

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zoologie a rybářství**



**Metody uchování spermatu trubců včely medonosné:  
testování kvality uchovávaných spermií pomocí  
průtokové cytometrie.**

**Diplomová práce**

**Autor: Bc. Filipp Savvulidi**

**Vedoucí práce: Ing. Dalibor Titěra, CSc.**

**© 2016 ČZU v Praze**

# PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Metody uchování spermatu trubců včely medonosné: testování kvality uchovávaných spermií pomocí průtokové cytometrie" jsem vypracoval 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 autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne: 8.5.2016

-----  
Bc. Filipp Savvulidi

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych touto cestou poděkoval mému vedoucímu diplomové práce Ing. Daliborovi Titěrovi, CSc. za odborné a cenní rady, poskytnutí biologického materiálu trubčího spermatu a za možnost účastnit se kurzu inseminace včelích matek ve VÚVč Dol. Také bych chtěl na tomto místě poděkovat Prof. MUDr. Emanuelu Nečasovi DrSc. a RNDr. Ludku Ševcovi, CSc. za možnost využití laboratorního zařízení a přístrojů v prostorách laboratoře průtokové cytometrie a analýzy obrazu, PatFyz, 1.LF UK. Rád bych poděkoval panu Rostislavu Pokludovi za uvedení do fascinujícího světa včel, a jeho manželce Margit za příjemnou atmosféru na jejich včelíně ve Všenorech u Prahy. Moje poděkování patří také mé přítelkyni Karin za neustálou podporu, diskuse, lásku a za naše společné minulé i budoucí cesty.

## SOUHRN

Hodnocení kvality spermií je nezbytnou metodou pro efektivní uchovávání trubčího spermatu. V praxi se hodnotí životaschopnost spermií pomocí testů zaměřených na posuzování strukturální a funkcionální integrity jejich plazmatické membrány. Pro hodnocení strukturální (fyzikální) integrity membrány se používají speciální fluorescenční látky, které vnikají do vnitra poškozených buněk a obarvují jejich DNA. Reakce spermií na hypoosmotické prostředí (tzv. HOS test) se používá pro vyhodnocení funkcionální (biochemické) integrity membrán. Tyto testy jsou primárně založeny na technice mikroskopického pozorování. Mikroskopické techniky jsou časově náročné, subjektivní a nepřesné. Naopak, průtoková cytometrie (což je modifikace fluorescenční mikroskopie) je velice rychlá, plně automatická, objektivní a přesná. V dnešní době průtokové cytometry již přestávají být striktně vědeckými přístroji a velmi úspěšně jsou využívány v oboru reprodukce hospodářských zvířat (a to nejenom pro účel sexování sperma). Navzdory výhodám a velkému potenciálu průtoková cytometrie zatím není rutinní metodou ve včelařském vědeckém výzkumu. Zavedení průtokové cytometrie do běžné včelařské výzkumné praxe by bylo velmi přínosné a to hlavně pro vývoj žádoucí metodiky dlouhodobého uchovávání trubčího sperma. Cílem předložené práce je zavedení a optimalizace metody průtokové cytometrie pro účel rutinní hodnocení kvality trubčího spermatu. Pro tento účel jsem vyvinul jednoduchý test simultánního hodnocení strukturální a funkcionální integrity plazmatické membrány spermií za pomoci průtokového cytometru. Ve výše popsaném testu jsem použil nové fluorescenční barvivo DRAQ7, které již bylo úspěšně aplikováno pro hodnocení kvality spermií některých hospodářských zvířat. Toto barvivo je netoxickou alternativou ke konvenčně používanému jadernému barvivu propidium iodidu. Barvení spermií pomocí DRAQ7 předcházelo cytometrické analýze vzorků trubčích spermií vystavených HOS testu. Hypoosmotický test již od 80. let 20. století je běžně používanou metodou určenou k posouzení funkcionální integrity plazmatické membrány spermií u savců. Avšak u včel tento velmi jednoduchý a rychlý test není stále rozšířen. Ukázalo se, že kombinace obou metodik (barvení jádra barvivem DRAQ7 a HOS test) představuje velice hodnotný nástroj pro rychlé a přesné cytometrické vyhodnocení kvality trubčího spermatu.

**Klíčová slova:** trubčí spermie, životaschopnost, průtoková cytometrie, DRAQ7, HOS test.

## **SUMMARY**

Assessment of semen quality (sperm viability) is an essential for the efficient honeybee semen storage. The motility of spermatozoa is not the ultimate parameter of sperm viability. Instead, the viability of spermatozoa is assessed by testing their structural or functional plasma membrane integrity. These assays are based primarily on the technique of microscopy evaluation of either fluorescent DNA dyes or hypo-osmotic “tail-coiling” reaction of spermatozoa. However, the technique of microscopy evaluation is time-consuming, subjective and often is not accurate. On the other hand, the technique of flow cytometry is rapid, objective and precise. Nowadays, this technique is affordable for many institutions, as the price of “benchtop” flow cytometer is relatively low. To best of our knowledge, there is currently no flow cytometry assay available for evaluation of functional integrity of honeybee spermatozoa. Here we report the establishing of novel flow cytometry assay for simultaneous evaluation of structural and functional plasma membrane integrity. DRAQ7, the new fluorescent DNA dye was used to test the structural integrity of plasma membranes. The hypo-osmotic “tail-coiling” reaction was used for flow cytometric assessment of functional integrity of spermatozoa plasma membranes. The combination of both is a valuable tool for rapid and precise evaluation of sperm viability in honey bees.

**Key words:** drone sperm, viability, flow cytometry, DRAQ7, hypoosmotic shock, membrane integrity

**Motto:** *Multum in parvo.*



# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	10
<b>2. VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE</b> .....	11
2.1 Vědecká hypotéza.....	11
2.2 Cíle práce.....	11
<b>3. PŘEHLED LITERATURY</b> .....	12
3.1 Odebírání a uchovávání trubčího spermatu.....	12
3.1.1 Trubčí sperma.....	12
3.2 Technika odběru trubčího spermatu.....	13
3.3 Metody uchovávání trubčího spermatu.....	14
3.3.1 Krátkodobé uchovávání spermatu.....	14
3.3.2 Dlouhodobé uchovávání (kryokonzervace).....	15
3.3.2.1 Stupňovité zamrazování spermií v programovatelném zmrazovacím přístroji.....	15
3.3.2.2 Vitifikace spermií.....	16
3.3.2.3 Antifreeze proteiny: nový typ netoxických kryoprotektorů.....	17
3.3.2.4 Stálý vývoj metod kryokonzervaci trubčího spermatu.....	17
3.4 Hodnocení životaschopnosti spermií.....	18
3.4.1 Pohyblivost spermií.....	18
3.4.2 Metody hodnocení životaschopnosti trubčích spermií <i>in vivo</i> .....	19
3.4.3 Metody hodnocení životaschopnosti trubčích spermií <i>in vitro</i> .....	20
3.4.3.1 Testování integrity plazmatické membrány spermií.....	20
3.4.3.2 Testování strukturální integrity membrány trubčích spermií.....	21
3.4.3.2.1 Průtoková cytometrie a její výhody pro testování strukturální integrity membrán trubčích spermií.....	23
3.4.3.3 Testování funkcionální (biochemické) integrity membrány trubčích spermií.....	25
3.4.3.3.1 Reakce trubčích spermií na hypoosmotické prostředí.....	26
<b>4. MATERIÁL A METODY</b> .....	29
4.1 Materiál.....	29
4.1.2 Biologický materiál.....	29
4.1.3 Chemikálie.....	29
4.2 Metody.....	30
4.2.1 Vystavení trubčích spermií podmínkám hypoosmotického prostředí.....	30
4.2.2 Analýza vzorků trubčího spermatu pomocí automatického počítačového přístroje Cellometer Auto T4.....	30
4.2.3 Provedení hodnocení strukturální a funkcionální integrity plazmatických membrán trubčích spermií.....	32
4.2.4 Postup přípravy experimentálních vzorků pro zjišťování korelace mezi testem hodnotícím strukturální integritu a testem hodnotícím funkcionální integritu plazmatické membrány trubčích spermií.....	37
4.2.5 Statistická analýza dat.....	37
4.2.6 Další použité programy.....	38

<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	39
5.1 Použití hypoosmotického testu pro hodnocení funkcionální integrity plazmatické membrány trubčích spermií.....	39
5.1.1 Reakce trubčích spermií na hypoosmotické prostředí.....	39
5.1.2 Zjišťování průměrní velikosti prstencovitých spermií.....	42
5.1.3 Optimalizace podmínek provedení hypoosmotického testu.....	43
5.2 Počítání koncentrace živých spermií pomocí automatického přístroje buněk Cellometer Auto T4.....	49
5.3 Využití metody průtokové cytometrie pro simultánní hodnocení strukturální a funkcionální integrity plazmatické membrány trubčích spermií.....	51
5.3.1 Optimalizace fluorescenčního barvení trubčích spermií pro průtokovou cytometrii.....	51
5.3.2 Hodnocení strukturální a funkcionální integrity plazmatických membrán trubčích spermií pomocí průtokové cytometrie.....	55
5.3.3 Analýza korelace mezi testem hodnotícím strukturální integritu a testem hodnotícím funkcionální integritu plazmatické membrány trubčích spermií.....	59
<b>6. DISKUZE</b> .....	62
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	65
<b>8. SEZNAM LITERATURY</b> .....	66



# 1. ÚVOD

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je celosvětově ekonomicky nejužitečnější skupinou hmyzu. V dnešní době jsou však včely vystaveny mnohým stresovým faktorům: parazitům, patogenům, pesticidům, omezené včelí pastvě vlivem rozšíření monokultur v moderním zemědělství. Všechny výše jmenované stresové faktory již přivedly k alarmujícím ztrátám včelstev ve státech s vyvinutým včelařstvím. Jedno z atraktivních řešení tohoto celosvětového problému je vyšlechtění včely, která by byla rezistentní k určitým stresovým faktorům. Kupříkladu je známo, že nadměrné použití akaricidů (látek určených k ničení roztočů) vede k rychlému vzniku populací roztočů *Varroa destructor* s nízkou citlivostí na tyto chemické látky. Pro efektivní boj s roztočem toto pak vyžaduje použití ještě vyšších dávek akaricidů známých svým negativním vlivem na zdraví včelstva a také člověka. Vyšlechtění včely tolerantní ke včelímu exoparazitu *Varroa destructor* by vedlo ke snížení používání chemických akaricidů, a to proto, že tolerantní včela by měla mít výrazně vyvinutý pud zbavovat se parazita.

Tyto šlechtitelské programy jsou zpravidla dlouhodobé (až desítky roků trvající) (Niño a Jasper, 2015). Na druhou stranu, délka života trubce je velmi krátká: jenom 20 - 40 dnů (Page a Peng, 2001). Dostupnost trubčího spermatu v průběhu roku v oblastech s mírným klimatem je obvykle jenom 3 až 5 měsíců (Wegener et al., 2014a). Z výše uvedeného je jasná urgentní potřeba zavedení účinné metody uchovávání trubčího spermatu. Toto uchovávání, pokud by bylo úspěšné, by prodloužilo období dostupnosti trubčího spermatu pro účel šlechtění. Vyvinutí účinné metody uchovávání spermatu ale závisí na dostupnosti spolehlivé metody pro vyhodnocení jeho kvality.

V literárním přehledu se budu věnovat morfologii trubčích spermií a metodice odběru trubčího spermatu. Budou diskutovány způsoby krátkodobého a dlouhodobého uchovávání (s důrazem na programovatelné zamrazování a jiné moderní trendy, jako je vitifikace). Bude diskutována možnost použití „antifreeze“ proteinů - velmi atraktivních látek s kryokonzervačním účinkem - pro zamrazování trubčích spermií. Budou kriticky hodnoceny moderní metody posouzení životaschopnosti spermií založené na testování integrity plazmatické membrány, se speciálním důrazem na použití průtokové cytometrie. Bude odůvodněna nutnost vývoje nové, spolehlivější metody pro vyhodnocování kvality trubčího spermatu, i když některé metody pro posouzení kvality trubčího spermatu již existují (Locke a Peng, 1990; Collins a Donoghue, 1999; Rzymiski et al., 2012; Nur et al., 2012).

## **2. VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE**

### **2.1 Vědecká hypotéza**

Vědecká hypotéza pro předloženou práci je následovná: Životaschopnost spermií trubců včely medonosné může být hodnocena pomocí metody průtokové cytometrie.

### **2.2 Cíle práce**

Prvním cílem práce je zavedení testu simultánního hodnocení strukturální a funkcionální integrity plazmatických membrán trubčích spermií pomocí metody průtokové cytometrie.

Druhým cílem práce je zavedení metody přístrojového počítání koncentrace živých spermií ve vzorku trubčího spermatu založenou na principu analýzy obrazu nahrazující metodu spektrofotometrickou.

## 3. PŘEHLED LITERATURY

### 3.1 Odebírání a uchovávání trubčího spermatu

Všichni trubci z druhu *Apis* se vyznačují unikátním kopulačním aparátem. Skládá se z dlouhé a komplikované trubice, která se nazývá endofalus, a která je umístěna uvnitř zadečku trubce. Když stlačíme hrud' (*thorax*) trubce, svaly zadečku se kontrahují a tlak hemolymfy v nitru zadečku se značně zvětší. Následkem toho je endofalus vytlačen ven (evertován). Zároveň dochází k ejakulaci. Tato procedura je nejjednodušším způsobem sbírání spermatu od trubců. Trubec v průběhu tohoto procesu hyne (Woyke, 2008).

#### 3.1.1 Trubčí sperma

Za normálních podmínek jsou trubci haploidní, protože se vyvíjí z neoplozených vajíček (Woyke, 1984; Beye et al., 2003). Trubci přerušují tvorbu spermií po svém vylíhnutí z buňky, a proto dospělí trubci mají zásobu spermií, která nemůže být již doplněna v průběhu jejich života (King et al., 2011). Sperma trubce se skládá ze seminální tekutiny (sekretů pohlavních žláz) a samotných spermií.

Seminální tekutina je biochemický komplex proteinů, které jsou důležité pro podporování životaschopnosti spermií po ejakulaci (King et al., 2011).

Trubčí spermie jsou haploidní, nesou 16 chromosomů. Trubčí spermie má délku 250 - 270  $\mu\text{m}$  a šířku 0,7  $\mu\text{m}$ . Má relativně malou a úzkou oblast hlavičky. Hlavička trubčí spermie je protáhlého tvaru s délkou 12  $\mu\text{m}$  a šířkou 0,5  $\mu\text{m}$ . Hlavička se skládá z jádra (6,5  $\mu\text{m}$  dlouhé) a akrosomálního komplexu (délka 5,5  $\mu\text{m}$ ). Hlavička je obalena plazmatickou membránou. Přední část akrosomálního komplexu je tvořena hrotem (tzv. acicular apex) tubulárního tvaru, který měří na délku 0,6  $\mu\text{m}$  a je široký 0,25  $\mu\text{m}$  (Peng et al., 1992). Bičík je tvořen axonemou (*flagellum*), dvěma mitochondriálními deriváty a dvěma malými přídatnými tělísky trojúhelníkového tvaru. *Axonema* je svazek mikrotubulů s průměrem 0,235  $\mu\text{m}$  (Woyke, 1984). Příčný řez axonemy má typický uspořádání mikrotubulů ve vzorci 9+9+2 (Peng et al., 1993). Jeden z mitochondriálních derivátů je větší a delší než ten druhý. Oba začínají v blízkosti jádra a pokračují přes většinu části bičíku, ale nedosáhnou jejího konce, nýbrž končí před ukončením axonemy (Woyke, 1984). Dvě přídatná tělíska trojúhelníkového tvaru jsou uspořádána paralelně k axonemě. Jsou lokalizována mezi axonemou a mitochondriálními deriváty. Přídatní tělíska mají rozměr 0,125  $\mu\text{m}$  na šířku a 0,055  $\mu\text{m}$  na

výšku (Woyke, 1984). Plazmatická membrána bičíku je složitá: jak axonema tak i mitochondriální deriváty jsou obaleny vlastními plazmatickými membránami. Nebyla však pozorována společná plazmatická membrána, která by obalovala axonemu i mitochondriální deriváty. Proto je pravděpodobné, že v intaktních spermiích jsou mitochondriální deriváty udržovány pohromadě pomocí jiného neznámého mechanismu (Peng et al., 1992).

Je známo, že plazmatická membrána savčích spermií není jednolitá, ale je kompartmentována - rozdělena do několika biochemicky a funkčně nezávislých kompartmentů, ze kterých každý obsahuje unikátní mozaiku proteinů a lipidů. V savčích spermiích je takových kompartmentů popsáno pět (akrosomální, ekvatoriální, post-akrosomální, střední a koncový) (Mackie et al., 2001). Toto rozdělení membrány na různé, nezávislé regiony je biologicky opodstatněno jejími různými rolami v procesu fertilizace. Pravděpodobně by stejný biologický mechanismus kompartmentalizace plazmatické membrány (i když není popsán) měl existovat také v trubčích spermiích.

### **3.2 Technika odběru trubčího spermatu**

Sperma je odebíráno od dospělých trubců ve věku 14 a více dnů. Pro odběr trubčího spermatu je nejvhodnější sbírat trubce na česně úlu po jejich návratu ze snubních letů. Čas návratu trubců varíruje v závislosti od roční sezóny a lokálních povětrnostních podmínek. Proto je potřeba sledovat včelstva v lokálních oblastech za účelem určení optimálního "časového okna" pro sběr trubců. V České republice toto časové okno je od 13:00 do 17:00 (Titera, 2015, osobní sdělení). Sperma je odebíráno z povrchu evertovaného endofalusu (Cobey et al., 2013). K získání spermatu je potřeba evertovat endofalus trubce ručně. Ruční evertování endofalusu se v praxi nejvíce osvědčilo. Everze endofalusu se skládá ze dvou fází: nejdříve dochází k částečné everzi (bez ejakulace) a pak k úplné everzi s ejakulací. K dosažení částečné everze endofalusu musí být prsty stlačena hlavička a hrud' trubce. Jestliže se jedná o dospělého a zralého trubce, zadeček se bude citelně kontrahovat a objeví se pár žlutě-oranžových rohů endofalusu (*cornua*). K dosažení úplné everze endofalusu a ejakulaci je potřeba vyvinout vyšší tlak na zadeček trubce. Ejakulát je krémové, mramorové barvy na vrstvě bílého hlenu. Sperma je odebráno od mnoha trubců do skleněné mikrokapiláry (Cobey et al., 2013). Obecně objem ejakulátu jednoho trubce činí přibližně 1  $\mu$ l (Cobey et al., 2013; Czekońska et al., 2015; Rousseau et al., 2015). Koncentrace spermií v ejakulátu je v rozmezí

kolem 3,5 - 10 miliónu na 1  $\mu$ l spermatu (Bienkowska et al., 2011; Abdelkader et al., 2014; Czeakońska et al., 2015).

### 3.3 Metody uchovávání trubčího spermatu

Vývoj jednoduchých a efektivních metod uchovávání trubčího spermatu ve značné míře přispěje k rozvoji šlechtění požadovaných genotypů včel (např.: genotypů varroa-tolerantních včel).

#### 3.3.1 Krátkodobé uchovávání spermatu

V každodenní praxi instrumentální inseminace včelích matek, která je v dnešní době nejefektivnějším nástrojem šlechtění včely medonosné, se používá sperma čerstvé anebo uchovávané po dobu maximálně jednoho týdne při pokojové teplotě (20 - 25 °C). Některé studie však uvádějí, že trubčí spermie jsou mnohem odolnější vůči negativnímu efektu *in vitro* uchovávání. Bylo prokázáno, že trubčí sperma může být uchováváno až po dobu 39 týdnů, kdy životaschopnost spermií byla ještě stále akceptovatelná pro účel instrumentální inseminace včelích matek (Collins, 2000a). Trubčí spermie můžou být uchovávány minimálně po dobu 6 týdnů při pokojové teplotě, přičemž si zachovají vysokou (až 80 %) životaschopnost (Locke a Peng, 1993; Collins, 2000b; Burley et al., 2008). Uchovávání spermatu při nízkých (do 10 °C) a příliš vysokých teplotách (nad 40 °C) je již silně poškozující pro trubčí sperma ve srovnání s uchováváním při pokojové teplotě (Harbo a Williams, 1987; Pettis et al., 2016).

Tato poměrně dlouhá doba uchovávání (6 až 39 týdnů) je určitě postačující kupříkladu pro účel mezinárodního zasílání trubčího spermatu. Zjevně však není postačující pro účely jakéhokoliv dlouhodobého šlechtitelského programu. Z těchto důvodů největší snaha byla věnována metodám dlouhodobého uchovávání trubčího spermatu. K takovým metodám patří kryokonzervace, což je uchovávání spermatu zamrazováním při extrémně nízkých teplotách (v tekutém dusíku)

### 3.3.2 Dlouhodobé uchovávání (kryokonzervace)

V roce 1948 Polge a kolektiv náhodně objevili, že přidání glycerolu k ptačím spermii umožňuje jejich přežití při hlubokém (do  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) zamrazování a následní rozmrazování (Polge et al., 1949), což nastartovalo dramatický vývoj techniky nazývané v dnešní době „kryokonzervace“. Pod termínem „kryokonzervace“ (kryogenická konzervace) se rozumí uchovávání buněk a tkání při ultra-nízkých teplotách v tekutém dusíku ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

První pokusy kryokonzervace trubčích spermií byly udělány již na začátku 70. let 20. století.

V poslední dekádě se znovu dostává do popředí zájmu kryokonzervace trubčího spermatu (Taylor et al., 2009; Hopkins a Herr, 2010; Wegener et al., 2014a; Alcay et al., 2015). Biologický základ kryokonzervace spočívá v rychlém zchlazení buňky, důsledkem kterého veškeré dynamické procesy v buňce přejdou do stavu statického. V tomto stavu jsou zastaveny všechny energetické reakce buňky. Za těchto podmínek buňka teoreticky může být uchovávána nekonečně dlouhou dobu.

V praxi trubčí spermie mohou být zamrazovány buď stupňovitě, kdy se nádoba se spermii (obvykle skleněná mikrokapilára) postupně zchlazuje ve speciálním programovatelném zmrazovacím přístroji (angl. „programmable freezer“) anebo jednoduchým ponořením zmrazovací nádoby přímo do tekutého dusíku (vitřifikace) (Hopkins a Herr, 2010; Wegener et al., 2014a).

#### 3.3.2.1 Stupňovité zamrazování spermií v programovatelném zmrazovacím přístroji

S touto metodou je důležité používat optimální program či rychlost zamrazování buněk. Optimální program by měl chránit buňky před tzv. „cold shock“ efektem, což je poškození buněčných membrán příliš rychlým zchlazením buněk na teplotu těsně nad nulou (Holt, 2000), a před tvorbou nitrobuněčného ledu (Pegg, 2015). Optimální rychlostí zamrazování trubčích spermií je rychlost  $3\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$ , až teplota ve zmrazovací nádobě klesne na teplotu  $-40$  až  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pak je zmrazovací nádoba ponořena a uchovávána v tekutém dusíku (Hopkins a Herr, 2010; Wegener et al., 2014a).

