

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Predikce fertilizační schopnosti inseminačních dávek
kohoutů pomocí laboratorních *in vitro* analýz**

Bakalářská práce

Matěj Horský

Chov hospodářských zvířat

Ing. Filipp Georgijevič Savvulidi, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne _____

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Filipp Georgijevič Savvulidimu, Ph.D. za pomoc a užitečné rady, které vedly k sepsání této práce, a jeho čas který věnoval pro tvorbu mé bakalářské práce.

Predikce fertilizační schopnosti inseminačních dávek kohoutů pomocí laboratorních *in vitro* analýz

Souhrn

Vědci se snaží vyvinout laboratorní testy, které by přesně předpověděly fertilizační schopnost vzorku spermatu. Tento cíl se však zdá nedosažitelný a s největší pravděpodobností ho bude velmi těžké dosáhnout kvůli komplexní povaze problému. Část problému vyplývá z množství atributů, kterých musí spermie pro oplodnění vajíčka dosáhnout, a z toho, jak mohou laboratorní testy vyhodnotit všechny tyto atributy současně. Pro hodnocení kvality spermatu se nejčastěji používá procento pohyblivých spermií ve vzorku, vyhodnoceno pomocí systému CASA (počítačem podporovaná analýza spermií). Tento test však příliš nekoreluje s fertilitou vzorků spermatu, protože hodnotíme pouze jeden atribut spermií, a to je pohyblivost. Dalším často používaným systémem je průtoková cytometrie, pomocí které můžeme vyhodnotit více atributů naráz.

Tato bakalářské práce se snaží přijít na systém hodnocení kvality vzorku spermií, který nejvíce koreluje s fertilizační schopností inseminačních dávek kohoutů.

V literární rešerši jsou popsány základní procesy potřebné pro získání inseminační dávky, jako je odběr ejakulátu, ředění ejakulátu a následná výroba inseminační dávky. A dále jsou popsány nejčastěji používané systémy a testy pro zjištění jejich kvality (CASA, průtoková cytometrie a funkční testy spermií) a jejich korelace s fertilizační schopností.

Klíčová slova: inseminace, inseminační dávky kohoutu, průtoková cytometrie, CASA, přežitelnost

Prediction of the fertilizing capacity of rooster insemination doses by means of laboratory-based in vitro assays

Summary

Scientists are trying to develop laboratory tests that accurately predict the fertilizing ability of a sperm sample. However, this goal seems unattainable and will most likely be very difficult to achieve due to the complexity of the problem. Part of the problem stems from the number of attributes a sperm must achieve to fertilize an egg, and how lab tests can evaluate all of these attributes simultaneously. The percentage of motile sperm in the sample, evaluated using the CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) system, is most often used to assess sperm quality. However, this test does not correlate very well with the fertility of the sperm samples because we only evaluate one sperm attribute, which is motility. another frequently used system is flow cytometry, with the help of which we can evaluate several attributes at once.

This bachelor's thesis tries to come up with a system for evaluating the quality of the sperm sample, which is most correlated with the fertilizing abilities of insemination doses of roosters.

The literature review describes the basic processes required for obtaining insemination doses, such as collection of ejaculate, solution of ejaculate and subsequent production of insemination doses. Furthermore, the most frequently used systems and tests are used to determine their quality (CASA, flow cytometry and functional sperm tests) and their correlation with fertilization ability.

Keywords: insemination, rooster insemination doses, flow cytometry, CASA, survivability

Obsah

1 Úvod.....	7
2 Cíl práce.....	8
3 Literární rešerše.....	9
3.1 Obecná Fyziologie fertilizace drůbeže.....	9
3.1.1 Spermatogeneze.....	10
3.1.2 Fertilizační schopnost spermií.....	10
3.2 Pohlavní soustava.....	11
3.3 Ejakulát.....	11
3.3.1 Odběr ejakulátu.....	12
3.3.2 Posouzení kvality.....	12
3.4 Výroba inseminační dávky.....	13
3.4.1 Ředění spermatu.....	13
3.4.2 Kryokonzervace.....	14
3.4.3 Skladování spermatu v kapalném stavu.....	15
3.5 Umělá inseminace.....	16
3.5.1 Metody umělé inseminace.....	16
3.6 Posouzení kvality vyrobených a konzervovaných inseminačních dávek pomocí <i>in vitro</i> analýz.....	17
3.6.1 Computer Asistent Sperm Analysis.....	17
3.6.2 Průtoková cytometrie.....	22
3.7 Funkční testy spermií.....	26
3.7.1 Test penetrace spermií.....	26
3.7.2 Test vazby spermie na zonu pellucidu.....	26
3.7.3 Test vazby hyalorunu.....	27
3.7.4 Test hypoosmotického bobtnání.....	27
4 Závěr.....	28
5 Literatura.....	29

1 Úvod

Jednou z největších ekonomických ztrát v oblasti chovu drůbeže je velký počet neoplozených vajec, která jsou produkována pro účely líhnutí. Ve snaze snížit tuto ztrátu je řada výzkumů zaměřena na fertilizační schopnost drůbeže a nalezení laboratorních testů, které by ji dokázaly spolehlivě odhadnout.

Plodnost jako znak zahrnuje genetické a negenetické faktory, pocházející od samců i samic, které ovlivňují oplodnění vajíček a vývoj embrya (Brillard 2003). U domácí drůbeže je však jediný samec schopen během svého života obsloužit mnoho samic, přispívá k plodnosti mnoha vajec a poskytuje 50 % genetického materiálu, takže plodnost samce je pravděpodobně jedním z primárních faktorů omezujících plodnost vajec. V souladu s tím jsou samci považováni za odpovědné za pokles plodnosti hejna (Bramwell a kol. 1995), a proto jsou považováni za cíl pro řešení problémů s neplodností.

Cílem analýzy spermatu je určit fertilizační potenciál vzorku spermatu (ať už jde o čerstvé, chlazené nebo zmrazené a následně rozmražené), pomocí rychlého a nenákladného postupu. V přehledu literatury Graham a kol. (1980) uvedli, že korelace mezi plodností a testy motility, morfologie a životaschopnosti se pohybovaly od 0,06 do 0,86 a že žádný test konzistentně neposkytoval konzistentní žádoucí korelace s plodností. Část příčiny tohoto nedostatku konzistence je způsobena přesností údajů o plodnosti (Amann 1989), částečně je způsobena multifaktoriální povahou funkce spermií a částečně nepřesností měření *in vitro*.

Existuje mnoho metod hodnocení kvality spermatu a odhadu fertilizačního potenciálu spermií. Některé z nich jsou považovány za subjektivní, jiné vyžadují speciální laboratorní vybavení. Tradiční metody hodnocení spermatu používané k hodnocení kvality spermatu zahrnovaly odhad procenta pohyblivých spermií (na předehřátém podložním sklíčku), morfologii spermií (s různými technikami barvení) a koncentraci v jednotkové dávce (pomocí počítací komory). Konvenční hodnocení spermatu pomocí světelného mikroskopu je stále více nahrazováno technikami fluorescenčního barvení, počítačem asistovaným systémem analýzy spermií (CASA) a průtokovou cytometrií (Partyka a kol. 2010; Nagy a kol. 2003).

Tato bakalářská práce se bude věnovat problematikám jednotlivých laboratorních systémů hodnocení fertilizační schopnosti vzorků spermatu a jejich schopností odhadnout fertilizační schopnost inseminačních dávek kohoutů.

2 Cíl práce

Kvalita inseminačních dávek používaných v umělé inseminace drůbeže hraje klíčovou roli pro její celkovou úspěšnost. S pojmem „kvalita inseminačních dávek“ těsně souvisí jejich fertilizační schopnost. Dnes jsou k dispozici desítky laboratorních *in vitro* analýz (průtoková cytometrie, CASA a jiné), z nichž každý vyhodnocuje jen některý dílčí ukazatel kvality inseminačních dávek. Obrovskou výhodou je, že *in vitro* analýzy jsou mnohem levnější a rychlejší ve srovnání s testy *in vivo* (polní testy). Vzhledem k extrémně složité biologické podstatě procesu oplodnění však žádný z laboratorních *in vitro* analýz není schopen bezpečně předpovědět fertilizační schopnosti inseminační dávky. Současné použití více laboratorních *in vitro* analýz může zlepšit předpověď. Cílem této práce proto bude podat přehled laboratorních *in vitro* analýz za účelem výběru těch, které nejvíce souvisí s fertilizační schopností inseminačních dávek kohoutu.

3 Literární rešerše

3.1 Obecná Fyziologie fertilizace drůbeže

U ptáků se vyvinuly původní reprodukční procesy, které jsou velmi účinné pro adaptaci zvířat do velmi proměnlivých podmínek prostředí. Oviparita se vyvinula k produkci telolecitálních vajíček s tvrdou skořápkou, což umožňuje autonomní vývoj embrya ve vysoce chráněném mikroprostředí. Vysoce specializovaná produkce vajec má za následek u dospělých samic většiny ptačích druhů vývoj pouze jednoho vejcovodu. Vejcovod sdílí dvě hlavní funkce:

- 1) skladování a výběr spermií před polyspermickým oplodněním oocytu v infundibulu
- 2) tvorbu vnější vitelinní blány, bílku a skořápky vajíčka, která přispívá k autonomii vývoje embrya. Vejcovod je také místem tvorby a dělení zygoty až do stádia 30-50 tisíc buněk, kdy je genom embrya aktivován do fáze ovipozice (Blesbois & Brillard 2007). Mezi další funkce patří přítomnost tubulů pro ukládání spermií v uterovaginální junkci (UVJ) vyvinuté pro dlouhodobé skladování spermií což poskytuje „adaptivní svobodu“ samic k udržení fertilizačního potenciálu i v nepřítomnosti samců. Spermie jsou produkované dvěma intraabdominálními varlaty. Samčí tělesná teplota (41-43°) může souviset s krátkým časovým intervalem potřebným pro spermatogenezi (Aire 2007). Například u kuřete, perličky, kachny a krůty, je délka spermatogeneze přibližně 14 dní, což poskytuje samcům rozšířený potenciál produkovat velké množství gamet v daném čase. Po jejich evakuaci z *rete testis* jsou ptačí spermie rychle transportovány přes nadvarle do chámovodu, kde jsou po omezenou dobu skladovány (např. 2-3 dny u kuřete) před exportem při ejakulaci (Williamse 1981). Na rozdíl od savčích druhů u ptáků neexistují žádné přídavné pohlavní žlázy. Rychlost a nízká specializace na transport ptačích spermií v samčím traktu je v rozporu s vysokou složitostí jejich skladování u samice (od 10 dnů u křepelky až 70 dní u kruty) (Aire 2007). Skladování spermií v ženském traktu posloužilo k rozvoji původní reprodukční adaptace. Tedy výběr plemenů s vysokým reprodukčním potenciálem na základě preferenčního výběru a skladování jejich spermatu se pravděpodobně vyvinulo u volně žijících druhů (Birkhead & Brillard, 2007). U domácích druhů se vývoj genealogického výběru v drůbežářském průmyslu podřídil standardizaci vajec a produkci masa. Kontrola reprodukčních výkonů však stále není optimální a produkce, kvalita a účinnost skladování samčí gamety nebyly široce brány v potaz. To má nyní za následek konvenční šlechtění s častými poklesy reprodukční výkonnosti. Proces *in vivo* skladování spermií ve vejcovodu je také výzvou pro vývoj vhodných metodologií k uchování spermií *in vitro*, protože ptačí spermie musí ještě projít normální procesy selekce a dlouhodobého skladování SST v samičím pohlavním traktu po skladování *in vitro* (Hammerstedt 1999; Brillard 2004; De Jong & Guemene 2011).

