

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Sledování funkčních parametrů spermií po inovaci  
kryokonzervačních médií**

**Diplomová práce**

**Bc. Gabriela Guthová  
Reprodukční biotechnologie**

**Vedoucí práce: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.  
Konzultant: Ing. Ondřej Šimoník, Ph.D.**

© 2020/2021 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Sledování funkčních parametrů spermií po inovaci kryokonzervačních médií" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2021

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala paní doktorce RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. a panu doktorovi Ing. Ondřeji Šimoníkovi, Ph.D. za umožnění vypracování této práce. Vážím si jejich cenných rad, zkušeností i ochoty, kterou mi projevovali v průběhu zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Ondřeji Honcovi za poskytnuté školení práce na průtokovém cytometru BD LSR Fortessa (BD Bioscience).

Projekt BIOCEV—z originálu Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University (CZ.1.05/1.1.00/02.0109) z Evropského fondu pro regionální rozvoj, byl dotován grantem Technologické Agentury ČR TJ02000219 Inovativní nástroje pro diagnostiku a zlepšení fertilizační schopnosti spermií.

# Sledování funkčních parametrů spermií po inovaci kryokonzervačních médií

## Souhrn

Cílem práce bylo hodnocení kančích spermií v kryokonzervačních médiích po náhradě glycerolu.

Teoretická část práce byla věnována hodnocení fyziologických i patofyziologických procesů, jimiž se reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species – ROS) podílejí na metabolismu spermatických buněk. Zhoršená fertilizační schopnost spermií může často souviset právě s nadměrnou produkcí ROS. Proto je část práce věnována také způsobům vyšetření zátěže buněk volnými radikály.

V rámci praktické části diplomové práce byla na spermiích kanců, býků a lidí kompletně nastavena metodika hodnocení ROS pomocí fluorochromu CellROX Deep Red. Tato analýza následně byla prováděna fluorescenční mikroskopií a průtokovou cytometrií.

Nově nastavená metodika značení buněk pomocí sondy CellROX byla aplikována pro hodnocení ROS u spermií kanců, inkubovaných v kryokonzervačních médiích, ve kterých byla snížena procentuální koncentrace standardně využívaného kryoprotektantu glycerolu, za využití polysacharidu dextranu. Paralelně s ROS byla hodnocena také viabilita rozmrazených buněk, a to rovněž pomocí fluorochromu novější generace Zombie Ultra Violet dye.

V rámci této práce byla potvrzena vyšší přesnost analýzy zátěže ROS pomocí markeru CellROX Deep Red oproti častěji využívané sondě H<sub>2</sub>DCFDA. Dále byl optimalizován protokol pro přípravu vzorků k hodnocení ROS pomocí fluorescenčního mikroskopu a průtokové cytometrie. Tato metoda by v budoucnosti, díky své přesnosti a možnosti vzorky fixovat, mohla dosáhnout větší a tedy praktické využitelnosti při hodnocení zátěže ROS u různých živočišných druhů. V rámci této práce však nebyl prokázán signifikantní vliv využití glycerolu v kombinaci s 20 kDa dextranem v médiu pro kryokonzervaci ejakulátu kanců ( $p < 0,05$ ).

**Klíčová slova:** ROS, viabilita, průtoková cytometrie, fluorescenční markery, kryokonzervace

# **Monitoring of sperm functional parameters after innovation of cryopreservation media**

## **Summary**

Main goal of this theses was to analyse boar semen after substitution of glycerol in a freezing media.

Theoretical part of this theses was dedicated to evaluation of physiological and patophysiological processes of ROS (reactive oxygen species) in sperm cells metabolism. Increase of ROS production may have some connection with impaired male fertility. Determination methods of oxidative stress in cells were also discussed in this part of the theses.

ROS evaluation methodology by fluorochrome CellROX Deep Red on boar, bull and human semen was set in practical part of this theses. Analysis of samples was conducted by fluorescent microscopy or flow cytometry.

The new methodology of cell marking by CellROX was then applied for evaluation of stress in boar sperm incubated in a freezing media with lowered procentual concentration of standardly used cryoprotectant glycerol by using dextran polysaccharide.

The precision of CellROX Deep Red probe was confirmed in comparison with more often used fluorochrome H<sub>2</sub>DCFDA in this thesis. Protocol optimalization of sample preparation for ROS assessment by fluorescent microscopy and flow cytometry was also accomplished. This method of ROS assessment could be used more widely and practically for evaluation of oxidative stress in various species, due to its precision and possibility to fixate the sample. Experiment performed in this theses didn't confirm significant effect of glycerol combined with 20 kDa dextran in medium for cryopreservation of boar semen ( $p < 0,05$ ).

**Keywords:** ROS, viability, flow cytometry, fluorescent probes, cryopreservation

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1 Volné radikály a Reactive Oxygen Species (ROS)</b> .....	<b>3</b>
<b>3.2 Antioxidační mechanismy</b> .....	<b>5</b>
3.2.1 Antioxidanty enzymatické povahy.....	5
3.2.2 Antioxidanty neenzymatické povahy.....	6
<b>3.3 Vznik ROS v ejakulátu</b> .....	<b>7</b>
3.3.1 Vznik ROS ve spermatických buňkách.....	7
3.3.2 Vznik ROS v leukocytech pohlavních vývodných cest.....	8
<b>3.4 Vliv ROS na spermiogenezi a maturaci spermií</b> .....	<b>9</b>
3.4.1 Spermiogeneze.....	9
3.4.2 Průchod nadvarletem.....	10
3.4.3 Kapacitace a hyperaktivace spermií.....	10
3.4.4 Akrosomální reakce.....	11
3.4.5 Fúze gamet.....	11
<b>3.5 Patofyziologie a vliv ROS na samčí infertilitu</b> .....	<b>12</b>
3.5.1 Plazmatická membrána spermie.....	12
3.5.2 Jádro spermie.....	13
3.5.3 Vnější faktory působící na produkci ROS.....	14
<b>3.6 Hodnocení ROS v ejakulátu</b> .....	<b>17</b>
3.6.1 Nepřímé metody stanovení ROS v ejakulátu.....	18
3.6.2 Přímé metody stanovení ROS v ejakulátu.....	21
<b>4 Materiál a metody</b> .....	<b>26</b>
4.1.1 Použité reagensie a chemikálie.....	26
4.1.2 Vzorky spermií využití v experimentu a jejich příprava.....	26
4.1.3 Příprava a zpracování vzorků.....	28
4.1.4 Analýza vzorků fluorescenčním mikroskopem.....	29
4.1.5 Analýza vzorků průtokovou cytometrií.....	31
4.1.6 Statistická analýza.....	31
<b>5 Výsledky</b> .....	<b>32</b>
<b>5.1 Hodnocení CASA</b> .....	<b>32</b>
<b>5.2 Hodnocení průtokovým cytometrem</b> .....	<b>33</b>
5.2.1 Nastavení metodiky pro býčí spermie.....	33
5.2.2 Nastavení metodiky pro humánní spermie.....	36
5.2.3 Nastavení metodiky pro kančí spermie a její aplikace na hodnocení rozdílů v modifikovaných médiích pro kryokonzervaci.....	36

5.2.4	Statistická analýza efektu kryoprotektantů .....	38
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>44</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratek a symbolů .....</b>	<b>51</b>





# 1 Úvod

Využívání kryokonzervovaných dávek spermií kanců bylo v komerční sféře známo již od 70. let minulého století. Technologie kryokonzervace spermatu zahrnuje ředění vzorku, jeho ošetření kryoprotektivou, chlazení, zmrazení, uchovávání v tekutém dusíku a také rozmrazování (Pursel & Johnson 1975). Tento proces zpracování však způsobuje značný osmotický i chemický stres spermiím ve vzorku. Obzvláště spermie kanců jsou k tomuto stresu extrémně náchylné. Zhruba 40 % až 50 % všech spermií ve vzorku nepřežije chladový šok při kryokonzervaci a rozmrazování dávek a hodnoty úspěšného zabřezávání samic jsou o 20 % až 30 % nižší, než při inseminaci chlazenými dávkami (Saravia et al. 2005). Proto jsou kryokonzervované dávky kančího spermatu v celosvětovém měřítku využívány pouze z 1 % oproti dávkám chlazeným (Holt 2000). Tato skutečnost je zásadním pilířem snah vědců o inovace mrazicích médií. Již od počátku využití kryokonzervovaných inseminačních dávek je využíván glycerol, jako kryoprotektivní médium. Snaha o vylepšení hodnot parametrů viability, motility, integrity akrosomů spermií a s tím související fertility spermií, vede k tvorbě inovativních médií.

Tato diplomová práce bude zaměřena na hodnocení viability a míry oxidačního stresu při využití klasického média s obsahem glycerolu a média obohaceného o dextran, tedy o glukózový polysacharid. Mimo extrémně citlivých kančích spermií bude analýza oxidačního stresu po rozmrazení dávek prováděna na spermiích býčích a lidských.

Oxidační stres může být jedním ze zásadních problémů doprovázejících kryokonzervaci spermatu a negativně ovlivňujících parametry spermií ve vzorku. Díky vysoké produkci volných kyslíkových radikálů (Reactive Oxygen Species - ROS) mohou být narušeny integrity plazmatických membrán, což ve svém důsledku může mít dopad na oplozovací schopnost spermií, jejich pohyb i viabilitu (de Lamirande et al. 1997). Proto bude teoretická část věnována hlavně metabolismu volných kyslíkových radikálů, popisu fyziologických i patologických procesů buněk souvisejících s ROS a postupům, kterými jsou ROS v laboratořích vyšetřovány.

Laboratorní vyšetření oxidačního stresu buněk je možné provádět na průtokovém cytometru pomocí fluorescenčních sond, které oddělí populaci stresovaných buněk a populaci buněk s fyziologickou hladinou volných radikálů. Nejčastěji je k hodnocení oxidačního stresu momentálně využívána sonda H<sub>2</sub>DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát). Jsou však vyráběna novější fluorescenční próby, které mají oproti H<sub>2</sub>DCFDA i značné výhody (Lançoni et al. 2017). Experimentální část práce se proto mimo hodnocení oxidačního stresu a viability buněk po rozmrazení kryokonzervovaných inseminačních dávek, bude zabývat výhodou využití poměrně nově na trhu dostupného fluorochromu CellROX Deep Red, a to v porovnání s výsledky získanými ze vzorků barvených sondou H<sub>2</sub>DCFDA.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem práce bylo analyzovat hodnoty viability a oxidačního stresu na vzorcích kančích spermii po náhradě glycerolu v médiích pro jejich kryokonzervaci.

Hlavní hypotéza práce tvrdí, že inseminační dávky kanců, kryokonzervované v mrazicím médiu 2% glycerolu a 1% 20 kDa dextranu, tedy nepermeabilního kryoprotektantu, budou po rozmrazení vykazovat méně spermii zatížených oxidačním stresem, než referenční inseminační dávky kryokonzervované v médiu s penetrujícím kryoprotektantem 3% glycerolem.