Bylo prokázáno, že trubčí spermie nejsou schopny přežít uchovávání v tekutém dusíku bez přidání vysokých koncentrací tzv. kryoprotektorů do zmrazovací nádoby (Peng et al., 1992; Wegener et al., 2012). Jedním z v dnešní době rutinně používaných kryoprotektorů je

dimethylsulfoxide (C<sub>2</sub> H<sub>6</sub> OS). Tato látka je používána pro svoji vysokou kryoprotektivní účinnost, avšak je cytotoxická (Harbo, 1986; Wegener a Bienefeld, 2012).

### 3.3.2.2 Vitřifikace spermií

Při metodě vitřifikace je používána velmi vysoká rychlost zmrazování (až 30000 °C / min). Při takové rychlosti nevznikne nitrobuněčný led, protože veškerá tekutina jak v nitru buňky tak i zvenčí rapidně přejde do amorfního (bezstrukturního) sklu podobního stavu (Wowk, 2010). Při takovém rapidním přechodu z tekutého do sklu podobního stavu zpravidla nedochází k poškození buněk a jejich membrán. Vitřifikace by mohla být velmi užitečnou kryokonzervační metodou uchovávání trubčího spermatu, jelikož je rychlá, velice jednoduchá a nevyžaduje pořízení drahého programovatelného přístroje pro zamrazování. Hopkins a Herr (2010) však ve své studii prokázali, že stupňovité zamrazování trubčích spermií v programovatelném zmrazovacím přístroji je dokonalejším způsobem v porovnání s vitřifikací. Wegener et al. (2014a) v jejich nedávném sdělení popsali dosáhnoutí výrazného úspěchu za použití programovatelného zmrazovacího přístroje. V jejich práci však tento úspěch může být vysvětlen nejenom použitím programovatelného zmrazení samotného, ale nejspíše i použitím speciálního kroku odmytí spermií od cytotoxického kryoprotektoru. Zajímavé je, že při zamrazování spermií člověka použití metody programovatelného zmrazení nepřineslo výraznějšího zlepšení výsledků a bylo naprosto porovnatelné s výsledky vitřifikace (Mohamed, 2015). Další výzkum zaměřený na optimalizaci protokolu vitřifikace pro uchovávání trubčích spermií je nevyhnutně potřebný.

Některé studie uvádějí používání kompromisního protokolu pro zamrazení trubčích spermií, který se nazývá metodou „vapor-sensitization“, což je krátkodobá expozice zmrazovací nádoby se spermiemi parám tekutého dusíku. Teplota těchto par (-110 °C) je o něco vyšší než teplota tekutého dusíku. Při použití této metody je sperma nejdříve krátkodobě vystaveno parám tekutého dusíku (na dobu několik vteřin až minut) a pak plně ponořeno do tekutého dusíku, kde je dále uchováváno (Alcay et al., 2015; Yoon et al., 2015). Tento protokol je velice užitečný, protože spojuje jednoduchost vitřifikace s výhodami stupňovitého zamrazování spermií.

Kryoprotektory mohou být úspěšně používány pro zamrazování spermií metodou vitřifikace (Hopkins a Herr, 2010; Wegener et al., 2014a). Jiní autoři prokázali, že při použití modifikovaného postupu vitřifikace savčích spermií nejsou potřebné kryoprotektory

(Isachenko et al., 2004). Nepoužití kryoprotektorů je určitou výhodou, jelikož klasické kryoprotektory jsou zpravidla cytotoxické. Zdá se však, že tato metoda bez kryoprotektní vitrifikace není vhodná pro účel zamrazování trubčích spermií (moje osobní pozorování, nepublikováno).

Je důležité zmínit, že rychlost rozmrazování vitrifikovaných spermií je zároveň velmi důležitým faktorem pro úspěch kryokonzervace. V současnosti je preferován postup rapidního rozmrazování při velmi vysokých teplotách (Dinnyes et al., 2007; Hopkins a Herr, 2010).

### **3.3.2.3 Antifreeze proteiny: nový typ netoxických kryoprotektorů**

K relativně novým typům netoxických kryoprotektorů můžeme zařadit tzv. „antifreeze“ proteiny (proteiny bránící mrznutí). Antifreeze proteiny byly izolovány z mnoha živočichů obývajících chladné polární regiony. Tato skupina zahrnuje proteiny s unikátní afinitou (přilnavostí) k ledu. Antifreeze proteiny velice efektivně tlumí růst ledových krystalů (Davies et al., 2002). Zároveň byla prokázána jejich schopnost tlumit proces rekrystalizace ledu. Rekrystalizace ledu je velmi nežádoucí proces zodpovědný za mechanické poškození buněk při jejich rozmrazení (Gibson, 2010). Dle mých znalostí však zatím neexistuje žádná publikace popisující použití antifreeze proteinů pro účel kryokonzervace trubčích spermií. Pozitivní efekt použití antifreeze proteinů byl prokázán při kryokonzervaci spermií ryb a savců (Prathalingam et al., 2006; Beirao et al., 2012; Abed-Elmdoust et al., 2015).

### **3.3.2.4 Stálý vývoj metod kryokonzervaci trubčího spermatu**

I přes dříve dosažené úspěchy v kryokonzervaci trubčího spermatu výzkum v tomto oboru není ještě u konce. Příkladem může být výzkumný projekt probíhající ve Spojených státech amerických pod záštitou tamějšího Ministerstva zemědělství, který je zaměřen na založení první světové banky trubčího spermatu včely medonosné. Nejdůležitější částí tohoto projektu je vypracování kryokonzervačního protokolu zabezpečujícího vysoké přežívání a fertilitu (schopnost oplození) uchovávaného spermatu (Rinehart a Yocum, 2015).

Na rozdíl od savců, u kterých je pro úspěšné oplození postačující jenom jedna životaschopná spermie, matka včely medonosné by měla být zabezpečena co největším počtem životaschopných spermií. V opačném případě matka bude velice rychle vyměněna, a



to buď včelstvem, nebo včelařem samotným. Děje se tak proto, že včelí matka s nízkou zásobou spermií nedokáže vést vysoce produkční včelstvo dlouhodobě (Titera, 2015, osobní sdělení).

Z toho je zřejmé, že pro instrumentální inseminace včelích matek by měla být rutinně použita spolehlivá metoda vyhodnocování kvality uchovávaného trubčího spermatu.

### **3.4 Hodnocení životaschopnosti spermií**

Životaschopnost spermií je často používaným, avšak ne úplně jasným termínem, jelikož neexistuje jen jeden jediný rozhodující prvek životaschopnosti spermie, ale nejspíše se jedná o celý komplex prvků podmiňujících její fertilitu (schopnost oplodnit vajíčko). Sice můžeme pohyblivé spermie definovat jako životaschopné, avšak tento termín je ve většině případů dáván do souvislosti se zachováním intaktní plazmatické membrány. To je proto, že plazmatická membrána je nejdůležitějším prvkem pro interakci spermií s jejich okolím a hraje hlavní roli v procesu fertilizace (Hossain et al., 2011).

Kromě testování intaktnosti plazmatické membrány může být životaschopnost spermií hodnocena některými jinými metodami (jak manuálními tak přístrojovými). Tyto metody (přesahující rámec tohoto literárního přehledu) zahrnují vyhodnocení oxidativního stresu, akrosomální integrity, energetické aktivity mitochondrií, neporušenosti chromatinu a apoptotických změn ve spermiích (Hossain et al., 2011; Cunha et al., 2015).

#### **3.4.1 Pohyblivost spermií**

Pohyblivost spermií je považována za důležitý prediktivní parametr pro úspěšnou fertilizaci u savců (Sellem et al., 2015). U včel nicméně není možné předurčit fertilizační schopnost spermií měřením jejich pohyblivosti (Wegener et al., 2012), a to navzdory esenciální roli, kterou hraje pohyblivost spermií v procesu jejich migrace do spermatéky včelí matky. Spermie neschopné aktivního pohybu nedokážou migrovat do spermatéky, a tak se neúčastní procesu oplození vajíček (Collins, 2000a).

U včely medonosné již v 60. - 70. letech 20. století bylo prokázáno, že pohyblivost spermií je výrazně ovlivněna fyzickými a chemickými faktory. Lensky a Schindler (1967) popsali možnost aktivace pohybu nepohyblivých spermií jednoduchou změnou teploty

roztoku, ve kterém bylo sperma zkoumané *in vitro*. Později bylo prokázáno, že pohyblivost spermií může být také ovlivněna přítomností cukrů (glukóza, fruktóza nebo sacharóza) v roztoku (Poole a Edwards, 1972). Verma ve své studii (1973) popsal vztah mezi pohyblivostí spermií a koncentrací iontů  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  v roztoku. Camarago (1975) dále zjistil, že pohyblivost trubčích spermií může být aktivována anebo inaktivována změnami pH prostředí. Peng a Locke (1990) zdůraznili nebezpečí podceňování množství spermií neschopných pohybu v nenařazeném ejakulátu trubců. Při pozorování pod mikroskopem v čerstvém nenařazeném ejakulátu zpravidla pozorujeme synchronizovaný vlnitý pohyb spermií, při kterém spermie neschopné pohybu můžou být unášeny aktivním pohybem živých spermií.

Z výše popsaných skutečností jasně vyplývá, že pohyblivost trubčích spermií není dostačujícím parametrem vyhodnocení jejich životaschopnosti. Je zřejmé, že použití dalších metod testování životaschopnosti spermií je nezbytné.

### **3.4.2 Metody hodnocení životaschopnosti trubčích spermií *in vivo***

Na začátku výzkumu kryokonzervace trubčího spermatu vědci testovali kvalitu spermatu metodami *in vivo*: prováděla se instrumentální inseminace včelích matek uchovávaným spermatem a pak se sledovalo buď množství spermií ve spermatéce, anebo množství dělničího plodu (což odpovídá množství oplozených vajíček) ve včelstvu. Tyto metody byly využívány zaprvé kvůli tomu, že tyto dva parametry (množství spermií ve spermatéce a množství dělničího plodu ve včelstvu) jsou absolutní indikátory kvality spermatu (Collins, 2000a; Wegener et al., 2014a); zadruhé z toho důvodu, že v danou dobu nebyly dostupné jiné způsoby jak zjistit kvalitu uchovávaného spermatu.

Dnes jen málo výzkumníků stále používá kvalitativní *in vivo* metodu. Je tomu tak proto, že využívání tyto metody je pracné, časově náročné, drahé a vyžaduje usmrcení včelích matek (pro účel vyhodnocení množství spermií v jejich spermatkách). Výsledky *in vivo* metody také mohou být zkresleny některými environmentálními faktory (predátory, povětrnostními a snůškovými podmínkami), které mají vliv na reprodukční schopnost včelích matek (Peng et al., 1990).

### 3.4.3 Metody hodnocení životaschopnosti trubčích spermií *in vitro*

Přístup vyhodnocení kvality spermatu *in vitro* (laboratorními metodami) je dnes velmi rozšířen a aplikace těchto metod není ohraničena jen oborem kryokonzervace (Collins, 2004; Burley et al., 2008; Tarpy et al., 2012; Nur et al., 2012; Tofilski et al., 2012; Sturup et al., 2013; Abdelkader et al., 2014; Paynter et al., 2014; Rousseau et al., 2015; Pettis et al., 2016).

Byla prokázána výrazná variabilita (58,5 % - 91 %) životaschopnosti čerstvě odebraných trubčích spermií mezi jednotlivými trubci (Collins, 2004). Možný zdroj této variability je mechanické poškození spermií při jejich odebírání do skleněné mikrokapiláry.

Dále bylo prokázáno, že v průběhu kryokonzervace jsou spermie vystaveny škodlivému vlivu prostředí (např. mechanickému poškození krystaly ledu). Tyto vlivy způsobují nenávratné změny v buněčné struktuře a funkci (Celeghini et al., 2008). V průběhu kryokonzervace je poškozena převážně plazmatická membrána spermií (Kopeika et al., 2015).

V důsledku výše popsaného poklesu kvality spermatu (a to již při odběru, anebo po kryokonzervaci) byly vyvinuty laboratorní testy pro vyhodnocování životaschopnosti trubčích spermií (Peng et al., 1990; Locke et al., 1990; Collins a Donoghue, 1999; Nur et al., 2012; Abdelkader et al., 2014). Tyto *in vitro* testy jsou mnohem rychlejší a přesnější než kvalitativní metoda *in vivo*. Rovněž byla prokázána signifikantní pozitivní korelace mezi integritou plazmatické membrány spermií a množstvím spermií migrujících do spermatéky inseminovaných matek (Wegener et al., 2012). Většina *in vitro* testů používaných rutinně v dnešní praxi je převážně podložena testováním integrity plazmatické membrány trubčích spermií.

#### 3.4.3.1 Testování integrity plazmatické membrány spermií

Strukturální (fyzikální) a funkcionální (biochemická) integrita plazmatické membrány spermie má fundamentální význam z důvodu svého centrálního postavení v procesu spojení spermie a vajíčka. Hodnocení integrity plazmatické membrány představuje velice užitečný parametr pro stanovení fertilizačních schopností spermií (Jeyendran et al., 1984).

### 3.4.3.2 Testování strukturální integrity membrány trubčích spermií

Pro testování strukturální integrity plazmatické membrány trubčích spermií se používají supravitální barvicí techniky. Supravitální techniky barvení jsou založeny na principu, že mrtvé buňky s fyzikálně poškozenou membránou jsou schopny propustit do svého nitra některé chemické látky vážící se k deoxyribonukleové kyselině (DNA) (Ahmadi a Ng, 1997). Tyto látky po proniknutí do nitra buňky obarví její DNA nebo cytoplazmatické proteiny. Živé buňky (se strukturálně nepoškozenou membránou) tyto látky do svého nitra nepropustí.

Peng a Locke (1990) v jedné ze svých raných prací věnovaných barvení trubčích spermií popsali aplikování sedmi různých metod supravitálních barvení původně vyvinutých pro savčí spermie. Mezi těchto sedm metod patřily následující: Trypanová modrá, Nigrosin-eosin B, Eosin B, Erytrocin B, Eosin B-FCF, Eosin B-anilín modrá a Eosin Y. Z výše jmenovaných barvení pouze barvení pomocí Eosinu Y (Eosin žlutý) se jeví jako vhodná metoda barvení pro vyhodnocení životaschopnosti trubčích spermií. S tímto barvením se živé trubčí spermie obarví modro-purpurově a mrtvé trubčí spermie intenzivně žlutě. Obarvené buněčné preparáty (nátěry) byly vyhodnoceny mikroskopicky. Toto barvení (na sklíčkách) bylo vyvinuto za účelem uchovávání záznamů měření životaschopnosti spermií. V dnešní době je tato metoda uchovávání záznamů již zastaralá vzhledem k široké dostupnosti výkonných digitálních fotografických systémů.

Později Locke a Peng (1990) vyvinuli dokonalejší techniku fluorescenční mikroskopie za účelem hodnocení životaschopnosti trubčích spermií v suspenzi. Tato fluorescenční technika má jisté výhody. Fluorochrom je molekula, která absorbuje světelnou excitační energii. Tato energie je pak rychle proměněna v emisní energii viditelného světla s delší vlnovou délkou (tzv. fluorescencí). Tato fluorescence je detekována a analyzována (Cunha et al., 2015). V technice popsané Locke a Peng byly použity dva velice intenzivně emitující, a proto lehké detekovatelné fluorochromy: Propidium iodid a Hoechst 33342. Oba fluorochromy se vážou na DNA. Hoechst 33342 je fluorochrom ze skupiny bisbenzimidů, který barví DNA jak živých tak mrtvých buněk. Po obarvení umožňuje odlišit DNA obsahující buňky od buněčných úlomků (debris), které DNA neobsahují, a tak dovoluje určit celkový počet spermií v zorném poli fluorescenčního mikroskopu. Fluorochrom Hoechst 33342 svítí intenzivně modře při excitaci světlem o vlnové délce 355 nm nebo 405 nm (Ellwart a Dörmer, 1990). Propidium iodid je fluorochrom, který není schopný projít přes

strukturálně intaktní membránu životaschopných buněk. Propidium iodidem se obarví jen mrtvé a poškozené buňky (Krishan, 1975). Propidium iodid svítí intenzivně červeně, když je excitován světlem při vlnové délce 488 nm. Procento spermií obarvených propidium iodidem odpovídá množství poškozených neživotaschopných spermií (Locke a Peng, 1990).

Známou alternativou k fluorochromu Hoechst 33342 je SYBR-14. Fluorochrom SYBR-14 byl původně vyvinut jako alternativa k Hoechst 33342 pro hodnocení životaschopnosti spermií u býků (Garner et al., 1994). Po vstupu SYBR-14 do nitra buňky dochází k vazbě fluorochromu na DNA (Silva a Gadella, 2006). SYBR-14 je molekula s amfipatickým charakterem, obsahuje hydrofobní a také hydrofilní skupiny, což jí umožňuje pronikat přes intaktní membránu buňky. V buňce dochází k biochemickému procesu deacylaci SYBR-14 vlivem nitrobuňčných esteráz, čímž se membrána buňky stává pro deacylovaný fluorochrom nepropustná. Díky tomu SYBR-14 barví jen živé buňky (z buněk s poškozenou strukturální integritou membrány tato barvička lehce uniká ven a neakumuluje se v buňce). Obarvené jádra živých buněk svítí intenzivně zeleně, pokud je fluorochrom SYBR-14 excitován světlem o vlnové délce 488 nm. SYBR-14 se používá v kombinaci s propidium iodidem pro odlišení živých a mrtvých trubčích spermií (Collins a Donoghue, 1999).

Nedávno byla vyvinuta nová fluorescenční molekula pocházející ze skupiny antracyklínů (organických látek používaných k léčbě rakoviny). Jedná se o flurochrom DRAQ7, který je netoxickou alternativou propidium iodidu (Akagi et al., 2013). DRAQ7 proniká do buněk se strukturálně porušenou integritou plazmatické membrány a váže se na DNA. DRAQ7 svítí intenzivně červeně při excitaci světlem o vlnové délce 633 nm. V porovnání s propidium iodidem se DRAQ7 vyznačuje lepšími spektrálními vlastnostmi (například nízká ko-excitace ultrafialovým zdrojem světla). Z tohoto důvodu by kombinace tohoto fluorochromu s Hoechst 33342 měla být výhodnější než kombinace Hoechst 33342 / propidium iodid. Bylo by zajímavé otestovat tento nový fluorochrom v metodice hodnocení membránové integrity trubčích spermií v kombinaci s již osvědčenými flurochromy jako Hoechst 33342 a SYBR-14; takové využití DRAQ7 zatím nebylo v literatuře popsáno. DRAQ7 již byl úspěšně použit pro testování životaschopnosti kančích spermií (Didion, 2015).

### 3.4.3.2.1 Průtoková cytometrie a její výhody pro testování strukturální integrity membrán trubčích spermií

Průtoková cytometrie v dnešní době představuje již uznávanou a rutinní metodu používanou ve výzkumu reprodukce hospodářských zvířat (Nynca et al., 2016); a to nejenom pro účel sexování spermatu. S rozvojem LED technologií (anglická zkratka „Light-Emitting Diode“, dioda emitující světlo) rozměr a cena moderních průtokových cytometrů výrazně poklesly. Tento pokrok umožňuje využití dříve striktně výzkumných přístrojů pro účel praktické aplikace v oboru zemědělství. Dokonce dneska se již testují miniaturní přenosné průtokové cytometry postavené na platformě fotografické kamery mobilního telefonu (avšak zatím nejsou dostupné pro širokou veřejnost) (Zhu et al., 2011).

Průtoková cytometrie je ve své podstatě modifikovaná fluorescenční mikroskopie. Nejlepším důkazem toho je fakt, že první komercializovaný průtokový cytometr, který byl zkonstruován v 60. letech 20. století Wolfgangem Gohde na univerzitě v Münsteru (Německo) představoval běžný fluorescenční mikroskop s nadstavbou (Dittrich a Gohde, 1969). Tato nadstavba umožňovala rapidní automatizovanou analýzu fluorescenčně značených buněk v suspenzi.

Principiální schéma průtokového cytometru můžeme popsat následovně: suspenze buněk (zpravidla obarvená fluorochromy) je vstříkována do speciálně navržené křemenné kyvety (tzv. „flow cell“). V této komůrce každá buňka prochází s velkou rychlostí přes paprsek světelného zdroje (zpravidla laserový). Buňky prochází přes výše popsaný světelný paprsek jedna za druhou v tzv. „koaxialním laminárním toku“. Důležité je to, že tento laminární tok umožňuje individuální spektrální analýzu buněk. Přejít buněk přes excitační laserový paprsek způsobuje jeho rozptyl do všech uhlů. Světlo rozptýlené do malých uhlů je pak sbíráno fotodiodou umístěnou ve směru laserového paprsku. Toto rozptýlené světlo nazývané „forward scatter light“ (FSC, světlo rozptylující se dopředu) koreluje s relativní velikostí buněk změřených v komůrce. Rozptyl světla sbíráan při větším úhlu (nazýván „side scatter light“, SSC - světlo rozptylující se do stran) je způsoben odrazem a lomem světla od intracelulárních organel (granul, vakuol a podobně). Tento rozptyl je zachycen detektorem umístěným kolmo ke směru laserového paprsku a koreluje s morfologickou složitostí intracelulárního kompartmentu buňky. Tento parametr nazýváme „granularita“. Světlo emitované fluorochromy je také zachycováno pomocí optického objektivu a navíc zesilováno pomocí fotonásobiče. Zachycený rozptyl laserového paprsku a zesílená fluorescence jsou

analyzovány pomocí počítače za použití specifického analyzačního softwaru (Picot et al., 2012; Cunha et al., 2015).

V dnešní době je hodnocení kvality (integrity plazmatické membrány) trubčích spermií ještě stále založené primárně na technice fluorescenční mikroskopie (Hopkins a Herr, 2010; Wegener et al., 2014b; Rousseau et al., 2015; Meneses et al., 2015; Pettis et al., 2016). Tato technika má několik nevýhod. Jednou z nevýhod je zpravidla její nízká statistická reprezentativnost. Je známo, že technika mikroskopického pozorování prakticky umožňuje analýzu jen několika stovek spermií z celkového ejakulátu. Extrapolace těchto výsledků získaných analýzou jen malé frakce spermií na celkový ejakulát pak nemusí být vždy přesná (Peña, 2015).