Spermie dozrávají ve varlatech a nadvarlatech u většiny druhů savců. U kohoutů, stejně jako pravděpodobně u jiných druhů ptáků, však konečné dozrávání probíhá v chámovodu (vývody, které transportují spermie z nadvarlete do ejakulačního orgánu) (Bernal a kol. 2022). Produkce spermií je iniciována dostatečnou sekrecí hormonu uvolňujícího gonadotropin (GnRH) z hypotalamu, sekrece luteinizačního hormonu (LH) a folikuly stimulujícího hormonu (FSH) předním lalokem hypofýzy a sekrecí gonadálních steroidů (testosteron a estrogen). Luteinizační hormon působí na Leydigovy buňky uvnitř varlata a stimuluje

produkci progesteronu, který se přeměňuje na mužský pohlavní hormon testosteron. Testosteron v semenotvorných tubulech je nezbytný pro spermatogenezi, zatímco Leydigovy buňky přestávají reagovat na udržování vysokých hladin LH (Senger 2003). Varlata jsou obklopena vrstvou pojivové tkáně obsahující semenotvorné tubuly a Leydigovy buňky. V intersticiálních buňkách varlat se produkuje několik androgenů, ale hlavním hormonem v krvi je testosteron. Testosteron je nezbytný pro vývoj sekundárních pohlavních znaků a pro normální pářící chování samců. Je také nezbytný pro produkci spermií a udržování samčího vývodného systému. Tento hormon také napomáhá spermatocytogenezi, transportu spermií a jejich ukládání v samčím reprodukčním traktu (Beardonet a kol. 2004). Když kohout dosáhne dospělosti, je produkce testosteronu stimulována zvyšující se koncentrací cirkulujících gonadotropinů (Etches 1996). Hlavními gonadotropiny jsou FSH a LH, které se u samců také nazývají intersticiální buněčný stimulační hormon (ICSH). Oba gonadotropní hormony jsou vylučovány přední hypofýzou (Salisbury a kol. 1978). FSH jako takový působí na zárodečné buňky v semenotvorných kanálcích varlat a podporuje spermatogenezi až do výše stádia sekundárních spermatocytů. LH stimuluje Leydigovy buňky k produkci testosteronu a dalších androgenů (Hafez 2000).

3.1.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces dělení a diferenciací, při kterém vznikají spermie v semenných kanálcích varlat a který se skládá ze dvou fází, a to spermatocytogeneze a spermiogeneze (Gordon 2005). Podle předchozího autora je spermiogeneze metamorfni proces, při kterém nedochází k buněčnému dělení a řetězec událostí vede ke vzniku ocásku spermie. Změny v morfologii spermií lze pozorovat u jaderných proteinů, velikosti buněk, jejich tvaru a polohy akrozomálních granulí a lokalizace centriol. Počet vytvořených spermií závisí na počtu přítomných Sertoliho a Leydigových buněk. Golgiho aparát je jednou z buněčných organel, která se nachází v blízkosti jádra spermie a která vede ke vzniku subcelulární organely známé jako akrozom. Akrozom se vyvíjí a tvoří čepičku nad přední částí jádra a rozšiřuje se, dokud nepokryje dvě třetiny přední části jádra (Senger 2003). Během fáze zrání dochází k úplné diferenciaci spermatid s konečnou tvorbou bičků (hlavní a koncový díl), sestavením mitochondrií (střední část), krčkové části a úplnou kondenzací a tvarováním jádra (Beardonet a kol. 2004).

3.1.2 Fertilizační schopnost spermií

Počáteční událostí oplodnění u ptáků je fixace spermie na zonu pelucidu, která obklopuje oocyt při ovulaci. Po fixaci následuje akrozomová reakce (AR), proces anexocytózy zahrnující fúzi meziplazmatická membrána spermií a vnější akrozomální membrána (Okamura & Nishiyama 1978a). Vrchol hlavičky spermie, který prošel akrozomovou reakcí, přichází do kontaktu s plazmatickou membránou vajíčka. Poté, co se celý povrch vnitřní akrozomální membrány dostane do těsného kontaktu s plazmatickou membránou vajíčka, obě membrány se spojí a vytvoří souvislou membránu. Všechny části spermií, které postrádají plazmatickou membránu, pronikají do ooplazmy. Jak se hlavička spermie posouvá hlouběji do ooplazmy, chromatin se začne rozptylovat a hlavička spermie se přemění na velké kulovité jádro s nízkou elektronovou hustotou. V pozdější fázi přeměny se kolem jádra objeví mnoho

malých váčků, které následně splynou a vytvoří dvě souvislé membrány. Tyto membrány představují mužský pronukleární obal. Ke kondenzaci chromatinu dochází v jádře, aby se vytvořil mužský pronukleus. V průběhu utváření mužského pronukleu se subakrozomální tyčinka a ocas oddělují od hlavy a rozpadají se. Mnoho spermií může podstoupit AR a poté proniknout do ptačího oocyty po splnutí mezi vnitřní membránou oocyty akrozomu a plazmatickou membránou oocyty (Okamura & Nishiyama 1978b). Přednostně pronikají do blízkosti na zárodečné ploténky, ale ne na zárodečnou ploténku a pak se vyvine k vytvoření samčích pronukleí (Stepinska & Bakst 2007). Tvorba pronuclei zahrnuje hluboké změny v jádrech spermií, včetně dekondenzace chromatinu a následného vzniku jaderné membrány. Nicméně, pouze jeden mužský pronucleus je zapojen do závěrečné syngamie. Role polyspermie u ptáků stále zůstává otázkou. Jedna hypotéza zahrnuje množství fosfolipázy C zeta (PLC ζ) produkované spermiemi, které je potřebné k aktivaci oocyty (Coward a kol. 2005).

3.2 Pohlavní soustava

Samčí reprodukční trakt se skládá z varlat, nadvarlat, chámovodu a kloaky. Spermie jsou uloženy se zastavenou motilitou v chámovodu až do ejakulace. Samičí reprodukční trakt se skládá z vaječníku, vejcovodu a ovulovaného oocyty procházejícího vejcovodem. Ejakulované spermie jsou uloženy v zásobních spermatických tubulech umístěné v uterovaginálním spojení do doby ovulace. K oplození dochází v infundibulární části vejcovodu. Jak bylo uvedeno výše, spermie uložené v chámovodu mají schopnost hybnosti, avšak iniciace motility je zastavena (Leeson 2009).

Na rozdíl od většiny savců, varlata kohouta fungují při normální tělesné teplotě téměř 41 °C, protože varlata jsou hluboko uvnitř tělní dutiny v blízkosti ledvin. Před zralostí, jsou malé, každé jen 1–2 g. Podobně jako situace s vaječníkem u slepice, se velikost dramaticky zvětšuje kolem osmnáctého týdne a varlata jsou zralá o hmotnosti kolem 15–20 g. Produkce spermií a velikost varlat přímo korelují, a velikost varlat také do jisté míry pozitivně koreluje s velikostí těla. Denní produkce spermií je asi 100 milionů na gram hmotnosti varlat, která je poměrně konstantní bez ohledu na frekvenci páření nebo odběru. „Průměrní“ samci v hejnu jsou pravděpodobně nejúčinnější pro udržení plodnosti. Samec může produkovat sperma již ve dvanáctém týdnu věku, v závislosti na velikosti těla a světelném režimu. Nicméně spermie od takových kohoutů jsou málokdy životaschopné a efektivní zralost se nevyvine, dokud nebudou mít věk okolo osmnácti týdnů (Leeson 2009).

3.3 Ejakulát

Aviární ejakulát obsahuje málo semenné plazmy, a proto je semeno husté (Etches 2000). Koncentrace spermií v ejakulátu u kohoutů je variabilní a pohybuje se od 1,00 – 12,40 $\times 10^6 \times \text{mm}^3$ (Ledeč a kol. 1981), respektive 0,50 – 7,00 $\times 10^6 \times \text{mm}^3$ (Gamčík a kol. 1992) a při každodenním odběru se koncentrace postupně snižuje (Šmerha a kol. 1980). Samčí pohlavní buňka domácí drůbeže je dlouhá, cylindrická a na obou koncích zúžená. Objem kohoutího ejakulátu se pohybuje mezi 0,20 a 0,62 cm^3 (Máchal & Křivánek 2002).

3.3.1 Odběr ejakulátu

Odběr zahrnuje omezení samce držením, prsami směrem dolů, obvykle na stole nebo na kolenu odběratele, který obvykle sedí. Pták je držen jiným pracovníkem případně v nějakém typu mechanické nožní svorky. Břicho je pak pevně masírováno jednou rukou a druhou rukou je držen přes hřbet a přes ocasní peří. Falus se zvětší po třetí až šesté takové masáži v závislosti na variaci mezi samci a v tuto dobu sběratel rychle položí ruce kolem kloaky. Kloaka se lisuje shora a zdola pomocí palce a ukazováčku, které umožňují ventilaci evert out (Leeson 2009). Semeno se pak odsaje z povrch falusu přímo do odběrové nádoby. Postup masáže kloakální oblasti může být proveden podruhé, aby byla vypuzena druhá dávka semene. Sperma se odebírá čtyřikrát až šestkrát za týden (Kharayat a kol. 2016).

Objemy spermatu odebraného z drůbeže se pohybují od 0,1 do 1,5 ml. Kohout produkuje v průměru 0,6 ml ejakulátu (Taye & Esatu 2022). Různí kohouti stejného druhu často produkují různé objemy semene v různých časech (Getachew 2016). Průměrný objem ejakulovaný pomocí techniky masáže břicha je přibližně 0,25 ml (Gordon, 2005). Bylo zjištěno, že zaznamenaný objem spermatu se pohybuje od 0,37 do 0,73 ml (Peters s kol. 2008). Průměrná koncentrace spermií ve spermatu drůbeže je mnohem vyšší ($6-10 \times 10^9$ spermií /ml) než u býčího spermatu ($1-2 \times 10^9$ spermií /ml) a funkce spermatu drůbeže je negativně ovlivněna nadměrným zředěním jako efekt zředění (Parker & McDaniel 2006).

3.3.2 Posouzení kvality

3.3.2.1 Motilita a mobilita spermií

Pohyblivost spermií může být progresivní (vpřed a rychlá) nebo neprogresivní (náhodný pohyb nebo kmitání) pohyb. Obecně se určuje progresivní motilita při teplotě okolí pomocí mikroskopu při malém zvětšení (technika hang-drop) popř. pomocí počítačem podporované analýzy spermatu (CASA) (Bakst a kol. 2013). Ukázalo se, že pohyblivost hodnocená mikroskopicky má malou korelaci s plodností a odhalí pouze to, že spermie jsou pohyblivé. Test mobility spermií získal popularitu jako měřítko jednotlivce, schopnost produkovat vysoce mobilní spermie. Test mobility spermií definuje schopnost spermií pohybovat se progresivně ve viskózním médiu při 41 °C, u kterých je pravděpodobnější, že oplodní vajíčko než samci produkující méně pohyblivé spermie. Test mobility spermií je a důležitý nástroj pro výběr těch nejpłodnějších samců k použití při umělé inseminaci (Froman 2006).

3.3.2.2 Koncentrace spermií

Pokud se má sperma ředit, je nejlepší mít před zahájením odběru v nádobě na sperma známý objem ředidla (médiu podobné tkáňové kultuře, které je připraveno k udržení životaschopnost spermií) při teplotě okolí. Při běžné umělé reprodukci krůt se sperma deseti až dvanácti samců shromažďuje v jedné nádobě a po odběru každého samce se jemně promíchá. Stanoví se objem spermatu a pokud je dávka pro umělou inseminaci založena na počtu spermií (obvykle 250–350 milionů spermií na dávku), určí se koncentrace spermií. Metody pro stanovení koncentrace spermatu jsou:

1. Přímá metoda: Hemocytometr je přímá metoda pro odhad koncentrace spermií.

2. Nepřímé metody: Objem sbalených buněk (PCV): Označuje se také jako spermatokrit. Stanovení koncentrace spermií pomocí objemu sbalených buněk je téměř totožné se stanovením hodnot krevního hematokritu (Bakst a kol. 2013). Sperma nasáté do mikrohematokritových zkumavek se odstředí v hematokritové centrifuze, dokud nejsou spermie pevně zabaleny (10 min), stanoví se procento zabalených spermatických buněk vzhledem k původnímu objemu spermatu v mikrozkuhavce. Koncentrace spermií se odvodí pomocí konverzního faktoru nebo grafickým vynesemím koncentrace spermií sériově ředěných vzorků z počtů na hematocytometru s odpovídajícími hodnotami spermatokritu.

