 2017. Ejaculation does not contribute to the stress response to electroejaculation in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*. 52 (3). 403–408. doi: 10.1111/RDA.12922.
- Abril-Sánchez, Silvia, Freitas-de-Melo, A., Giriboni, J., Santiago-Moreno, J., Ungerfeld, R. 2019. Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: A review on welfare problems and alternative techniques. *Animal Reproduction Science*. 205 . 1–9. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2019.03.023.
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A. 2016. Flow cytometry: basic principles and applications. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>. 37 (2). 163–176. doi: 10.3109/07388551.2015.1128876.
- Agarwal, A., Bragais, F. M., Sabanegh, E. 2008. Assessing Sperm Function. *Urologic Clinics of North America*. 35 (2). 157–171. doi: 10.1016/J.UCL.2008.01.012.
- Akashi, T., Mizuno, I., Okumura, A., Fuse, H. 2005. Usefulness of sperm quality analyzer-V (SQA-V) for the assessment of sperm quality in infertile men. *Archives of Andrology*. 51 (6). 437–442. doi: 10.1080/014850190959081.
- Albiaty, N. M., Alobaidi, H. J., Kareem, A. F., Al-Hakim, A. M., Alnaeb, A. Y. 2016. EFFECT OF EXTENDERS AND PRESERVATION PERIODS IN SOME SEMEN CHARACTERISTICS OF AWASSI RAMS. Albiaty et al. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 5 . 234. Retrieved from [www.wjpr.net](http://www.wjpr.net)
- Amann, R. P., Katz, D. F. 2004. Andrology Lab Corner\*: Reflections on CASA After 25 Years. *Journal of Andrology*. 25 (3). 317–325. doi: 10.1002/J.1939-4640.2004.TB02793.X.
- Ansari, M. S., Rakha, B. A., Akhter, S. 2017. Cryopreservation of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in AndroMed® extender; in vitro and in vivo evaluation. *Reproduction in Domestic Animals*. 52 (6). 992–997. doi: 10.1111/RDA.13008.

- Ansari, M. S., Rakha, B. A., Akhter, S., Ashiq, M. 2016. OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. *Theriogenology*. 85 (3). 528–532. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2015.09.035.
- Arando, A., Delgado, J. V., León, J. M., Nogales, S., Navas-González, F. J., Pizarro, M. G., Pérez-Marín, C. C. 2019. Effect of three commercial extenders on sperm motility and fertility in liquid ram semen stored at 15 °C or 5 °C. *Acta Veterinaria Hungarica*. 67 (3). 430–444. doi: 10.1556/004.2019.043.
- Bernstein, A. D., Petropavlovsky, V. v 1937. Effect of non-electrolytes on viability of spermatozoa. *Bjull Eksp Biol Med*. 3 (1). 41–43.
- Borini, Andrea., Coticchio, Giovanni. 2009. Principles of Cryopreservation. . 34–46. doi: 10.3109/9780203092873-6.
- Brazil, C., Swan, S. H., Drobnis, E. Z., Liu, F., Wang, C., Redmon, J. B., Overstreet, J. W. 2004. Standardized Methods for Semen Evaluation in a Multicenter Research Study. *Journal of Andrology*. 25 (4). 635–644. doi: 10.1002/J.1939-4640.2004.TB02835.X.
- Castro, L. S., Hamilton, T. R. S., Mendes, C. M., Nichi, M., Barnabe, V. H., Visintin, J. A., Assumpção, M. E. O. A. 2016. Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: Flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 7 (1). 1–9. doi: 10.1186/S40104-016-0076-X/TABLES/1.
- Cossarizza, A., Chang, H., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S., Agace, W. W., Aghaepour, N., Akdis, M., Allez, M. 2019. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *European Journal of Immunology*. 49 (10). 1457–1973.
- Davis, R., *Andrology*, D. K.-J. of, 1992, undefined 1992. Standardization and comparability of CASA instruments. *Wiley Online Library*. 13 (1). 81–86. doi: 10.1002/j.1939-4640.1992.tb01632.x.
- de Paz, P., Estesó, M. C., Alvarez, M., Mata, M., Chamorro, C. A., Anel, L. 2010. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology*. 74 (4). 663–671. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2010.03.022.
- del Olmo, E., Bisbal, A., Maroto-Morales, A., García-Alvarez, O., Ramon, M., Jimenez-Rabadan, P., Martínez-Pastor, F., Soler, A. J., Garde, J. J., Fernandez-Santos, M. R. 2013. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Animal Reproduction Science*. 138 (1–2). 102–109. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2013.02.007.
- Dey, P. 2021. Introduction and History of Flow Cytometry. *Diagnostic Flow Cytometry in Cytology*. 3–8. doi: 10.1007/978-981-16-2655-5\_1.
- Evenson, D., Jost, L. 2000. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods in Cell Science* 2000 22:2. 22 (2). 169–189. doi: 10.1023/A:1009844109023.
- Fiser, P. S., Fairfull, R. W. 1984. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology*. 21 (5). 542–551. doi: 10.1016/0011-2240(84)90053-1.
- Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H. R., Nasr-Esfahani, M. H. 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram

- semen. *Theriogenology*. 73 (4). 480–487. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2009.10.005.
- Fritschy, J.-M., Härtig, W. 2001. Immunofluorescence. *ELS*. doi: 10.1038/NPG.ELS.0001174.
- Fukui, Y., Kohno, H., Togari, T., Hiwasa, M., Okabe, K. 2008. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *Journal of Reproduction and Development*. 54 (4). 286–289.
- Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W. M. C. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*. 63 (2 SPEC. ISS.). 445–457. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.09.024.
- Givan, A. L. 2001. a Chapter 2 Principles of flow cytometry: An overview. *Methods in Cell Biology*. 63 (63). 19–50. doi: 10.1016/S0091-679X(01)63006-1.
- Givan, A. L. 2001. b Principles of flow cytometry: An overview. *Methods in Cell Biology*. (63). 19–50. doi: 10.1016/S0091-679X(01)63006-1.
- Hammadeh, M. E., Strehler, E., Zeginiadou, T., Rosenbaum, P., Schmidt, W. 2001. Chromatin decondensation of human sperm in vitro and its relation to fertilization rate after ICSI. *Archives of Andrology*. 47 (2). 83–87.
- Horák, F. 2004. Ovce a jejich chov. . Retrieved from <https://www.knizniklub.cz/knihy/33276-ovce-a-jejich-chov.html>
- Horst, G. van der 2020. Computer Aided Sperm Analysis (CASA) in domestic animals: Current status, three D tracking and flagellar analysis. *Animal Reproduction Science*. 220 . 106350. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2020.106350.
- Horst, G. van der, Maree, L., du Plessis, S. S. 2018. Current perspectives of CASA applications in diverse mammalian spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*. 30 (6). 875–888. doi: 10.1071/RD17468.
- inv technologies 2022. , November 1 OviXcell. .
- Jiménez-Rabadán, P., Soler, A. J., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Fernández-Santos, M. R., Montoro, V., Pérez-Guzmán, M. D., Garde, J. J. 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science*. 167 . 103–108. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2016.02.013.
- Johansson, C. S., Matson, F. C., Lehn-Jensen, H. 2008. Equine spermatozoa viability comparing the NucleoCounter SP-100 and the eosin-nigrosin stain. *Animal Reproduction Science*. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.05.102.
- Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Pelzer, K. D., Dascanio, J. J. 2007. Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4°C. *Animal Reproduction Science*. 101 (1). 60–73. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.09.001>.
- Khalifa, T., Lymberopoulos, A. 2013. Changeability of sperm chromatin structure during liquid storage of ovine semen in milk-egg yolk- and soybean lecithin-based extenders and their relationships to field-fertility. *Cell and Tissue Banking* 2013 14:4. 14 (4). 687–698. doi: 10.1007/S10561-012-9357-6.
- Khalifa, T., Lymberopoulos, A., Theodosiadou, E. 2013. Association of soybean-based extenders with field fertility of stored ram (*Ovis aries*) semen: A randomized double-