Zároveň bude v práci zkoumána hypotéza říkající, že CellROX Deep Red je díky možnosti fixace paraformaldehydem oproti nefixovatelnému fluorochromu H<sub>2</sub>DCFDA sonda, která bude zaručovat přesnější výsledky hodnocení ROS zátěže spermatických buněk.

### 3 Literární řešerše

Spermatické buňky vyprodukované ve varleti nejsou schopny oplodnit vajíčko. Schopnost oplození získávají až průchodem skrz vývodné cesty pohlavní a močové. Zrání a maturace buněk jsou podmíněny chemickými látkami prostředí a změnami, které probíhají na membránách i v cytoskeletu buněk (Bedford 1975).

Základním předpokladem metabolických změn probíhajících ve spermích je produkce energie mitochondriemi uloženými ve středním segmentu bičíku spermii. Molekuly reaktivních forem kyslíku (Reactive Oxygen Species - ROS) vznikají jako vedlejší produkt této reakce. Ve fyziologických procesech buněk fungují jako mezibuněční i vnitrobuněční poslové. Podporují proliferaci, diferenciaci, migraci i růst buněk (Dymkowska 2016). Pozitivní vliv však mají pouze ve chvíli, kdy je udržena homeostáza. Při narušení oxidoredukční rovnováhy organismu dochází ke zvýšení produkce ROS. Tím, že tělo nestačí vzniklé radikály odbourávat, je navozen patologický stav. ROS mohou poškodit struktury stavebních proteinů i lipidů, stejně jako i stavbu DNA. Podporují zánětlivé reakce a snižují životaschopnost buněk. V konečném stadiu mohou přispět až k buněčné smrti (Agarwal et al. 2006). Ačkoliv zatím nebylo potvrzeno, že by ROS ovlivňovaly samotnou schopnost fertilizace, jejich působením vznikají morfologické abnormality, které nepřímo mohou ovlivnit i schopnost oplození (Wagner et al. 2017).

Z plemenářského hlediska nás zajímá, jak mohou ROS ovlivnit životaschopnost a oplozeníschopnost spermii hlavně kvůli biotechnologickým postupům využívaným při skladování a transportu spermii. Kryokonzervované inseminační dávky jsou praktické z hlediska využití kvůli dlouhé době skladování a možnosti inseminovat samice spermatem samce ze druhého konce světa (Rozeboom 2000). Nicméně právě kryokonzervace značně zvyšuje stresovou zátěž, které jsou buňky vystaveny. S mírou stresu se zvyšuje také množství produkovaných radikálů, které mohou mít na spermie již výše zmíněné negativní účinky (Barbas & Mascarenhas 2008). Pro vytváření kvalitních inseminačních dávek je tedy nutné porozumět metabolismu ROS a získané poznatky aplikovat do praxe při jejich vytváření.

V experimentálních podmínkách se dnes využívá velké množství postupů k detekci oxidativního stresu buněk. V plemenářské praxi se však při hodnocení ejakulátu přistupuje hlavně k vyšetření morfologických a pohybových schopností gamet (Quintero-Moreno et al. 2004). Technik pro zjištění koncentrace ROS v buňkách se využívá až ve chvíli, kdy sperma nedosahuje požadované kvality při oplození, i přes dobré makroskopické i mikroskopické hodnocení (Barbas & Mascarenhas 2008).

#### 3.1 Volné radikály a Reactive Oxygen Species (ROS)

Volné radikály jsou částice schopné samostatné existence, které ve svých orbitalech obsahují alespoň jeden nespárovaný elektron. Taková struktura jim zajišťuje vysokou reaktivitu s lipidy, mastnými kyselinami a karbohydráty. Přímou oxidací těchto struktur může dojít k zásadním poruchám morfologie i metabolismu buněk (Bansal & Bilaspuri 2011). Nízké hladiny ROS naopak vedou k vyčerpání zásob ATP a nízké fosforylaci membránových

proteinů. Ve svém důsledku tedy nedostatek ROS v buňkách vede k dočasné ztrátě motility spermií (Griveau et al. 1995).

Termín ROS se využívá při popisu všech kyslíkových radikálů (Halliwell & Gutteridge 1999). Radíme mezi ně superoxidové aniony ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), peroxylové ( $\bullet\text{ROO}^-$ ) a hydroxylové ( $\bullet\text{OH}$ ) radikály a peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Technicky k ROS nejsou řazeny molekuly oxidu dusnatého (NO) a peroxynitridového anionu ( $\text{ONOO}^-$ ). Jedná se o zástupce reaktivních forem dusíku (RNS). Interakce těchto molekul s ostatními ROS však významně přispívá k samčí infertilitě, proto jsou zde také zmíněny (Sies 1997).

Superoxidové aniony vznikají redukcí molekuly kyslíku při metabolických dějích v mitochondriích nebo endoplazmatickém retikulu buněk. Původní relativně stabilní struktura kyslíku, kdy oba atomy obsahují jeden nespárovaný elektron, je redukcí narušena a vzniká značně nestabilní molekula superoxidu. V určitém množství jsou tyto molekuly zásadní pro správný vývoj samčích gamet (Halliwell & Gutteridge 1999). Podílejí se na prvotním narušení stability membrány, která předchází změnám v její stavbě. Stálé hladiny těchto radikálů jsou potřebné k vyvolání kapacitační reakce a následné hyperaktivaci spermií (de Lamirande & Gagnon 1993). Dále ze superoxidů redoxními reakcemi vznikají další reaktivní formy kyslíku.

Dismutační reakcí superoxidu vzniká v mitochondriích peroxid vodíku. Volné elektrony obou atomů kyslíku jsou využity pro vazbu s atomy vodíku. Peroxid vodíku není pro buňku tak toxický jako superoxidové radikály (Alvarez et al. 1987). Jelikož nenesou žádný náboj, snadno pronikají přes plazmatické membrány buněk, a ačkoliv se nejedná o radikály, vykazují jeho molekuly vysokou reaktivitu s buněčnými strukturami. Tyto molekuly slouží buňkám hlavně k přenosu signálu mezi jednotlivými kompartmenty a k formování struktury molekul DNA v jádře (Halliwell & Gutteridge 1989).

Reakcí peroxidu vodíku a superoxidu, katalyzovanou atomy kovů, vznikají hydroxylové radikály. Ty jsou ze všech ROS nejvíce reaktivní a pro buňky tím pádem i nejvíce toxické. Jejich reaktivita je však omezena velmi nízkou stabilitou molekuly a krátkým poločasem rozpadu. Hydroxylové radikály ovlivňují všechny buněčné struktury. Zásadní je jejich role přenašečů elektronů při redoxních reakcích v buňkách (Halliwell & Gutteridge 1999). Do nich patří například iniciace peroxidace membránových lipidů. V případě, že radikály proniknou do jádra, mají schopnost navázat se na guanin zabudovaný v DNA šroubovici a vytvořit hydroxyguanin (Helbock et al. 1998).

Peroxylový radikál je vytvářen v aerobním prostředí při rozpadu molekul peroxidu vodíku. V buňce peroxylový radikál oxiduje nikotinamid adenosin dinukleotid (NADH) a hraje důležitou roli při extrakci vodíku z nenasycených mastných kyselin membrán. Lipidová peroxidace působí v membráně snížení fluidity, inaktivaci membránových receptorů i enzymů a zvýšení nespecifické permeability membrány pro ionty, což je důležité pro metabolické zranění spermií. Peroxylace membrán však probíhá pouze do doby, kdy spolu zreagují dva peroxylové radikály (de Lamirande & Gagnon 1993).

Zástupci RNS jsou oxid dusnatý (NO) a peroxynitrid ( $\text{ONOO}^-$ ). Oxid dusnatý podobně jako superoxydy podporuje kapacitační a akrosomální reakci spermií. Snižuje také hladinu nebezpečných hydroxylových radikálů v organismu (Herrero et al. 2001).

Reakcí oxidu dusnatého s hydroxylovým radikálem vzniká peroxynitrid. Záporný náboj vzniklého peroxynitridu urychlí jeho reakci s NADH. Ten slouží v organismu jako přenašeč

elektronů. Tímto reakčním mechanismem zanikají volné radikály a jsou ochráněny bílkovinné struktury, které s peroxynitridem reagují méně ochotně než NADH (de Lamirande et al. 1997).

V organismu musí být zachována rovnováha koncentrací mezi těmito reaktivními částicemi a molekulami antioxidantů, které zabraňují oxidaci buněčných struktur tím, že podporují reakce radikálů a navozují opět stabilní strukturu molekul (Sies 1997).

## 3.2 Antioxidační mechanismy

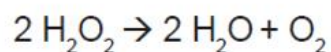
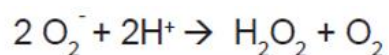
Antioxidační ochrana organismu spočívá ve snaze minimalizovat počet volných radikálů v buňkách. Některé antioxidanty zabraňují tvorbě radikálů, jiné indukují reakce přeměňující radikály na stabilní molekuly. Poslední formou obrany jsou opravy poškozených struktur buněk. Díky těmto mechanismům se netvoří další molekuly ROS, které by mohly zvýšit oxidativní stres buněk (Sies 1997). Volné radikály zanikají například zachycením na molekulách, takzvaným quenchingem. Dalším způsobem zániku jsou vzájemné reakce dvou radikálů. ROS jsou také z těla vylučovány močí, stolicí, nebo i potem a hnisem. Zásadní roli antioxidační ochrany hrají chemické látky schopné snížit hladinu ROS v těle nebo přímo potlačit jejich tvorbu (Halliwell & Gutteridge 1999).

Antioxidanty mohou být enzymatické ale i neenzymatické povahy. Látky enzymatické povahy jsou hojně zastoupeny v semenné plazmě i v tekutině nadvarlete. Mezi neenzymatické antioxidanty řadíme například vitamíny přijímané v potravě (Sies 1997). Při sestavování krmných dávek by chovatel neměl zapomenout právě na esenciální vitamíny, nezbytné i pro udržení hladiny ROS v organismu (Puppel et al. 2014).

### 3.2.1 Antioxidanty enzymatické povahy

V buňkách existují reakční mechanismy, které jsou schopné díky enzymům přeměnit radikálové molekuly opět na molekuly kyslíky a vody (de Lamirande et al. 1997).

Důležitými katalyzačními antioxidanty jsou enzymy SOD (superoxid dismutáza), GPX (glutathion peroxidáza) a CAT (kataláza).