Průtoková cytometrie je z tohoto hlediska mnohem výhodnější, jelikož umožňuje měřit až desítky tisíc spermií za vteřinu (Picot et al., 2012). Toto zvyšuje statistickou reprezentativnost výsledků získaných pomocí průtokové cytometrie a snižuje jejich variabilitu (Paynter et al., 2014). Další výhodou průtokové cytometrie je pochopitelně rychlost analýzy v porovnání s běžnou fluorescenční mikroskopií.

Za zmínění stojí i fakt, že pomocí průtokové cytometrie je možné jednoduše hodnotit koncentraci spermií ve vzorku. Původně byla koncentrace spermií zjišťována pomocí hemocytometru (speciální podložní sklíčko určeno k počítání buněk). Avšak počet buněk sečtených hemocytometrem je nízký a výsledek velmi nepřesný. Později byla zavedena spektrofotometrická metoda hodnocení koncentrací spermií ve vzorku ejakulátu. Pro hodnocení koncentrace trubčích spermií metoda spektrofotometrie byla použita již v 70. letech 20. století (Harbo, 1975). Princip spektrofotometrické metody můžeme popsat takto: paprsek světla ze světelného zdroje prochází skrze spektrofotometrickou kyvetu obsahující vzorek spermatu určený k analýze a následně dopadá na fotoelektrické čidlo. Množství světla projdoucí přes vzorek je analyzováno a je nepřímo úměrné koncentraci spermií ve vzorku. Tato metoda je relativně přesná (v porovnání s hemocytometrem), ale nevýhodou je, že částice nespermatického původu v analyzovaném vzorku mohou interferovat s prostupem světla přes vzorek a tím značně ovlivňovat výsledek. Průtoková cytometrie je v tomto ohledu metodou přesnější, protože výsledky hodnocení koncentrace spermií nejsou ovlivněny přítomností částic nespermatického původu ve vzorku (Petrunkina a Harrison, 2011).

Zobrazovací průtoková cytometrie (angl. „Imaging Flow Cytometry“) je ještě vyvinutějším nástrojem pro měření buněk kombinujícím v sobě přednosti technik průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie. Tato platforma byla vyvinuta společností Amnis

Corporation na začátku 21. století. *ImageStream X* je příkladem obrazového průtokového multispektrálního cytometru, který je schopen nejen analyzovat spektrální vlastnosti buněk, ale také pořizovat digitální záznamy (mikrofotografie) buněk v průběhu měření. Rychlost mikrofotografování je až 2000 buněk za vteřinu (Picot et al., 2012). Za pomoci systému *MultiMag*, je přístroj schopen pořizovat mikrofotografie se zvětšením (softwarovým) až 60x, co umožňuje přesnou analýzu morfologie buněk.

Jedinou nevýhodou metody průtokové cytometrie je stále vysoká pořizovací cena přístroje. Současná cena průtokového cytometru je vyšší než cena fluorescenčního mikroskopu. Avšak s moderním prudkým rozvojem elektroniky, optiky, technologie světelných zdrojů a programového vybavení můžeme očekávat výrazný pokles v ceně průtokových cytometrů. Již v roce 2012 takový pokles byl predikován (Picot et al., 2012) a v dnešní době můžeme vidět skutečné naplnění této předpovědi. Někteří autoři již popisují metodu průtokové cytometrie jako budoucí „zlatý standart“ v hodnocení životaschopnosti trubčích spermií (Paynter et al., 2014).

I přes výše zmiňované výhody průtokové cytometrie momentálně existují jenom čtyři práce zabývající se hodnocením strukturální integrity plazmatické membrány trubčích spermií pomocí průtokové cytometrie: Chorbinski et al. (2006), Rzymiski et al. (2012), Tofilski et al. (2012) a Paynter et al. (2014). Dále jen jedna vědecká skupina využila možnosti obrazového multispektrálního průtokového cytometru pro účel vyhodnocení životaschopnosti trubčích spermií (Paynter et al., 2014). Je proto velmi důležité zařadit v co největší míře metodu průtokové cytometrie do praxe laboratoří zabývajících se výzkumem včel.

### **3.4.3.3 Testování funkcionální (biochemické) integrity membrány trubčích spermií**

Plazmatická membrána trubčích spermií díky své polopropustnosti hraje centrální roli v udržování chemického gradientu iontů a jiných solubilních komponentů. Bylo prokázáno, že specifické membránové proteiny zabezpečují transport glukózy a fruktózy z extracelulárního prostředí do nitra spermií (Schurmann et al., 2002). Je známo, že glykolýza (rozklad glukózy) je esenciálním procesem pro tvorbu adenosintrifosfátu potřebného pro motilitu savčích spermií (Mukai a Okuno, 2004). Z tohoto důvodu zachování funkcionální integrity plazmatické membrány je nezbytné pro metabolismus a aktivní pohyb spermií.



Funkčnost plazmatické membrány je také velmi důležitá v procesu oplození, protože na ní závisí správný průběh kapacitace spermií, akrosomální reakce a samotné splnutí pohlavních buněk (Jeyendran et al., 1984).

Z výše uvedeného důvodu je zřejmé, že hodnocení funkcionální integrity plazmatické membrány je stejně důležité pro určení životaschopnosti trubčích spermií jako hodnocení strukturální integrity membrány.

#### **3.4.3.3.1 Reakce trubčích spermií na hypoosmotické prostředí**

Pro účel hodnocení funkcionální integrity plazmatické membrány spermií byl vyvinut tzv. hypoosmotický test (angl. „Hypoosmotic Swelling Test“). Tento test, původně vyvinutý pro savčí spermie, stanovuje účinnost transportu molekul vody přes plazmatickou membránu. Účinný transport vody přes plazmatickou membránu je znakem zachování její funkcionální integrity (Jeyendran et al., 1984).

Principem tohoto testu je vystavení spermií hypoosmotickému prostředí. Funkcionálně intaktní plazmatická membrána bičíku spermií v hypoosmotickom prostředí podléhá tzv. „efektu balónku“: objem, který ohraničuje plazmatická membrána bičíkového kompartmentu se bude zvětšovat v důsledku aktivního přenosu extracelulární vody přes plazmatickou membránu do nitra spermií. Plazmatická membrána, která za normálních podmínek těsně přiléhá k axoneme bičíku a kopíruje její protáhlý tvar, se v podmínkách hypoosmotických (z důvodu nasávání vody) mění na tvar sférický. Přitom dojde ke zkroucení axonemy bičíku do prstencovitého útvaru umístěného v nitru plazmatické membrány (Drevius a Eriksson, 1966). Takové prstencovité spermie můžou být detekovány pod mikroskopem a celkové procento spermií s funkcionálně intaktní membránou může být vypočteno. Mrtvé anebo poškozené spermie nebudou v hypoosmotických podmínkách vykazovat zkroucení bičíku.

V práci Jeyendran et al. (1984), kde je poprvé popsána aplikace hypoosmotického testu byl použitý hypoosmotický roztok fruktózy a sodium citrátu. Lomeo a Giambersio (1991) navrhly nahrazení roztoku fruktózy a sodium citrátu, destilovanou vodou. Použití destilované vody zjednodušuje a standardizuje techniku provedení hypoosmotického testu. To je proto, že destilovaná voda má vždy stejnou osmolalitu a tedy výsledky hypoosmotického testu můžou být jednoduše porovnané mezi laboratořemi. Osmolalita je obecně definována jako množství osmoticky aktivních látek v 1 kilogramu rozpouštědla.

Byla prokázána vysoká korelace výsledků ( $r > 0,77$ ) mezi použitím roztoků fruktózy a sodium citrátu, a destilovanou vodou (Bahamondes et al., 2001; Osorio-Melendez et al., 2011). Zajímavostí je, že již v roce 1954 Kurennoi popsal zkroucení axonem bičíku trubčích spermií v destilované vodě (Kurennoi, 1954). Avšak toto jeho pozorování zřejmě nevedlo k vyvinutí testu pro hodnocení funkcionální integrity plazmatických membrán spermií.

V dnešní době je hypoosmotický test rutinně používán pro testování funkcionální integrity plazmatické membrány spermií člověka (Jeyendran et al., 1984; Lomeo a Giambersio, 1991; Ahmadi a Ng, 1997), kanců (Perez-Llano et al., 2009), býků (Osorio-Melendez et al., 2011; Yoon et al., 2015) a včelích trubců (Nur et al., 2012; Alcay et al., 2015). Avšak, v poslední době je přesnost tohoto testu spochybňována (Gadea-Mateos, 2016; osobní sdělení).

Důvodem tohoto zpochybnění je občasné mikroskopické pozorování spermií se strukturálně poškozenou plazmatickou membránou hlavičky, ale s funkcionálně intaktní plazmatickou membránou bičíku. Toto bylo pozorováno ve spermiích některých hospodářských zvířat (Perez-Llano et al., 2009; Osorio-Melendez et al., 2011) a člověka (Lomeo a Giambersio, 1991).

Lomeo a Giambersio (1991) popsali sice vysokou ( $r > 0,86$ ;  $p < 0,01$ ), ale ne absolutní korelaci mezi metodami pro hodnocení strukturální a funkcionální integrity plazmatické membrány spermií u člověka. Tento výsledek může být objasněn známou kompartmentizací plazmatické membrány savčích spermií. Tudiž membrána hlavičky a membrána bičíků může vykazovat rozdílnou odolnost ke škodlivým vlivům prostředí (Osorio-Melendez et al., 2011). Jiní autoři vysvětlují tento výsledek postupným procesem umírání spermií (Gadea-Mateos, 2016, osobní sdělení). Umírající spermie reagují na hypoosmotické prostředí zkroucením bičíků avšak již propustí do svého vnitřního prostoru fluorescenční barvy zaznamenávající smrt buňky.

Z výše popsaného plyne, že jenom souběžné hodnocení strukturální a funkcionální integrity plazmatické membrány spermií nám může poskytnout nejpřesnější výsledek testu hodnotícího kvalitu spermatu. V práci Perez-Llano et al. (2009) je popsáno souběžné hodnocení strukturální a funkcionální integrity plazmatických membrán ve spermiích kanců a v práci Osorio-Melendez et al. (2011) ve spermiích býků.

V trubčích spermiích také nebylo dosaženo naprosto stejných výsledků při použití testů hodnotících strukturální a funkcionální integritu plazmatických membrán (Nur et al., 2012). Tento fakt odůvodňuje nevyhnutelnou potřebu vývoje nové metody pro souběžné hodnocení strukturální a funkcionální integrity plazmatických membrán i v trubčích

spermiích. Dle mých znalostí zatím nebyla popsána metoda, která by souběžně hodnotila tyto parametry kvality plazmatických membrán ve spermiích trubců. I přesto, že průtoková cytometrie již byla úspěšně použita pro hodnocení strukturální integrity membrán trubčích spermií, dle mých znalostí zatím ještě nebylo popsáno využití této metody pro hodnocení funkcionální integrity plazmatických membrán ve spermiích trubců včely medonosné. Navíc, souběžné hodnocení těchto parametrů za využití průtokové cytometrie by bylo dalším a nezanedbatelným přínosem do oboru výzkumu kryokonzervace trubčího spermatu.

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1 Materiál

#### 4.1.2 Biologický materiál

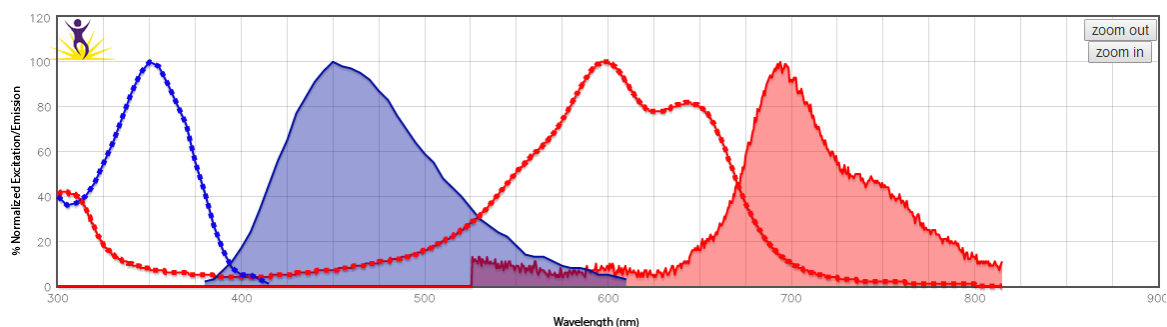
**Trubčí sperma** bylo odebíráno v měsících červenec - srpen, 2015. Sperma bylo odebíráno za odborné asistence výzkumných pracovníků ve Výzkumném ústavu včelařském v Dolu. Vzorky spermatu byly odebírány do skelných mikrokapilár dle postupu popsánému v práci Dostál (2006), které byly transportovány do prostorů laboratoře průtokové cytometrie a obrazové analýze (Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta). Čas transportace byl 1 až 2 hodiny. Vzorky byly analyzovány buď v den odběru anebo na druhý den. Avšak maximální doba uchovávání vzorků v mikrokapilárah (ve tmě, při pokojové teplotě) byla po dobu dvaceti dnů.

#### 4.1.3 Chemikálie

**Izotonický roztok "Kiev"** byl připraven dle Collins (2000b). Uvedené chemikálie: D-glukóza (0,3 g), chlorid draselný (0,41 g), sodium bikarbonát (0,21 g) a sodium citrát 2 hydrát (2,4 g) byly naváženy pomocí analytických vah a rozpuštěny ve 100 ml destilované, sterilní vody. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 8,5 (proměřeno na automatickém pH metru). Roztok byl uchováván v lednici při 4°C po dobu jednoho měsíce (v den experimentu byl roztok temperován na pokojovou teplotu).

**Fluorescenční látka DRAQ7** (kat.č.: 424001, firma BioLegend). Spektrální vlastnosti fluorescenční látky (excitace a emise) jsou znázorněny na obrázku 4.1. Zásobní roztok s koncentrací 300  $\mu$ M byl uchováván v lednici při 4°C (dlouhodobě). Ze zásobního roztoku v den experimentu byl připraven pracovní roztok ředěním (do požadované koncentrace) v izotonickém roztoku Kiev.

**Fluorescenční látka Hoechst 33342 bisBenzimide** (kat.č.: B 2261, firma SIGMA-ALDRICH). Spektrální vlastnosti fluorescenční látky (excitace a emise) jsou znázorněny na obrázku 4.1 (za připomínku stojí, že v mých experimentech jsem byl schopen detekovat emisi látky Hoechst 33342, která byla excitována laserem 405 nm). V den experimentu byl připraven pracovní roztok rozpuštěním prášku (do požadované koncentrace) v izotonickém roztoku Kiev.



**Obr. 4.1:** Spektrální vlastnosti fluorescenčních látek DRAQ7 a Hoechst 33342. Osa X znázorňuje vlnovou délku (v nanometrech). Osa Y znázorňuje excitace anebo emise v procentech. Červenou přerušovanou a červenou plnou čarou je znázorněná excitace a emise látky DRAQ7. Modrou přerušovanou a modrou plnou čarou je znázorněná excitace a emise látky Hoechst 33342. Zdroj: webové stránky firmy BioLegend (prohlížeč spektrálních vlastností).

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Vystavení trubčích spermií podmínkám hypoosmotického prostředí

Kapka vzorky spermatu (s objemem 2 - 3  $\mu\text{l}$ ) byla aplikována na podložní sklíčko do předem připravené kapky izotonického roztoku Kiev (s objemem 10  $\mu\text{l}$ ). Po promíchání automatickou pipetou s nastavitelným objemem byl vzorek spermatu smyt destilovanou vodou do plastové Petriho misky (výslední objem činil 1 ml). Naředěné sperma po několika cyklech nasávání pomocí automatické pipety bylo ponecháno po dobu 3 minut (pokud se nejednalo o testování různých časových dob ponechávání spermatu v takhle vytvořeném hypoosmotickém prostředí). Následně prstencovité spermie (vytvořené vlivem hypoosmotického prostředí) byly analyzovány pomocí automatického počítačového přístroje Cellometer Auto T4 anebo pomocí průtokového cytometru.

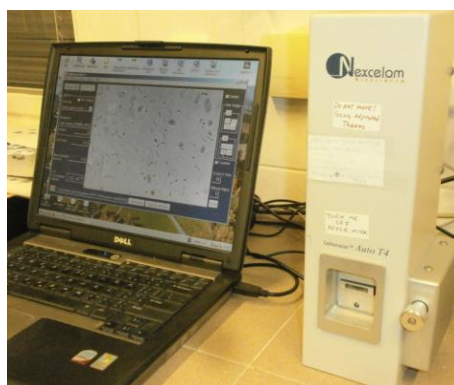
### 4.2.2 Analýza vzorků trubčího spermatu pomocí automatického počítačového přístroje Cellometer Auto T4

Vzorek spermatu odebraný jak je uvedeno výše v textu, byl nejdříve změřen přístrojem spektrofotometer UV - 160 (Schimadzu; při vlnové délce  $\lambda = 400 \text{ nm}$ ; obr. 4.2) dle postupu používanému ve Výzkumném ústavu včelařském v Dolu (za pomoci odborní

asistence) a pak byl změřen automatickým počítačím přístrojem Cellometer Auto T4 (Nexcelom; obr. 4.3) dle mnou zadaných parametrů. Parametry nastavení automatického počítačícího přístroje jsou znázorněny na obrázku 4.4. Pro počítání spermií vzorek s objemem 20  $\mu$ l byl nanesen do speciálního plastového podložního sklíčka, které bylo vyfoceno zabudovanou kamerou přístroje Auto T4. Čas pořízení mikrofotografií představuje jenom několik vteřin, což umožňuje práci s velkým množstvím vzorků.



**Obr. 4.2:** Ilustrativní obrázek spektrofotometru UV - 160 (Shimadzu). Zdroj: internet.



**Obr. 4.3:** Automatický počítačící přístroj Cellometer Auto T4 (Nexcelom).

Cell Type Name	<input type="text" value="Drone spermatozoa"/>	<input type="checkbox"/> Save as New Cell Type
Detailed Description	<input type="text"/>	
Cell Diameter Min.	<input type="text" value="5"/>	micron
Cell Diameter Max.	<input type="text" value="15"/>	micron
Cell Roundness	<input type="text" value="0.20"/>	default: 0.10; range: 0 - 1.0; 1.0 for perfect circle
Contrast Enhancement	<input type="text" value="0.30"/>	default: 0.40; range: 0 - 0.5; high value for light cells
<input type="checkbox"/> Modify Dead Cell Parameters		
Sensitivity	<input type="text" value="1.0"/>	default: 1.0; range 0 - 2.0; higher value to pick up more dead cells
Uniformity	<input type="text" value="150"/>	default: 150; range 100 - 255 higher value for non-uniform dead cells
<input type="checkbox"/> Very Dim Dead Cells		
<input checked="" type="checkbox"/> Modify Decluster Details		
Decluster Edge Factor	<input type="text" value="0.6"/>	default: 0.5; range 0 - 1.0 higher value for more edge enhancement
Decluster Th Factor	<input type="text" value="1.0"/>	default: 1.0; range 0 - 1.0 higher value for more sensitivity
<input checked="" type="checkbox"/> Select Special Cell Type		
Background Adjustment	<input type="text" value="1.0"/>	default: 1.0; range 0 - 1.0 lower value to pick up dim cells
<input type="checkbox"/> No Decluster		

**Obr. 4.4:** Parametry použity pro nastavení automatického počítačového přístroje Cellometer Auto T4. Parametry jsou přístrojově specifické.

#### 4.2.3 Provedení hodnocení strukturální a funkcionální integrity plazmatických membrán trubčích spermií

Kapka vzorku spermatu (s objemem 2  $\mu$ l) byla aplikována na podložní sklíčko do předem připravené kapky izotonického roztoku Kiev (s objemem 8  $\mu$ l). Po promíchání automatickou pipetou s nastavitelným objemem byl vzorek přenesen do plastové mikrozkušavky (1,5 ml). Do mikrozkušavky byl pak napipetován izotonický roztok Kiev v objemu 40  $\mu$ l. Následně byly přidány fluorescenční látky DRAQ7 (12  $\mu$ M) a Hoechst 33342 (5  $\mu$ g/ml) pokud se nejednalo o testování různých koncentrací. Doba barvení byla 7 minut (pokud se nejednalo o testování různých časových dob barvení) při pokojové teplotě a ve tmě. Fluorescenčně obarvené vzorky byly naředěny destilovanou vodou do finálního objemu 1 ml (anebo do finálního objemu 500  $\mu$ l pokud se jednalo o poměr sperma : voda jako 1 : 9). Po několika cyklech invertování, mikrozkušavka s obarveným vzorkem byla inkubována po dobu 3 minut při pokojové teplotě (pro účel vystavení fluorescenčně obarvených vzorků hypoosmotickému prostředí). Následně byly vzorky změřeny pomocí průtokového cytometru.

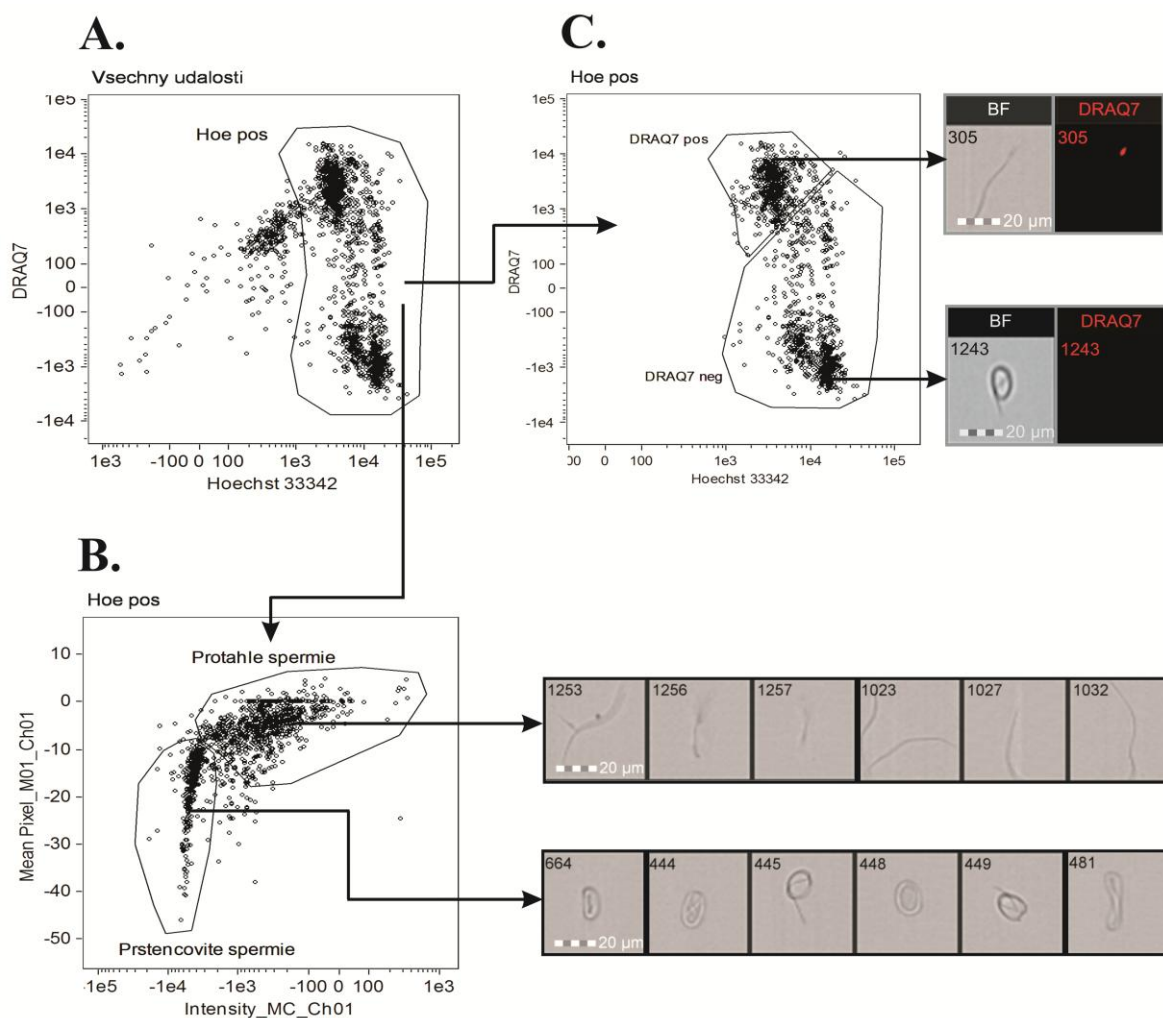
V mých experimentech jsem používal dva typy průtokových cytometrů: obrazový průtokový cytometer ImageStream X (Amnis Corporation) a konvenční průtokový cytometer FACS Canto II (Becton Dickinson).