Optická hustota (OD; fotometrie): Optická hustota (OD) se stanoví pomocí a fotometru. Optická hustota vysoce zředěného spermatu je přímo úměrná koncentraci spermií, a poskytuje tak odhad koncentrace spermií. Stejně jako u metody PCV se koncentrace spermií odvozuje pomocí konverzního faktoru nebo předem odvozené standardní křivky porovnáním a grafickým znázorněním (Kharayat a kol. 2016)

Koncentrace spermií je jednou z nejdůležitějších charakteristik spermatu a problémů s neplodností, které jsou spojeny s nízkou hodnotou tohoto parametru. Přesné měření koncentrace spermií stanovené CASA zůstává problémem u každého druhu (Verstegen a kol. 2002).

3.3.2.3 Životaschopnost spermií

Počet mrtvých a abnormálních spermií ve vzorku by měl být méně než 10 % (Leeson 2009). Životaschopnost spermií se určuje pomocí barvení eosinen a nigrosinem a následným mikroskopickým vyšetřením. Živé životaschopné spermie zůstávají na černém (nigrosinovém) pozadí bílé nebo bezbarvé, protože jejich membrána je pro eosin nepropustná, mrtvé spermie však eosinové barvivo přijímají a při pohledu pod mikroskopem při osmdesát až stonásobném zvětšení se jeví růžové. Normální ptačí spermie mají vzhled „červa“ s tenkým symetricky tvarovaným tělem zakončeným krátkým (15-20 % délky) tenkým ocáskem (Leeson 2009). Tyto normální spermie jsou jemně zakřivené. Většina abnormálních spermií se vyznačuje silným prohnutím v oblasti hlavy, středu nebo ocasu (Kharayat a kol. 2016).

3.4 Výroba inseminační dávky

3.4.1 Ředění spermatu

Sperma lze naředit tak, aby pokrylo asi 5–20 slepic. Stupeň ředění závisí na počáteční koncentraci spermií, která se u jednotlivých kohoutů a v průběhu času liší. Většina ředidel obsahuje glutamát sodný, glukózu, fruktózu a specializované pufrý k udržení pH na hodnotě kolem 7,0 a osmolarity kolem 400 miliosmolů. Glutamát je obzvláště důležitý, pokud má být sperma skladováno déle než 4-6 hodin. Drůbeží sperma reaguje velmi špatně na kryokonzervaci z hlediska plodnosti. Dávka spermatu je 100–200 milionů spermií/inseminaci v 50 mikrolitrech objemu (Etches 2000). Celkový objem zředěného spermatu (V) se počítá podle následujícího vzorce: $V = \text{neředěný objem (ml)} \times \text{koncentrace spermií/ buněk na inseminaci} \times 0,05 \text{ ml}$. Objem potřebný k naředění spermatu tedy bude: Celkový objem zředěného semene – objem ejakulátu. Existují různé druhy ředidel spermatu, které jsou

komerčně dostupné. Sperma lze ředit roztokem známým jako modifikovaný Ringerův roztok. Tento modifikovaný Ringerův roztok je velmi levný a snadno dostupný. Složení modifikovaného Ringerova roztoku je následující: Chlorid sodný- 0,68g, Chlorid draselný 0,173g, Chlorid vápenatý 0,0 642 g, Síran hořečnatý 0,025g, Hydrogenuhličitan sodný 0,025g, Destilovaná voda 100ml (Kharayat a kol. 2016).

3.4.2 Kryokonzervace

Kryokonzervace minimalizuje náklady spojené s údržbou zvířat a zařízení, jako je personál, voda, energie a prostor. Prodlužuje dobu, po kterou lze z jednotlivých organismů vyprodukovat potomstvo, snižuje potřebu udržovat živé populace, poskytuje flexibilitu pro plánování budoucích experimentů a výzkumných projektů a může zabránit katastrofální ztrátě nenahraditelných výzkumných linií. U zebříček se kryokonzervace spermatu běžně praktikuje od 80. let 20. století.

Navzdory skutečnosti, že kryokonzervace zárodečných buněk je cenným nástrojem pro drůbežářský průmysl, není zmrazení spermatu drůbeže dosud v praxi často používaným postupem. Kvalita zmrazeného a rozmrazeného spermatu drůbeže, jakož i míry plodnosti získané po umělé inseminaci použitím kryokonzervovaného spermatu jsou relativně nízké. To je částečně způsobeno některými jedinečnými biologickými a fyziologickými vlastnostmi drůbežích spermií, které je činí potenciálně náchylnějšími k poškození mrazem. Kryokonzervace je škodlivý proces a vyvolává mnoho nepříznivých změn spermií. Zmrazování a rozmrazování vede ke strukturálnímu poškození mitochondrií a akrozomální oblasti a modifikuje permeabilitu buněčné membrány. Uchování spermií obecně vyžaduje snížení nebo přerušování fyziologického metabolismu, čímž se prodlouží doba životaschopnosti těchto gamet. Spermie jsou morfologicky a fyziologicky jedinečné, diferencované a jsou to polarizované buňky, které mají integrální funkci přenosu otcovské DNA a aktivaci oocyty po oplodnění. Existuje však mnoho druhově specifických rozdílů ve spermatu, zejména pokud jde o morfologii hlavičky spermií, specifické kinematické parametry, složení plazmatické membrány nebo mrazicí kapacitu. Hlavní vysvětlení těchto rozdílů spočívá v přítomnosti specifických, vysoce diferencovaných, reprodukčních funkcí mezi druhy. Tyto jedinečné druhové funkce, jako je doba životaschopnosti spermií uvnitř ženského genitálního traktu, se mohou lišit od několika hodin (tj. dobytek) až po několik dní (tj. kuře). Další faktory, které mohou mít za následek modulaci funkce spermií, zejména související se skladováním spermatu, jsou to ty, které souvisejí s možností prodlouženého přežití po odběru spermatu, náchylností k peroxidaci lipidů (LPO) *in vitro*, náchylností k oxidativnímu stresu (OS) a nakonec ty, které určují dobu životaschopnosti spermií po rozmrazení. To znamená, že každý aspekt spermatu, od morfologie po molekulární mechanismy modulace fyziologických funkcí spermií, je přizpůsoben způsobem, který vede ke zvýšené plodnosti zvířat každého druhu (Donoghue & Wishart 2000).

Kryokonzervace spermatu je však důležitou biotechnologickou strategií používanou k uchování a ochraně genetických zdrojů, které jsou u některých druhů stále vážněji omezovány, a ke zvýšení biologické rozmanitosti zvířat tam, kde došlo nebo je možné riziko příbuzenské plemenitby. Tento postup by nebyl možný bez náhodného pozorování Christophera Polgeho, provedeného před více než 70 lety, které změnilo myšlenky týkající se

schopnosti kryokonzervace spermatu, pokud jde o životaschopnost spermií po provedení postupů zmrazení a rozmrazení. Byly to skutečně kohoutí, nikoli savčí spermie, které byly prvními zmrazenými pomocí glycerolu, avšak i když po prvotním zjištění potenciálu tohoto postupu přetrvává zájem o toto téma, stále se provádí velká většina kryokonzervace vzorků spermatu používaných pro komerční umělou inseminaci u savců. Důvodem této situace jsou vysoké náklady na přípravu a skladování zmrazených ejakulátů ve srovnání s tržní cenou jednodenních kuřat, stejně jako horší než optimální kvalita spermatu a v konečném důsledku výsledky umělé inseminace, které jsou výrazně nižší než při použití vzorku čerstvého spermatu pro umělou inseminaci ptáků (Blesbois 2007). Některá z těchto omezení jsou důsledkem struktury ptačích spermií. Drůbeží spermie, většinou z řádu Galliformes, mají nitkovitou morfologii, přičemž hlavičky spermií jsou relativně užší a delší, což má za následek menší objem buněk než u savčích gamet (Santiago-Moreno a kol. 2016). Membrána ptačí spermie obsahuje více polynenasycených mastných kyselin (PUFA) než spermie savců a má menší obsah bílkovin, nižší poměr cholesterol/fosfolipid a větší celkovou tekutost při fyziologických teplotách (Cerolini a kol. 2006). Na rozdíl od savčích spermií získávají kuřecí spermie motilitu a fertilizační schopnosti poté, co byly transportovány z varlete do ductus deferens (Howarth 1983). Akrozomová reakce je nutná pro schopnost oplodnění spermií, ale na rozdíl od savců neexistuje žádný důkaz, že u ptačích spermií existuje kapacitační proces, zatímco tento proces je nezbytný pro oplodnění savčími spermii (Howarth 1970). Střední část spermií kohoutů obsahuje přibližně 30 mitochondrií a ve střední části některých křepelčích spermií je až 1000 mitochondrií, přičemž mitochondrie jsou nedílnou součástí energetického využití pro pohyb bičíků. Bičík, který je u kohoutích spermií velmi dlouhý (90 μm), usnadňuje transport spermií do zásobních tubulů uterovaginálního spojení, kde mohou být spermie skladovány a zůstat životaschopné po několik týdnů, než jsou transportovány do místa oplodnění v infundibulu ženského reprodukčního systému. Tyto biologické vlastnosti jsou nedílnou součástí funkcí energetického metabolismu a dochází k prodloužení konzervace při zachování fertilizační kapacity (po dobu 3 týdnů) v reprodukčním traktu samic ptáků ve srovnání s tím, co se vyskytuje u savců (Nguyen a kol. 2014).

3.4.3 Skladování spermatu v kapalném stavu

Skladování spermatu v kapalném stavu při teplotách mezi 4 a 5 °C se používá ke snížení metabolismu spermií a udržení životaschopnosti spermií po relativně delší dobu, než je tomu u vzorků spermatu skladovaných při pokojové teplotě (Donoghue & Wishart 2000; Blesbois & Brillard 2007). U savčích druhů je skladování spermatu v kapalném stavu se zachováním životaschopnosti spermií možné po delší dobu než u ptáků. To bylo částečně způsobeno nedostatkem potřeby kryokonzervace spermatu v komerčních podnicích pro produkci drůbeže ve srovnání s potřebami skladování spermatu v odvětvích živočišné výroby potravin na bázi savců. Semeno savců, zejména hospodářských zvířat, ale také psů, je často přepravováno do jiných oblastí světa z místa, kde bylo sperma odebráno samcům před použitím pro umělou inseminaci. U drůbeže se zásilky chlazeného spermatu pro umělou inseminaci v komerčních podnicích zřídka kdy používají, takže doba potřebná pro skladování spermatu je kratší, obvykle mezi 24 a 48 hodinami po době, kdy došlo k odběru od kohoutů. Je to především proto, že během 48 hodin po odběru spermatu od samců ptáků dochází k výraznému snížení

životaschopnosti a funkce spermií (Blesbois & Brillard 2007). Snížení životaschopnosti drůbežích spermií během 48 hodin po odběru spermatu je většinou spojeno s výraznými změnami ve složení lipidů plazmatických membrán spermií. Krutí spermie ztrácejí jak fosfolipidy, tak volný cholesterol během 48 hodin po odběru spermatu, pokud jsou skladovány při 4 °C (Zaniboni & Cerolini 2009), a reprodukční výkonnost je obvykle neuspokojivá, pokud jsou uchovávány za těchto podmínek, a to i když jsou slepice inseminovány spermatem skladovaným po dobu mírně delší než 6 hodin (Sexton & Fewlass 1978).