**Obrázek 1 : Reakce katalyzované antioxidačními enzymy**

**Zdroj: <https://www.thermofisher.com>**

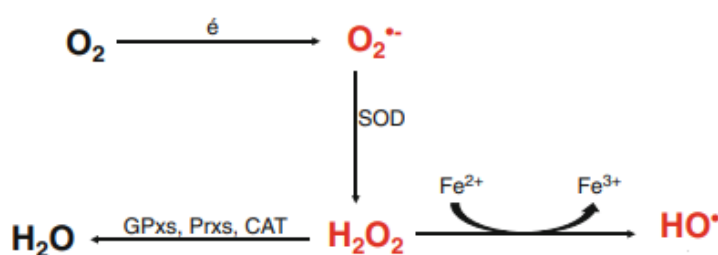
První reakci na Obrázku 1. katalyzuje enzym SOD. Reakce superoxidů pro přeměnu na peroxidy vodíku by bez tohoto enzymu probíhala pouze velmi pomalu. Jelikož je tento způsob jediným zdrojem pro získání peroxidů vodíku ve spermiích, je tento enzym nezbytný pro získání spermií s fertilizační schopností (Alvarez et al. 1987). Přeměnou superoxidu se snižuje míra narušení membrán i poškození DNA buněk. Velké koncentrace SOD byly objeveny v Sertoliho buňkách, které poskytují podporu a výživu germinálním buňkám v rámci

spermatogeneze (Guerriero et al. 2014). Dále je SOD přítomna v epididimální tekutině a také v semenné plazmě (Wagner et al. 2017).

Druhá reakce přeměny peroxidu je katalyzována enzymem katalázou. CAT je enzym peroxisomů, který urychluje přeměnu  $\text{H}_2\text{O}_2$  na  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{O}_2$ . Peroxid vodíku je nejčastějším ROS, který je zodpovědný za ztrátu funkce spermie. Kataláza je jediný antioxidant, který peroxidy v pohlavním traktu selektivně vychytává. V aerobních podmínkách však kataláza naopak peroxid produkuje (de Lamirande et al. 1997). Jelikož má tento enzym vysokou molekulární váhu, nedostane se skrz membránu do buňky a rozkládá peroxidy pouze v extracelulárním prostoru.

Zatím nebyl objeven mechanismus, kterým peroxidy zahajují akrosomální reakce. Jak již bylo řečeno, jsou schopné pronikat skrz membránu, ale i v případě, že by pro zahájení reakce byly potřebné peroxidy uvnitř buněk, je kataláza schopna ovlivňovat jejich koncentraci (Bize et al. 1991).

GPX katalyzuje oxidací glutathionu přeměnu  $\text{H}_2\text{O}_2$  na vodu. Velké koncentrace GPX jsou v Sertoliho buňkách i ve výstelce hlavy nadvarlete. Tento enzym chrání hlavně plazmatické membrány před účinky ROS. V přítomnosti kovového kationtu však peroxidy vodíku dávají vzniknout reaktivnějším hydroxylovým radikálům, jak vidíme na obrázku níže (El-Osta & Circu 2016).



**Obrázek 2: Přeměna ROS působením enzymů**

**Zdroj: El-Osta & Circu (2016)**

Dle obrázku 2. si můžeme představit, že disbalance způsobená velkým množstvím antioxidantů vede k nadměrné produkci vody a nedostatečné koncentraci ROS. Naopak se buňka dostává při nadměře produkce ROS do oxidativního stresu. Také proto je důležité, aby byla v okolí buněk zachována rovnováha mezi prooxidanty a antioxidanty (Agarwal et al. 2006).

### 3.2.2 Antioxidanty neenzymatické povahy

Neenzymatické antioxidanty mohou být syntetizovány samotnými buňkami, nebo přijímány s potravou (Sies 1997). Asi nejvýznamnějším antioxidantem je glutathion sloužící jako koenzym pro GPX při přeměně peroxidu vodíku na vodu. Jeho koncentrace jsou vysoké hlavně ve vyvíjejících se spermatozoích. Bylo dokázáno, že glutathion má zásadní vliv pro zachování motility u kryokonzervovaných a opět rozmrazených vzorků spermií (Uysal & Bucak 2007).

Jak spermie putuje pohlavním traktem, koncentrace glutathionu v jejím okolí postupně klesají. Po penetraci spermie do zralého vajíčka spouští nárůst koncentrace glutathionu kolem spermie dekondukcí chromozomů, kterou začíná tvorba samčího prvojádra (Rodrigues et al. 1985).

V tuku rozpustný vitamín E je považován za hlavní obranu proti ROS v membránách buněk. Zabraňuje v nich řetězové reakci tvorby lipidových radikálů (Sies 1997). Reakcí vitamínu E s lipoperoxidovým radikálem membrány dojde k přesmyknutí volného elektronu. Z vitamínu E je vytvořen tokoferolový radikál, který je následně rozložen dalšími antioxidanty, jako například ve vodě rozpustným vitamínem C (Bansal & Bilaspuri 2011). Mimo neutralizace radikálů v membránách chrání vitamín C spermie před oxidací guaninu v DNA (Wagner et al. 2017). Nedostatek těchto vitamínů má za následek sníženou životaschopnost spermií (Sies 1997).

Některé chemické prvky také mají antioxidační účinky. Zinek se váže na vazebná místa plazmatické membrány místo kovů, které by podporovaly přenos elektronů a následný nárůst koncentrace ROS. Manganové kationty zmírňují oxidativní stres a tím podporují motilitu a viabilitu spermií a počátek kapacity i akrosomové reakce (Bansal & Bilaspuri 2011).

Ubiquinol nacházející se v semenné plazmě pomáhá v redukci ROS a má pozitivní efekt na počty spermií a jejich motilitu (Wagner et al. 2017).

### **3.3 Vznik ROS v ejakulátu**

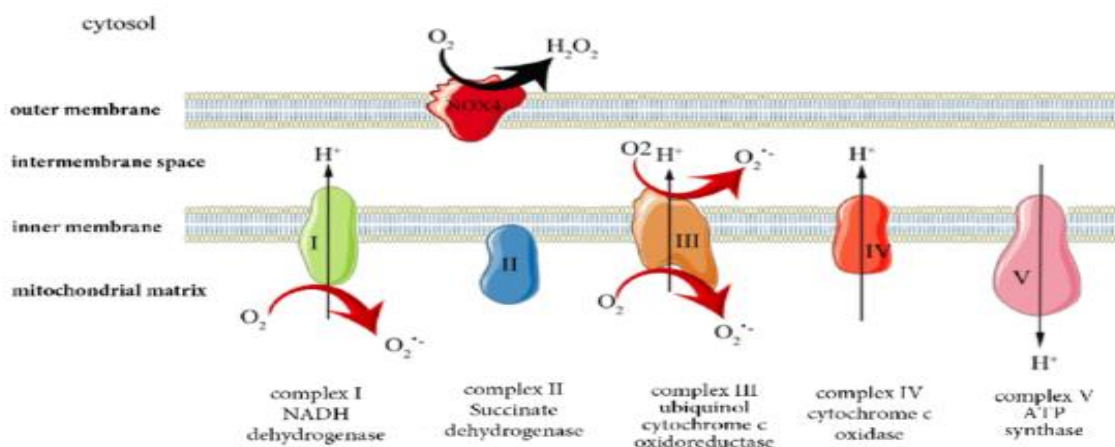
Buněčná složka ejakulátu se skládá z buněk různého stádia vývoje spermií, oválných buněk, leukocytů a epiteliálních buněk. Aktivované leukocyty a nezralé spermatocyty jsou hlavními zdroji ROS v ejakulátu (Evenson & Melamed 1983).

#### **3.3.1 Vznik ROS ve spermatických buňkách**

Nejvyšším producentem ROS ve spermích jsou děje probíhající v mitochondriích, nacházejících se ve středních segmentech bičků buněk (Aitken & Clarksen 1988).

Energie získaná oxidativní fosforylací na membránách mitochondrií vzniká díky přenosu elektronů z donorů na akceptory. Důležitým akceptorem elektronů je molekulární kyslík, jehož redukci na obrázku níže symbolizují červené šipky (Halliwell & Gutteridge 1999). Na obrázku 3. je také vidět, že producenty elektronů v rámci elektronového transportního řetězce jsou komplexy NADH dehydrogenázy a oxidoreduktázy cytochromu C. Enzymatické systémy na membránách mitochondrií v rámci tvorby jedné molekuly ATP emitují 4 elektrony, které přispívají k vytvoření ROS ve formě superoxidů (de Lamirande et al. 1997).

Na obrázku 3. dále vidíme na vnější membráně mitochondrií umístěný NADPH oxidázový systém (NOX). Stejný systém najdeme i v membránách spermií. NOX pracuje podobně jako enzym semenné plazmy superoxid dismutáza, která přeměňuje nestabilní superoxidy na stabilnější peroxidy vodíku. Superoxidy mají velmi krátkou životnost a kvůli svému náboji nejsou schopné dostat se přes membránu. Peroxidy však nemají elektrický náboj, a mohou tedy pronikat plazmatickou membránou bez narušení její struktury. Mitochondriální produkce ATP i stálá hladina peroxidů v buňce jsou důležité pro nastartování fyziologických dějů, kterými spermie musí projít před splynutím s vajíčkem (Aitken & Fisher 1997).



**Obrázek 3: Enzymatické systémy oxidativní fosforylace na membránách mitochondrií**  
**Zdroj: Dymkowska (2016)**

Zdravé spermie vyprodukují tímto způsobem pouze velmi malé množství ROS. Jejich hladiny se liší dle stupně vývoje a prostředí, ve kterém se spermie nacházejí. Vyšší produkce ROS mají na svědomí hlavně spermie s patologickou morfologií nebo zánětlivá onemocnění vývodných pohlavních cest (Sies 1997). Při zaznamenání neopravitelných změn v metabolismu buněk může být v mitochondriích zahájen pomocí tvorby cytochromu c proces programované buněčné smrti. Tímto způsobem tedy může dojít k apoptóze buňky kvůli vysokému oxidačnímu stresu (Cai et al. 1998).

### 3.3.2 Vznik ROS v leukocytech pohlavních vývodných cest

Aktivované leukocyty produkují až 1000× více ROS než mitochondrie ve spermiiích. Takové množství reaktivních molekul je pro ně zásadní, jelikož jim umožňuje zničení patogenů ve fagocytujících vesikulech (Wagner et al. 2017). Při uvolnění obsahu ROS do vnějšího prostředí však tyto hladiny mohou zapříčinit významné snížení životaschopnosti spermií.

Díky hemato-testikulární bariéře ve varleti se spermie setkají s prvními supresorovými lymfocyty až ve vývodných cestách varlete. Množství leukocytů zde souvisí hlavně se zdravotním stavem jedince. Při infekcích dochází ke zvýšení jejich počtu, což může u samců s poruchami tvorby spermií vést ke zjištění špatných hodnot parametrů souvisejících s plodností jedince (Henkel 2010).