Obrazový průtokový cytometer ImageStream X (obr. 4.5) je vybaven světelným zdrojem (laserem) s vlnovou délkou 405 nm (100 mW) pro excitaci fluorescenční látky Hoechst 33342 a laserem s vlnovou délkou 642 nm (150 mW) pro excitaci fluorescenční látky DRAQ7. Emise byla detekována v optickém kanálu 7 (pro Hoechst 33342) a kanálu 11 (pro DRAQ7). Přesné hodnoty fluorescenčních signálů byly získány pomocí funkce automatické kompenzace mezi optickými kanály. Tento obrazový průtokový cytometer je schopen pořizovat mikrofotografie zkoumaných objektů (spermií) s rychlostí až 2000 událostí za vteřinu. Mikrofotografický záznam je prováděn také ve světelném poli (angl. "bright field"). Rozměr zorního pole je 120 x 512  $\mu\text{m}$ . Vzorek spermatu je měřen přímo v mikrozkuvkách. Pro analýzu dat jsem použil originální software IDEAS 6.2. Příklad použití softwarové analýzy dat je znázorněn v obrázku 4.6.



**Obr. 4.5:** Obrazový průtokový cytometer ImageStream X (Amnis Corporation).





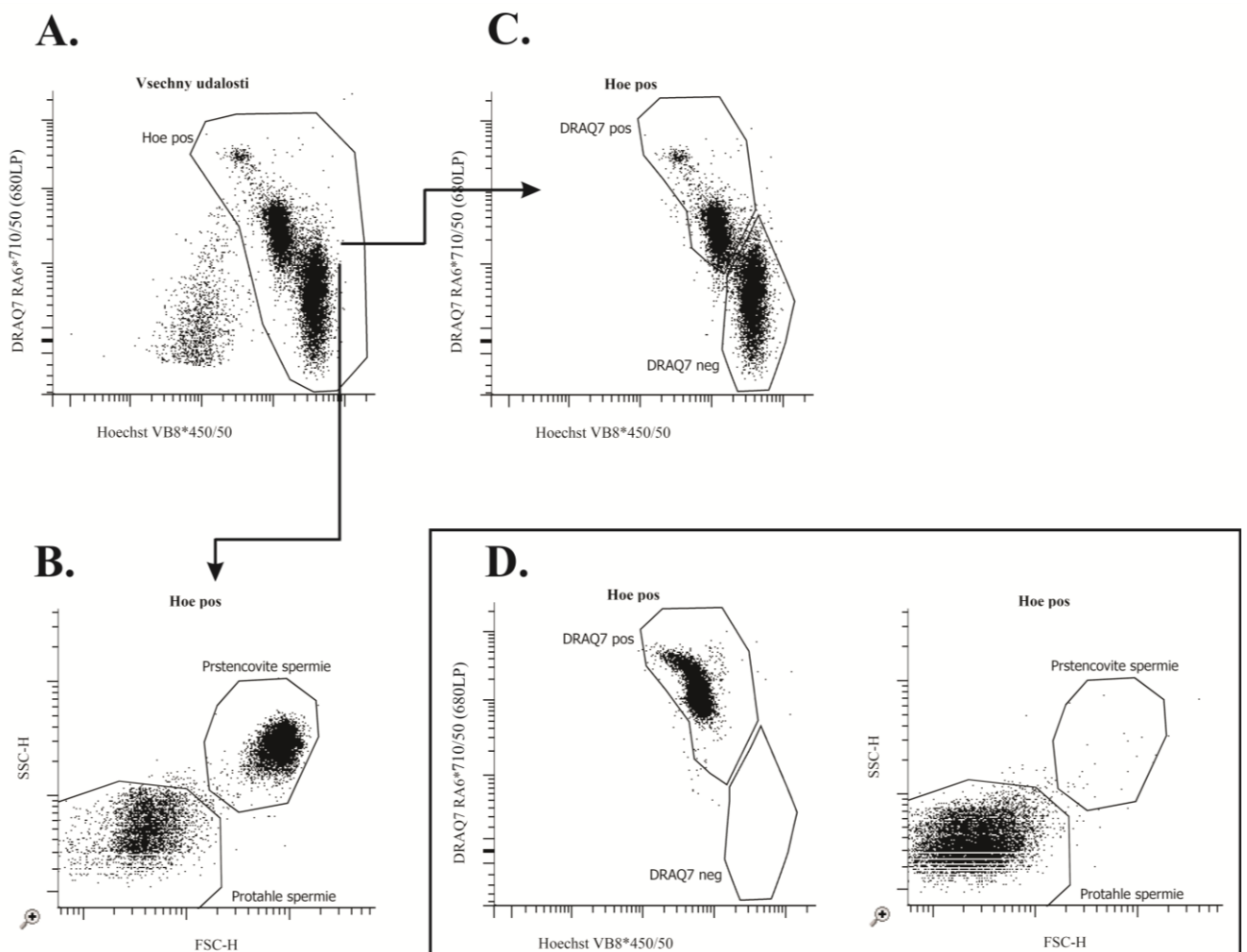
**Obr. 4.6:** Příklad analýzy dat vygenerovaných obrazovým průtokovým cytometrem pomocí originálního softwaru IDEAS 6.2. Panel **A** znázorňuje ohraničení (tzv. "gatování") oblasti Hoechst pozitivních spermií (jaderních buněk). Panel **B** znázorňuje jednu z možností softwarového rozřídění Hoechst pozitivních spermií na spermie protáhlého a spermie prstencovitého tvaru. Panel **C** znázorňuje softwarové rozřídění Hoechst pozitivních spermií na základě DRAQ7 pozitivity. Statistická analýza dat byla prováděna vyhodnocením procentuálních zastoupení ohraničených oblastí.

Konvenční průtokový cytometer FASC Canto II (obr. 4.7) je vybaven laserem s vlnovou délkou 405 nm (60 mW) pro excitaci fluorescenční látky Hoechst 33342 a laserem s vlnovou délkou 633 nm (15 mW) pro excitaci fluorescenční látky DRAQ7. Emise byla detekována za použití setu optických filtrů pro optimální detekci fluorescenčního signálu: 450/50 pro detekci Hoechst 33342 a 710/50 pro detekci DRAQ7 (s použitím optického zrcadla 680 „long pass“). Přesné hodnoty fluorescenčních signálů byly získány pomocí

funkce automatické kompenzace mezi optickými kanály. Tento konvenční průtokový cytometer není schopen pořizovat mikrofotografie zkoumaných objektů, ale umožňuje analýzu velkého počtu událostí za vteřinu (10 000 událostí za vteřinu). Vzorek spermatu je měřen v cytometrických zkumavkách. Pro analýzu dat jsem použil originální software FACS Diva 6.1. Příklad použití softwarové analýzy dat je znázorněn v obrázku 4.8.



**Obr. 4.7:** Konvenční průtokový cytometer FACS Canto II (Becton Dickinson).



**Obr. 4.8:** Příklad analýzy dat vygenerovaných konvenčním průtokovým cytometrem pomocí originálního softwaru FACS Diva 6.1. Panel **A** znázorňuje gatování oblasti Hoechst pozitivních spermií. Panel **B** znázorňuje jednu z možností softwarového roztřídění Hoechst pozitivních spermií protáhlého a prstencovitého tvaru. Panel **C** znázorňuje softwarové roztřídění Hoechst pozitivních spermií na základě DRAQ7 positivity. Panel **D** (v rámečku) znázorňuje spermie usmrcené zamrazováním v tekutém dusíku bez přidání kryoprotektoru. Statistická analýza dat byla prováděna vyhodnocením procentuálních zastoupení ohraničených oblastí.

#### **4.2.4 Postup přípravy experimentálních vzorků pro zjišťování korelace mezi testem hodnotícím strukturální integritu a testem hodnotícím funkcionální integritu plazmatické membrány trubčích spermií**

Pro korelační analýzu dvou testů jsem připravil sérii smíchaných vzorků spermatu, z kterých každý obsahoval známý poměr živých a mrtvých (mrazem poškozených) spermií. Pro tento účel kapka spermatu v objemu 2 - 4  $\mu\text{l}$  byla aplikována na podložní sklíčko do kapky izotonického roztoku Kiev s objemem 20  $\mu\text{l}$ . Po důkladném promíchání pomocí automatické pipety bylo odebráno 10  $\mu\text{l}$  této suspenze, přeneseno do plastové mikrozkušavky, která byla ponechána na stole při pokojové teplotě ve tmě po dobu 10 minut. Další část vzorky (10  $\mu\text{l}$ ) byla přenesena do plastové mikrozkušavky, která byla ponořena do tekutého dusíku (- 196 °C) v polystyrénové nádobě. Po době 5 minut byla tato mikrozkušavka vyndaná z tekutého dusíka a rozmrazena v ruce. Následovně, sperma z obou zkumavek bylo smícháno v různých známých poměrech (objem / objem; nezamražená + zamražená): 1) 100 % + 0 %, 2) 75 % + 25 %, 3) 50 % + 50 %, 4) 25 % + 75 %, 5) 0 % + 100 %. Nadále tyto smíchané vzorky byly měřeny oběma typy průtokových cytometrů.

#### **4.2.5 Statistická analýza dat**

V mých experimentech pro účel statistické analýzy dat jsem používal následovně statistické parametry a testy: Směrodatná odchylka od střední hodnoty (SD); Konfidenční a predikční interval (95 %); Studentův t-test (za podmínky spárovaného výběru anebo za podmínky různých rozptylů ve skupinách); ANOVA analýza rozptylu (Tukey-Kramer test); ANCOVA (analýza kovariance). Uvedené statistické parametry a testy byly vypočteny pomocí statistického softwaru Microsoft Office Excel 2007 (doplňný balíčkem XL TB Verze 6.60). Pro výběr statistických testů a jejich správné pochopení jsem používal jako zdroj on-line knihu „Handbook of biological statistics“ (McDonald, 2014).

#### **4.2.6 Další použité programy**

Pro úpravu (tzv. postprocessing) získaných mikrofotografií z přístroje Amnis ImageStream X byl použit volně dostupný software ImageJ.

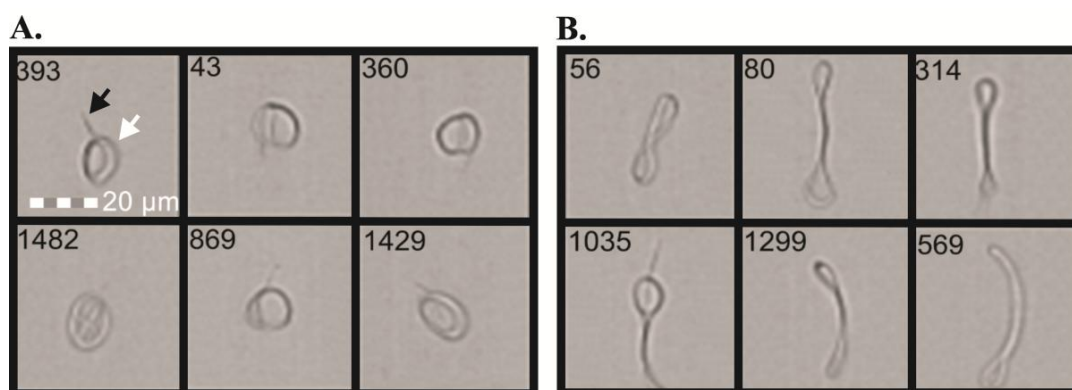
## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Použití hypoosmotického testu pro hodnocení funkcionální integrity plazmatické membrány trubčích spermií

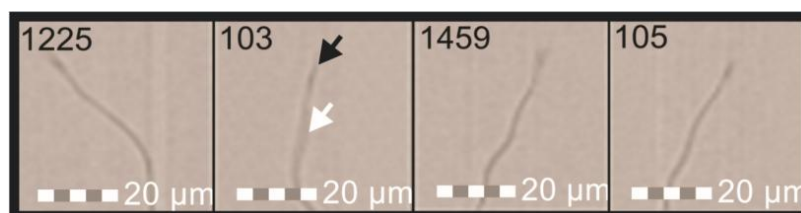
#### 5.1.1 Reakce trubčích spermií na hypoosmotické prostředí

Hypoosmotickým testem hodnotíme funkcionální integritu plazmatické membrány spermií. Principem testu je ředění spermatu hypoosmotickým ředidlem. Takovým ředidlem může být destilovaná voda.

Reakci trubčích spermií na hypoosmotické prostředí popisuje obrázek 5.1. Po vystavení spermií hypoosmotickému prostředí dochází ke skroucení bičíku a vytváření buď pravidelných anebo nepravidelných prstencovitých tvarů (obr. 5.1 A, B). Tato reakce svědčí o funkcionální integritě plazmatické membrány spermií. U spermií s poškozenou membránou (a to buď strukturálně, nebo funkcionálně) k takovéto reakci nedochází (obr. 5.2).

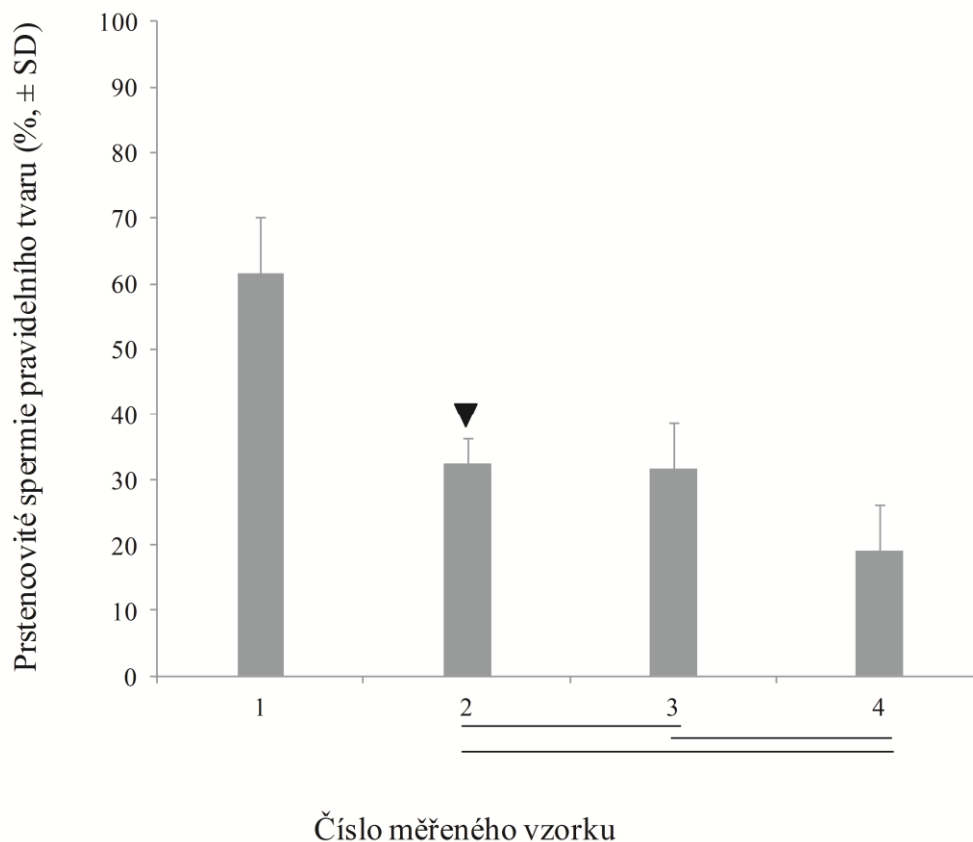


**Obr. 5.1:** Znázornění reakce trubčích spermií na hypoosmotické prostředí. **A.** Pravidelní prstencovitý tvar trubčích spermií. **B.** Nepravidelní tvar trubčích spermií. Mikrofotografie spermií se skroucenými bičíky byly vyhotoveny přístrojem Amnis ImageStream X (obrazový průtokový cytometr). Na obrázku je znázorněna oblast hlavičky (černá šipka) a skroucený bičík spermie (bílá šipka). U spermií s nepravidelným prstencovitým tvarem je hlavička většinou ukryta v oblasti bičíku. Čísla v horní levé části obrázků představují pořadí vyhotovených snímků.



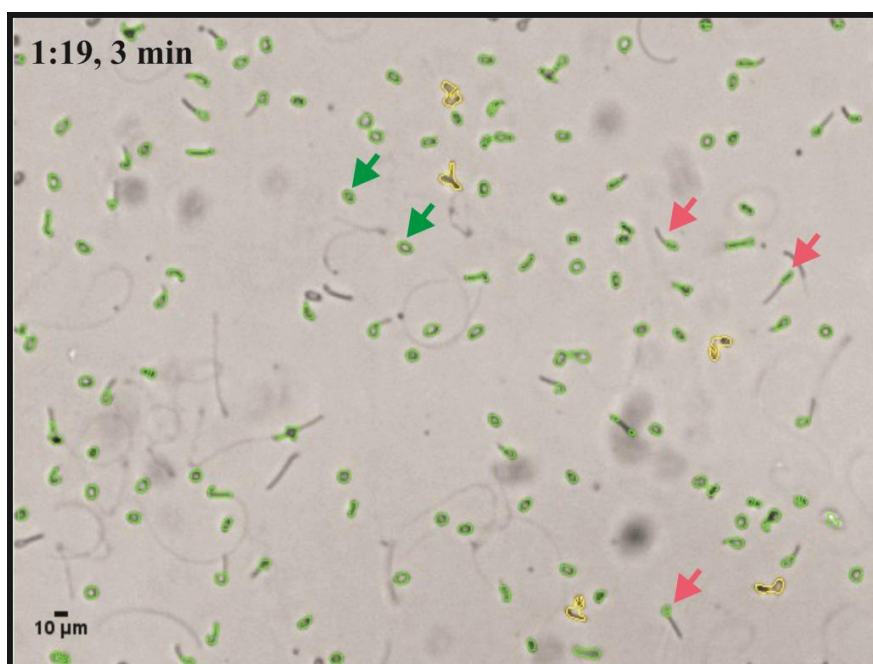
**Obr. 5.2:** Znárodnění trubčích spermíí s poškozenu membránu po jejich vystavení hypoosmotickému prostředí. Na obrázku je znázorněna oblast hlavičky (černá šipka) a mírně ohnutý bičík spermie (bílá šipka). Nedočází k tvorbě prstencovitých tvarů spermíí. Mikrofotografie, Amnis ImageStream X.

Tvorba pravidelných prstencovitých tvarů u spermíí reagujících na hypoosmotické prostředí je vzorkově specifické (závislé od jednotlivých vzorků trubců). Tuto vzorkovou specificitu popisuje graf 5.1. V grafu je znázorněno procentuální zastoupení spermíí reagujících na hypoosmotické prostředí za tvorby pravidelných prstencovitých tvarů. Tyto pravidelné prstencovité tvary zodpovídají mikrofotografiím v obr. 5.1 (panel A).



**Graf 5.1:** Procentuální zastoupení populace spermií s pravidelným prstencovitým tvarem v různých vzorcích. Na ose X jsou znázorněné měřené vzorky trubčího spermatu (N=4). Os Y vyjadřuje procentuální zastoupení spermií pravidelného prstencovitého tvaru ze všech spermií reagujících na hypoosmotické prostředí zkroucením bičíku. Podmínky hypoosmotického prostředí byly následující: hypoosmotickým ředidlem byla destilovaná voda. Trubčí sperma v izotonickém ředidle bylo naředěno destilovanou vodou v poměru 1:19 (sperma : voda). Doba působení vody byla 3 minuty. Variance v rámci vzorku je znázorněna výpočtem směrodatných odchylek od střední hodnoty ( $\pm$ SD). Rozdíl středních hodnot mezi vzorky 2 - 3, 2 - 4 a 3 - 4 nebyl signifikantním (ANOVA, Tukey-Kramer test,  $p > 0,05$ ; znázorněno liniemi pod osou X). Výsledky byly vygenerované pomocí obrazového průtokového cytometru Amnis ImageStream X. Trojúhelník znázorňuje vzorek, který byl dodatečně vyfocen pomocí automatického počítačového přístroje buněk Cellometer Auto T4 (obr. 5.3).