3.5 Umělá inseminace

Techniky asistované reprodukce nejsou u ptačích druhů využívány v takové míře, jako u mnoha savců. U ptačího spermatu dochází po odběru spermatu k rychlé ztrátě funkcí spermií (Blesbois a kol. 2007, Blesbois & Brillard, 2007), proto je u ptáků nejpoužívanější technikou umělá inseminace se zředěným spermatem skladovaným buď při pokojové teplotě, nebo chlazené a skladované po dobu kratší než 24 hodin. Kromě toho jediným ptačím druhem, u kterého k rozmnožování dochází pouze v důsledku využití umělé inseminace je krůta. Kryokonzervace ptačího spermatu se však ve větší míře využívá pro účely biobankování vzorků spermatu ohrožených plemen v národním měřítku spíše než pro skladování inseminačních dávek pro umělou inseminaci v chovatelských programech (Blesbois a kol. 2007).

Vzhledem k vysoké koncentraci spermií v krutím spermatu poskytuje optimální plodnost 0,025ml (2 miliardy spermií) neředěného směsného spermatu, inseminovaného v pravidelných intervalech 10-14 dnů (Kharayat a kol. 2016). U kuřat, kvůli nižší koncentraci spermií a kratšímu trvání plodnosti, je třeba 0,05 ml neředěného směsného spermatu v intervalu 7 dní. Chování slepice v dřepu naznačuje vnímavost a čas pro první inseminaci. Pro dosažení maximální plodnosti lze s inseminací začít před prvním snášením vajec. Plodnost má tendenci klesat v pozdějších fázích snášky, proto může být odůvodněné inseminovat častěji nebo použít více spermií na inseminační dávku. Interval mezi inseminací a ovipozice by měl být 8-18 hodin pro dosažení maximální plodnosti (Etches 2000).

3.5.1 Metody umělé inseminace

Obecně existují dva způsoby umělé inseminace u drůbeže. Tyto metody jsou intraperitoneální inseminace a vaginální inseminace. Nejspolehlivějším a nejúspěšnějším postupem inseminace drůbeže je uložení spermatu přímo do střední části pochvy (Cole & Cupps 1977).

3.5.1.1 Intraperitoneální inseminace

Tato technika umělé inseminace není spolehlivá. Při této technice se ostrou jehlou prorazí břišní stěna a zavede se kanyla, která uloží sperma v oblasti vaječníku (Cole & Cupps 1977).

3.5.1.2 Vaginální inseminace

Jedná se o nejčastěji používaný postup umělé inseminace a jsou k němu zapotřebí dva pracovníci. Tato technika byla vyvinuta ve 30. letech 20. století a spočívá v tlaku na břicho slepice a evertingu (otočení směrem ven) vaginálního otvoru přes kloaku (Quinn & Burrows 1936; Cole & Cupps 1977). Tento postup se také označuje jako prasknutí, odvdzdušnění nebo everting slepice. Sperma se ukládá 2–4 cm do poševního otvoru současně s uvolněním tlaku na břicho slepice. Inseminace se provádí sterilními slámkami, stříkačkami nebo plastovými trubičkami. Ve velkých komerčních provozech se běžně používají automatizované dávkovače spermatu s jednotlivými brčky naplněnými stanovenou dávkou spermatu (Aisha & Zain 2010). Začínáte tím, že slepici přidržíte hlavou dolů proti svému tělu stejným způsobem, jakým jste drželi kohouta při odběru ejakulátu. Vyvinutím silného tlaku na levou stranu průduchu způsobíte, že se kloaka (urogenitální otvor u ptáků) vyvrátí, musíte použít palec a ukazováček k obnažení vejcovodu (vaginy). Podle Aisha (2010), je vejcovod otvor na levé straně kloaky vedle řitního otvoru. Inseminační trubici můžete zasunout co nejdále do vejcovodu, poté vytlačit sperma a zároveň uvolnit tlak na kloaku. Uvolněním kloaky se sperma dostane dále do těla slepice. Inseminaci slepic lze provést během dvou po sobě jdoucích dnů a poté jednou týdně. Protože většina slepic nosí ráno vejce ve vaječniku, čímž brání cestě spermií k vaječniku, měla by inseminace probíhat v odpoledních hodinách po snůšce (Aisha & Zain 2010).

3.6 Posouzení kvality vyrobených a konzervovaných inseminačních dávek pomocí *in vitro* analýz

Korelace mezi plodností vzorků spermatu a výsledky z laboratorních testů se u různých zkoumaných studií velmi měnily (korelace mezi plodností a pohyblivostí spermií se pohybovaly od 0,15 do 0,84; korelace mezi plodností a morfologickými testy se pohybovaly od 0,06 do 0,86 a korelace mezi plodností a životaschopnost buněk se pohybovala od 0,33 do 0,66) (Graham 2001).

3.6.1 Computer Asistent Sperm Analysis

První komerční systémy CASA (Computer Asistent Sperm Analysis) byly poprvé uvedeny na trh v 80. letech, přičemž jedním z prvních byl tehdy dobře známý systém CellSoft. Zatímco mnoho publikací bylo vytvořeno pomocí CellSoft, byla to v podstatě černá skříňka bez funkcí ověřování nebo přehrávání a snímková frekvence omezená na 30 snímků za sekundu (Mortimer 1990; Amann & Waberski 2014). Během počátku 90. let se staly komerčně dostupné sofistikovanější systémy CASA se snímkovými frekvencemi 50 a 60 Hz. Mezi ně patřily například Hamilton-Thorne and Motion Analysis (USA), Sperm Class Analyzer od Microptic SL (Španělsko), Hobson Tracker (UK), Sperm Motility Quantifier (Jižní Afrika), SpermVision (Německo) a Proiser/ ISAS (Španělsko) a mnoho dalších.

Za posledních 20 let prošly systémy CASA revolucí především díky pokroku ve vývoji hardwaru i softwaru, přičemž většina systémů poskytuje vysokou úroveň kontroly a ověřování kvality (Mortimer a kol. 2015; van der Horst a kol. 2018). CASA se stále více používá při

hodnocení kvality a funkce spermií u domácích zvířat (Amann & Waberski 2014; Mortimer a kol. 2015; van der Horst a kol. 2018). Některé ze systémů CASA navíc poskytují v rámci automatizované analýzy nejen funkční aspekty, jako je průnik spermií do sliznice, hyperaktivace, ale také morfologii, vitalitu, fragmentaci a akrozomovou reakci (van der Horst a kol. 2018).

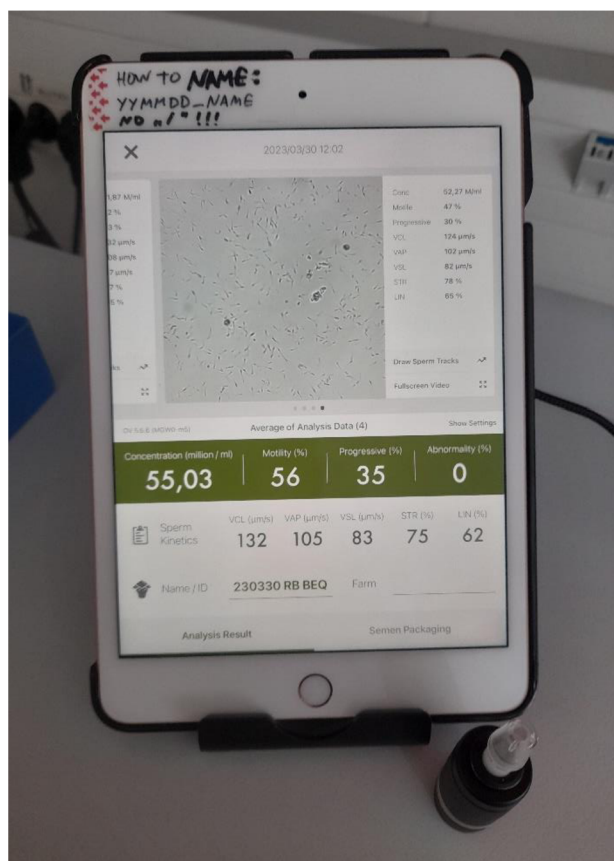
Počítačová analýza spermií poskytuje prostředky pro objektivní klasifikaci dané populace spermií. Pomocí digitálních snímků dráhy každé spermie jsou přístroje CASA schopny pomocí algoritmů zpracování analyzovat pohybové vlastnosti spermií. Mezi běžně uváděné parametry CASA patří křivočará rychlost (VCL), což je průměrná rychlost měřená na aktuální trase z bodu do bodu, kterou buňka sleduje, v mikrometrech za sekundu; amplituda bočního posuvu hlavičky v mikrometrech (ALH); křížová frekvence (BCF), což je frekvence, při které hlavička spermie kříží průměrnou dráhu spermie v Hertzech; průměrná rychlost dráhy (VAP), která odpovídá průměrné rychlosti vyhlazené dráhy buňky v mikrometrech za sekundu; rychlost na přímce (VSL), která představuje průměrnou rychlost měřenou v přímce od začátku do konce jedné dráhy v mikrometrech za sekundu; přímost (STR), což je průměrná hodnota poměru VSL/VAP v procentech (tato přímost hodnotí blízkost buněčné dráhy k přímce, přičemž 100 % odpovídá optimální přímocí); a konečně linearita (LIN), což je průměrná hodnota poměru VSL/VNCL v procentech (linearita odhaduje blízkost dráhy buňky k přímce). Tyto Parametry CASA byly modelovány a matematicky zpřesněny tak, aby co nejlépe popisovaly parametry pohybu každé spermie při jejím pohybu mikroskopickým polem (Boyer a kol. 1989).

Podle nízké hranice VAP (LVV) a střední hranice VAP (MVV), se celková populace spermií rozdělí do čtyř kategorií (na základě klasifikace WHO, 161, 163): rychlá, kde VAP je větší než MVV; střední, kde LVV je menší než VAP a VAP je menší než MVV; pomalá, kde VAP je menší než LVV; a statické, tvořené podílem všech buněk, které se během analýzy nepohybují. Procento progresivních spermií zahrnuje pohybující se buňky s $VAP > MVV$ a $STR > So$ (So = mezní hodnota přímocí pro stanovení progresivních spermií). Křivočará rychlost je průměrná vzdálenost za jednotku času mezi po sobě jdoucími polohami jednotlivých spermií. Přímocí rychlost je rychlost spermie v přímém směru. Jedná se o míru progresu vpřed. Linearita je určena vydělením přímé VSL VCL. Mezi další měření patří boční posun hlavičky, frekvence bičíku a analýza kruhového pohybu. ALH je důležitý parametr, protože se jedná o jeden z parametrů ovlivňující výsledek IVF (Jeulin a kol. 1996) a schopnost spermií proniknout cervikálním hlenem a splýnout s oocyty (Aitken a kol. 1992). Tento parametr je velmi důležitý, protože udává intenzitu bičíku spolu s frekvencí rotace buněk (David a kol. 1981), které jsou pravděpodobně důležité pro postup spermií do cervikálního hlenu a do obalů per-oocytů. K identifikaci trajektorií je zapotřebí minimálně 15 bodů při 30 Hz nebo 30 bodů při 60 Hz (aktivace trvající alespoň 0,5s) (Mortimer a kol. 1995).