- blind parallel group design. *Theriogenology*. 79 (3). 517–527. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2012.11.009.
- Khatun, A., Fazili, M. R., Malik, A. A., Shah, R. A., Khan, H. M., Choudhury, A. R., Naikoo, M., Lone, F. A., Malik, A. 2021. In Vitro Assessment of Tris Egg Yolk and Soybean Lecithin Based Extenders for Cryopreservation of Crossbred Ram Semen. *Cryoletters*. 42 (2). 73–80.
- Kos, V., Andrlíková, M., Ledabylová, A., Marková, B., Novotný, R. 2019. Příručka pro praktická cvičení z andrologie. VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO.
- Kozumplík, J., Gamčík, P. 1984. Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat : celoštátna vysokoškolská učebnica pre vysoké školy veterinárske /. *Príroda*.
- Kubíček, V. 2010. Spermatologické vyšetření. Centrum Andrologické Péče, České Budějovice. Retrieved from [www.urologiepropraxi.cz](http://www.urologiepropraxi.cz)
- Kulaksiz, R., Çebi, Ç., Veterinary, E. A.-T. J. of, 2012, undefined 2012. The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4 C. *Journals.Tubitak.Gov.Tr*. 36 (2). 177–182. doi: 10.3906/vet-1103-11.
- Kuster, C. 2005. Sperm concentration determination between hemacytometric and CASA systems: Why they can be different. *Theriogenology*. 64 (3). 614–617. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.047>.
- Larson, J. W. 2021. Ram Reproductive Management - Management and Nutrition - MSD Veterinary Manual. . Retrieved March 6, 2023, from <https://www.msddvetmanual.com/management-and-nutrition/management-of-reproduction-sheep/ram-reproductive-management?query=ram%20managment>
- Ledesma, A., Manes, J., Ríos, G., Aller, J., Cesari, A., Alberio, R., Hozbor, F. 2015. Effect of Seminal Plasma on Post-Thaw Quality and Functionality of Corriedale Ram Sperm Obtained by Electroejaculation and Artificial Vagina. *Reproduction in Domestic Animals*. 50 (3). 386–392. doi: 10.1111/RDA.12500.
- Louda, F. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. Česká zemědělská univerzita - AF. ISBN: 80-213-0702-1.
- Louda, F., Hegedüšová, Z. 2009. Inseminace ovcí - intenzifikační faktor šlechtitelské práce. *Agrovýzkum Rapotín*. ISBN: 978-80-87144-09-1. Retrieved from <https://www.vuchs.cz/main/agrovyzkum/inseminace-ovci-intenzifikacni-faktor-slechtitelske-prace>
- Lu, J. C., Huang, Y. F., Lü, N. Q. 2014. Computer-aided sperm analysis: past, present and future. *Andrologia*. 46 (4). 329–338. doi: 10.1111/AND.12093.
- Luick, R. 2004. Transhumance in Germany. .
- Macey, M. G. 2007. Principles of flow cytometry. *Flow Cytometry: Principles and Applications*. 1–15. doi: 10.1007/978-1-59745-451-3\_1/COVER.
- Malá, G. 2011. Chov dojných ovcí - zásady správné chovatelské praxe : certifikovaná metodika. .
- 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 (SUPPL. 2). 67–78. doi: 10.1111/J.1439-0531.2010.01622.X.