Infekce i záněty značně zvyšují počty leukocytů vyplavených do semenné plazmy. Z počátku se jedná hlavně o buňky nespecifické imunity. Ve vývodných cestách varlete jsou to makrofágy. Z přídatných pohlavních žláz jsou vyplavovány hlavně neutrofilů. Cytotoxické T lymfocyty se nacházejí hlavně mezi epiteliálními buňkami výstelky vývodných cest. Za fyziologického stavu se tedy přímo se spermiiemi neseťkávají. Při infekci jsou sice vyplavovány do lumen kanálků, ale jejich aktivita je regulována supresorovými T lymfocyty (el Demiry et al. 1985).



Ačkoliv se v souvislosti s lymfocyty v pohlavních cestách zmiňují hlavně patologické stavy, i jejich zvýšená přítomnost může mít pozitivní vlivy na koncentraci spermií, jejich motilitu i navození akrosomální reakce. Fagocyty ničí patologické spermie a tím chrání ostatní buňky před vysokou produkcí ROS. Lymfocyty děložního krčku samice jsou zase podstatné pro indukci motility a zahájení kapacitace spermií. Příliš velké koncentrace lymfocytů však vedou k respiračnímu vzplanutí a vyplavení velkého množství ROS, které mají negativní účinky na kvalitu ejakulátu (Henkel 2010).

### **3.4 Vliv ROS na spermiogenezi a maturaci spermií**

Spermie vznikají v semenotvorných kanálcích varlete. Vývoj germinálních buněk můžeme rozložit do fáze rozmnožovací, růstové a fáze zrání. Celý tento proces je poměrně náročný na spotřebu kyslíku v dýchacím řetězci buněk a navozuje produkci velkého množství ROS. Obranu před nadprodukcí prooxidantů v této tkáni představuje hemato-testikulární bariéra, zajišťující poměrně nízkou saturaci tkáně kyslíkem (Guerriero et al. 2014).

Germinální buňky se mitotickým dělením diferencují na spermatogonie, primární a sekundární spermatocyty a následně na spermatidy, ze kterých vznikají spermiogenezi spermie. V průběhu diferenciaci jsou všechna stádia vyvíjejících se buněk obklopena Sertolihovo buňkami, zajišťujícími ochranu a výživu těchto vývojových stádií spermií. Do lumen kanálků by měly být uvolňovány pouze zralé spermie, které jsou nachystány na maturační zrání. Je však vylučováno i malé množství nezralých buněk, které následně jsou producenty vyššího množství ROS v ejakulátu (Hossain et al. 2011).

#### **3.4.1 Spermiogeneze**

Fyziologická hladina ROS je důležitá pro správný průběh spermiogeneze, kdy dochází ve hlavičce spermie k zahušťování genetické informace jádra a tvorbě akrosomu nad jádrem (Hossain et al. 2011).

Ve spermiích jsou syntetizovány vysoce bazické proteiny protaminy. Ty v průběhu spermiogeneze a následné maturace spermií v nadvarleti nahradí většinu histonů, které stabilizují DNA v somatických jádrech buněk. Histony jsou nejprve nahrazeny takzvanými tranzičními proteiny. Následně dochází k protaminaci genetické informace v jádře. Díky chemickým vlastnostem protaminů je zajištěna vysoká kompaktnost spermatické DNA (Calvin & Bedford 1971).

Fáze zrání je také obdobím, kdy dochází ke tvorbě bičíku a odvrhování cytoplazmy spermie. Nezralé spermie tak pod mikroskopem mohou být patrné díky viditelné cytoplazmatické kapce ve středním segmentu bičíku. Tato kapka obsahuje poměrně velké množství SOD a glukóza-6-fosfát dehydrogenázy. Dehydrogenáza je důležitá pro produkci NADPH v pentózovém cyklu. NADPH redukuje oxidovaný glutathion, který slouží jako substrát pro GPX při přeměně peroxidu vodíku na vodu (Uysal & Bucak 2007). Při příliš velké koncentraci NADPH v buňce tedy není umožněno odbourávat vznikající peroxid vodíku a je navozena disbalance v koncentracích ROS a antioxidantů. Díky tomu se stále zvyšují koncentrace ROS v buňkách.

K posunu ke konci bičíku a následnému vstřebání cytoplazmatické kapky by mělo dojít maximálně v ocasu nadvarlete. Ve vyprodukovaném ejakulátu by takto nevyzrálé spermie neměly být zastoupeny ve více, než v 15 % (Rozeboom 2000).

### 3.4.2 Průchod nadvarletem

Z vývodných kanálků varlete se spermie dostávají do nadvarletního kanálu, kde probíhá její maturace. U jednotlivých druhů se liší oblast, kde maturace probíhá. Do ocasu nadvarlete však vždy doputují již maturované spermie, které by byly schopny oplodnit vajíčko. Maturační změny spočívají hlavně ve změně struktury membrán a již zmíněných změnách v jaderném uspořádání spermií (Bedford 1975).

V jádře dochází k úplnému nahrazení tranzičních proteinů, vznikajících v procesu spermiogeneze, za protaminy. Kladný náboj stavebních aminokyselin protaminů zaručuje silnou vazbu se záporně nabitými molekulami DNA. Protaminy také obsahují ve své struktuře cysteiny, mezi jejichž molekulami síry se vytváří disulfidické můstky (Calvin & Bedford 1971).  $H_2O_2$  funguje jako substrát pro peroxidázu, která tvorbu těchto struktur podporuje (Guerrero et al. 2014). Vysoká koncentrace spermatické DNA následně chrání paternální genom při průchodu samičím pohlavním traktem i při oplození. Při správném procesu maturace jádra je snížen výskyt chromozomálních aberací, které mohou být způsobeny ROS. Správná protaminace má tedy zásadní vliv na vznik a vývoj zdravého jedince (Nasr-Esfahani et al. 2005).

Plazmatická membrána spermie se podobně jako uspořádání jádra liší od somatických buněk. Obsahuje velké množství fosfolipidů, sterolů, nasycených i polynenasycených mastných kyselin. Právě polynenasycené mastné kyseliny mohou za to, že membrány jsou citlivé k působení ROS (Sanocka & Kurpisz 2004). Při průchodu nadvarletem jsou spermie obklopeny epidimální tekutinou, která vytváří prostředí pro zrání spermií. Některé její proteiny se také váží do plazmatických membrán buněk. Postupnou fosforylací a glykosylací membránových struktur dochází k získání motility a aktivaci receptorů zodpovědných za splnutí spermie s vajíčkem. Vysoká produkce ROS může proces fosforylace membrány narušit, a tak přispět k infertilitě samců (de Lamirande et al. 1997).

### 3.4.3 Kapacitace a hyperaktivace spermií

Kapacitace je děj probíhající na membránách spermií po ejakulaci v samičím pohlavním traktu. U hospodářských zvířat probíhá kapacitace spermií ve chvíli, kdy jsou spermie imobilizované v rezervoáru spermií ve vaječníku. De Lamirande et al. (1997) svými experimentálními pokusy na myších spermiích zjistil, že k indukci kapacitace i hyperaktivace jsou nutné peroxidy vodíku i superoxidy. Peroxidy jsou pro tento proces zásadním spouštěčem, nicméně superoxidy po reakci s NO mohou vytvořit vysoce reaktivní peroxynitrid, který u některých druhů významně podporuje kapacitační reakci (Herrero et al. 2001).

ROS působí na počátku procesu kapacitace a hyperaktivace jako sekundární poslové při transdukcii signálu po membráně. Podporují funkci enzymu adenylyl cyklázy a tím tvorbu cyklického 3',5'-adenosinmonofosfátu (cAMP). Následně také pozitivně stimulují protein kinázu A, která se zapojuje do fosforylace a otevření kalciových kanálů. ROS naopak zabraňují

funkci tyrosinové fosfatázy. Hrají roli při oxidaci cholesterolu v membránách, jehož následným efluxem dochází k narušení propustnosti membrány a otevírání kalciových kanálů závislých na napětí (Aitken 2017). Právě masivní nárůst hladiny intracelulárního vápníku je dalším stimulem podporujícím tyrosinovou fosforylaci proteinů membrány, která je nezbytná pro dosažení kapacitovaného stavu (Griveau et al. 1995).

V průběhu kapacitace dochází díky fosforylaci proteinů bičíků spermii k jejich hyperaktivaci. Koncentrace ROS v buňce mají vliv na iniciaci tohoto procesu. Mrskání bičíku je po hyperaktivaci nepravidelné s velkou amplitudou. To spermii umožňuje nelineární pohyb, nutný k uvolnění z rezervoáru spermii a pohybu vejcovodem směrem k vajíčku. Uvolnění z povrchu vejcovodu do lumen je také umožněno díky fosforylaci proteinů hlavičky spermie, která zaručí rozvolnění vazby povrchových receptorů spermie a glykoproteinové výstelky vejcovodu (de Lamirande & Gagnon 1993).

#### **3.4.4 Akrosomální reakce**

Spermie na základě termotaxe a chemotaxe doputuje do horní třetiny vejcovodu, kde dochází k jejímu střetnutí s vajíčkem. Pouze kapacitované spermie proniknou přes expandovaný cumulus oophorus obklopující vajíčko. Pomocí enzymu hyaluronidázy v akrosomové oblasti membrán spermii se spermie dostávají skrz kumulární buňky ke glykoproteinovému obalu zona pellucida. Vazba povrchu spermie s tímto obalem následně vyvolává akrosomální reakci (Cross et al. 1986).

Navázání spermatických receptorů s proteiny zona pellucida je signálem k otevření kanálů pro vápenaté kationty. Zvýšení jejich koncentrace ve spermii vede ke spuštění signální kaskády, popsané při kapacitačním procesu. Experimentálně bylo zjištěno, že na tomto procesu se zásadně podílí peroxidy vodíku, ačkoliv superoxidy mají v tomto procesu také svoji roli (Bize et al. 1991). Signální kaskáda končí tyrosinovou fosforylací vnější membrány akrosomu i membrány spermie a vede ke splynutí obou membrán a vylití akrosomálního obsahu vně buňky. Působením hydrolytických enzymů, proteináz a glykosidáz se spermie po akrosomální reakci dostává skrz zonu pellucidu vajíčka a může jej oplodnit (de Lamirande et al. 1997).

Aby akrosomální reakce proběhla a spermie byla schopna proniknout glykoproteinovým obalem vajíčka, musí se integrita akrosomální membrány začít narušovat právě ve chvíli, kdy spermie přichází do kontaktu s vajíčkem. V případě, že k akrosomální reakci dojde ještě před kontaktem se samičí gametou, není spermie schopna oplození. Spermie, u kterých proběhne akrosomální reakce při průchodu samičím pohlavním traktem, však mohou pomocí enzymů, které vyloučí do svého okolí, pozitivně stimulovat ostatní spermie při cestě k vajíčku (Bize et al. 1991).