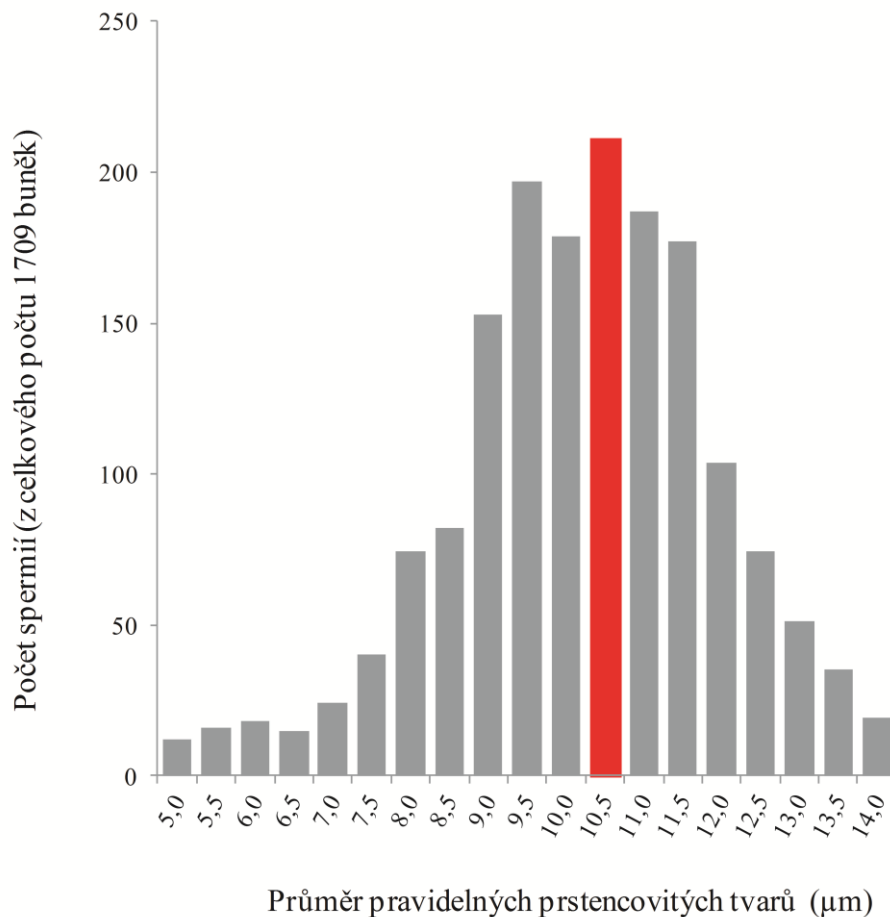


**Obr. 5.3:** Fotografický záznam zorného pole automatického počítačového přístroje buněk Cellometer Auto T4. Na obrázku jsou znázorněny trubčí spermie po jejich vystavení hypoosmotickému prostředí. Zeleně označené objekty v obrázku představují přístrojem sečtené prstencovité spermie pravidelného (zelené šipky) a nepravidelného tvaru (červené šipky). Podmínky hypoosmotického prostředí byly stejné, jak je uvedeno v legendě grafu 5.1.

### 5.1.2 Zjišťování průměrní velikosti prstencovitých spermií

S pomocí automatického počítačového přístroje buněk Cellometer Auto T4, který umožňuje měření průměru buněk, jsem zjistil průměr pravidelných prstencovitých tvarů. Z naměřených výsledků je zřejmé, že tento průměr zodpovídá průměru krevních buněk savců ~10 mikrometrů (znázorněno v histogramovém grafu 5.2).

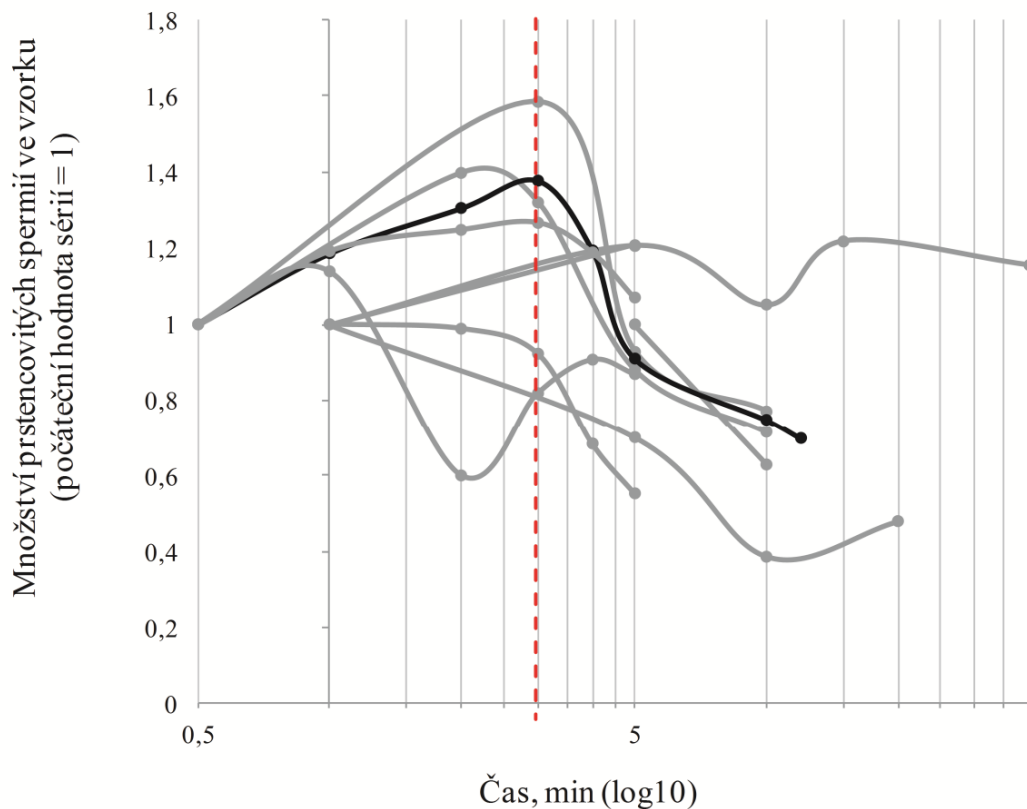
Toto umožňuje analýzu prstencovitých trubčích spermií s využitím průtokové cytometrie, která je optimalizována pro měření objektů s rozměrem savčích krevních buněk.



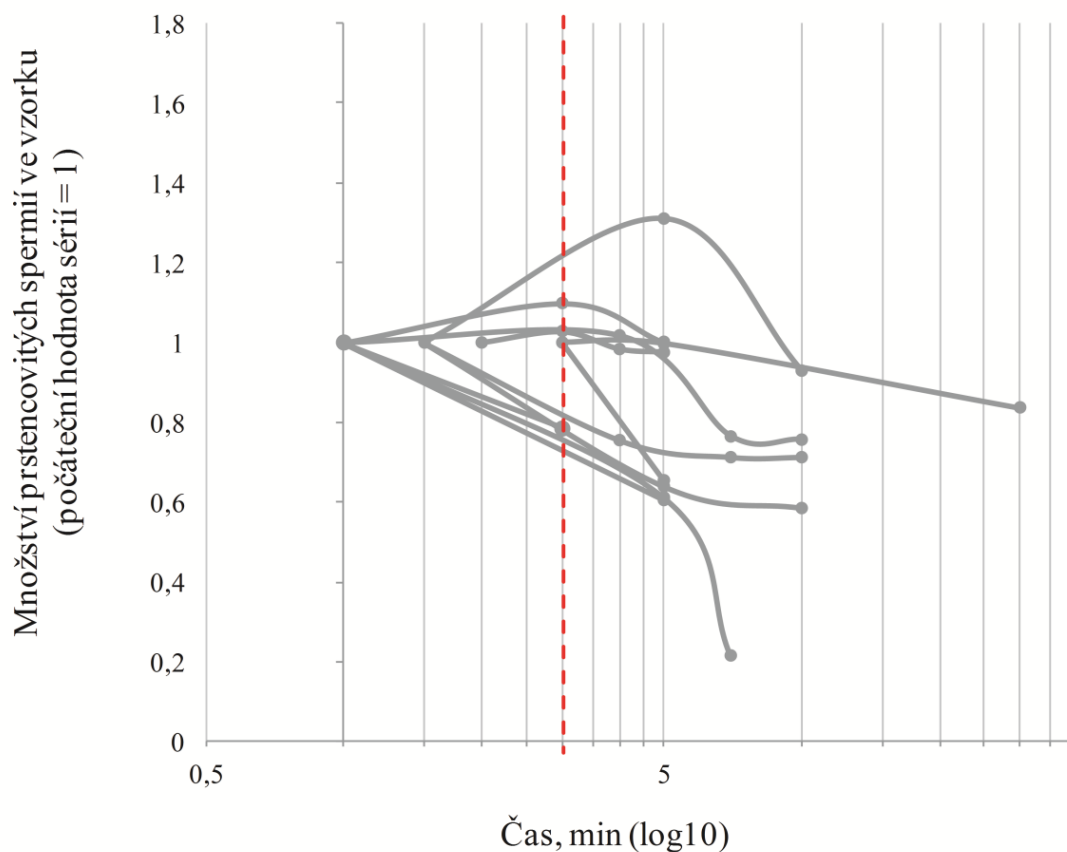
**Graf 5.2:** Průměr (v mikrometrech) spermii pravidelného prstencovitého tvaru. Sloupec označený červeně vyjadřuje nejčetnější hodnotu průměru. Výsledky byly vygenerovány pomocí automatického počítačového přístroje buněk Cellometer Auto T4.

### 5.1.3 Optimalizace podmínek provedení hypoosmotického testu

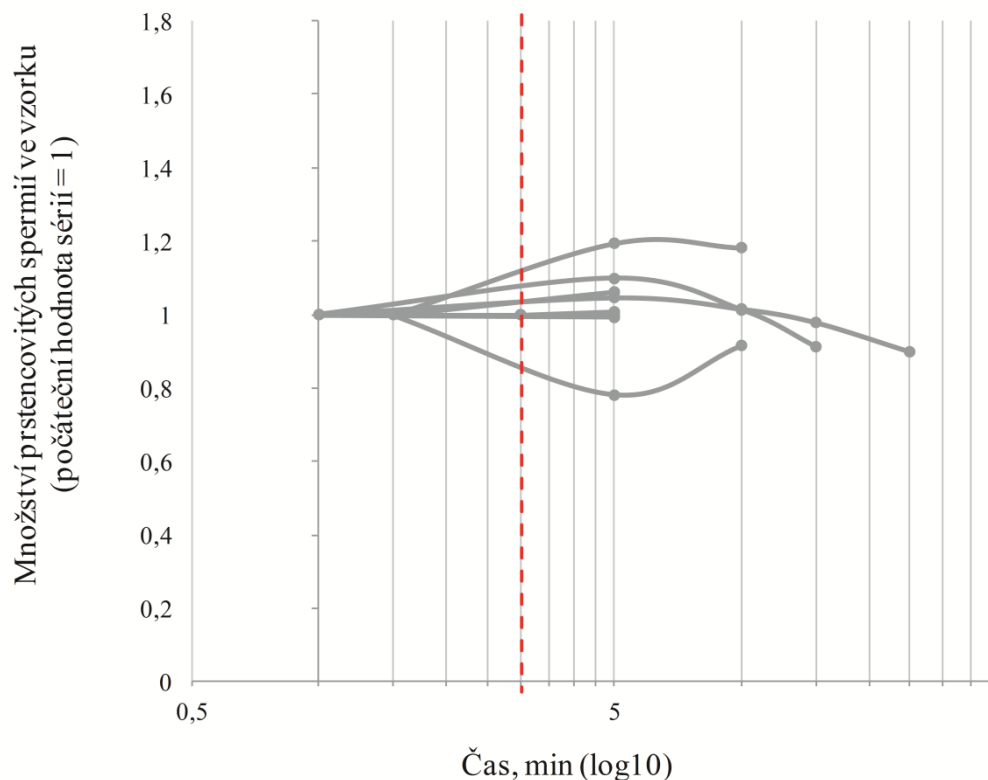
Po ponechání spermatu v hypoosmotickém ředidle (roztoku) dochází nejdříve k tvorbě prstencovitých tvarů a následně k rychlému rozvolnění a narovnání spermii. Toto je způsobeno prasknutím plazmatické membrány v důsledku intenzivního nasávání extracelulární vody do nitra buněk. Časovou dynamiku těchto změn znázorňují grafy 5.3, 5.4 a 5.5.



**Graf 5.3:** Dynamika časových změn tvaru prstencovitých spermií v hypoosmotickém prostředí (**destilovaná voda**). Osa X vyjadřuje čas v minutách (logaritmičké měřítko; od 0,5 minuty do 40 minut). Na ose Y je znázorněno množství prstencovitých spermií v sériích (opakované měření vzorků v rozdílném čase). Počáteční hodnota každé série je normalizována na hodnotu 1. Naměřené hodnoty  $> 1$  znamenají nárůst množství prstencovitých spermií; naměřené hodnoty  $< 1$  znamenají pokles množství prstencovitých spermií. Jednotlivé série úmyslně nebyly označeny pro účel zjednodušení grafu a pro znázornění trendů. Přerušovaná červená svíslá čára znázorňuje časový bod 3 minuty. Mikroskopický záznam dynamiky časových změn tvaru prstencovitých spermií v destilované vodě je znázorněn níže v textu v obr 5.4 (mikroskopický záznam je vytvořen ze série, která je v uvedeném grafu znázorněna plnou černou linií).



**Graf 5.4:** Dynamika časových změn tvaru prstencovitých spermií v hypoosmotickém prostředí (**1 : 19**; sperma : voda). Osa X vyjadřuje čas v minutách (logaritmičké měřítko; od 0,5 minuty do 40 minut). Na ose Y je znázorněno množství prstencovitých spermií v sériích (opakované měření vzorků v rozdílném čase). Počáteční hodnota každé série je normalizována na hodnotu 1. Naměřené hodnoty  $> 1$  znamenají nárůst množství prstencovitých spermií; naměřené hodnoty  $< 1$  znamenají pokles množství prstencovitých spermií. Jednotlivé série úmyslně nebyly označeny pro účel zjednodušení grafu a pro znázornění trendů. Přerušovaná červená svislá čára znázorňuje časový bod 3 minuty.



**Graf 5.5:** Dynamika časových změn tvaru prstencovitých spermií v hypoosmotickém prostředí (**1 : 9**; sperma : voda). Osa X vyjadřuje čas v minutách (logaritmické měřítko; od 0,5 minuty do 40 minut). Na ose Y je znázorněno množství prstencovitých spermií v sériích (opakované měření vzorků v rozdílném čase). Počáteční hodnota každé série je normalizována na hodnotu 1. Naměřené hodnoty  $> 1$  znamenají nárůst množství prstencovitých spermií; naměřené hodnoty  $< 1$  znamenají pokles množství prstencovitých spermií. Jednotlivé série úmyslně nebyly označeny pro účel zjednodušení grafu a pro znázornění trendů. Přerušovaná červená svislá čára znázorňuje časový bod 3 minuty.

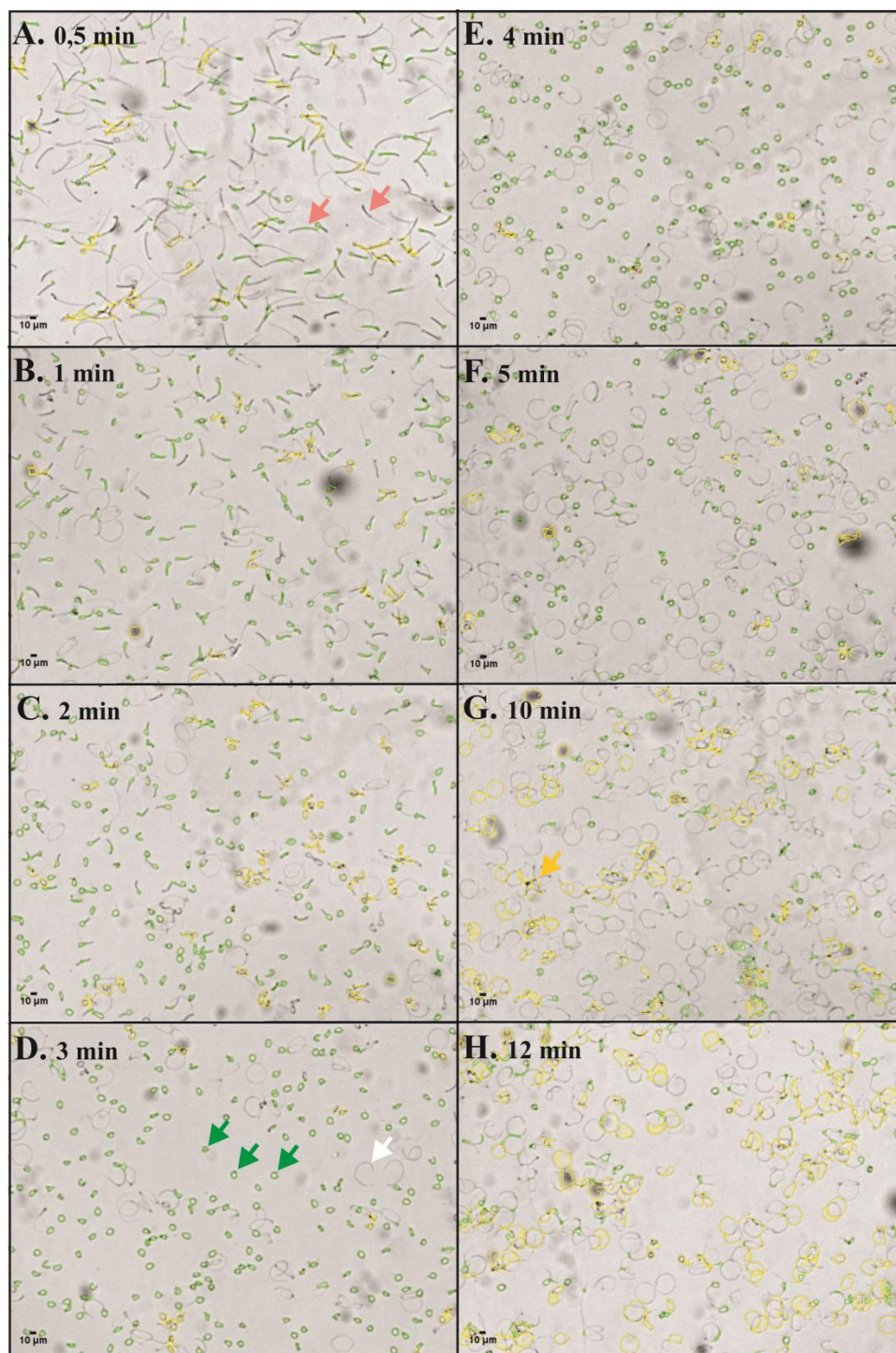
Z výše uvedených grafů je zřejmé, že změny tvaru prstencovitých spermií (jejich narovnání) nastávají již po krátkodobém (minuty) vystavení spermatu hypoosmotickému prostředí, kterým je destilovaná voda. To znamená, že pokud chceme počítat procento živých spermií (s funkcionálně intaktní plazmatickou membránou) pomocí počítání prstencovitých spermií v hypoosmotickém testu s destilovanou vodou musíme počítání provést v časovém intervalu 2 - 3 minuty od počátku testu. Pokud spermie v hypoosmotickém prostředí

ponecháme delší dobu, prstencovité spermie se začnou narovnávat a tím se snižuje přesnost měření jejich počtu.

Podobně je tomu tak i v případě vystavení spermatu hypoosmotickému roztoku 1 : 19 (sperma : voda). Avšak, zjistil jsem, že přidání trubčího spermatu smíchaného s izotonickým ředidlem k destilované vodě v poměru 1 : 9 (sperma : voda) vytvoří suboptimální hypoosmotické prostředí. V tomto suboptimálním hypoosmotickém prostředí nedochází k tvorbě prstencovitých spermií pravidelného tvaru (~ 90 % spermií tvarem zodpovídá tvaru uvedenému na obr 5.1, panel B).

Pro účel vytvoření hypoosmotického prostředí jsem ve svých experimentech používal hypoosmotický roztok s poměrem 1 : 19 (sperma : voda). Stojí za připomínku, že přesná osmolalita použitých hypoosmotických roztoků v mých experimentech nebyla změřena z důvodu nedostačujícího přístrojového vybavení laboratoře.

Jako nejvhodnější časový interval byl vybrán časový interval 3 minuty. Je to z důvodu, že delší vystavení spermatu hypoosmotickému prostředí neumožňuje sledování prstencovitých spermií pomocí průtokové cytometrie (prasknutí membrány a narovnání spermií). Příliš krátká doba působení hypoosmotického ředidla (< 2 minuty) taktéž není optimální nakolik za takovou krátkou dobu nedochází k vytvoření prstencovitých spermií pravidelného tvaru.



**Obr. 5.4:** Fotografický záznam zorného pole automatického počítacího prístroje buněk Cellometer Auto T4. Dynamika časových zmien tvaru prstencovitých spermii v destilovanej vode, A až H. Zeleně označené objekty v obrázku predstavujú prístrojom sečtené prstencovité spermie pravidelného (zelené šípky) a nepravidelného tvaru (červené šípky). Žltě označené objekty jsou prístrojom ignorované artefakty (žltá šípka). Na obrázku jsou viditelné spermie narovňavající se po prasknutí membrány (bílá šípka).

Z uvedeného obrázku 5.4 je zřejmé, že největší množství prstencovitých spermií pravidelního tvaru bylo pozorováno v době po 2 - 3 minutách působení hypoosmotického roztoku. Avšak s narůstajícím časem množství spermií prstencovitého tvaru prudce klesalo (po 5 minutách byl pozorován jejich viditelný pokles).

## **5.2 Počítání koncentrace živých spermií pomocí automatického přístroje buněk Cellometer Auto T4**

V praxi je koncentrace živých trubčích spermií běžně počítána pomocí spektrofotometru, který musí být nejdříve kalibrován ručním počítáním živých spermií pod mikroskopem. Koncentrace živých spermií pod mikroskopem je zjišťována pomocí hypoosmotického testu. Za spermie živé považujeme ty spermie, které reagují v hypoosmotickém prostředí skroucením jejich bičíku. Vytvořená kalibrační křivka je následně používána pro automatické počítání koncentrace živých spermií spektrofotometrem. Nicméně nevýhodou automatického počítání koncentrace spermií pomocí spektrofotometru (který měří absorbanci resp. zákal roztoku) je to, že nemáme možnost vizuální kontroly počítaných objektů.

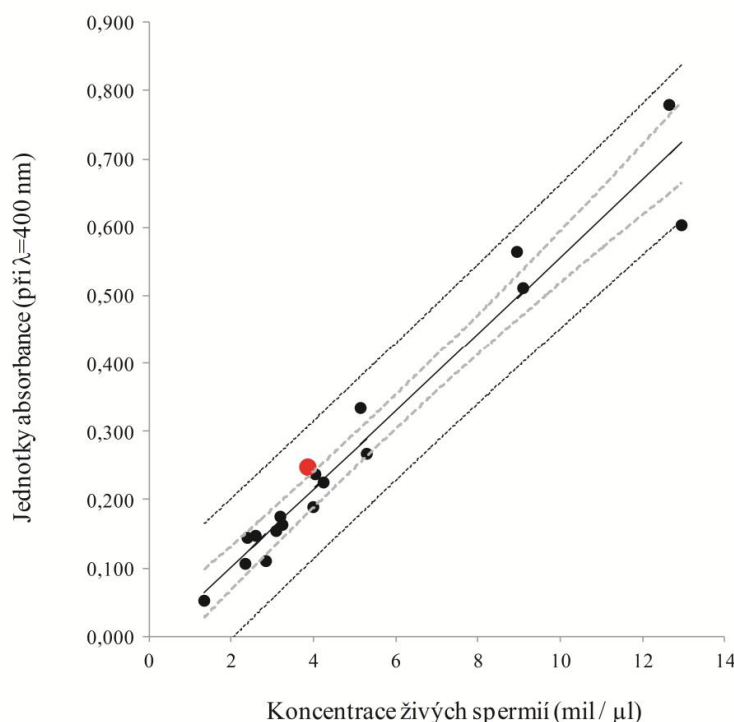
V mých experimentech jsem porovnal dva přístupy pro počítání koncentrace živých spermií v tom samém vzorku trubčího spermatu. A to pomocí spektrofotometru kalibrovaného ručním počítáním živých spermií pod mikroskopem a automatického počítacího přístroje buněk Cellometer Auto T4 (kterého počítání je založeno na principu analýzy obrazu). Výsledky porovnání těchto dvou přístupů jsou znázorněny v tabulce 5.1 a grafu 5.6.