Analýza distribuce subpopulace buněk s různými charakteristikami motility umožňuje lepší hodnocení fertilizačního potenciálu spermií. Také může být užitečné při predikci zmrazitelnosti spermatu vybrat „dobré mrazničky“ nebo vyloučit „špatné mrazničky“. Je třeba zdůraznit, že selektivní smrt nejvíce nehybných a oslabených spermií při kryokonzervaci vede k situaci, kdy normální parametry CASA vykazují „pseudoenhancement“ kinematiky. Parametry střední rychlosti a linearity tedy mohou být po zmrazení vyšší. To je způsobeno

skutečností, že subpopulace nejodolnějších buněk, které přežijí zmrazení-rozmrazení, může mít vyšší průměrné kvalitativní parametry než větší populace pohyblivých spermií v čerstvém spermatu. Přestože kryokonzervaci přežije pouze polovina nebo třetina populace spermií, jejich střední rychlost může být vyšší ve srovnání s rychlostními parametry větší populace spermií v čerstvém spermatu. Někteří vyšetřovatelé (Katkov & Lulat 2000) pozorovali zvýšení kinematických parametrů (KP) vzorku po zmrazení-rozmrazení a současně byly pozorovány podstatné ztráty motility po rozmrazení (procento pohyblivých buněk). Možným vysvětlením tohoto jevu je selektivní eliminace nejpomalejší subpopulace v rámci vzorků. Tento „paradox CASA“ je způsoben podstatným selektivním vyloučením pomalu se pohybujících buněk z pohyblivé frakce měřené po zmrazení-rozmrazení.

Pohyb spermií je jedním z důležitých parametrů kvality spermatu. Hodnocení motility závisí na strukturální a funkční integritě spermií a umožňuje predikci fertilizačního potenciálu spermatu (Wishart & Palmer 1986).



Obrázek 1: Mobilní počítačem podporovaná analýza spermatu (mCASA).
Archiv autora

3.6.1.1 Procento motility (MOT)

Podle Madhuri a kol. (2012) je procento motility spermií definováno jako počet pohyblivých buněk vydělených celkovým počtem analyzovaných buněk a vyjádřeno v procentech. Buňka je považována za pohyblivou, pokud její průměrná rychlost na přímce (VSL) splnila nebo překročila parametr minimální pohyblivosti. Pro analýzu je třeba analyzovat nejméně 200 buněk, aby bylo možné vyjádřit procento pohyblivých buněk

(Madhuri a kol. 2012). Negativní korelace $-0,31 + 0,035$ byla nalezena mezi počtem defektních spermii a motilitou. To naznačuje, že spermie, které mají relativně nízkou motilitu můžou mít vysoký výskyt morfologických defektů (Allen & Champion 1955).

3.6.1.2 Progresivní motilita (PMOT)

Progresivní motilita je definována jako populace buněk, které se aktivně pohybují vpřed, a je vyjádřena v procentech (Agnieszka a kol. 2012). Progresivně pohyblivá spermie je definována jako ta, která má průměrnou dráhovou rychlost (VAP) $> 50 \mu\text{m/s}$ a poměr přímočarosti (STR) $> 75 \%$ (Seyoum 2020).

Korelace mezi procenty pohyblivých nebo progresivně pohyblivých spermii ve vzorku spermatu a plodností nejsou v různých studiích konzistentní ($0,015-0,84$) (Graham a kol. 1980). Kladná korelace $0,72 + 0,018$ byla prokázána mezi hodnocením motility a plodností (Allen & Champion 1955).

3.6.1.3 Přímá rychlost (VSL)

Tato se měří v $\mu\text{m/s}$ a je definována jako průměrná rychlost měřená na přímce od začátku do konce dráhy. Je to míra postupu buňky vpřed a vypočítá se vynásobením křivočaré rychlosti (VCL) střední přímkovou rychlostí a vydělením 100. Vypočítá se pro populaci pohyblivých buněk zprůměrováním průměrných hodnot jednotlivých buněk (Madhuri a kol. 2012).

3.6.1.4 Křivočará rychlost (VCL)

Tato hodnota se vypočítá jako průměrná skalární rychlost (nebo rychlost) pro všechny pohybové dráhy. Vypočítá se tak, že se celková vzdálenost uražená podél každé dráhy vydělí časovým intervalem. Stejně jako VSL se populační VCL počítá pouze pro pohyblivé buňky a dosahuje se zprůměrováním průměrných hodnot z každé jednotlivé buňky. Podle Ulfina a kol. (2014) se rovněž měří v $\mu\text{m/s}$ a definuje se jako časově průměrná rychlost hlavičky spermie podél její skutečné křivočaré dráhy, jak je vnímána ve dvou rozměrech pod mikroskopem.

3.6.1.5 Rychlost průměrné dráhy (VAP)

Měří se také v $\mu\text{m/s}$ a je definována jako průměrná rychlost na vyhlazené dráze buňky. Vypočítává se vyhlazením skutečné dráhy a používá se k charakterizaci celkové trajektorie spermatické buňky (Agnieszka a kol. 2012; Ulfina a kol. 2014).

3.6.1.6 Střední linearita (LIN)

Vzdálenost, kterou spermatická buňka urazí po své normální (neboli nevyhlazené) dráze se označuje jako její hrubý posun. Přímá vzdálenost od počátečního bodu do jeho aktuální polohy X-Y (vzdušnou čarou) se označuje jako čistý posun. Poměr těchto dvou měř vynásobený 100 (tj. $VSL * 100 / VCL$) je mírou linearit pro spermie. Vyhodnocuje se na konci každé pohybové dráhy a všechny hodnoty pohyblivých drah se zprůměrují, aby se vytvořilo

jediné číslo pro zprávu. Buňka, která plave v přímce má hodnotu 100 a buňka, která právě dokončila kružnici, měla okamžitou hodnotu nula (Ulfina a kol. 2014).

3.6.1.7 Amplituda bočního posunu hlavy (ALH)

Pro každou buňku se vypočítá vzdálenost mezi skutečnou vypočítá se křivolakou a hladkou (nebo průměrnou) dráhou. Tyto hodnoty jsou někdy označují jako RISERS. Tento parametr (ALH) je vypočítán pomocí maximální hodnoty RISER pro každou dráhu a poté se vypočítá jako průměrná hodnota všech jednotlivých maxim jako jediná hodnota, která se zahrne do zprávy o bočním posunutí hlavy populace pohyblivých buněk (Madhuri a kol. 2012). Podle Agnieszky a kol. (2012) se tento parametr měří v μm a definuje se jako střední šířka kmitání hlavičky při pohybu spermatické buňky. Různé přístroje CASA počítají ALH pomocí různých algoritmů, takže hodnoty nemusí být mezi systémy srovnatelné (WHO 2010).

3.6.1.8 Křivočará Frekvence (BCF)

Měří se v Hz a definuje se jako průměrná frekvence, při které křivočará dráha spermií protíná její průměrnou dráhu (Madhuri a kol. 2012). Agnieszka a kol. (2012) také definují tento parametr jako frekvenci, s jakou se hlavička spermie pohybuje tam a zpět po své dráze napříč buňkou (Agnieszka a kol. 2012).

3.6.1.9 Hyperaktivace

Jednou ze změn, které signalizují dosažení kapacitního stavu, je projev hyperaktivované motility. Tento pohyb se vyznačuje rozvojem vysoké rychlosti, velkou amplitudou bočního posunu a asymetrickými bičíkovými vlnami. Hyperaktivita usnadňuje oddělení spermií z vejcovodného epitelu a průnik do zóny pellucidy (ZP). Tento vzor rytmu generuje charakteristický neprogresivní vzor pohybu hvězdy, který je automaticky identifikován a kvantifikován systémy CASA (Niżański a kol. 2009; Rota a kol. 1999).

3.6.1.10 Morfologie

Vyšetřování spermií pomocí systémů počítačové morfologické analýzy spermií (CASA) má technická omezení, protože tyto systémy byly navrženy tak, aby zkoumaly spermie savců s přibližně kulovitou hlavou (Santiago-Moreno a kol. 2016). U krůtích a kuřecích spermií se krční oblast střední části skládá z proximálního a prodlouženého distálního centriolu. Naproti tomu spermie perliček obsahují pouze jednu prodlouženou centriolu a související pericentriolární výběžky. Příčné řezy centriolů mají typické „větrníkové“ uspořádání devíti tripletových mikrotubulů zapuštěných do válcovité, husté stěny (Thurston & Hess 1987).

Studie naznačují, že vzorky spermatu s vyšším procentem morfologicky abnormálních spermií vykazují sníženou plodnost (Lavara a kol. 2005). Ačkoli morfologie spermií ovlivňuje plodnost, některé z těchto vlastností mohou být kompenzovatelné, což znamená, že plodnost lze zlepšit, pokud je inseminováno více spermií, zatímco jiné jsou nekompenzovatelné (Saacke a kol. 2000; Walters a kol. 2005), což ztěžuje korelace mezi

hodnocením morfologie a plodností. Snížená fertilizační kapacita a embryonální vývoj spojený s morfologicky abnormálními spermii je mnohostranným problémem (Walters a kol. 2005). Negativní korelace $-0,55 + 0,027$ byla zjištěna mezi počtem defektních spermii a počty potomků. Z této korelace se odvozuje, že čím méně pozorovaných morfologických defektů ve spermii tím lepší plodnost. Vysoké procento defektních spermii znamená snížený počet oplození schopných spermii (Allen & Champion 1955).

3.6.2 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je moderní technika, která vznikla v lékařském a veterinárním andrologickém výzkumu, dokáže analyzovat tisíce jednotlivých spermii za méně než minutu. Tato metoda může současně analyzovat několik indikátorů souvisejících se spermii (např. integritu membrány, obsah DNA a mitochondriální aktivitu), různých aspektů souvisejících s fertilizační kapacitou nebo stresovou odolností spermii. Kromě toho lze sperma analyzovat jako celek pro rozlišení jednotlivých populací spermii. Například spermie s poškozenými cytoplazmatickými membránami lze odlišit od spermii s nepoškozenými cytoplazmatickými membránami. Průtoková cytometrie rychle poskytuje přesné informace o velikosti, tvaru a struktuře buněk. Bylo vyvinuto několik fluorescenčních barviv pro použití s průtokovou cytometrií, což umožňuje výzkumníkům zkoumat funkční stav a specifické buněčné procesy. Aplikace průtokové cytometrie pro hodnocení kvality spermii savců hodnotí životaschopnost spermii, integritu akrozomů, kapacitní stav, fragmentaci DNA, mitochondriální aktivitu, apoptotické změny, lipoperoxidaci a oxidační stres. Dlouhodobě používanou kombinací je SYBR-14, propustné barvivo, které může procházet intaktní buněčnou membránou, a propidium jodid (PI), který se může dostat pouze do buněk s poškozenými membránami.