#### **3.4.5 Fúze gamet**

Částečná lipoperoxidace membrán je důležitá jak pro vazbu spermie na zona pellucida vajíčka, tak pro fúzi samčí a samičí pohlavní buňky (de Lamirande et al. 1997). V průběhu kapacitační i akrosomální reakce se díky ROS zvyšuje fluidita membrány. Po kapacitaci spermii jsou ROS důležité při inaktivaci tyrosin fosfatázy. Ta dále nemůže zabránit fosfolipáze vázat

mastné kyseliny na plazmatickou membránu spermie. Právě tímto mechanismem je dosaženo potřebné fluidity membrány, která následně umožňuje splnutí obou gamet (Khosrowbeygi & Zarghami 2007).

### **3.5 Patofyziologie a vliv ROS na samčí infertility**

Změny v morfolofii a fyziologii spermií způsobené oxidativním stresem představují idiopatické příčiny snížené plodnosti samců. Kvůli své vyšší citlivosti ke kyslíkovým radikálům mají spermie oproti somatickým buňkám odlišnou strukturu plazmatické membrány i extrémně kompaktně zabalenou genetickou informaci v jádře (Saleh & Agarwal 2002). Když je narušena rovnováha mezi prooxidanty a antioxidanty v organismu, dochází ke zvýšení lipoperoxidace membrán a následně i změně struktury cytoskeletu, jádra i dalších organel (Agarwal et al. 2006). V předchozích kapitolách byl vysvětlen princip ovlivnění metabolismu spermií pomocí ROS. Snížená kvalita spermatu se může projevat na poklesu počtu spermií, jejich snížené motilitě, morfologických abnormalitách hlavičky i krčku spermií nebo ztrátě schopnosti spermií kapacitovat, projít akrosomální reakcí a následně oplodnit vajíčko a vést k úspěšnému vývoji plodu (Rodriguez-Martinez 2003).

Míra projevu patologie může být závislá na řadě faktorů. Například na tom, jakému množství ROS je buňka vystavena a na jak dlouho, nachází-li se v okysličeném prostředí a jsou-li v jejím okolí přítomny například leukocyty. Dalším faktorem je množství antioxidantů obsažené v okolní tekutině a také jejich tvorba uvnitř buňky (Aitken & Clarskson 1988).

#### **3.5.1 Plazmatická membrána spermie**

Plazmatická membrána spermie obsahuje velké množství polynenasycených mastných kyselin, což ji dělá velmi náchylnou k působení ROS (Guerriero et al. 2014). Peroxidace membránových lipidů je autokatalytický děj. Spočívá v uvolnění vodíkového kationtu z nenasycené mastné kyseliny a vzniku lipidového radikálu. Po zreagování tohoto radikálu s molekulou kyslíku vzniká peroxylový radikál. Okolní nenasycené mastné kyseliny ochotně uvolní vodík z dvojné vazby a vytváří tak lipidový radikál a lipidový hydroxyperoxid (Sanocka & Kurpisz 2004). Vzniklá řetězová reakce je ukončena až vzájemnou reakcí dvou radikálů. Než k ní však dojde, může být oxidováno již více než 50 % lipidů plazmatické membrány spermie. Vznikající lipidové radikály se navíc hromadí pod povrchem membrány a snižují tak fluiditu fosfolipidové dvojvrstvy. Efektivita pohybu membrány se snižuje a v oblasti bičíku tak přispívá ke snížení motility spermie (Wagner et al. 2017).

Peroxidací membrán mitochondrií může být narušena produkce adenosintrifosfátu (ATP). Dochází tedy ke snížení energetických zásob buněk a omezení pohybu spermií skrz samičí pohlavní soustavu. Nedostatečná fosforylace membránových proteinů může následně vést k narušení axonemální struktury bičíku a zhoršení pohybu spermií (Barbas & Mascarenhas 2008).

Změna struktury mebrány akrosomu zase může vést k narušení průběhu akrosomální reakce. Aktinová vlákna, vytvářející podpurné struktury při splývání akrosomální membrány s vnější membránou buňky, nemusejí správně polymerizovat a umožnit tak akrosomálním váčkům, aby se spojily a celý obsah akrosomu byl vylit vně buňky. I v případě, že by se spermií

povedlo dostat až k plazmatické membráně vajíčka, příliš peroxidované membrány by neměly na svém povrchu vystavené dostatečné množství receptorů a gamety by tak nemohly splynout (Hossain et al. 2011).

Lipidová peroxidace působí v membráně snížení fluidity, inaktivaci membránových receptorů a enzymů a zvýšení nespecifické permeability membrány pro ionty. Z peroxidových radikálů vznikají vedlejší produkty této reakce, a to malondialdehyd (MDA) a 4-hydroxynonenal (Alvarez et al. 1987). Hydroxynonenal způsobuje i ve velmi malých koncentracích zástavu proliferace buňky a je také mutagenní (Sanocka & Kurpisz 2004).

### 3.5.2 Jádru spermie

Oxidativní stres může mít negativní účinky na integritu jaderné i mitochondriální DNA. Z ROS vykazují mutagenní aktivitu hydroxylové radikály i superoxydy. Mohou reagovat přímo s purinovými a pyrimidinovými bázemi, nebo působit nepřímo v řetězci nukleotidů. Přímá reakce s nukleotidy je dokázána nálezem 8-hydroxydeoxyguanosinu ve struktuře chromatinu. Nepřímá reakce může vést ke zlomům molekulární DNA a chybnému párování nehomologních bází. Tvorba oxidovaných nukleotidů silně koreluje s nálezy zlomů jednochromatinových i dvouchromatinových molekul DNA (Helbock et al. 1998).

Vysoká produkce ROS a chromozomální aberace mají také negativní účinky na metylaci DNA. Cytosiny sousedící s oxidovanými puriny nemohou navázat metylovou skupinu. Důsledkem toho je narušení epigenetického ovlivňování exprese genů, které vede například ke zhoršené vitalitě a oplozovací schopnosti spermií. Se stoupající oxidací DNA stále klesá úroveň metylace chromatinu. Pozitivní vliv na metylaci mají naopak antioxidanty, které ve správném množství zajišťují správný průběh oplození (Tunc & Tremellen 2009).

#### 3.5.2.1 Dekondenzace chromatinu

V průběhu migrace buněk skrz pohlavní cesty mají ROS možnost reagovat v jádře s dekonzenzovaným chromatinem ve chvíli, kdy nedošlo ke správné protaminaci v průběhu spermiogeneze a maturace buněk. Protaminace může být narušena například reakcí enzymů s thiolovými skupinami cysteinů. V případě, že nedojde k vytvoření disulfidických můstků, protaminy nezaujímají kompaktní strukturu a chromatin se rozvolňuje, následkem čehož mohou být výše zmíněné patologické stavy (Calvin & Bedford 1971).

Dalším důvodem pro rozvolnění chromatinu a narušení struktury DNA může být ve spermatické buňce zahájení procesu řízené smrti (Agarwal et al. 2006). Narušením vnitřních i vnějších mitochondriálních membrán spermií je aktivován komplex cytochromu c, který aktivací kaspáz spouští signální kaskádu vedoucí k narušení jaderných struktur, zástavě všech biosyntetických procesů, tvorbě apoptotických tělísek a finálně k zániku buňky. Tento proces se uplatňuje při optimalizaci počtu germinálních buněk ve varlatech i vývodných cestách močových a pohlavních. Měl by být aktivován také ve chvíli, kdy jsou zjištěny poruchy v jádře spermie, nicméně se tak nemusí dít vždy (Cai et al. 1998).

Pro správný průběh oplození a vývoje embrya je nutná dekonzenzace samčího prvojádra po vniknutí do vajíčka. V podmínkách *in vivo* má spermie s vadami chromatinu nižší šanci na průnik do vajíčka, i kvůli výše zmíněné možnosti apoptózy. Vajíčko, které bylo oplodněno

spermií s jadernými defekty však obsahuje reparační systémy, které mohou do jisté míry tyto defekty zmírnit i zcela opravit. V případě, že je z vajíčka a defektní spermie přesto vytvořena zygota, závisí na míře poškození genetické informace, zdali dojde k úspěšnému dělení zygoty, implantaci blastocysty a vývoji embrya (Moustafa et al. 2004).

### 3.5.3 Vnější faktory působící na produkci ROS

V lidské populaci má na produkci ROS v pohlavním traktu velký efekt životní styl jedince, stres a často i vysoký věk otce. Je například dokázáno, že kouření i požívání alkoholu má efekt na zvýšenou produkci ROS (Evenson & Melamed 1983).

Hospodářská zvířata sice nejsou ohrožena těmito civilizačními návyky, nicméně jsou většinou chována v umělých vysokoprodukčních chovech, kde vzniká velké množství stresových situací. V případě, že v takovém chovu nejsou dodržena přísná zoohygienická opatření, mohou se mezi zvířaty šířit zánětlivá onemocnění. Vyšší počty bílých krvinek mohou v takovém případě přetrvávat i po konci léčby a mít tak vliv na sníženou fertilitu zvířat (Puppel et al. 2014).

Dalším spouštěčem produkce ROS může být chov v nevyhovujících teplotních podmínkách, nevhodně sestavená krmná dávka, nebo v případě vnějších chovů i chemikálie a toxiny obsažené v půdě (Evenson & Melamed 1983).

#### 3.5.3.1 Věk samce

Vyšší věk samců a jeho souvislost s tvorbou ROS v ejakulátu se studuje hlavně v lidské populaci. U hospodářských zvířat jsou samci po uplynutí doby ideální pro rozmnožování vyřazeni z chovu. V případě, že je plemenný samec s dobrými užitkovými vlastnostmi poslán na jatka, mohou mu být odebrána varlata. Z varletní tkáně se následně získávají sice nezralé, ale cenné zárodečné buňky. Díky jejich složitějšímu získávání je však opět zvyšován oxidační stres vzorku (Amann & Veeramachaneni 2007).

S věkem otce se zvyšuje množství přirozených potratů. Může to souviset s vyšší četností chyb replikačního aparátu a tím pádem i s větším množstvím vzniklých mutací. Mutace jsou mimo replikačních chyb podporovány právě zvyšujícím oxidativním stresem při stárnutí organismu. Bylo také dokázáno, že s věkem se zhoršuje kvalita protaminace chromatinu. Jeho rozvolnění zhoršuje oxidativní poškození DNA, jak bylo popsáno v předcházející kapitole (Rybář et al. 2004).