Měření	Spektrofotometr „UV-160“		Cellometr „Auto-T4“	
	Absorbance (jednotky)	Zodpověďá koncentrace živých spermii (mil / $\mu$ l)*	Vypočtená koncentrace živých spermii (mil / $\mu$ l)	Vypočteno z celkového počtu buněk
1	0,233	4,32	3,65	1580
2	0,262	4,83	3,86	1667
3	---	---	3,96	1709
4	---	---	4,00	1731
<b>Průměr</b>	<b>0,247</b>	<b>4,57**</b>	<b>3,86**</b>	---
Směrodatná odchylka	0,020	0,36	0,156	---

\*Kalibrační křivka (Dostal 2006); \*\*Nesignifikantné (p = 0,195)

**Tab. 5.1:** Měření koncentrace živých spermii pomocí ručně kalibrovaného spektrofotometru a automatického počítačového přístroje. Koncentrace živých spermii v tom samém vzorku trubčím spermatu byla počítána pomocí spektrofotometru a automatického počítačového přístroje. Variance v rámci měření je vyjádřena směrodatní odchylkou. Absence statisticky signifikantního rozdílu mezi výsledky dvou metod byla ověřena pomocí Studentova t-testu (za podmínky různých rozptylů ve skupinách). Pravý sloupec představuje množství buněk sečtených v zorném poli automatického počítačového přístroje.



**Graf 5.6:** Kalibrační křivka ke spektrofotometru pro počítání koncentrace živých spermii ve vzorku. Na ose X je znázorněná koncentrace živých spermii ručně vypočtena pomocí mikroskopu. Na ose Y jsou znázorněné bezrozměrné jednotky absorbance získané z měření spektrofotometrem. Z těchto hodnot (znázorněno černými tečkami) je vypočítána kalibrační křivka, převzata od (Dostál, 2006). Přerušované šedé čáry znázorňují konfidenční interval (95 %). Černé tečkové čáry znázorňují predikční interval (95 %). Hodnota označená červenou tečkou je průnik hodnot získaných měřením téhož vzorku pomocí spektrofotometru a automatického počítačového přístroje buněk Cellometer Auto T4.

Z grafu 5.6 je zřejmé, že výsledky získané pomocí automatického počítačového přístroje Cellometer Auto T4 pracujícího na principu analýzy obrazu jsou porovnatelné s výsledky získanými spektrofotometrickou metodou. Zjistil jsem, že výsledek koncentrace živých spermií získaný z automatického počítačového přístroje Cellometer Auto T4 může být predikován výsledkem spektrofotometrického měření s pravděpodobností 95 % (červená tečka na grafu 5.6 se nachází v oblasti 95 % predikčního intervalu). Závěrem, automatický počítačový přístroj Cellometer Auto T4 může být použitý pro přesné počítání živých spermií ve vzorkách trubčího spermatu.

### **5.3 Využití metody průtokové cytometrie pro simultánní hodnocení strukturální a funkcionální integrity plazmatické membrány trubčích spermií**

#### **5.3.1 Optimalizace fluorescenčního barvení trubčích spermií pro průtokovou cytometrii**

Pro hodnocení strukturální integrity plazmatické membrány spermií jsem použil fluorescenční látku barvící jádro buňky s komerčním názvem DRAQ7. Tato látka proniká do jádra buněk se strukturálně poškozenou plazmatickou membránou. U živých buněk se strukturálně intaktní plazmatickou membránou tato látka do jádra neproniká.

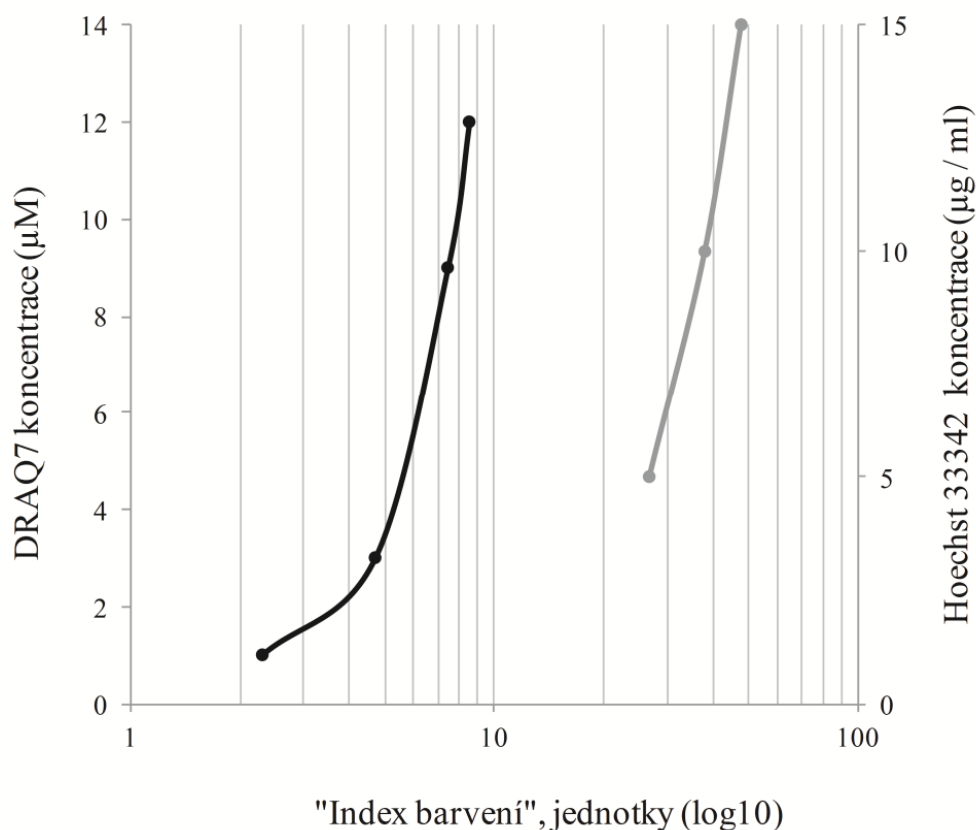
Pro odstranění nečistot (buněčné úlomky a jiný nebuněční částice; Obr. 5.6) z analýzy jsem použil fluorescenční látku pod komerčním názvem Hoechst 33342. Tato fluorescenční látka proniká do všech buněk (jak s intaktní tak s poškozenou membránou) a barví jejich jádro. Toto umožňuje analýzu jenom jaderných buněk ve vzorku.

Kombinace barvení obou látek umožňuje procentuální sečtení mrtvých (poškozených) buněk ze všech jaderných buněk daného vzorku.

Spermie obarvené kombinací těchto dvou fluorescenčních látek, v mých experimentech byly vystavené hypoosmotickému prostředí pro účel analýzy funkcionální integrity jejich plazmatických membrán (dle reakce "zkroucení bičíků"). Analýzu strukturální a funkcionální integrity plazmatických membrán jsem prováděl pomocí dvou komerčních

přístrojů: průtokový cytometr BD FACS Canto II a obrazový průtokový cytometr Amnis ImageStream X.

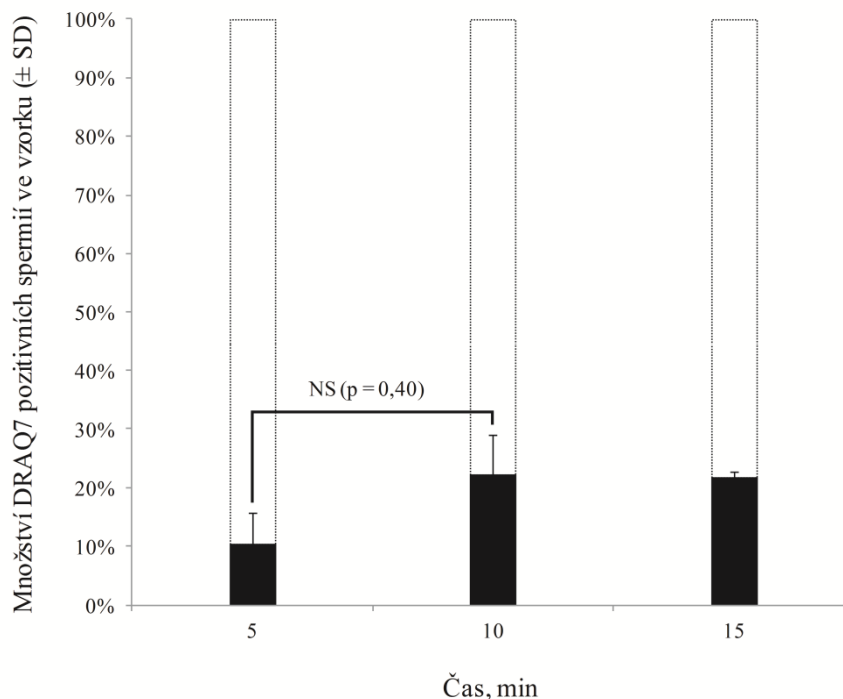
Graf 5.7 znázorňuje optimalizaci koncentrace fluorescenčních látek DRAQ7 a Hoechst 33342.



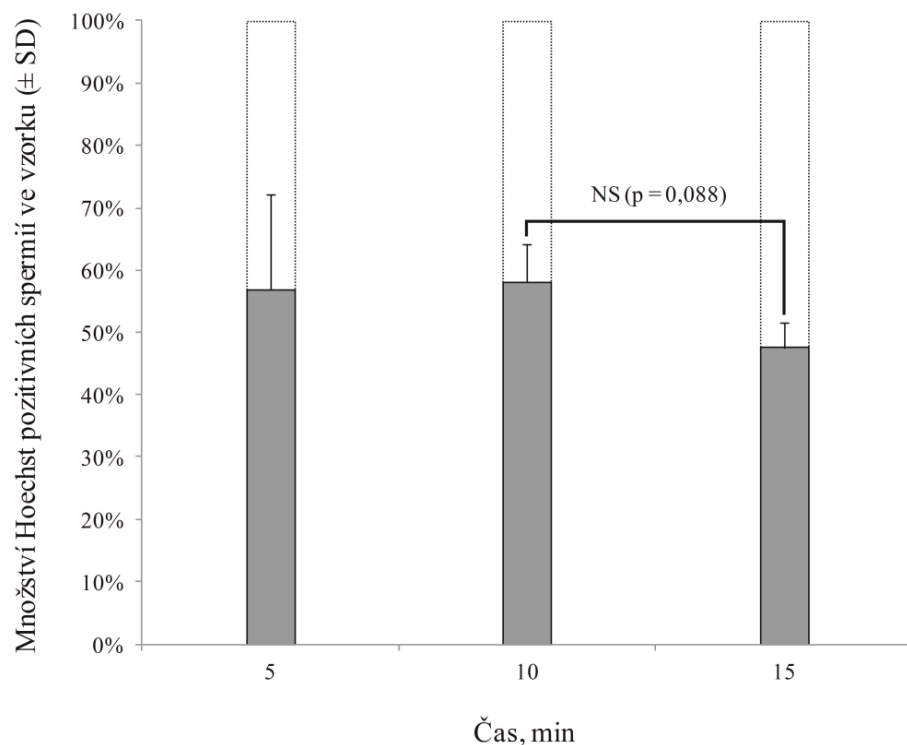
**Graf 5.7:** Optimalizace koncentrací fluorescenčních látek DRAQ7 a Hoechst 33342. Na ose X jsou znázorněny jednotky tzv. "indexu barvení" (parametr vyjadřující rozlišení mezi pozitivní a negativní populací obarvených buněk). Index barvení byl vypočten následovně: medián fluorescence pozitivní populace - medián fluorescence negativní populace /  $2 \times$  SD negativní populace. S růstem hodnoty indexu barvení roste kvalita rozlišení mezi pozitivní a negativní populací obarvených buněk. Na levé ose Y je znázorněna škála koncentrací pro fluorescenční látku DRAQ7 (v mikromolech); a na pravé ose Y je znázorněna škála koncentrací pro fluorescenční látku Hoechst 33342 (v mikrogramech na mililitr). Fluorescenční hodnoty pozitivních a negativních populací byly získány z obrazového cytometru Amnis ImageStream X.

Z dosažených výsledků optimalizace koncentrací pro fluorescenční látku DRAQ7 jsem se rozhodnul používat v mých experimentech koncentraci 12  $\mu$ M (nakolik této koncentraci odpovídá index barvení s nejvyšší hodnotou). Avšak pro fluorescenční látku Hoechst 33342, navzdory dosažených výsledků, jsem se rozhodnul používat v mých experimentech nejnižší koncentraci 5  $\mu$ g / ml (z důvodu možné cytotoxicity této chemické látky aplikované ve vysokých koncentracích).

Zjišťoval jsem minimální dobu postačující k obarvení spermií ve vzorku spermatu fluorescenčními látkami DRAQ7 a Hoechst 33342. Zjistil jsem, že barvení fluorescenčními látkami probíhá velice rychle (spermie jsou již obarvené za dobu 5 - 10 minut po přidání fluorescenčních látek). Toto znázorňuje graf 5.8 a 5.9.



**Graf 5.8:** Množství obarvených spermií v závislosti od času působení fluorescenční látky DRAQ7. Osa X znázorňuje čas (v minutách) působení fluorescenční látky DRAQ7 na vzorek spermatu. Osa Y znázorňuje procentuální množství spermií obarvených fluorescenční látkou DRAQ7 (vypočteno z celkového počtu Hoechst 33342 pozitivních jaderných buněk). Celkový počet Hoechst 33342 pozitivních jaderných buněk pro každý časový bod představuje výšku bílého a černého sloupce dohromady. Variance v rámci každého časového bodu je vyjádřena směrodatní odchylkou od střední hodnoty (N=2 pro každý časový bod). Rozdíl v množství obarvených spermií mezi časovým bodem 5 a 10 minut není signifikantní (Studentův t-test;  $p > 0,05$ ; za podmínky spárovaného výběru). Data jsou vygenerována z obrazového průtokového cytometru Amnis ImageStream X.



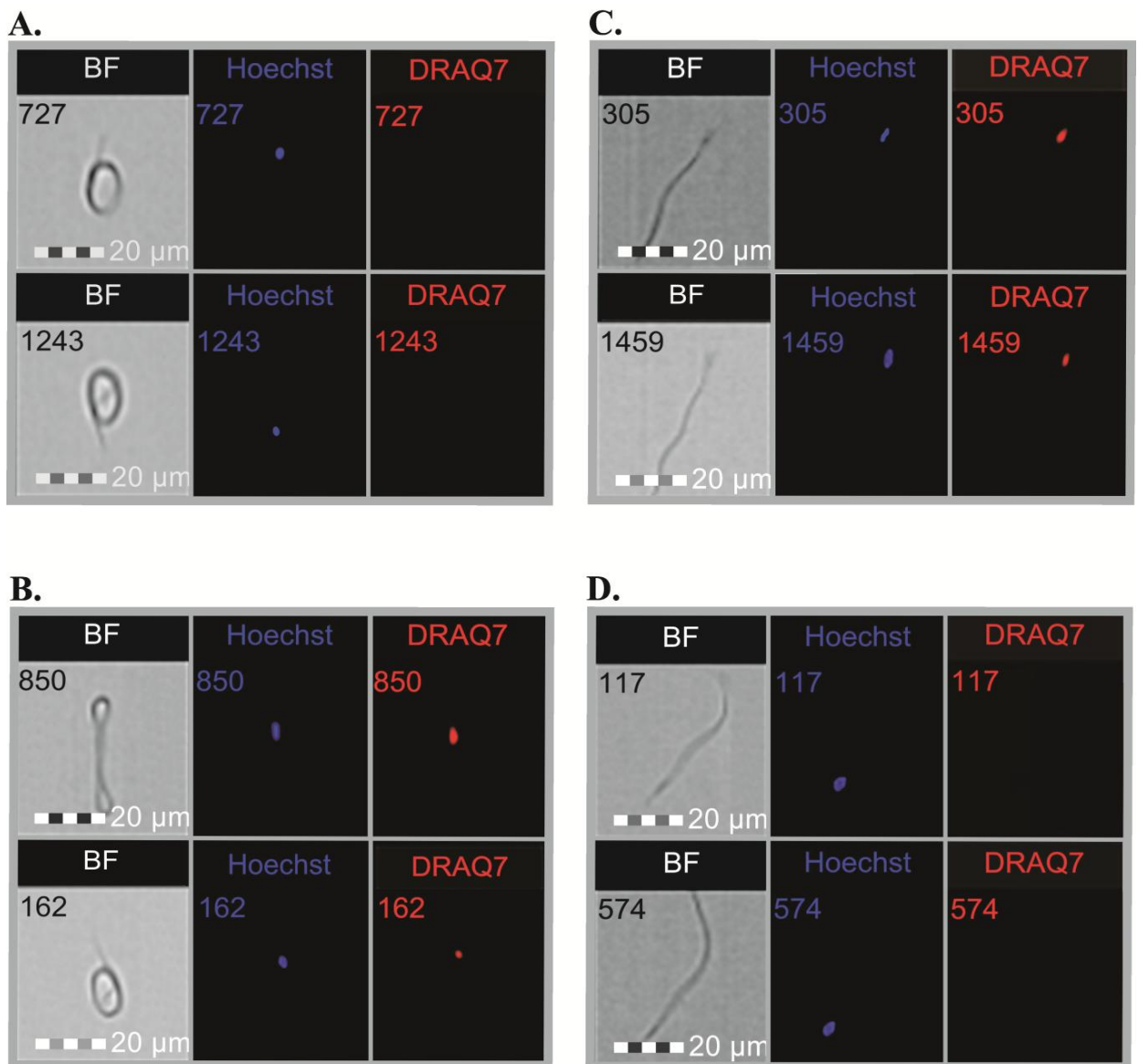
**Graf 5.9:** Množství obarvených spermií v závislosti od času působení fluorescenční látky Hoechst 33342. Osa X znázorňuje čas (v minutách) působení fluorescenční látky Hoechst 33342 na vzorek spermatu. Osa Y znázorňuje procentuální množství spermií obarvených fluorescenční látkou Hoechst 33342 (vypočteno z celkového počtu analyzovaných událostí ve vzorku). Celkový počet analyzovaných událostí ve vzorku pro každý časový bod představuje výšku bílého a šedého sloupce dohromady. Variance v rámci každého časového bodu je vyjádřena směrodatní odchylkou od střední hodnoty (N=2 pro každý časový bod). Rozdíl v množství obarvených spermií mezi časovým bodem 10 a 15 minut není signifikantní (Studentův t-test;  $p > 0,05$ ; za podmínky spárovaného výběru). Data jsou vygenerována z obrazového průtokového cytometru Amnis ImageStream X.

Z dosažených výsledků jsem usoudil, že minimálně postačující dobou působení fluorescenčních látek DRAQ7 a Hoechst 33342 na spermie pro jejich efektivní obarvení je doba 5 minut. Po této době již nedochází k žádnému dalšímu barvení spermií (nedochází k tzv. efektu "overstainingu" - přebytečnému barvení). V mých dalších experimentech jsem používal jako standardní dobu působení fluorescenčních látek dobu 7 minut (což zodpovídá době s mírnou časovou nadsázkou od minimálně postačující doby působení fluorescenčních látek).

V mých experimentech nebyla zkoumána závislost výsledků barvení od různých teplot. V experimentech byla vždy použita pokojová teplota (~ 25 °C) jako standardní teplota barvení spermií. To je z praktického důvodu nakolik jsem se chtěl zjednodušit techniku a vyhnout se použití termostatu.

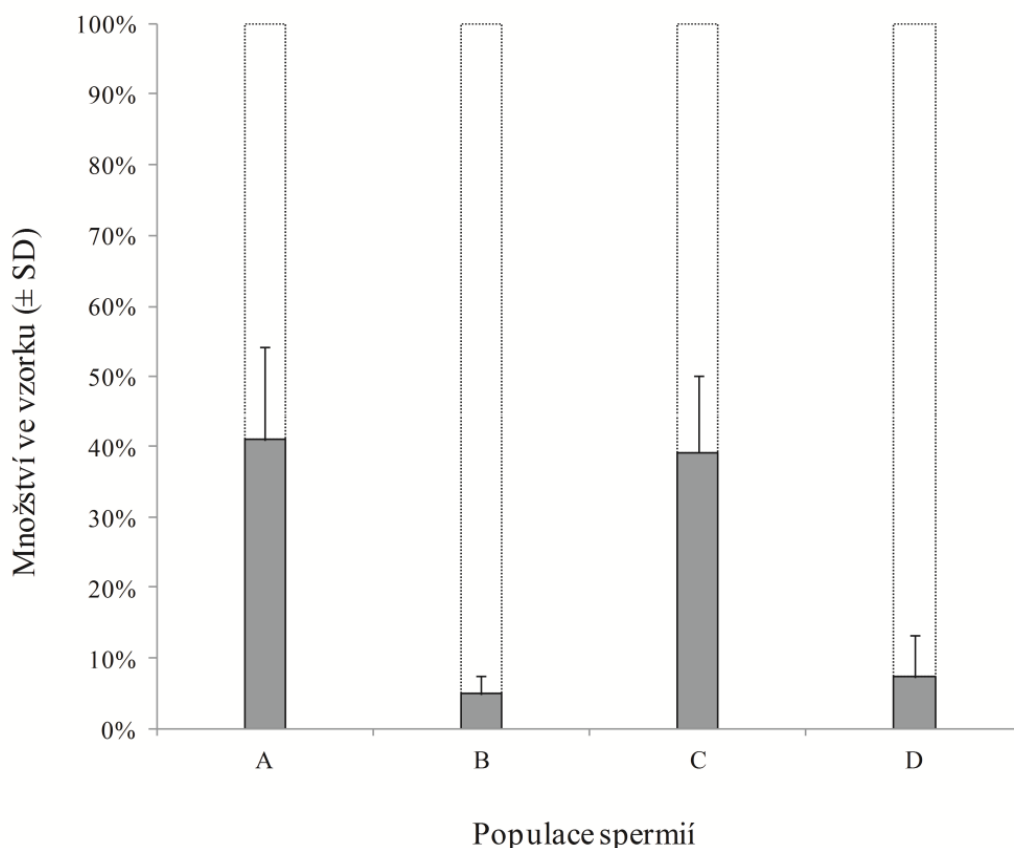
### **5.3.2 Hodnocení strukturální a funkcionální integrity plazmatických membrán trubčích spermií pomocí průtokové cytometrie**

Za použití obrazového průtokového cytometru jsem byl schopen pořídit mikrofotografický záznam čtyř populací spermií vznikajících kombinací těchto dvou metodik. Jedná se o populaci živých spermií (se strukturálně a funkcionálně intaktní plazmatickou membránou); o populaci mrtvých spermií (se strukturálně a funkcionálně poškozenou membránou); o populaci spermií se strukturálně intaktní, ale nefunkční plazmatickou membránou a o populaci umírajících spermií se strukturálně poškozenou membránou avšak s funkční plazmatickou membránou bičíku. Tyto čtyři populace jsou znázorněny v obrázku 5.5.