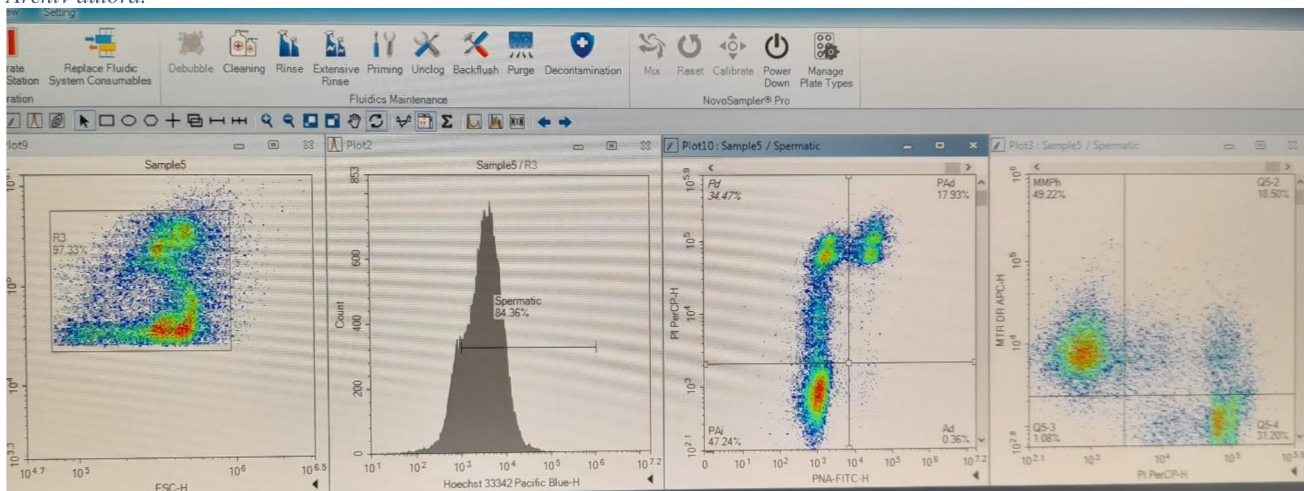
U savců jsou fluorescenční barviva používána k hodnocení kvality spermatu v čerstvém stavu, uchovávaných a kryokonzervovaných vzorků (Garner a kol. 1994). Užitečnost těchto barviv závisí na schopnosti membrány spermii selektivně absorbovat nebo vyloučit tyto barviva z buňky. Integrita plazmatické membrány se hodnotí pomocí různých membránově permeabilních nesespecifických esterázových substrátů, jako je karboxydimethylfluorecein diacetát (CMFDA), karboxyeosin diacetát (CEFDA) nebo Calcein-AM (Haugland 1989; Ericsson a kol. 1993). Tyto enzymové substráty jsou snadno hydrolyzovatelné vnitřními esterázami, výsledkem je fluorescenční membránou nepropustný zelený fluorofor (Waggoner 1990), který je zadržen spermii. Nové barvivo SYBR-14, které zabarvuje jádra živých spermii, bylo nedávno vyvinuté k určení integrity membrány hovězího spermatu (Garner a kol. 1994). Barviva, která umožňují odhady životaschopnosti spermii můžou být spojena s tradičními barvivy pro označení mrtvých buněk, propidium jodidem (PI) a ethidiové dimery (EthD-1 a EthD-2), které snadno zabarví mrtvé nebo umírající spermie. Protokoly, které se mají použít při hodnocení spermatu drůbeže jsou velmi omezené. U kuřat se fluorogenní barviva karboxyfluorescein diacetát (CFDA) a propidium jodide používají k rozlišení tří populací spermii; živé spermie, membrány poškozené nebo mrtvé spermie a přechodné populace (Bayyari a kol. 1990). Průtoková cytometrie je rychlým prostředkem hodnocení životaschopnosti spermii a organel stav založený na diferenciální fluorescenci barvení (Garner a kol. 1986; Graham a kol. 1990). Tato analytická metoda má oproti klasické

laboratoři řadu výhod. Velký počet buněk lze vyhodnotit (10 000 za vzorek) během krátké doby (1 min) a mnohočetné organely jednotlivých spermií vyhodnocovat naráz (Garner a kol. 1994). Životaschopnost spermií a VCL prokázaly významnou, i když omezenou prediktivní kapacitu na plodnost (Santolaria a kol. 2015). Procento životaschopných buněk, stanovené průtokovou cytometrií, se zdá být nejpřiměřenějším laboratorním testem korelujícím s plodností (Wilhelm a kol. 1996). Procento živých buněk detekovaných průtokovou cytometrií koreluje ($r=0,68$) s plodností hřebce (Wilhelm a kol. 1996). Korelace mezi celkovým počtem životaschopných spermií v inseminační dávce a polní plodností je nízká, ale významná ($r = 0,051$, $P = 0,016$), což naznačuje, že hodnocení integrity plazmatické membrány může sloužit jako nákladově výhodná metoda kontroly kvality zmrazených a rozmražených inseminačních dávek býků (Alm a kol. 2001).



Obrázek 2: Moderní průtoková cytometrie.

Archiv autora.



Obrázek 3: Výsledky získané průtokovým cytometrem.

Archiv autora.

3.6.2.1 Poškození plazmatické membrány

Podle Partyky a kol. (2010) se integrita membrány spermií hodnotí duálními fluorescenčními sondami SYBR-14 a propidium jodidem (PI) (sada živé/mrtvé spermie, Invitrogen™, Eugene, OR, USA). Čerstvé, zmrazené a rozmražené vzorky se zředí EK ředidlem na koncentraci 50×10^6 spermií na ml. Alikvoty 300 μ l suspenze spermatu se smíchají s 5 μ l pracovního roztoku SYBR-14 a směs se inkubuje při teplotě místnosti po dobu 10 minut. Pracovní roztok se získá zředěním komerčního roztoku SYBR-14 v destilované vodě v poměru 1:49. Po inkubaci se buňky kontrastně obarví 5 μ l PI 5 minut před analýzou (Partyka a kol. 2010).

Čtyři subpopulace událostí analyzovaných průtokovým cytometrem se zaznamenají vytvořením dvourozměrných bodových grafů fluorescence PI (detektor FL1) versus SYBR-14 (detektor FL2). Procento spermií ve zbytku populace se upraví na 100 %. Populace PI – SYBR+ byla PI negativní, ale obarvená SYBR-14 a vykazuje zelenou fluorescenci, což ukazuje, že tyto buňky měly plazmatickou membránu neporušenou. Populace PI+ SYBR – obsahovala buňky s červenou fluorescencí a bez známek fluorescence SYBR-14, což naznačuje, že tyto buňky byly mrtvé a populace PI+ SYBR+ vykazující SYBR-14 a PI pozitivní barvení je považována za umírající (Partyka a kol. 2011). Integrita membrán spermií je nezbytnou podmínkou pro zachování funkcí spermií během skladování v reprodukčním traktu samice a pronikání perivitellinní vrstvou oocyту (Bongalhardo a kol. 2002). Narušení integrity plazmatické membrány způsobené změnou uspořádání lipidů v membráně během kryokonzervace může vyvolat další poškození buněk a následně vést ke smrti spermií (Blesbois a kol. 2005). Plazmatická membrána spermií je nezbytná pro stabilní metabolické funkce, kapacitu, integraci s buňkami vejcovodů, vazbu na zónu pellucidu, akrozomovou reakci a fúzi membrán. Ztráta integrity této struktury je tedy považována za neslučitelnou s životaschopností spermií a hodnocení stavu plazmatické membrány spermií může být užitečné pro predikci fertilizační schopnosti spermií (Brito a kol. 2003; Rodríguez-Martínez 2003).

3.6.2.2 Poškození akrozomu

Podle Partyky a kol. (2010) se akrozomální poškození hodnotí tak, že se sperma zředí NaCl 0,9 % na koncentraci 50×10^6 spz/ml. Část (500 μ l) zředěného semene se umístí do cytometrických zkumavek a přidá se 1 μ l fykoerythrinu značeného roztokem aglutininu z arašídů (PE-PNA) (Invitrogen) (10 μ g/ml). Vzorky se smíchají a inkubují po dobu 5 minut při teplotě místnosti ve tmě. Buňky se kontrastně obarví 1 μ l komerčního roztoku propidium jodidu 2 minuty před analýzou. Disrupce akrozomů byla identifikována pro pozitivitu na PE-PNA (žlutá fluorescence) a mrtvé buňky pro pozitivitu na propidium jodid (červená fluorescence). Byly ukázány čtyři populace spermií: živé buňky s intaktním akrozomem, živé buňky s rupturou akrozomu, mrtvé buňky s intaktním akrozomem a mrtvé buňky s rupturou akrozomu (Partyka a kol. 2010). Posouzení akrozomálního stavu je velmi důležitou součástí hodnocení spermatu s ohledem na roli této struktury v udržení schopnosti spermií pronikat do zóny pellucida vajíčka (u savců) nebo do obalu vajíčka (u ptáků) a schopnosti splývat s plazmatickou membránou vajíčka. Buňky si musí zachovat normální akrozom, aby bylo

zajištěno, že k akrozomové reakci může dojít ve vhodnou dobu k usnadnění oplodnění (Esteves a kol. 2007). Zásadní význam má také stanovení stavu akrozomu u kryokonzervovaných spermií, protože kryokonzervace přímo poškozují membránu spermií, což je následováno ztrátou obsahu akrozomální matrice (Partyka a kol. 2010).

Akrozomální stav lze hodnotit pomocí lektinů, jako je arašidový aglutinin z *Arachis hypogaea* (PNA) nebo aglutinin *Pisum Sativum* (PSA), konjugovaný s fluorescenčními sondami, jako je fluorescein isothiokyanát (FITC), fykoerythrin (PE) nebo Alexa Fluor (Nizański a kol. 2012). Některé buňky vykazují intaktní stav akrozomu, zatímco jiné jsou akrozomově reagované. Akrozomová reakce může být fyziologickou součástí zrání spermií před oplodněním nebo může být projevem akrozomálního poškození v důsledku kryokonzervace (falešná akrozomová reakce). Obě akrozomální změny mohou být přesně detekovány fluorochromy. Přímé stanovení procenta spermií s poškozeným akrozomem v čerstvém a konzervovaném spermatu je jednou z nejdůležitějších částí hodnocení spermatu. Správná funkce akrozomu se kontroluje také indukci akrozomové reakce ionoforem A23187, ionty, progesteronem, vejcovodnou tekutinou, zona pellucida ZP nebo prvky ZP a posouzením správné reakce zárodečných buněk na tuto stimulaci (Liu & Baker 1996; Oehninger a kol. 2014). Srovnání počtu/procenta buněk reagujících na akrozom po stimulaci buněk spontánní akrozomové reakce je považováno za dobrý nástroj pro hodnocení potenciálu oplodnění spermií. Výsledky metaanalýzy odhalily vysokou prediktivní schopnost testů indukované akrozomové reakce pro predikci oplodnění (Oehninger a kol. 2014).

3.6.2.3 Poškození DNA

Mezi metodami používanými pro detekci změn ve stavu DNA je přesným, včasným a nákladově efektivním diagnostickým nástrojem stanovení struktury chromatinu ve spermatu (SCSA). Má také nejširší použití pro účely zjišťování změn stavu DNA ve zvířecím a lidském spermatu. Metoda SCSA je založena na předpokladu, že strukturně abnormální chromatin je náchylnější ke kyselé nebo tepelné denaturaci a využívá metachromatických vlastností akridinové oranže (AO). Toto barvivo emituje fluorescenci v zeleném pruhu, když se vkládá do neporušené dvojité šroubovice DNA. Když je barvivo spojeno s RNA a denaturovanou DNA, emituje fluorescenci v červeném pruhu (Partyka a kol. 2010).

Poškození DNA je důležitým prvkem kvality spermií, který je třeba posoudit, protože koreluje nejen se zhoršenou fertilitou *in vivo* a *in vitro*, ale také se zdravím potomků (Aitken 2006).

3.6.2.4 Poškození mitochondrií

Procento spermií s funkčními mitochondriemi bylo odhadnuto, jak popsal Partyka a kol. (2010). Stručně řečeno, sperma se zředí NaCl 0,9 % na koncentraci 100×10^6 spz/ml. Části (1000 ul) zředěného spermatu se umístí do cytometrických zkumavek a 20 ul pracovního roztoku Rhodaminu 123 (R123, Invitrogen) (0,01 g/ml) získaného zředěním zásobního roztoku Rhodaminu 123 (0,1 g/ml; 0,1 g Rhodaminu 123 byl zředěn v 1 ml NaCl 0,9 % v NaCl 0,9 % v poměru 1:10. Vzorky byly smíchány a inkubovány po dobu 20 minut při teplotě místnosti ve tmě. Buňky byly kontrastně obarveny 1 ul komerčního roztoku propidium jodidu

2 minuty před analýzou. Funkční mitochondrie byly identifikovány pro pozitivitu na Rhodamin 123 (zelená fluorescence) a mrtvé buňky pro pozitivitu na propidium jodid (červená fluorescence). Byly identifikovány dvě populace spermií: živé spermie s aktivními mitochondriemi a živé spermie s neaktivními mitochondriemi (Partyka a kol. 2010).