#### 3.5.3.2 Obezita

Při nesprávném složení krmné dávky samců se mohou nevyužité živiny ukládat ve formě tukových buněk. Velké množství tukové tkáně může u samců vést ke změnám hormonální regulace steroidními hormony. Zvýšení produkce ROS u těchto jedinců je pravděpodobně způsobeno hlavně vyššími metabolickými nároky organismu a vyšší teplotou varlat. Ta má negativní efekt na funkci enzymů v nadvarleti i na proces spermiogeneze (Sabeti et al. 2016). U samců, využívaných v reprodukci, je tedy zásadní přizpůsobovat krmné dávky jejich vývojovému stadiu tak, aby byly co nejefektivněji využity pro tvorbu bílkovin a zvířata nebyla přetučnělá (Puppel et al. 2014).

### 3.5.3.3 Morfologické patologie

U lidských samců je varikokéla nejčastější morfologickou vadou, vedoucí ke zvýšené produkci ROS. Jedná se o dilataci žil v žilním pletenci šourku, odvádějících krev ze šourku. U této diagnózy se zvyšuje produkce ROS, což souvisí se zvýšením teploty v šourku (Evenson & Melamed 1983).

U hospodářských zvířat je vyšší teplota v šourku a snížená spermatogeneze ve varlatech spojována s kryptorchismem. Jedná se o genetické autozomálně recesivní onemocnění, kdy varlata v průběhu embryonálního vývoje dokonale nesestoupí varletním kanálem z břišní dutiny do šourku. Tato choroba je častá hlavně u koní, kanců a kozlů. Z varlat kryptorchidů jsou produkovány spermie s morfologickými vadami v menším množství než u zdravých samců. I v případě, že varlata sestoupí do šourku v postembryonálním vývoji, může být do budoucna narušena schopnost tvorby fertilizace schopných spermií. Jelikož se jedná o geneticky přenosnou vrozenou vadu, jsou samci s touto diagnózou vyřazováni z plemnitby (Amann & Veeramachaneni 2007).

### 3.5.3.4 Stres

Zatím nebyla provedena studie, která by přímo zkoumala účinky psychologického stresu na kvalitu spermatu. Stres způsobený špatnými podmínkami ustájení i špatně složenou krmnou dávkou však ovlivňuje fyziologické vlastnosti organismu. Víme, že když je organismus delší dobu vystaven stresoru, zvýší se aktivita enzymu NO syntetázy (NOS). Ta přeměňuje L-arginin na oxid dusnatý (Puppel et al. 2014). Zvýšením koncentrace NO v semenné plazmě nad fyziologickou hranici je negativně ovlivněna morfologie, a hlavně motilita spermií. NO inhibuje v buňkách glykolýzu a děje oxidativní fosforylace na membránách mitochondrií. Snižuje tedy tvorbu ATP v buňkách (Eskiocak et al. 2006). Se snížením koncentrace antioxidantů v semenné plazmě je také potlačena obranyschopnost proti oxidativnímu stresu (Sabeti et al. 2016).

Oxid dusnatý reaguje se superoxidovým radikálem a vytváří peroxinitrid ( $\text{NO}\bullet$ ). Ten je schopen cestovat na poměrně velké vzdálenosti a snadno proniká plazmatickými membránami. Velmi ochotně také reaguje s proteiny, lipidy i DNA (Eskiocak et al. 2006). Má důležitou roli jako spouštěč kapacity u některých druhů zvířat, nicméně může způsobovat značné patologie v morfologii i metabolismu produkováných buněk (Herrero et al. 2001).

Stresovaný organismus vykazuje vyšší míru morfologických i fyziologických změn spermií v ejakulátu. K těmto změnám přispívá i oxidativní stres a děje popsáné v této kapitole.

### 3.5.3.5 Infekce a záněty

V kapitole 3.3.2. již byla zmíněna produkce ROS leukocyty, které se v ejakulátu vyskytují i za fyziologických podmínek. V případě, že dojde k infekci vývodných pohlavních cest nebo přídatných žláz, zvýší se produkce těchto leukocytů (leukocytospermie) i hladina ROS v ejakulátu. Infekce přídatných pohlavních žláz mohou být často asymptomatické. U zvířat s vysokou produkcí seminální plazmy nás na ni může upozornit změna barvy ejakulátu (el Demiry et al. 1985).

Záněty jsou často zapříčiněny bakteriálními a virovými infekcemi. Bakteriální buňky a cytokiny jimi produkované ovlivňují vyšší produkci ROS polymorfonukleáry. Viry naopak napadají přímo buňky výstelky vývodných cest a způsobují tak změny metabolismu buněk včetně vyšší produkce ROS (Henkel 2010).

Leukocytospermie, vyvolaná nadprodukcí bílých krvinek v průběhu infekce, tak přispívá k výraznému navýšení produkce ROS a snížení funkce antioxidantů v semenné plazmě. Zánětlivá onemocnění mohou mít dlouhodobý efekt na kvalitu spermatu a jsou často spojována s infertilitou u samců (Sabeti et al. 2016).

### 3.5.3.6 Enviromentální faktory

Znečištění prostředí určitými polutanty může vést ke snížené fertilitě samců. Toxiny mohou zvyšovat výskyt oxidativních poruch buněk i DNA fragmentací. Mezi chemické látky ovlivňující reprodukční schopnosti samce můžeme řadit některé plyny (NO), těžké kovy (olovo, rtuť, kadmium), pesticidy, rozpouštědla a uhlovodíky (Puppel et al. 2014).

Olovo a oxid dusnatý jsou do atmosféry vylučovány při spalování ropných produktů motorovými vozidly. Olovo a kadmium mají negativní účinky na morfologii a životaschopnost spermií. Bylo také dokázáno, že vysoké znečištění ovzduší vede ke zvýšenému výskytu preimplantačních potratů, způsobených vysokou fragmentací paternálního DNA (Evenson & Wixon 2005).

Ftaláty obsažené v plastech mají negativní efekt na hladinu testosteronu v séru a působí toxicky na tkáň varlete. Butyl benzyl ftalát způsobuje zvýšení produkce ROS v organismu a snížení antioxidační ochrany (Eskiocak et al. 2006).

Chemické látky zmíněné výše nemají negativní důsledky pouze na parametry fertility samce. Ovlivňují metabolismus celého organismu a mohou mít teratogenní i karcinogenní účinky. Proto je důležité, aby se v oblasti chovu hospodářských zvířat prováděly testy zeminy i vody na toxické látky (Sabeti et al. 2016).

### 3.5.3.7 Kryokonzervace spermatu

Procesy využívané pro uchování spermií a arteficiální inseminace výrazně zvyšují produkci ROS v ejakulátu a způsobují buněčnou smrt velkého počtu spermií (Hossain et al. 2011). Komparativní mezidruhové studie ukázaly, že větší velikost hlavičky spermií negativně ovlivňuje snášenlivost spermií ke kryokonzervaci. Lidské spermie obsahují v hlavičce nejméně cytoplasmu, a proto jsou nejodolnější vůči kryokonzervaci. Kančí spermie naopak obsahují ve své cytoplasmě velké množství tukových kapének, a proto jsou k teplotnímu šoku extrémně náchylné (Gao et al. 1997).

Při přípravě inseminačních dávek jsou spermie izolovány ze semenné plazmy pomocí swim-up metody, gradientové separace, nebo u například u kanců pouze frakčním odběrem spermatu. Spermie tak ztrácí ochranu antioxidantů, obsažených v semenné plazmě, a dochází v ní ke zvýšení produkce hlavně hydroxylových radikálů. Následně jsou buňky smíchány s médiem, obsahujícím vyživující látky i kryoprotektiva. K výživě buněk se dodnes často využívá vaječného žloutku. Nejčastěji využívaným kryoprotektivem mrazičích médií je glycerol. Ten po přidání do isotonického média prostupuje spermatické buňky, aniž by narušil jejich strukturu (Barbas & Mascarenhas 2008). Díky své nízké molekulové hmotnosti proniká



glycerol do buněk skrz plazmatické membrány. Ochranu buňky při kryokonzervaci pravděpodobně zajišťuje tvorbou vodíkových můstků s koncovými fosfáty plazmatických membrán. Takto vytvořená ochranná vrstva zabraňuje vytváření krystalů v blízkosti membrány.

Kryokonzervací inseminačních dávek je zvýšena osmolarita média vůči spermii. Intracelulární voda díky tomu difunduje vně buňky a uvnitř spermie nezůstává v průběhu mrazení větší množství vody (Kundu et al. 2002). V buňce tedy nedochází ke tvorbě větších krystalů. Při rozmrazení dávky naopak hyperosmotické prostředí uvnitř spermie zajišťuje hydrataci buněčných struktur.

Stále se zvyšující nároky na produkci a úspěšnost zabřeznutí udávají trendy ve vývoji kryoprotektivních činidel. Glycerol má chránit buněčný skelet při vysoké osmotické zátěži související s kryokonzervací a rozmrazováním vzorků. Nicméně je sám o sobě hlavně pro ptací spermie toxický (Gloria et al. 2019). Jeho využití je problematické také u kančích spermií, které po rozmrazení dávky nedosahují požadovaných kvalit (Kundu et al. 2002). Z tohoto důvodu jsou zkoumána alternativní mrazící média s přidáním etylen glykolu, dimethyl sulfoxidu (DMSO) nebo nepermeabilních kryoprotektantů (Barbas & Mascarenhas 2008).

Glycerol ve vhodných koncentracích pro kryokonzervaci vzorku prostupuje zhruba do 30 % buněk (Gloria et al. 2019). Dextran, tedy  $\alpha$ -D-1,6-glukózový polymer, je nepermeabilní kryoprotektant, s vyšší molekulovou hmotností v porovnání s glycerolem. Ta mu nedovolí penetrovat skrz membrány do buněk. Podobně jako glycerol vytváří vodíkové můstky s koncovými fosfáty vnějších pólů membrán. Jelikož má ve své struktuře značné množství koncových OH skupin, může vytvořit kompaktní vrstvu kolem buněčné membrány spermií. Díky své velikosti také zabraňuje formování sekundárních krystalů, které by mohly mechanicky narušit buňky při zmrazování vzorku. Dle studie na spermiih kozlů se však mechanismus funkce glycerolu a dextransu pravděpodobně liší. Při využití obou kryoprotektantů byla po rozmrazení vzorků zjištěna celková motilita až u 50 % spermií ve vzorku. Tato hodnota se ještě zvýšila při mrazení vzorku s glycerolem, DMSO a dextranem zároveň (Kundu et al. 2002).

Po rozmrazení vzorku by měl být ejakulát vyšetřen, aby se určila jeho kvalita. Měřením progresivní i celkové motility odhadneme energetický stav buněk i jejich funkční integritu. (Quintero-Moreno et al. 2004). U každého druhu jsou stanovena kritéria, kdy může být inseminační dávka použita k umělému oplodnění samic. Pouze v případě, že se jedná o samce se skvělými užitkovými vlastnostmi a špatným spermatem, využívá se u hospodářských zvířat k oplodnění možnosti in vitro fertilizace (IVF) nebo intracytoplazmatické injekce (ICSI) (Waberski et al. 2019).