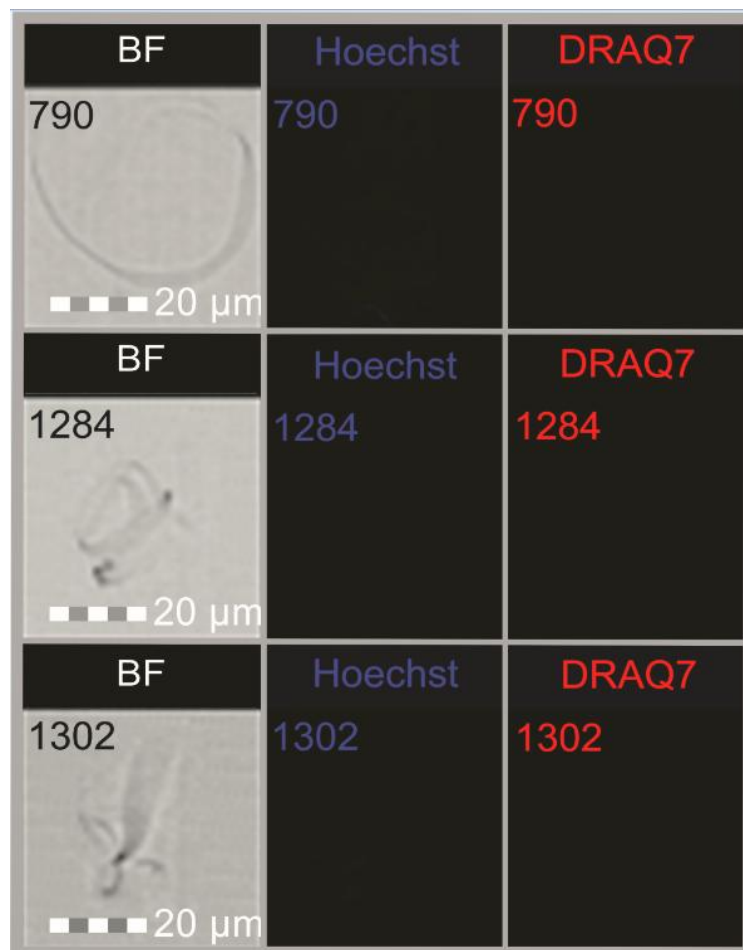
**Obr. 5.5:** Mikrofotografický záznam čtyř populací trubčích spermií vznikajících kombinací fluorescenčního barvení a hypoosmotického testu. Panel **A** znázorňuje populaci živých spermií se strukturálně a funkcionálně intaktní plazmatickou membránou. Panel **B** znázorňuje populaci umírajících spermií se strukturálně poškozenou membránou avšak s funkční plazmatickou membránou bičíku. Panel **C** znázorňuje populaci mrtvých spermií se strukturálně a funkcionálně poškozenou membránou. Panel **D** znázorňuje populaci spermií se strukturálně intaktní, ale nefunkční plazmatickou membránou. BF (Bright Field): mikrofotografie byla pořízená v tzv. světlém poli. Signál fluorescenčních látek Hoechst 33342 (barvící jádro všech buněk) a DRAQ7 (barvící jádro jen mrtvých a poškozených buněk) je znázorněn v modré a červené barvě. Z obrázku je patrná reakce spermií na hypoosmotické prostředí (panel **A** a **B**). Mikrofotografie spermií byly vyhotoveny přístrojem Amnis ImageStream X (obrazový průtokový cytometr); počítačová úprava mikrofotografií byla provedena v softwaru ImageJ.

Procentuální zastoupení výše popsaných čtyř populací znázorňuje graf 5.10.



**Graf 5.10:** Procentuální zastoupení populací spermií zjištěných pomocí kombinace fluorescenčního barvení a hypoosmotického testu. Osa X znázorňuje čtyři populace spermií: **A.** Populaci živých spermií se strukturálně a funkcionálně intaktní plazmatickou membránou; **B.** Populaci umírajících spermií se strukturálně poškozenou membránou avšak s funkční plazmatickou membránou bičíku; **C.** Populaci mrtvých spermií se strukturálně a funkcionálně poškozenou membránou; **D.** Populaci spermií se strukturálně intaktní, ale nefunkční plazmatickou membránou. Variance v rámci populace je vyjádřena směrodatnou odchylkou od střední hodnoty (N=5 pro každou populaci). Osa Y znázorňuje procentuální zastoupení množství uvedených populací spermií vypočteno z celkového počtu Hoechst 33342 pozitivních jaderných buněk. Celkový počet Hoechst 33342 pozitivních jaderných buněk pro každou populaci představuje výšku bílého a šedého sloupce dohromady. Výsledky jsou vygenerovány pomocí obrazového průtokového cytometru Amnis ImageStream X.





**Obr. 5.6:** Mikrofotografický záznam nečistot - buněčných úlomků a jiných nebuněčných částic (debrisu). Panel znázorňuje různé typy debrisu, který jsem pozoroval ve vzorcích spermií obarvených fluorescenčními látkami DRAQ7, Hoechst 33342 a vystavených hypoosmotickému prostředí. Debris neobsahuje jaderné elementy (není pozorovatelný signál fluorescenčních látek Hoechst 33342 a DRAQ7) a neprokuje specifickou reakci "zkroucení bičíku". BF (Bright Field): mikrofotografie byly pořízené v tzv. světlém poli. Mikrofotografie debrisu byly vyhotoveny přístrojem Amnis ImageStream X (obrazový průtokový cytometr). Počítačová úprava mikrofotografií byla provedena v softwaru ImageJ.

Závěrem uvedených měření je to, že kombinací dvou metodik (barvení fluorescenčními látkami a hypoosmotický test) jsem byl schopen simultánně vyhodnotit jak strukturální tak funkcionální integritu plazmatických membrán trubčích spermií.

Kombinace těchto dvou metodik zvyšuje přesnost hodnocení životaschopnosti trubčích spermií. Důkazem toho je moje pozorování populace spermií reagujících na

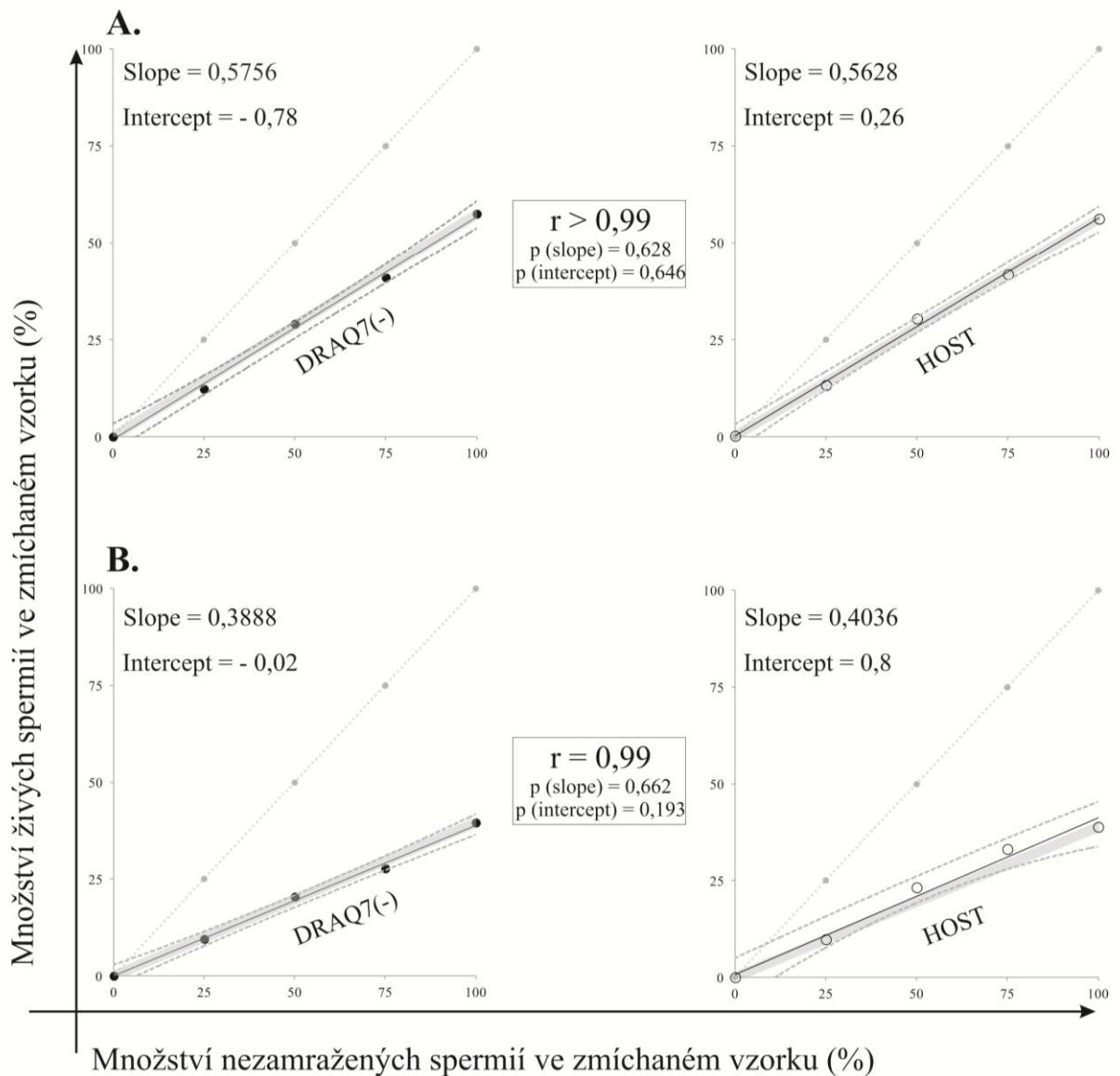
hypoosmotické prostředí zkroucením bičíku (co naznačuje, že se jedná o populaci živých buněk) avšak již obarvených fluorescenční látkou DRAQ7 (barvicí buňky mrtvé anebo poškozené). Procentuálně tato populace tvoří 5 % z celkového počtu Hoechst pozitivních (jaderných) buněk (směrodatná odchylka  $\pm 2,59$ ; vypočteno z měření pěti nezávislých vzorků trubčího spermatu). Při použití jenom hypoosmotického testu tato poměrně rozsáhlá populace umírajících spermií by byla připočtena k buňkám živým, což by zvětšilo chybovost metody.

### **5.3.3 Analýza korelace mezi testem hodnotícím strukturální integritu a testem hodnotícím funkcionální integritu plazmatické membrány trubčích spermií**

Obecně předpokládáno, že dva druhy testů, které jsou založeny na různých principech a používané pro hodnocení buď strukturální anebo funkcionální integrity plazmatických membrán spermií by měly být ve vztahu pozitivní korelace. Avšak jenom simultánní hodnocení strukturální a funkcionální integrity plazmatických membrán spermií v tomtéž vzorku spermatu nám umožní přesný výpočet zmíněné korelace.

V mých experimentech jsem se pokusil o přesný výpočet korelace mezi testem hodnotícím strukturální integritu plazmatických membrán spermií (založeném na použití fluorescenční látky DRAQ7) a testem hodnotícím funkcionální integritu plazmatických membrán spermií (hypoosmotický test) nakolik jsem měl možnost aplikovat oba tyto testy na ten samý vzorek spermatu.

Připravil jsem vzorky spermatu s různým známým poměrem živých a mrtvých spermií. Spermie usmrcené zamražením v tekutém dusíku bez přidání kryoprotektorů (mrtvé) jsem smíchal se spermiemi nezamraženými (živé). Každý z těchto smíchaných vzorků byl následně změřen oběma výše uvedenými testy za použití dvou různých typu průtokových cytometrů. Dosažené výsledky těchto měření jsou znázorněny v grafu 5.11.



**Graf 5.11:** Analýza korelace mezi testem hodnotícím strukturální integritu a testem hodnotícím funkční integritu plazmatické membrány trubčích spermií. Panel **A** znázorňuje výsledky dvou testů dosažených měření pomocí konvenčního průtokového cytometru (časový bod měření 3 minuty). Panel **B** znázorňuje totéž, ale za použití obrazového průtokového cytometru (časový bod měření ~7 minut). Levý graf v obou panelech znázorňuje výsledky testu strukturální integrity (výsledky byly získané hodnocením DRAQ7 negativních spermií ve vzorku; černé plné tečky). Pravý graf v obou panelech znázorňuje výsledky testu funkční integrity (výsledky tohoto testu byly získané hodnocením množství prstencovitých spermií ve vzorku; prázdní kroužky). DRAQ7 (-) a HOST (hypoosmotický test) jsou zkratky názvů použitých testů. Osa X každého grafu znázorňuje množství (v procentech) nezamražených spermií přidaných ke vzorku. Osa Y znázorňuje množství (v procentech) spermií vyhodnocených oběma testy jako spermie životaschopné. Přerušované šedé čáry znázorňují konfidenční interval (95 %). "Slope" - směrnice; "intercept" - regresní konstanta; r - korelační koeficient. Korelační koeficient mezi dvěma testy je vypočten porovnáním dvou trendů pomocí statistické analýzy ANCOVA (analýza kovariance).

Závěrem mých experimentů je přesný výpočet korelace mezi testem hodnotícím strukturální integritu a testem hodnotícím funkcionální integritu plazmatických membrán trubčích spermií. Statistickým výpočtem jsem zjistil, že tato korelace je pozitivní a vysoká ( $r = 0,99$ ). Stejné výsledky byly dosaženy za použití obou typů průtokových cytometrů.

## 6. DISKUZE

Prvním cílem mé diplomové práce bylo potvrzení vědecké hypotézy, že kvalita spermatu trubců včely medonosné může být hodnocena pomocí metody průtokové cytometrie. Mé experimentální výsledky tuto hypotézu plně potvrzují.

Pod kvalitou trubčího spermatu se obecně rozumí životaschopnost spermií, která je rutinně hodnocena testováním buď strukturální anebo funkcionální integrity plazmatické buněčné membrány. To je proto, že u trubců včely medonosné na rozdíl od jiných hospodářských zvířat pohyblivost spermií není jednoznačným parametrem hodnotícím jejich životaschopnost. V dnešní době je životaschopnost zpravidla testována na základě *in vitro* metod využívajících metodu fluorescenční mikroskopie. Avšak, principiálně, použití mikroskopického pozorování pro účel hodnocení kvality spermatu (a to jak u hmyzu, tak i u savců) není vhodným nakolik je vždycky toto pozorování limitováno malým počtem pozorovaných buněk. Pak extrapolace výsledků získaných z malého počtu buněk na celkový objem ejakulátu nemůže být důvěryhodný. Další nevýhodou mikroskopie je její časová náročnost, která může být spojena s určitou nepřesností hodnocení kvality spermatu. Kupříkladu v mých experimentech jsem pozoroval pokles v přesnosti vyhodnocení životaschopnosti trubčích spermií provedeného pomocí hypoosmotického (HOS) testu a to v případě vystavení vzorku spermatu hypoosmotickému prostředí delší dobu. V důsledku známé reakce spermií na hypoosmotické prostředí dochází nejdříve ke zkroucení axonémy bičíku (na základě čeho vyhodnocujeme životaschopnost) a pak v důsledku intenzivního nasávání extracelulární vody do nitra buňky dochází k prasknutí plazmatické membrány a k narovnání bičíku. Narovnání bičíku v některých mnou analyzovaných vzorkách bylo pozorovatelné již po 3 minutách od počátku vystavení spermií hypoosmotickému prostředí. Z důvodu určité časové náročnosti manuálního mikroskopického vyhodnocování spermatu (kdy doba vyhodnocování může trvat i více než 3 minuty) může nastat situace, při které bude podceněno množství spermií reagujících na hypoosmotické prostředí. Dalším možným problémem je vysychání suspenze spermatu na podložním sklíčku při dlouhém mikroskopickém vyšetřování vzorku.

Technika průtokové cytometrie umožňuje naopak rapidnu analýzu velkého množství spermií ve vzorku v průběhu několika vteřin. Běžná rychlost cytometrické analýzy je 10000 až 20000 spermií za vteřinu. Toto eliminuje jak problém extrapolace výsledků získaných z

analýzy frakce ejakulátu na celý ejakulát také i problém podceňování množství živých spermií ve vzorku, který je specifický pro mikroskopické vyšetření.

V dnešní době, s prudkým rozvojem elektroniky, optiky, technologie světelných zdrojů (laserů) a počítačové techniky, pořizovací cena průtokových cytometrů výrazně klesá a tyto přístroje (dříve striktně vědecké) se v současnosti dostávají také do oboru zemědělství.

I přes výše zmiňované výhody průtokové cytometrie momentálně existují jenom čtyři práce zabývající se hodnocením životaschopnosti trubčích spermií pomocí průtokové cytometrie: Chorbinski et al. (2006), Rzymiski et al. (2012), Tofilski et al. (2012) a Paynter et al. (2014). Avšak v těchto pracích životaschopnost byla analyzována jen na základě vyhodnocování strukturální integrity plazmatické membrány spermií. Na stranu druhou je známo, že pro správný průběh nezbytných reakcí procesu oplození (kapacitace spermií, akrosomální reakce a splynutí pohlavních buněk) je nutná plná funkčnost plazmatické membrány spermií. V současné době byla jenom ve dvou vědeckých pracích vyhodnocena životaschopnost trubčích spermií na základě analýzy funkcionální integrity jejich plazmatické membrány (Nur et al., 2012; Alcay et al., 2015).

V mé práci jsem se soustředil na zavedení testu pro hodnocení životaschopnosti trubčích spermií na základě simultánní analýzy strukturální a funkcionální integrity plazmatické membrány pomocí průtokové cytometrie. Test využívá výše uvedené výhody průtokové cytometrie a na rozdíl od již popsaných testů, umožňuje vyhodnocení kvality trubčího spermatu v širším fyziologickém měřítku, nakořik souběžně hodnotí dva parametry buněčné plazmatické membrány.

Druhým cílem mé práce bylo zavedení metody přístrojového počítání koncentrace živých spermií ve vzorku trubčího spermatu založenou na principu analýzy obrazu nahrazující metodu spektrofotometrickou. Spektrofotometrická metoda je relativně přesná (v porovnání s hemocytometrem), ale její nevýhodou je, že částice nespermatického původu a buněčné úlomky v analyzovaném vzorku mohou značně ovlivňovat výsledek počítání koncentrace živých spermií. To je proto, že při analýze vzorku na spektrofotometru nemáme možnost vizuální analýzy počítaných objektů. Další nevýhodou konvenční spektrofotometrické metody je její neschopnost počítání procentuálního zastoupení živých a mrtvých spermií ve vzorku.

Naopak při počítání koncentraci živých spermií ve vzorku spermatu pomocí metody založené na principu analýzy obrazu by byla pochopitelně eliminována nepřesnost spojená s ovlivněním výsledků částicemi nespermatického původu a buněčnými úlomky. Výhodou zavedené metody je relativně nízká pořizovací cena přístroje pro automatické počítání buněk.

V mých experimentech jsem použil běžně dostupný automatický přístroj k počítání buněk, který je schopen pořizovat digitální obraz počítaných objektů (fotografický snímek) a jeho následnou analýzu. Ale nevýhodou této metody (podobně jak tomu je u metody spektrofotometrické) je neschopnost přístroje odhadnout procentuální zastoupení živých a mrtvých spermií ve vzorku.

Obrazová průtoková cytometrie (která umožňuje jak analýzu obrazu, tak i výpočet procentuální zastoupení jednotlivých populací spermií ve vzorku) by byla nevhodnější alternativou nahrazující jak mikroskopickou tak i spektrofotometrickou analýzu spermatu. Avšak tato technologie je dnes ještě stále málo rozšířenou a to hlavně z důvodu vysoké pořizovací ceny přístrojového vybavení. Podobně jak v případě konvenční průtokové cytometrie, můžeme i u této technologii očekávat značný pokles v pořizovací ceně v blízké budoucnosti. Pak by se tato technologie stala opravdovým „zlatým standardem“ ve výzkumu zaměřenému na studium reprodukce včely medonosné. V mých experimentech jsem měl možnost tuto technologii vyzkoušet pro účel vyhodnocování kvality trubčího spermatu. Závěrem můžu konstatovat její nadřazenost nad konvenční mikroskopii, spektrofotometrií a průtokovou cytometrií pro výše uvedený účel.

## 7. ZÁVĚR

- 1) Byl zaveden nový test pro vyhodnocení kvality (životaschopnosti) trubčích spermií včely medonosné. Test využívá výhody průtokové cytometrie a simultánně vyhodnocuje strukturální a funkcionální integritu plazmatické membrány spermií.
- 2) Pro účel vyhodnocování strukturální integrity buněčné plazmatické membrány trubčích spermií bylo použité nové fluorescenční barvivo pod komerčním názvem DRAQ7. Toto barvivo je netoxickou alternativou barviva propidium iodid.
- 3) Pro účel vyhodnocování funkcionální integrity buněčné plazmatické membrány trubčích spermií byl použitý tzv. hypoosmotický (HOS) test, který je rutinně používaný pro hodnocení kvality spermatu hospodářských zvířat a člověka.
- 4) Byly optimalizovány podmínky simultánního vyhodnocování strukturální a funkcionální integrity plazmatické membrány trubčích spermií.
- 5) Byla zavedená nová metoda automatického počítání koncentrace živých spermií ve vzorku trubčího spermatu, která by mohla nahradit méně přesnou spektrofotometrickou metodu.
- 6) Pro účel vyhodnocování životaschopnosti trubčích spermií byla optimalizována technika obrazové průtokové cytometrie.



## 8. SEZNAM LITERATURY

ABED-ELMDOUST, A., FARAHMAND, H., MOJAZI-AMIRI, B., RAFIEE, G., RAHIMI, R. 2015. Novel droplet vitrification combined with fish antifreeze protein type III enhances cryoprotection of semen in wild endangered Persian sturgeon *Acipenser persicus* (Borodin, 1897). *Aquaculture Research*, 46, 2392-2397.