- Mátlová, V. 2013. Management of farm animal genetic resources in the Czech Republic. *Slovak Journal of Animal Science*. 46 (4). 127–130.
- Matshaba, B., Mphaphathi, M. L., Schwalbach, L. M., Greyling, P. C., Nedambale, T. L. 2014. 56 COMPARISON OF 4 DIFFERENT DILUENT AGENTS ON CRYOPRESERVATION OF SEMEN FROM UNIMPROVED INDIGENOUS SOUTH AFRICAN GOATS. *Reproduction, Fertility and Development*. 26 (1). 142–142. doi: 10.1071/RDV26N1AB56.
- McCoy, J. P. 2002. Basic principles of flow cytometry. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 16 (2). 229–243. doi: 10.1016/S0889-8588(01)00015-6.
- McKinnon, K. M. 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*. 120 (1). 5.1.1-5.1.11. doi: 10.1002/CPIM.40.
- Melamed, M. R. 2001. A brief history of flow cytometry and sorting. *Methods in Cell Biology*. 63 . 3–17.
- Milerski, I. M. 2016. Metodika uchování genetického zdroje zvířat Plemeno: Valašská ovce. .
- Moula, A., Allai, L., Badi, A., El Khalil, K., El Amiri, B. 2018. Effect of extender and storage temperature on sperm motility parameters of liquid ram semen. .
- Murphy, E. M., Murphy, C., O'Meara, C., Dunne, G., Eivers, B., Lonergan, P., Fair, S. 2017. A comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull semen. *Journal of Dairy Science*. 100 (2). 1541–1554. doi: 10.3168/JDS.2016-11646.
- Nur, Z., Zik, B., Ustuner, B., Sagirkaya, H., Ozguden, C. G. 2010. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*. 73 (9). 1267–1275. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2009.12.007.
- Oravcová, M., Huba, J., Hetényi, L., Bulla, J., Mátlová, V., Kadlečík, O. 2004. Farm animal genetic resources in the Slovak Republic. [Http://Agriculturejournals.Cz/Doi/10.17221/4328-CJAS.Html](http://Agriculturejournals.Cz/Doi/10.17221/4328-CJAS.Html). 49 (10). 430–435. doi: 10.17221/4328-CJAS.
- Peña, F. J., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J. A., Ortega Ferrusola, C., González Fernández, L., Macías García, B. 2009. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: A review. *Reproduction in Domestic Animals*. 44 (2). 345–349. doi: 10.1111/J.1439-0531.2008.01211.X.
- Peña, Fernando J. 2007. Detecting subtle changes in sperm membranes in veterinary andrology. *Asian Journal of Andrology*. 9 (6). 731–737. doi: 10.1111/J.1745-7262.2007.00311.X.
- Ptáček, M., Stádníková, M., Savvulidi, F., Stádník, L. 2019. Ram semen cryopreservation using egg yolk or egg yolk-free extenders: Preliminary results. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 50 (2). 96–103.
- Putnová, L., Štohl, R., Vrtková, I. 2018. Genetic monitoring of horses in the Czech Republic: A large-scale study with a focus on the Czech autochthonous breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics = Zeitschrift Fur Tierzucht Und Zuchtungsbiologie*. 135 (1). 73–83. doi: 10.1111/JBG.12313.
- Pytlík, J., Savvulidi, F. G., Ducháček, J., Codl, R., Vrhel, M., Nagy, S., Stádník, L. 2022. Effect of extender on the quality and incubation resilience of cryopreserved Holstein bull semen. *Czech Journal of Animal Science*. 67 (3). 75–86.