### **3.6 Hodnocení ROS v ejakulátu**

V laboratořích asistované reprodukce i testačních stanicích se přistupuje hlavně k základnímu makroskopickému a mikroskopickému vyhodnocení ejakulátu (Rodriguez-Martinez 2003). Metody využívané pro měření ROS jsou pro běžný provoz příliš zdoluhavé a nákladné. Nicméně určité parametry základní analýzy mohou indukovat vysoký oxidační stres ve vzorku. V předchozích kapitolách již byla popsána leukocytospermie, abnormální morfologie spermií s cytoplazmatickou kapkou v oblasti bičíku a změny ve stavbě

plazmatické membrány. ROS dále mohou mít vliv na sníženou pohyblivost spermií (asthenozoospermii) a vysokou viskozitu semenné plazmy (Aydemir et al. 2008). Na základě zjištění těchto příznaků laboratoře mohou přistoupit k detailnější analýze ROS.

Laboratorní techniky pro stanovení oxidačního stresu spermií dělíme na přímé a nepřímé. Přímé metody měří obsah oxidantů v ejakulátu, zatímco nepřímé techniky se využívají ke stanovení oxidovaných produktů ROS (Agarwal et al. 2018). Mezi přímé techniky řadíme analýzu chemiluminiscence, nebo fluorescence barevných sond, které nám odhalí míru oxidačního stresu buněk. Mezi nepřímé metody řadíme měření leukocytospermie v ejakulátu (Endtzův test), lipidové peroxidace, celkové antioxidační kapacity (TAC) nebo diagnostiku poruch DNA. Dále se množství ROS v ejakulátu dá odhadnout měřením koncentrací chemokinů, antioxidantů, markerů oxidačních reakcí a některých vitamínů (Agarwal et al. 2017).

### 3.6.1 Nepřímé metody stanovení ROS v ejakulátu

V tabulce níže jsou pro přehlednost zobrazeny techniky nepřímého stanovení ROS v ejakulátu společně s výhodami i nevýhodami jejich využití.

**Tabulka 1: Výhody a nevýhody využití nepřímých metod pro měření ROS**  
**Zdroj: Agarwal et al. 2017, Hossain et al. 2011**

Test	Výhody	Nevýhody
Stanovení leukocytů v ejakulátu	Rozpoznání granulocytů od nezralých spermatogonií	Nelze testovat produkci ROS samčími zárodečnými buňkami
Míra lipidové peroxidace	Lze měřit i malé koncentrace barevného malondialdehydu	Nevyužívá se v klinické praxi
Celková antioxidační kapacita ejakulátu (TAC)	Rychlá kolorimetrická metoda	Drahá. Nerozlišuje mezi enzymatickými a jinými (vitamíny) antioxidanty
Diagnostika poruch DNA	Více technik měřících DNA fragmentaci (SCSA, TUNEL)	Málo standardizované metody. Přípravou vzorku můžeme způsobit DNA oxidaci
Akrosomální integrita	Lze kombinovat s analýzou dalších vlastností buněk	Možná nespecifita vázání lektinů na buněčné struktury

#### 3.6.1.1 Stanovení leukocytů v ejakulátu

Stanovení počtu leukocytů v ejakulátu patří mezi nepřímé metody stanovení ROS (Agarwal et al. 2017). Tyto testy se využívají ve chvíli, kdy není jasná příčina snížené plodnosti u samců. Zjištěním množství leukocytů v ejakulátu však nelze přesně měřit množství vyprodukovaných ROS. I při odhalení aktivovaných leukocytů ve vzorku není možné určit, jaké množství ROS budou produkovat samotné spermie. V klinické praxi tyto metody mohou napovědět, co napomáhá k nižší plodnosti samce, nicméně nejsou určeny k přesnému měření

ROS v experimentálních podmínkách (Wolff & Anderson 1988). K diagnostice oválných buněk v ejakulátu lze využít Endtzův test nebo měření množství seminální elastázy.

Endtzův test, nebo také myeloperoxidázový test, se provádí ve chvíli, kdy je v ejakulátu samce při mikroskopickém vyšetření objeveno velké množství oválných buněk. Myeloperoxidáza obsažená v granulech lymfocytů katalyzuje redukci peroxidu vodíku pomocí izolace vodíku z molekul benzidinu. Benzidin je součástí inkubačního roztoku a po vlastní redukci vytváří tmavě hnědou sloučeninu. Ta je vidět světelným mikroskopem (Endtz 1974). Dle zabarvení buněk jsme následně schopni odlišit oválné buňky nezralých spermií od bílých krvinek. Počítáním buněk v Maklerově komůrce následně můžeme vztáhnout počet obarvených neutrofilů a makrofágu na celý ejakulát (Agarwal et al. 2016).

Jelikož benzidin je rakovinotvorná sloučenina, využívá se ke stanovení množství aktivovaných polymorfonukleárů v ejakulátu také studium dalších enzymů. Elastáza funguje jako enzym, který by měl při fagocytóze sloužit k natrávení těla nevlastních částic. V semenné plazmě jsou nicméně přítomny inhibitory elastáz, jako  $\alpha$ 1-antitrypsin inhibitor. Tyto komplexy jsme následně schopni identifikovat díky ELISA testování (Zorn et al. 2000).

Na druhově specifické anti-elastázové protilátky navážené na povrchu testovní zkušební zkumavky se po inkubaci ze semenné plazmy naváží  $\alpha$ 1-antitrypsin inhibitory. Ty následně zreagují se sekundárními protilátkami anti- $\alpha$ 1-antitrypsin inhibitory, které ve své struktuře mají uměle zabudovanou alkalickou fosfatázu. Po následné inkubaci s nitrofenylfosfátem, fungujícím jako chromofor, jsme pomocí spektrofotometru schopni detekovat míru barevného signálu ze zkumavky (Wolff & Anderson 1988).

Testováním množství leukocytů v ejakulátu však nejsme schopni určit, jaké množství ROS je produkováno samotnými spermii (Agarwal et al. 2017). Jelikož se jedná o poměrně starou techniku s nízkou vypovídající hodnotou, u hospodářských zvířat se tato diagnostika standardně neprovádí.

### 3.6.1.2 Míra lipidové peroxidace

Měření míry lipidové peroxidace se často využívá k analýze oxidativního stresu spermatických buněk. Vedlejšími produkty peroxidace membránových nenasycených mastných kyselin jsou malondialdehyd (MDA) nebo hydroxynonenal. Právě tyto sloučeniny slouží jako markery pro hodnocení míry peroxidace. Množství MDA je možné měřit v seminální plazmě a ve velmi malých koncentracích i uvnitř spermatických buněk (Sanocka & Kurpisz 2004). MDA je mutagenní látkou, zatímco hydroxynonenal má toxické účinky pro buňky (Wagner et al. 2018). Je tedy možné, že dojde k apoptóze buněk i v případě, že je reakce peroxidace membrán již ukončen.

Množství malondialdehydu ve vzorku je možné změřit po jeho reakci s kyselinou thiobarbiturovou (TBA). S touto vytváří MDA při reakci v poměru 1:2 barevnou substanci, jejíž množství ve vzorku lze následně změřit pomocí fluorometrie nebo spektrofotometrie (Aitken et al. 1993).

### 3.6.1.3 Celková antioxidační kapacita ejakulátu

Celková antioxidační kapacita ejakulátu je měřena z čisté seminální plazmy po odstranění veškerých buněčných komponent plazmy. Tato metoda je poměrně nákladná kvůli nutnosti

pořízení laboratorních kitů pro kolorimetrické hodnocení antioxidační kapacity. Její princip spočívá v oxidaci 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazolinesulfátu] (ABTS) na ABTS+. Oxidovaná forma je barevnou substancí, jejíž koncentraci můžeme změřit spektrofotometrem (Agarwal et al. 2017). Antioxidanty plazmy naopak tuto reakci brzdí. Tímto způsobem je možné odečíst koncentrace antioxidantů v plazmě. Ačkoliv se jedná o rychlou kolorimetrickou metodu, v klinické praxi se standartně nevyužívá hlavně kvůli nemožnosti analýzy enzymatických antioxidantů (Agarwal et al. 2006).

#### 3.6.1.4 Diagnostika poruch DNA

Vyšetření integrity DNA spermie je důležité pro zajištění správného vývoje zygoty po splynutí obou gamet (Rodriguez-Martinez 2003). Mutace DNA nemusí být vyvolány pouze vysokou koncentrací ROS, nicméně se v praxi také využívají pro hodnocení oxidačního stresu spermií. Nejčastěji využívanými metodami jsou hodnocení struktury chromatinu u spermií (sperm chromatin structure assay – SCSA) a hodnocení dle množství fluorescenčně označených volných konců DNA (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling-TUNEL) (Rybář et al. 2004). Oba testy jsou vyhodnocovány pomocí průtokové cytometrie, ale metoda TUNEL je více standardizovaná z hlediska využití v různých laboratořích (Evenson & Wixon 2005). K tomu přispívá i fakt, že TUNEL testování je možné provádět také za pomoci fluorescenční mikroskopie (Agarwal et al. 2018).

SCSA je metoda, která měří poškození v DNA struktuře nepřímo přes náchylnost DNA k denaturaci, vyvolané kyselinou v laboratorních podmínkách. Následným obarvením fluorescenční akridinovou oranží a vyhodnocením výstupního bodového diagramu je možné určit poměr buněk s denaturovanou DNA ve vzorku (Bungum et al. 2011).

Metoda TUNEL využívá enzymu terminální deoxynukleotidyl transferázy, která připojí fluorescenčně značené nukleotidy k volným 3'-OH koncům DNA vláken. Čím více zlomů se ve vzorku nachází, tím vyšší je tedy intenzita signálu (Bungum et al. 2011).

Pomocí SCSA i TUNEL je možné analyzovat zlomy jednoho i obou vláken dvoušroubovice DNA. Tyto metody však neslouží k určení patologií, kterými bylo tohoto poškození dosaženo (Agarwal et al. 2018). V případě stanovování hodnot ROS je tedy potřeba využít k těmto testům také některou z metod přímého stanovení ROS ve vzorku.

#### 3.6.1.5 Stanovení integrity akrosomální membrány

Volné radikály mohou narušit strukturu akrosomální membrány a vést k předčasné akrosomální reakci. Analýza integrity akrosomální membrány se provádí pomocí průtokové cytometrie, jejíž princip bude vysvětlen v následující kapitole. K hodnocení se využívá rostlinných lektinů *Pisum sativum* lektinu (PSA) a *Arachis hypogaea* agglutininu (PNA), značených fluorescenčním markerem FITC. PNA lektin se váže na vnější pól akrosomální membrány a pomocí jeho analýzy je možné určit, zda již proběhla akrosomální reakce (Cross et al. 1986). PSA se pravděpodobně častěji nespecificky váže na další buněčné struktury. Proto je nutné pod fluorescenčním mikroskopem odlišit kompartmenty spermií, které emitují světelný signál (Graham 2001).