AHMADI, A., NG, S.G. 1997. The single sperm curling test, a modified hypo-osmotic swelling test, as a potential technique for the selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility*, 68(2), 346-350.

AKAGI, J., KORDON, M., ZHAO, H., MATUSZEK, A., DOBRUCKI, J., ERRINGTON, R., SMITH, P.J., TAKEDA, K., DARZYNKIEWICZ, Z., WLODKOWIC, D. 2013. Real-time cell viability assays using a new anthracycline derivative DRAQ7(R) [online]. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 83(2), 227-234. Dostupné z: 10.1002/cyto.a.22228

ALÇAY, S., ÜSTÜNER, B., ÇAKMAK, I., ÇAKMAK, S., NUR, Z. 2015. Farklı Kriyoprotektanların Eritme Sonrası Arı Sperm Kalitesi Üzerine Etkileri [online]. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. Dostupné z: 10.9775/kvfd.2014.11515

BAHAMONDES, L., FAZANO, F., de LUCIO, M.A., NEVES, P.A., BOTTCHER, L.F., LORENZETTI, G.B. 2001. Evaluation of human sperm membrane integrity using the water test and the hypoosmotic test. *Andrologia*, 33(2), 75-77.

BEIRAO, J., ZILLI, L., VILELLA, S., CABRITA, E., SCHIAVONE, R., HERRAEZ, M.P. 2012. Improving sperm cryopreservation with antifreeze proteins: effect on gilthead seabream (*Sparus aurata*) plasma membrane lipids [online]. *Biology of reproduction*, 86(2), 59. Dostupné z: 10.1095/biolreprod.111.093401

BEN ABDELKADER, F., KAIRO, G., TCHAMITCHIAN, S., COUSIN, M., SENECHAL, J., CRAUSER, D., VERMANDERE, J.P., ALAUX, C., LE CONTE, Y., BELZUNCES, L.P., BARBOUCHE, N., BRUNET, J.L. 2014. Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions [online]. *Apidologie*, 45(2), 215-223. Dostupné z: 10.1007/s13592-013-0240-7

BEYE, M., HASSELMANN, M., FONDRK, M.K., PAGE, R.E., OMHOLT, S.W. 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell*, 114(4), 419-429.

BIENKOWSKA, M., LOC, K., PANASIUK, B., WEGRZYNOWICZ, P., GERULA, D. 2011. Effect of semen dose and application on the performance of instrumentally inseminated honeybee queens kept with 25 worker bees. *Journal of Apicultural Science*, 55(1), 99-109.

BURLEY, L.M., FELL, R.D., SAACKE, R.G. 2008. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa incubated at room temperature from drones exposed to miticides. *Journal of economic entomology*, 101(4), 1081-1087.

CAMARGO, C.A. 1975. Biology of the Spermatozoon of *Apis Mellifera*. I. Influence Of Diluents and pH [online]. *Journal of Apicultural Research*, 14(3-4), 113-118. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00218839.1975.11099813?journalCode=tjar20>

- CELEGHINI, E.C.C., ARRUDA, R.P.D., ANDRADE, A.F.C., NASCIMENTO, J., RAPHAEL, C.F., RODRIGUES, P.H.M. 2008. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin [online]. *Animal Reproduction Science*, 104(2), 119-131. Dostupné z: 10.1016/j.anireprosci.2007.02.001
- CHORBINSKI, P., WLODARCZYK M., TOMASZEWSKA B. 2006. Estimation of semen vitality located in spermatheca receptaculum seminis in queens. [online]. Dostupné z: <http://www.udmbee.narod.ru/LIBRARY/INFO/FOTO/stend2006-5.jpg>
- COBEY, S.W., TARPY, D.R., WOYKE, J. 2013. Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens [online]. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-18. Dostupné z: 10.3896/IBRA.1.52.4.09
- COLLINS A.M., DONOGHUE, A.M. 1999. Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. *Theriogenology*, 51(8), 1513-1523.
- COLLINS, A.M. 2000a. Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens [online]. *Apidologie*, 31(3), 421-429. Dostupné z: 10.1051/apido:2000132
- COLLINS, A.M. 2000b. Survival of Honey Bee (Hymenoptera [online]. *Apidae*) Spermatozoa Stored at Above-Freezing Temperatures. *Journal of Economic Entomology*, 93(3), 568-571. Dostupné z: 10.1603/0022-0493-93.3.568
- COLLINS, A.M. 2004. Sources of variation in the viability of honey bee, *Apis mellifera* L., semen collected for artificial insemination [online]. *Invertebrate Reproduction & Development*, 45(3), 231-237. Dostupné z: 10.1080/07924259.2004.9652594
- CUNHA, A.T.M., CARVALHO, J.O., DODE, M.A.N. 2015. Techniques for sperm evaluation using fluorescent probes [online]. *Semina: Ciências Agrárias*, 36(6Supl2), 4365-4376 [viewed 16 March 2016]. Dostupné z: 10.5433/1679-0359.2015v36n6Sup2p4365
- CZEKOŃSKA, K., CHUDA-MICKIEWICZ, B., SAMBORSKI, J. 2015. Quality of honeybee drones reared in colonies with limited and unlimited access to pollen [online]. *Apidologie*, 46(1), 1-9. Dostupné z: 10.1007/s13592-014-0296-z
- DAVIES, P.L., BAARDSNES, J., KUIPER, M.J., WALKER, V.K. 2002. Structure and function of antifreeze proteins [online]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1423), 927-935. Dostupné z: 10.1098/rstb.2002.1081
- DIDION A. 2015. Use of Amnis ImageStreamX technology for phenotyping boar sperm. [online]. VIIIth International Conference on Boar Semen Preservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(Supplement 2), 114-115. Dostupné z: 10.1111/rda.12559
- DINNYES, A., LIU, J., NEDAMBALE, T.L. 2007. Novel gamete storage [online]. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(6), 719. Dostupné z: 10.1071/RD07035
- DITTRICH, W., GOHDE, W. 1969. Impulse fluorometry of single cells in suspension. *Zeitschrift für Naturforschung. Teil B: Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie*, 24(3), 360-361.
- DOSTÁL J. 2006. Hodnocení kvality spermatu trubců včely medonosné. Diplomová práce. Praha.

- DREVIUS L.O., ERIKSSON, H. 1966. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Experimental cell research*, 42(1), 136-156.
- ELLWART, J.W., DÖRMER, P. 1990. Vitality measurement using spectrum shift in Hoechst 33342 stained cells [online]. *Cytometry*, 11(2), 239-243. Dostupné z: 10.1002/cyto.990110204
- GADEA-MATEOS, J. 2016. Reakce spermií na hypoosmotické prostředí. Osobní sdělení.
- GARNER, D.L., JOHNSON, L.A., YUE, S.T., ROTH, B.L., HAUGLAND, R.P. 1994. Dual DNA Staining Assessment of Bovine Sperm Viability Using SYBR-14 and Propidium Iodide [online]. *Journal of Andrology*, 15. Dostupné z: 10.1002/j.1939-4640.1994.tb00510.x
- GIBSON, M.I. 2010. Slowing the growth of ice with synthetic macromolecules [online]. *Beyond antifreeze(glyco) proteins. Polymer Chemistry*, 1(8), 1141. Dostupné z: 10.1039/c0py00089b
- HARBO, J.R. 1975. Measuring the Concentration of Spermatozoa from Honey Bees with Spectrophotometry [online]. *Annals of the Entomological Society of America*, 68(6), 1050-1052. Dostupné z: 10.1093/aesa/68.6.1050
- HARBO, J.R. 1986. Sterility in honey bees caused by dimethyl sulfoxide. *The Journal of heredity*, 77(2), 129-130.
- HOLT, W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal reproduction science*, 62(1-3), 3-22.
- HOPKINS, B.K., HERR, C. 2010. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa [online]. *Apidologie*, 41(5), 548-556. Dostupné z: 10.1051/apido/20010006
- HOSSAIN, M.S., JOHANNISSON, A., WALLGREN, M., NAGY, S., SIQUEIRA, A.P., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality [online]. *State of the art. Asian Journal of Andrology*, 13(3), 406-419. Dostupné z: 10.1038/aja.2011.15
- ISACHENKO, V., ISACHENKO, E., KATKOV, I.I., MONTAG, M., DESSOLE, S., NAWROTH, F., VAN DER VEN, H. 2004. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability [online]. *Biology of reproduction*, 71(4), 1167-1173. Dostupné z: 10.1095/biolreprod.104.028811
- JEYENDRAN, R.S., VAN DER VEN, H., PEREZ-PELAEZ, M., CRABO, B.G., ZANEVELD, L.J.D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics [online]. *Reproduction*, 70(1), 219-228. Dostupné z: 10.1530/jrf.0.0700219
- JOHN R.H., WILLIAMS, J.L. 1987. Effect of above freezing temperatures on temporary storage of honeybee spermatozoa [online]. *Journal of Apicultural Research*, 26(1), 53-55. Dostupné z: <http://www.ibrabee.org.uk/ibra-bee-research-journals-publications/bee-research-journal-of-apicultural-research-20-29/item/1863-effect-of-above-freezing-temperatures-on-temporary-storage-of-honeybee-spermatozoa>

- KING, M., EUBEL, H., MILLAR, A.H., BAER, B. 2011. Proteins within the seminal fluid are crucial to keep sperm viable in the honeybee *Apis mellifera* [online]. *Journal of Insect Physiology*, 57(3), 409-414. Dostupné z: 10.1016/j.jinsphys.2010.12.011
- KOPEIKA, J., THORNHILL, A., KHALAF, Y. 2015. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence [online]. *Human Reproduction Update*, 21(2), 209-227. Dostupné z: 10.1093/humupd/dmu063
- KRISHAN, A. 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *The Journal of cell biology*, 66(1), 188-193.
- KURENNOI N.M. 1954. Structure and vitality of drone spermatozoa. *Pchelovodstvo*, 31(10), 41-44.
- LENSKY Y., SCHINDLER, H. 1967. MOTILITY AND REVERSIBLE INACTIVATION OF HONEYBEE SPERMATOZOA IN VIVO AND IN VITRO [online]. *Les Annales de l'Abeille*, 10(1), 5-16. Dostupné z: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00890245/document>
- LOCKE, S.J. PENG, Y. 1993. The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*) [online]. *Physiological Entomology*, 18(2), 144-148. Dostupné z: 10.1111/j.1365-3032.1993.tb00461.x
- LOCKE, S.J., PENG, Y.-S., CROSS, N.L. 1990. A supravital staining technique for honey bee spermatozoa [online]. *Physiological Entomology*, 15(2), 187-192 [viewed 7 March 2016]. Dostupné z: 10.1111/j.1365-3032.1990.tb00506.x
- LOMEO A.M., GIAMBERSIO A.M. 1991. 'Water-test': a simple method to assess sperm-membrane integrity. *International journal of andrology*, 14(4), 278-282.
- MACKIE, A.R., JAMES, P.S., LADHA, S., JONES, R. 2001. Diffusion barriers in ram and boar sperm plasma membranes: directionality of lipid diffusion across the posterior ring. *Biology of reproduction*, 64(1), 113-119.
- MCDONALD J. 2014. *Handbook of Biological Statistics* [online]. 7 September 2015, 12:00 [viewed 10 April 2016]. Dostupné z: <http://www.biostathandbook.com/index.html>
- MENESES, H.M., KOFFLER, S., FREITAS, B.M., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., JAFFÉ, R. 2015. Assessing Sperm Quality in Stingless Bees [online]. *Sociobiology*, 61(4) [viewed 3 March 2016]. Dostupné z: 10.13102/sociobiology.v61i4.517-522
- MOHAMED M.S.A. 2015. Slow cryopreservation is not superior to vitrification in human spermatozoa; an experimental controlled study. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 13(10), 633-644.
- MUKAI, C., OKUNO, M. 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement [online]. *Biology of reproduction*, 71(2), 540-547. Dostupné z: 10.1095/biolreprod.103.026054
- NIÑO, E.L., CAMERON W.J. 2015. Improving the future of honey bee breeding programs by employing recent scientific advances [online]. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 163-169. Dostupné z: 10.1016/j.cois.2015.05.005

- NUR, Z., SEVEN-CAKMAK, S., USTUNER, B., CAKMAK, I., ERTURK, M., ABRAMSON, C.I., SAĞIRKAYA, H., SOYLU, M.K. 2012. The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm [online]. *Apidologie*, 43(1), 31-38. Dostupné z: [10.1007/s13592-011-0073-1](https://doi.org/10.1007/s13592-011-0073-1)
- NYNCA, J., DIETRICH, G.J., LISZEWSKA, E., JUDYCKA, S., KAROL, H., DOBOSZ, S., KROM, J., CIERESZKO, A. 2016. Usefulness of a portable flow cytometer for sperm concentration and viability measurements of rainbow trout spermatozoa [online]. *Aquaculture*, 451, 353-356 [viewed 16 March 2016]. Dostupné z: [10.1016/j.aquaculture.2015.09.027](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.09.027)
- OSORIO-MELÉNDEZ, C., FINOL-PARRA, G., NAVA-TRUJILLO, H., QUINTERO-MORENO, A., RUBIO-GUILEN J., CARILLO-FERNANDEZ, F. 2011. Use of water test to assess the sperm membrane functional integrity in cryopreserved bull semen [online]. *Revista Científica*, 3, 211-214. Dostupné z: <http://www.redalyc.org/pdf/959/95918239004.pdf>
- PAGE, R.E., PENG J.R., PENG, C.Y. 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental gerontology*, 36(4-6), 695-711.
- PAYNTER, E., BAER-IMHOOF, B., LINDEN, M., LEE-PULLEN, T., HEEL, K., RIGBY, P., BAER, B. 2014. Flow cytometry as a rapid and reliable method to quantify sperm viability in the honeybee *Apis mellifera* [online]. *Cytometry Part A*, 85(5), 463-472. Dostupné z: [10.1002/cyto.a.22462](https://doi.org/10.1002/cyto.a.22462)
- PEGG, D.E. 2015. Principles of Cryopreservation. In: J.G. DAY and G. STACEY, eds. *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. New York: Humana Press, pp. 3-19.
- PEÑA F.J. 2015. Multiparametric flow cytometry: a relevant tool for sperm function evaluation [online]. *Anim. Reprod*, 12(3), 351-355. Dostupné z: [http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v12/v12n3/page351-355%20\(AR757\).pdf](http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v12/v12n3/page351-355%20(AR757).pdf)
- PENG, C.Y.S., YIN, C.M., YIN, L.R.S. 1992. Effect of rapid freezing and thawing on cellular integrity of honey bee sperm [online]. *Physiological Entomology*, 17(3), 269-276. Dostupné z: [10.1111/j.1365-3032.1992.tb01021.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1992.tb01021.x)
- PENG, C.Y.S., YIN, C.M., YIN, L.R.S. 1993. Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera*, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation [online]. *Physiological Entomology*, 18(1), 93-101. Dostupné z: [10.1111/j.1365-3032.1993.tb00454.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1993.tb00454.x)
- PENG, Y.S., LOCKE, S.J., NASR, M.E., LIU, T.P., MONTAGUE, M.A. 1990. Differential staining for live and dead sperm of honey bees [online]. *Physiological Entomology*, 15(2), 211-217. Dostupné z: [10.1111/j.1365-3032.1990.tb00509.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1990.tb00509.x)
- PEREZ-LLANO, B., SALA, R., REGUERA, G., GARCIA-CASADO, P. 2009. Changes in subpopulations of boar sperm defined according to viability and plasma and acrosome membrane status observed during storage at 15 degrees C [online]. *Theriogenology*, 71(2), 311-317. Dostupné z: [10.1016/j.theriogenology.2008.07.023](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.023)
- PETRUNKINA, A.M., HARRISON, R.A.P. 2011. Cytometric solutions in veterinary andrology: Developments, advantages, and limitations [online]. *Cytometry Part A*, 79A(5), 338-348. Dostupné z: [10.1002/cyto.a.21044](https://doi.org/10.1002/cyto.a.21044)

- PETTIS, J.S., RICE, N., JOSELOW, K., VANENGELSDORP, D., CHAIMANEE, V., NIEH, J.C. 2016. Colony Failure Linked to Low Sperm Viability in Honey Bee (*Apis mellifera*) Queens and an Exploration of Potential Causative Factors [online]. PLOS ONE, 11(2), e0147220. Dostupné z: 10.1371/journal.pone.0147220
- PICOT, J., GUERIN, C.L., VAN KIM, C., BOULANGER, C.M. 2012. Flow cytometry [online]. Retrospective, fundamentals and recent instrumentation. Cytotechnology, 64(2), 109-130. Dostupné z: 10.1007/s10616-011-9415-0
- POLGE, C., SMITH, A.U., PARKES, A.S. 1949. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures [online]. Nature, 164(4172), 666. Dostupné z: 10.1038/164666a0
- POOLE, H.K., EDWARDS, J.E. 1972. Effect of toxic and non-toxic sugars on motility of honey bee (*Apis mellifera* L.) spermatozoa [online]. Experientia, 28(2), 235. Dostupné z: 10.1007/BF01935780
- PRATHALINGAM, N.S., HOLT, W.V., REVELL, S.G., MIRCZUK, S., FLECK, R.A., WATSON, P.F. 2006. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw [online]. Theriogenology, 66(8), 1894-1900. Dostupné z: 10.1095/biolreprod.111.093401
- RINEHART J., YOCUM G. 2015. Cryopreservation of Bee Germplasm Research [online]. Project Number: 3060-21000-041-00. Dostupné z: [http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN\\_NO=428476](http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=428476)
- ROUSSEAU, A., FOURNIER, V., GIOVENAZZO, P. 2015. *Apis mellifera* (Hymenoptera [online]. Apidae) drone sperm quality in relation to age, genetic line, and time of breeding. The Canadian Entomologist, 147(06), 702-711. Dostupné z: 10.4039/tce.2015.12
- RZYMSKI, P., LANGOWSKA, A., FLISZKIEWICZ, M., PONIEDZIAŁEK, B., KARCZEWSKI, J., WIKTOROWICZ, K. 2012. Flow cytometry as an estimation tool for honey bee sperm viability [online]. Theriogenology, 77(8), 1642-1647. Dostupné z: 10.1016/j.theriogenology.2011.12.009
- SELLEM, E., BROEKHUIJSE, M., CHEVRIER, L., CAMUGLI, S., SCHMITT, E., SCHIBLER, L., KOENEN, E. 2015. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen [online]. Theriogenology, 84(9), 1447-1454.e5. Dostupné z: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.035
- SCHURMANN, A., AXER, H., SCHEEPERS, A., DOEGE, H., JOOST, H.G. 2002. The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa [online]. Cell and tissue research, 307(2), 237-242. Dostupné z: 10.1007/s00441-001-0499-2
- SILVA, P.F., GADELLA, B.M. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells [online]. Theriogenology, 65(5), 958-978. Dostupné z: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.010
- STURUP, M., BAER-IMHOOF, B., NASH, D.R., BOOMSMA, J.J., BAER, B. 2013. When every sperm counts [online]. Factors affecting male fertility in the honeybee *Apis mellifera*. Behavioral Ecology, 24(5), 1192-1198. Dostupné z: 10.1093/beheco/art049

- TARPY, D.R., KELLER, J.J., CAREN, J.R., DELANEY, D.A. 2012. Assessing the Mating 'Health' of Commercial Honey Bee Queens [online]. *Journal of Economic Entomology*, 105(1), 20-25 [viewed 3 March 2016]. Dostupné z: 10.1603/EC11276
- TAYLOR, M.A., GUZMÁN-NOVOA, E., MORFIN, N., BUHR, M.M. 2009. Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios [online]. *Theriogenology*, 72(2), 149-159. Dostupné z: 10.1016/j.theriogenology.2009.02.012
- TITERA D. 2015. Technika odběru trubčího spermatu. Osobní sdělení.
- TOFILSKI, A., CHUDA-MICKIEWICZ, B., CZEKOŃSKA, K., CHORBIŃSKI, P. 2012. Flow cytometry evidence about sperm competition in honey bee (*Apis mellifera*) [online]. *Apidologie*, 43(1), 63-70. Dostupné z: 10.1007/s13592-011-0089-6
- VERMA, L. 1973. An ionic basis for a possible mechanism of sperm survival in the spermatheca of the queen honey bee (*Apis mellifera* L.) [online]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 44(4), 1325-1331. Dostupné z: 10.1016/0300-9629(73)90272-7
- WEGENER, J., BIENEFELD, K. 2012. Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens [online]. *Theriogenology*, 77(3), 600-607. Dostupné z: 10.1016/j.theriogenology.2011.08.036
- WEGENER, J., MAY, T., KAMP, G., BIENEFELD, K. 2014a. A successful new approach to honeybee semen cryopreservation [online]. *Cryobiology*, 69(2), 236-242. Dostupné z: 10.1016/j.cryobiol.2014.07.011
- WEGENER, J., MAY, T., KAMP, G., BIENEFELD, K. 2014b. New Methods and Media for the Centrifugation of Honey Bee (Hymenoptera [online]. Apidae) Drone Semen. *Journal of Economic Entomology*, 107(1), 47-53. Dostupné z: 10.1603/EC13159
- WEGENER, J., MAY, T., KNOLLMANN, U., KAMP, G., MÜLLER, K., BIENEFELD, K. 2012. In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honey bee semen [online]. *Cryobiology*, 65(2), 126-131. Dostupné z: 10.1016/j.cryobiol.2012.04.010
- WOWK, B. 2010. Thermodynamic aspects of vitrification [online]. *Cryobiology*, 60(1), 11-22. Dostupné z: 10.1016/j.cryobiol.2009.05.007
- WOYKE, J. 1984. ULTRASTRUCTURE OF SINGLE AND MULTIPLE DIPLOID HONEYBEE SPERMATOZOA [online]. *Journal of Apicultural Research*, 23(3), 123-135. Dostupné z: <http://www.ibrabee.org.uk/index.php/ibra-bee-research-journals-publications/bee-research-journal-of-apicultural-research-20-29/item/2482/2482>
- WOYKE, J. 2008. Why the eversion of the endophallus of honey bee drone stops at the partly everted stage and significance of this [online]. *Apidologie*, 39(6), 627-636. Dostupné z: 10.1051/apido:2008046
- YOON, S.-J., KWON, W.-S., RAHMAN, M.S., LEE, J.-S., PANG, M.-G., YAN, W. 2015. A Novel Approach to Identifying Physical Markers of Cryo-Damage in Bull Spermatozoa [online]. *PLOS ONE*, 10(5), e0126232. Dostupné z: 10.1371/journal.pone.0126232

ZHU, H., MAVANDADI, S., COSKUN, A.F., YAGLIDERE, O., OZCAN, A. 2011. Optofluidic fluorescent imaging cytometry on a cell phone [online]. *Analytical chemistry*, 83(17), 6641-6647. Dostupné z: [10.1021/ac201587a](https://doi.org/10.1021/ac201587a)