3.6.2.5 Oxidativní stres

Přesný mechanismus snížení fertilizační schopnosti kryokonzervovaných spermií není dosud zcela objasněn. Existují však studie o úloze reaktivních forem kyslíku (ROS) ve fungování spermií a jejich fertilizační schopnosti po krátkodobé konzervaci a kryokonzervaci (Chatterjee a kol. 2001). Mnoho studií ukázalo, že hlavním důvodem abnormálního fungování spermií je peroxidace lipidů (LPO) a antioxidační nerovnováha způsobená výskytem oxidačního stresu (Aitken a kol. 2006).

Oxidační stres vyskytující se ve spermiích je jev spojený se zvýšenou rychlostí oxidace buněčných komponentů a nadměrnou produkcí ROS (Aitken a kol. 1996). Nízká intenzita oxidačního stresu může mít příznivé účinky na buňky, zatímco jeho vysoká hladina může způsobit destrukci nukleových kyselin, proteinů, lipidů a sacharidů, což nakonec vede k buněčné smrti (Agarwal a kol. 2005). Vliv oxidačního stresu je zvláště důležitý při skladování spermií a jejich kryokonzervaci. Chatterjee & Gagnon (2001) zjistili zvýšenou produkci ROS v procesu zmrazování a rozmrazování spermatu. Hlavními místy jeho vzniku jsou mitochondrie a membrány spermií, které jsou zvláště citlivé na poškození náhlými změnami teploty. Aerobní buňka obsahuje substráty a enzymy k prevenci nebo omezení tvorby a množení ROS, ale antioxidační obrana spermií je relativně slabá a tyto zárodečné buňky jsou velmi náchylné k oxidačnímu stresu (Partyka a kol. 2010).

3.7 Funkční testy spermií

3.7.1 Test penetrace spermií

Testy penetrace oocytů zahrnují vícenásobné penetrace spermií oocytem a umožňují pozorování pronukleárního vývoje. Aplikace testu na oocytech křečka bez zón byla použita k hodnocení plodnosti mužů (Freeman a kol. 2001) a domácích zvířat (De los Reyes a kol. 2009). Test penetrace spermií je časově méně náročná technika než test *in vitro* fertilizace (IVF), protože oocyty mohou být nezralé a po vyhodnocení již nejsou dále vyvíjeny. V tomto testu jsou spermie přítomné v perivitelinním prostoru a v oplazmě oocytů pozorovány pod fluorescenční mikroskopií s použitím Hoechst 33258, PI nebo světelnou mikroskopií (aceto-orcein) (Hay a kol. 1997; Hewitt & England 1997). Všechny abnormality spermií a změny kryokonzervovaných spermií mohou ovlivnit konečné procento oplodněných oocytů a časový průběh penetrace spermií oocytovou zónou pellucidou.

3.7.2 Test vazby spermie na zonu pellucidu

Schopnost spermií vázat se na perivitelinní vrstvu je stěžejním krokem při oplodnění. Test na vazbu spermatu byl vyvinut tak, aby napodoboval tento krok *in vitro* a na kvantifikovat počet navázaných spermií (Barbato a kol. 1998). Tento test využívá

mikrotitrační destičky potažené extraktem z kuřecí perivitelinové vrstvy. Procento spermií ve vzorku se váže na mikrojamku, nenavázané spermie jsou vymyty a vázané spermie jsou kvantifikovány. Rozdíly ve kvalitě spermatu jednotlivých kohoutů jsou tímto testem detekovány. Rozdíly ve vazbě spermií jsou prediktivní plodnosti u několika různých linií kuřat (Barbato a kol. 1998; Barbato 1999).

Vazebný test vyžaduje určité technické dovednosti a čas. Data mohou být shromážděna na místě inkubace suspenze spermatu známé koncentrace na testovací destičce a následně odplavování nenavázaných spermií. Závěrečná analýza a hodnocení samců se provádí mimo pracoviště a zahrnuje specializované vybavení. Tento test byl upraven a zjednodušen pro použití v komerčních hejnech (Gill a kol. 1998).

3.7.3 Test vazby hyalorunu

Tento test je založen na skutečnosti, že kyselina hyaluronová se selektivně váže na zralé spermie s neporušeným akrozomem a s lepší morfologií (Huszar a kol. 2003). Spermie, které se dokázaly vázat na kyselinu hyaluronovou, dokončily spermatogenetické procesy remodelace plazmatické membrány spermií, cytoplazmatickou extruzi a nukleární náhradu histon-protamin. Vazba kyseliny hyaluronové se spermiemi indikuje buněčnou zralost, životaschopnost a spermie s neporušenými akrozomy. Pouze zralé, pohyblivé spermie se váží na hyaluron prostřednictvím specifických receptorů (Cayli a kol. 2003; Huszar a kol. 2003).

3.7.4 Test hypoosmotického bobtnání

Test hypoosmotického bobtnání je založen na principu, že životaschopné spermie mají neporušené membrány. V hypoosmotických podmínkách jsou proto bobtnání cytoplazmatického prostoru a stočení ocasu znaky pozorované u intaktních spermií. Mrtvé spermie tento jev nevykazují. Tento test vysoce koreluje s výsledky jiných metod hodnocení spermatu, jako je motilita a morfologie, ale stále existuje jen málo údajů o jeho významu pro plodnost (Goericke-Pesch & Failing 2013; Kumi-Diaka 1993).

4 Závěr

Cíl práce, sepsání přehledu *in vitro* analýz a porovnání jejich možnosti predikovat fertilizační schopnost inseminačních dávek kohoutů, byl splněn.

Ze zjištěných informací vyplývá, že průtoková cytometrie má největší potenciál predikce fertilizační schopnosti z toho důvodu, že hodnotí více atributů spermie současně (stav akrozomu, plazmatické membrány, mitochondrií a DNA).

Na základě přehledu doporučuji použití minimálně dvou systémů hodnocení spermií zároveň. Použití systému CASA (a to zejména parametry procenta motility a progresivní motility) a průtokové cytometrie (využitý parametrů poškození plazmatické membrány, poškození akrozomu a poškození mitochondrií) je dle mého názoru nejlepší kombinace pro získání vysoké korelace výsledků se skutečnou plodností kohoutů.

5 Literatura

- Agarwal A, Prabakaran S A, Said T M. 2005. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *Journal of andrology* **26**(6): 654-660.
- Agnieszka P, Wojciech N, Małgorzata O. 2012. Methods of Assessment of Cryopreserved Semen, *Current Frontiers in Cryobiology*, Prof. Igor Katkov (Ed.), ISBN: 978-953-51-0191-8, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-in-cryobiology/methods-of-assessment-of-cryopreserved-semen>
- Aire TA. 2007. Spermatogenesis and testicular Cycles. In *Reproduction Biology and Phylogeny of Birds*. Page 279-349 Jamieson BGM, Queensland Univ. Queensland, Australia.
- Aisha K, Zain UA. 2010. Artificial Insemination in Poultry. Department of Pathology, University of Agriculture Faisalabad, Pakistan. <http://www.vets-net.com/Default.aspx?page=pages/news/NewsItem.aspx&query=QMitemEQ273>
- Aitken R J, Buckingham D W, Carreras A, Irvine D S. 1996. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *Free Radical Biology and Medicine* **21**(4): 495-504.
- Aitken R J, Wingate J K, De Iuliis G N, Koppers A J, McLaughlin E A. 2006. Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **91**(10): 4154-4163.
- Aitken R J. 1992. On the contribution of leukocytes and spermatozoa to the high levels of reactive oxygen species recorded in the ejaculates of oligozoospermic patients. *J Reprod Fertil* **94**: 451-462.
- Aitken R J. 2006. Sperm function tests and fertility. *International journal of andrology* **29**(1): 69-75.
- Allen C J, Champion L R. 1955. Competitive fertilization in the fowl. *Poultry Science* **34**(6): 1332-1342.
- Alm K, Taponen J, Dahlbom M, Tuunainen E, Koskinen E, Andersson M. 2001. A novel automated fluorometric assay to evaluate sperm viability and fertility in dairy bulls. *Theriogenology* **56**(4): 677-684.
- Amann R P, Waberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* **81**(1): 5-17.
- Amann R P. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *Journal of andrology* **10**(2): 89-98.
- Bakst MR, Dymond JS. 2013. Artificial Insemination in Poultry. Page 175-188 *Success in Artificial Insemination, Quality of Semen and Diagnostics Employed*.
- Barbato G F, Cramer P G, Hammerstedt R H. 1998. A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertile males. *Biology of reproduction* **58**(3): 686-699.

- Barbato G F. 1999. Genetic relationships between selection for growth and reproductive effectiveness. *Poultry Science* **78**(3): 444-452.
- Bayyari G R, Cook J R, Harris Jr G C, Macy L B, Slavik M F, Skeeles J K. 1990. Research note: The evaluation of chicken spermatozoa using fluorescent staining in a 96-well format. *Poultry science* **69**(9): 1602-1605.
- Bearden HJ, Fuquay JW and Willard ST. 2004. *Applied Animal Reproduction*. Page 109-27 Pearson Education, Inc. New Jersey. 6th Edition.
- Bernal B, Behnamifar A, Álvarez-Rodríguez C, Toledano-Díaz A, Castaño C, Velazquez R, Santiago-Moreno J. 2022. Transit along the vas deferens results in a high percentage of filiform spermatozoa with compacted chromatin in the rooster (*Gallus domesticus*). *Reproduction, Fertility and Development* **34**(10): 699-712.
- Blesbois E, Brillard J P. 2007. Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. *Animal* **1**(10): 1472-1481.
- Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F. 2005. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction* **129**(3): 371-378.
- Blesbois E, Seigneurin F, Grasseau I, Limouzin C, Besnard J, Gourichon D, Tixier-Boichard M. 2007. Semen cryopreservation for ex situ management of genetic diversity in chicken: creation of the French avian cryobank. *Poultry Science*, **86**(3), 555-564.
- Bongalhardo D C, Somnapan-Kakuda N, Buhr M M. 2002. Isolation and unique composition of purified head plasma membrane from rooster sperm. *Poultry science* **81**(12): 1877-1883
- Boyers S P, Davis R O, Katz D F. 1989. *Automated semen analysis*. Year Book Medical Publishers.
- Bramwell R K, Marks H L, Howarth B. 1995. Quantitative determination of spermatozoa penetration of the perivitelline layer of the hen's ovum as assessed on oviposited eggs. *Poultry science* **74**(11): 1875-1883.
- Brillard J P. 2003. Practical aspects of fertility in poultry. *World's Poultry Science Journal*, **59**(4): 441-446.
- Brillard JP. 2004. Natural mating in broiler breeders: present and future concerns. *World's Poultry Science Journal* **60**: 439-445.
- Brito L F, Barth A D, Bilodeau-Goeseels S, Panich P L, Kastelic J P. 2003. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology* **60**(8): 1539-1551.
- Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, Ward D, Huszar G. 2003. Biochemical markers of spermatozoa function: Male fertility and spermatozoa selection for ICSI. *Reproductive Biomed Online* **7**: 462-468.