- Radcliff, G., Jaroszeski, M. J. 1998. Basics of flow cytometry. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). 91 . 1–24. doi: 10.1385/0-89603-354-6:1/COVER.
- Raffel, J. T., Sax, D., Serebrovskaya, K., Shapiro, R. I., Stadler, N. I., ; S Tadler, L. J., Sprague, L. J. 1940. The effects of low temperature and acclimatization on the respiratory activity and survival of ram spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences.* 129 (857). 517–527. doi: 10.1098/RSPB.1940.0050.
- Rekha, A., Zohara, B. F., Bari, F. Y., Alam, M. G. S. 2016. Comparison of commercial Triladyl extender with a tris-fructose-egg-yolk extender on the quality of frozen semen and pregnancy rate after transcervical AI in Bangladeshi indigenous sheep (*Ovis aries*). *Small Ruminant Research.* 134 . 39–43. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2015.12.007.
- Romano, J. E., Christians, C. J. 2009. Sperm loss using different artificial vaginas in rams. *Small Ruminant Research.* 83 (1–3). 85–87. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2009.04.004.
- Saha, A., Asaduzzaman, M., Bari, F. Y. 2022. Cryopreservation Techniques for Ram Sperm. *Veterinary Medicine International.* 2022 . doi: 10.1155/2022/7378379.
- Salamon, S., Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science.* 62 (1–3). 77–111. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00155-X.
- Savvulidi, F. G., Ptacek, M., Malkova, A., Beranek, J., Stadnik, L. 2021. Optimizing the conventional method of sperm freezing in liquid nitrogen vapour for Wallachian sheep conservation program. [Http://Agriculturejournals.Cz/Doi/10.17221/226/2020-CJAS.Html](http://Agriculturejournals.Cz/Doi/10.17221/226/2020-CJAS.Html). 66 (2). 55–64. doi: 10.17221/226/2020-CJAS.
- Scholfield, C. R. 1981. Composition of soybean lecithin. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 58 (10). 889–892. doi: 10.1007/BF02659652.
- Shapiro, H. M. 2005. *Practical flow cytometry.* John Wiley & Sons. ISBN: 0471434035.
- Spanò, M., Evenson, D. P. 1993. Flow cytometric analysis for reproductive biology. *Biology of the Cell.* 78 (1–2). 53–62. doi: 10.1016/0248-4900(93)90114-T.
- Stádník, L., Doležalová, Martina., Ducháček, Jaromír. 2015. Vliv mrazící křivky na kvalitativní ukazatele inseminační dávky : uplatněná certifikovaná metodika Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, katedra speciální zootechniky. Praha. Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, katedra speciální zootechniky. ISBN: 978-80-213-2615-6.
- Tao, J., Critser, E. S., Critser, J. K. 1993. Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. *Molecular Reproduction and Development.* 36 (2). 183–194. doi: 10.1002/MRD.1080360209.
- Toker, M. B., Alcay, S., Gokce, E., Ustuner, B. 2016. Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. *Cryobiology.* 72 (3). 205–209. doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2016.05.001.
- Vajta, G., Kuwayama, M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology.* 65 (1). 236–244. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.09.026.
- Valverde, A., Castro-Morales, O., Madrigal-Valverde, M., Soler, C., Valverde, A., Castro-Morales, O., Madrigal-Valverde, M., Soler, C. 2019. Sperm kinematics and

- morphometric subpopulations analysis with CASA systems: a review. *Revista de Biología Tropical*. 67 (6). 1473–1487. doi: 10.15517/RBT.V67I6.35151.
- Varela, E., Rojas, M., Restrepo, G. 2020. Membrane stability and mitochondrial activity of bovine sperm frozen with low-density lipoproteins and trehalose. *Reproduction in Domestic Animals*. 55 (2). 146–153. doi: <https://doi.org/10.1111/rda.13599>.
- Vejčík, A. 2007. *Teorie a praxe v chovu ovcí : odborná monografie = Theory and practice of sheep breeding : professional monograph*. .
- Wulster-Radcliffe, M. C., Williams, M. A., Stellflug, J. N., Lewis, G. S. 2001. Technical note: Artificial vagina vs a vaginal collection vial for collecting semen from rams. *Journal of Animal Science*. 79 (12). 2964–2967. doi: 10.2527/2001.79122964X.

## 10 Seznam použitých zkratek a symbolů

FCM – průtoková cytometrie

ID – inseminační dávka

AI – umělá inseminace

VCL – křivočará rychlost

VSL – přímočará rychlost

VAP – průměrná rychlost dráhy

LIN – linearita křivočaré dráhy

STR – přímočarost průměrné dráhy