- Cerolini S, Zaniboni L, Maldjian A, Gliozzi T. 2006. Effect of docosahexaenoic acid and α -tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology* **66**(4): 877-886.
- Cole HH, Cupps PT. 1977. *Reproduction in domestic animals*. Page 1953rd Ed. New York. Academic press.
- Coward K, Ponting CP, Chang HY, Hibbitt O, Savolainen P, Jones KT and Parrington J. 2005. Phospholipase C ζ , the trigger of egg activation in mammals, is present in non-mammalian species. *Reproduction* **130**: 157-163.
- David G, Serres C, Jouannet P. 1981. Kinematics of human spermatozoa. *Gamete research* **4**(2): 83-95.
- De Jong IC, Guemene D. 2011. Major welfare issues in broiler breeders. *World's Poultry Science Journal* **67**: 73-81.
- De los Reyes M, Palomino J, de Lange J, Anguita C, Barros C. 2009. In vitro sperm penetration through the zona pellucida of immature and in vitro matured oocytes using fresh, chilled and frozen canine semen. *Animal Reproduction Science* **110**: 37-45.
- Donoghue A M, Wishart G J. 2000. Storage of poultry semen. *Animal reproduction science* **62**(1-3): 213-232.
- Ericsson S A, Garner D L, Thomas C A, Downing T W, Marshall C E. 1993. Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology* **39**(5): 1009-1024.
- Esteves S C, Sharma R K, Thomas Jr A J, Agarwal A. 2007. Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test. *International braz j urol* **33**: 364-376.
- Etches JR. 2000. *Reproduction in Poultry*. Page 234-262 Chapter 9. *Artificial Insemination in Poultry*.
- Etches RJ. 1996. The male. *Reproduction in poultry*. Page 458, 208-233 RJ Etches Cab,
- Freeman M R, Archibong A E, James J, Mrotek C.M, Whitworth G A, Weitzman G A. 2001. Male partner screening before in vitro fertilization: Preselecting patients who require intracytoplasmic sperm injection with the sperm penetration. *Fertility and Sterility* **76**: 1113-1118.
- Froman D P. 2006. Application of the sperm mobility assay to primary broiler breeder stock. *Journal of applied poultry research* **15**(2): 280-286.
- 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. *Journal of andrology* **15**(6): 620-629.

- Garner D L, Pinkel D, Johnson L A, Pace M M. 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction* **34**(1): 127-138.
- Getachew T. 2016. A review article of artificial insemination in poultry. *World's Veterinary Journal* **6**(1): 25-33.
- Gill S P, Hulet M R, Amann R P. 1998. Identification of toms whose sperm differ in capacity to bind to an egg-membrane substrate in vitro. *Poultry Science* **77**: 90.
- Goericke-Pesch S, Failing K. 2013. Retrospective analysis of canine semen evaluations with special emphasis on the use of the hypoosmotic swelling (HOS) test and acrosomal evaluation using Spermac®. *Reproduction in Domestic Animals* **48**: 213–217.
- Gordon I. 2005. Reproductive technologies in farm animals. Page 16-28 CABI Publishing UK. Chapter: 1.
- Graham J K, Kunze E, Hammerstedt R H. 1990. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of reproduction* **43**(1): 55-64.
- Graham J K. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal reproduction science*, **68**(3-4): 239-247.
- Hafez B and ESE Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. New York. Lippincott Williams and Wilkins, USA
- Hammerstedt RH. 1999. Symposium summary and challenges for future. *Poultry Science* **78**: 459-466.
- Haugland R P. 1996. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. Molecular Probes, Eugene, **8**.
- Hay M A, King W A, Gartley C J, Leibo S P, Goodrowe K L. 1997. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility* **51**: 99–108.
- Hewitt D A, England G C W. 1997. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoa performance in vitro. *Animal Reproduction Science* **50**: 123–139.
- Howarth Jr B. 1970. An examination for sperm capacitation in the fowl. *Biology of Reproduction* **3**(3): 338-341.
- Howarth Jr B. 1983. Fertilizing ability of cock spermatozoa from the testis epididymis and vas deferens following Intramaginal insemination. *Biology of Reproduction* **28**(3): 586-590.
- <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85145390262&origin=inward&txGid=741f308b5857561d277403c8f48c51b9>

- Huszar G, Ozenci C C, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. 2003. Hyaluronic acid binding by human spermatozoa indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertility and Sterility* **79** (3): 1616–1624.
- Chatterjee S, Gagnon C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* **59**(4): 451-458.
- Int. J. Adv. Res. Biol. Sci., 9, Page90-97
- Jeulin C, Lewin L M, Chevrier C, Schoevaert-Brossault D. 1996. Changes in flagellar movement of rat spermatozoa along the length of the epididymis: Manual and computer-aided image analysis. *Cell motility and the cytoskeleton*: **35**(2): 147-161.
- Katkov I I, Lulat A G. 2000. Do conventional CASA-parameters reflect recovery of kinematics after freezing? CASA paradox in the analysis of recovery of spermatozoa after cryopreservation. *Cryo Letters* **21**(3): 141-148.
- Kharayat N S, Chaudhary G R, Katiyar R, Balmurugan B, Patel M, Uniyal S, Mishra G K. 2016. Significance of artificial insemination in poultry. *Research & Reviews: Journal of Veterinary Science and Technology* **5**(1): 1-5.
- Kumi-Diaka J. 1993. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology* **39**: 1279–1289.
- Lavara R, Mocé E, Lavara F, de Castro M P V, Vicente J S. 2005. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology* **64**(5): 1130-1141.
- Leeson S, Summer JD. 2009. *Broiler Breeder Production*. Page 22-49 Chapter 2. Reproduction. Nottingham University Press.
- Liu D Y, Baker H W. 1996. Relationship between the zonapellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction and the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding. *Fertility and Sterility* **66**: 312–315.
- Madhuri D, Gupta V, Nema S, Patidar A, Shivhare M, Singh N, Shakya V. 2012. Modern semen evaluation techniques in domestic animals: A review. *International Journal of Biomedical and Life Sciences (DHR-IJBLS)* **3**: 10-22
- Máchal L, Křivánek I. 2002. Quality Indicators of Semen of Roosters of Three Parental Layer Lines and Specific Conductivity of the Semen. *Acta Veterinaria Brno*, **71**(1), 109-116.
- Mortimer D, Aitken R J, Mortimer S T, Pacey A A. 1995. Workshop report: clinical CASA-- the quest for consensus. *Reproduction, Fertility and Development* **7**(4): 951-959.
- Mortimer D. 1990. Objective analysis of sperm motility and kinematics. *Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility* **97**: 133.
- Mortimer S T, Van der Horst G, Mortimer D. 2015. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian journal of andrology* **17**(4): 545.

- Nagy S, Jansen J, Topper E K, Gadella B M. 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology of reproduction* **68**(5): 1828-1835.
- Nguyen T M D, Alves S, Grasseau I, Métayer-Coustard S, Praud C, Froment P, Blesbois E. 2014. Central role of 5'-AMP-activated protein kinase in chicken sperm functions. *Biology of reproduction*, **91**(5), 121-1.
- Nizański W, Klimowicz M, Partyka A, Savić M, Dubiel A. 2009. Effects of the inclusion of Equex STM into Tris-based extender on the motility of dog spermatozoa incubated at 5 degrees C. *Reproduction in Domestic Animals* **44** (2): 363–365.
- Nizański W, Partyka A, Rijsselaere T. 2012. Use of fluorescent stainings and flow cytometry for canine semen assessment. *Reproduction in Domestic Animals* **47**(6): 215–221.
- Oehninger S, Franken D R, Ombelet W. 2014. Sperm functional tests. *Fertility and Sterility* **102**: 1528–1533.
- Okamura F, Nishiyama H. 1978a. The passage of spermatozoa through the vitelline membrane in the domestic fowl, *Gallus gallus*. *Cell Tissue Res*, **188**: 497-508.
- Okamura F, Nishiyama H. 19978b. Penetration of spermatozoa into the ovum and transformation of the spermatozoon nucleus into the male pronucleus in the domestic fowl. *Cell and Tissue Research*, **190**: 89-98.
- Parker H M, McDaniel C D. 2006. The immediate impact of semen diluent and rate of dilution on the sperm quality index, ATP utilization, gas exchange, and ionic balance of broiler breeder sperm. *Poultry science* **85**(1): 106-116.
- Partyka A, Łukaszewicz E, Nizański W. 2011. Flow cytometric assessment of fresh and frozen-thawed Canada goose (*Branta canadensis*) semen. *Theriogenology* **76**(5): 843-850.
- Partyka A, Nizański W, Łukaszewicz E. 2010. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology* **74**(6): 1019-1027.
- Peters SO. 2008. Semen quality traits of seven strain of chickens raised in the humid tropics. Page 949-953 Peters SO, Shoyebo OD, Ilori BM et al. *Int. j. poult. Sci.*
- Quinn JP, Burrows WH. 1936. Artificial insemination in fowls. *Journal of Hered* **27**: 31–37.
- Rodriguez-Martinez H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?. *Reproduction in domestic animals* **38**(4): 312-318.
- Rota A, Peña A I, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. 1999. In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Animal Reproduction Science* **57**: 199–215.
- Saacke R G, Dalton J C, Nadir S, Nebel R L, Bame J H. 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Animal reproduction science* **60**: 663-677.

- Salisbury GW, Van Demark NL and Lodge JR. 1978. Extenders and extension of unfrozen semen. Page 443-493 Salisbury GW, editor. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle, 2nd ed. San Francisco: W.H. Freeman and Company,
- Santiago-Moreno J, Estes M C, Villaverde-Morcillo S, Toledano-Díaz A, Castaño C, Velázquez R, Martínez J G. 2016. Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. Asian journal of andrology, 18(6): 882.
- Santolaria P, Vicente-Fiel S, Palacín I, Fantova E, Blasco M E, Silvestre M A, Yániz J L. 2015. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. Animal reproduction science **163**: 82-88.
- Senger PL. 2003. Pathways to pregnancy and Parturition. (99164-6332) 2nd Ed. Pullman, Washington, USA
- Sexton T J, Fewlass T A. 1978. A new poultry semen extender: 2. Effect of the diluent components on the fertilizing capacity of chicken semen stored at 5° C. Poultry Science **57**(1): 277-284.
- Seyoum K. 2020. Advanced Semen Evaluation Techniques: Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) and Flow Cytometry. GSJ, **8**(8).
- Stepinska U, Bakst MR. 2007. Fertilization. Page 553-587 Jamienson BGM In: Reproductive Biology and Phylogeny of Birds vol. 10.
- Taye S, Esatu W. 2022. Potential and possibility of artificial insemination in poultry: a review article
- Thurston R J, Hess R A. 1987. Ultrastructure of spermatozoa from domesticated birds: comparative study of turkey, chicken and guinea fowl. Scanning Microscopy **1**(4): 30.
- Ulfina G, Mohanty T, Raina V, Gupta A, Shiv P. 2014. Post thaw and fresh spermatozoa motion characteristics of sahiwal bull under computer assisted semen analyser (CASA). International journal of livestock production **5**: 65-70.
- Van der Horst G, Maree L, du Plessis S S. 2018. Current perspectives of CASA applications in diverse mammalian spermatozoa. Reproduction, Fertility and Development **30**(6): 875-888.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology, **57**(1): 149-179.
- Waggoner A S. 1990. Fluorescent probes for cytometry. Flow cytometry and sorting: 209-225.
- Walters A H, Eyestone W E, Saacke R G, Pearson R E, Gwazdauskas F C. 2005. Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology. Theriogenology **63**(7): 1925-1937.
- WHO. 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Page 120-205 5th ed. World Health Organization (WHO), Geneva.

- Wilhelm K M, Graham J K, Squires E L. 1996. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology* **46**(4): 559-578.
- Williams J, de Reviere M. 1981. Variations in the plasma levels of luteinizing hormone and androstenedione and their relationship with the adult daily sperm output in cockerels raised under different photoperiods. *Reproduction Nutrition Development* **21**: 1125-1135.
- Wishart G J, Palmer F H. 1986. Correlation of the fertilising ability of semen from individual male fowls with sperm motility and ATP content. *British Poultry Science* **27**(1): 97-102.
- Zaniboni L, Cerolini S. 2009. Liquid storage of turkey semen: Changes in quality parameters, lipid composition, and susceptibility to induced peroxidation in vitro in control, n-3 fatty acid, and alpha-tocopherol-rich sperm. *The science of animal reproduction* **112** (1-2): 51-65.