Poměrně nově se modifikovaný PNA lektin využívá v kombinaci s fluorescenčními markery pro značení DNA buněk a integrity plazmatické membrány spermie. Díky tomu

je v rámci jedné analýzy možné určit pouze živé spermie s nenarušeným akrosomem (Hossain et al. 2011).

### 3.6.2 Přímé metody stanovení ROS v ejakulátu

Díky přímým metodám stanovení ROS v ejakulátu jsme schopni identifikovat koncentraci samotných oxidantů v ejakulátu. Na rozdíl od nepřímých metod tedy nemusíme stanovovat míru poškození buněk pomocí vedlejších produktů oxidativních reakcí (Agarwal et al. 2017).

#### 3.6.2.1 Chemiluminiscence

Měření ROS pomocí chemiluminiscence využívá schopnosti chemických látek luminolu, lucigeninu nebo dichlorfluoresceinu (DCF) vyzářit v excitovaném stavu přebytečnou energii ve formě fotonů. Tento signál je následně převeden na elektrický signál a je měřen pomocí luminometru jako počet vyzářených fotonů za minutu (Aitken et al. 2004).

Luminol při oxygenační reakci uvnitř buňky v excitovaném stavu vyzařuje zelené světlo. Jelikož je tato reakce v buňce zprostředkována peroxidázami, můžeme detekovat oxidační stres buněk v laboratorních podmínkách právě inkubací spermií s peroxidem vodíku. Lucigenin je naopak oxidován v extracelulárním prostoru pomocí superoxidových anionů (Aitken & Clarskson 1988).

Měření pomocí chemiluminiscence však je díky technologickému pokroku zastaralé. Má poměrně vysokou senzitivitu i specifitu, když odhlédneme od možnosti kontaminace vzorku semennou plazmou nebo leukocyty. Technika je však poměně drahá a vyžaduje k hodnocení velké množství vzorku (Aitken et al. 2004).

Měření intracelulárních ROS v živých spermích je značně přesnější při využití derivátů DCF a hodnocení pomocí průtokové cytometrie (Rodrigues 2015). Technika průtokové cytometrie je tak základem pro analýzu ROS pomocí přímých metod.

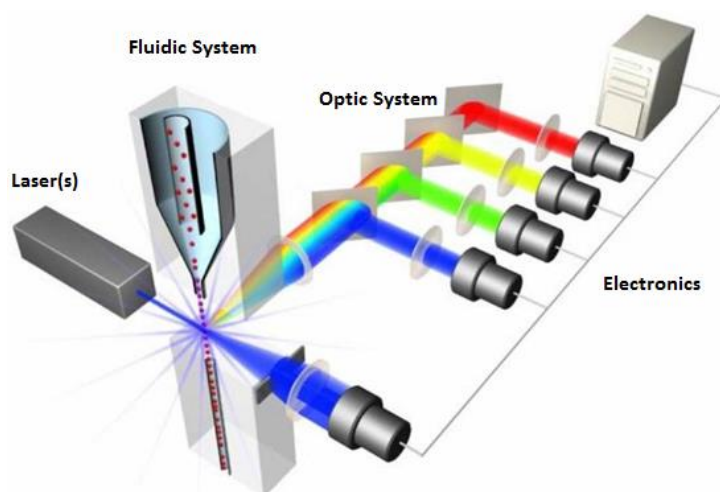
#### 3.6.2.2 Průtoková cytometrie

Metodická část diplomové práce byla věnována právě hodnocení ROS v ejakulátu pomocí průtokové cytometrie. Díky této metodě je možné určit velké množství parametrů buněk za jednotky minut. Hodnocení míry fluorescence tak slouží například k měření velikosti i tvaru buněk, intracelulárního pH i redoxního potenciálu a ve svém důsledku také viability spermií. Díky hodnocení zrnitosti buněk jsou identifikovány také vnitrobuněčné komponenty od DNA přes proteiny, lipidy, množství vnitrobuněčných iontů vápníku i povrchových receptorů a antigenů buněk (Rieseberg et al. 2001). Ačkoliv je průtoková cytometrie vysoce efektivní při hodnocení velkého množství buněčných parametrů v krátkém čase, pořizovací cena přístroje neumožňuje toto testování využívat běžně v klinické praxi. Zjištěné hodnoty také mohou být zkreslovány chybami při přípravě vzorku a špatnou obsluhou cytometru (Agarwal & Deepinder 2009).

Fluorescenční cytometr funguje na principu třech dílčích systémů, jak můžeme vidět na obrázku níže. Průtokový systém je sestaven tak, aby vždy byla analyzována pouze buňka, která je v danou chvíli osvětlena laserem. Jedná se o takzvanou hydrodynamickou fokusaci vzorku. Té je dosaženo naplněním kapiláry vedoucí do průtokové komory solným roztokem,

který proudí rychleji než testovaná tekutina. Po nasátí vzorku z testační zkumavky prochází vzorek testační komorou právě tak rychle, aby byla vždy osvětlena pouze jediná buňka vzorku. Tímto způsobem lze dosáhnout zhodnocení až 10 000 buněk za sekundu (Hossain et al. 2011). Procházející buňky jsou v tomto zařízení snímány CCD kamerami místo klasických fotodetektorů. Máme tedy k dispozici také fotodokumentaci procházejících buněk (Martínez-Pastor et al. 2010).

Optický systém se skládá z laseru a optiky sloužící k zachycení excitovaných elektronů ve formě barev. Na obrázku 4. vidíme zjednodušený model této techniky. Ve skutečnosti jsou v přístroji instalovány ještě sady čoček, které pomocí odrazu světla pomáhají při zaměření laserového paprsku do průtokové komory, i při směřování odražených paprsků dále k optickým zrcadlům (Rowley 2012). Z obrázku je zřejmé, že optická zrcadla slouží k odrazu světla určité vlnové délky k optickým detektorům. Společně s optickými filtry pro různé vlnové délky tak zrcadla zajišťují, že ke každému detektoru bude odražena pouze malá část vlnového spektra, na obrázku symbolizována různými barvami. Aby byl světelný signál dostatečný pro zachycení elektronickým systémem, jsou na začátku optických drah instalovány multiplikační systémy, které slouží k zesílení světelných stimulů (Rieseberg et al. 2001).

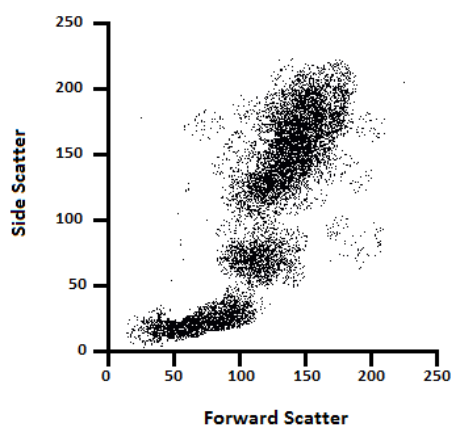


**Obrázek 4: Zjednodušený pohled na funkční systémy fluorescenčního cytometru**  
**Zdroj: Rowley T. 2012**

Díky elektrickému systému jsou následně zesílené světelné signály převedeny na elektrický proud, který vytvoří napěťový pulz. Tento pulz dosahuje svého maxima ve chvíli, kdy buňka prochází středem laserového paprsku a dochází tedy k odrazu nejširší škály světelných paprsků. Následně jsou změny napětí v čase převedeny na digitální signál, který je přepsán do grafů, sloužících jako výstupy pro hodnocení experimentu (Davey et al. 1999).

Na obrázku výše je patrné, že světlo je ze vzorku odráženo přímo ve formě jednoho světelného paprsku a do strany, kde je díky filtrům rozkládáno na různé vlnové délky. Síla odrazu přímého paprsku (forward scatter – FSC) nám určuje velikost buňky, která prochází pod laserem. Naopak odraz paprsku bočního (side scatter – SSC) a intenzity jednotlivých vlnových délek slouží k určování vnitrobuněčných parametrů, jako je granularita cytoplasmy, tvar jádra a složení membrán buněk (Rieseberg et al. 2001).

Na obrázku 5. je vyobrazen výstup analýzy, který nám umožní vyhodnotit počet buněk požadovaných rozměrů a granularity vzorku. Tato analýza nám při hodnocení ejakulátu umožňuje eliminovat chyby v testování tím, že vybereme k dalšímu hodnocení pouze buňky odpovídající svo velikostí spermii (Evenson & Melamed 1983). Nehodnotíme tedy nečistoty, které se do vzorku mohly dostat i při zpracování a odpadá nám také potřeba složitého barvení bílých krvinek v ejakulátu. V operačním systému cytometru je možné ohraničit si pouze určitou populaci z grafu níže (McKinnon 2018).



**Obrázek 5: Diagram pro analýzu velikosti a granularity buněk**  
**Zdroj: Rowley (2012)**

Vybranou populaci následně vyhodnocujeme z hlediska plochy, výšky a šířky napěťových impulzů jednotlivých buněk. Tímto způsobem jsme schopni populaci spermií očistit například o aglutinované spermie. Při registraci dvou neoddělených pulzů, pomocí návratu křivky grafu k nulovému napětí nebo vyššímu pulzu, prochází pod laserem více buněk najednou. Tyto buňky jsou na bodovém grafu posunuté od populace buněk dle hodnot, které zvolíme na osu X a Y (Martínez-Pastor et al. 2010). Singlety jsme tedy schopni odlišit například z grafu, kde si na osu X zvolíme hodnotu plochy napěťového pulzu z FSC a na osu Y výšku napěťového pulzu z FSC. Pro další analýzu je následně zvolena populace samostatných buněk (Rowley 2012). Na těchto buňkách jsou prováděny další analýzy, založené na hodnocení fluorescence buněk.

### 3.6.2.3 Fluorescenční sondy

Fluorescence je jev, při němž jsou látky schopné dostat se do excitovaného stavu díky příjmu energie například ozářením nebo přijmutím volných elektronů. Následně přebytečnou energii vydávají ve formě fotonů a tím se dostávají zpět do základní energetické hladiny. Takto mohou být tyto látky stimulovány opakovaně do doby, než dojde k narušení jejich struktury (Evenson & Melamed 1983).

Z definice fluorescence vyplývá, že při zvýšení koncentrace ROS v okolí sond dojde k zesílení signálu těchto látek po ozářením laserem v cytometru. Výrobci sond vždy definují rozsah vlnových délek, ve kterých jsou markery excitovány a ve kterých emitují přebytečnou energii. Díky těmto informacím je možné nastavit cytometr pro detekci signálu správných vlnových délek (Zhang et al. 2018).

Fluorescenční markery jsou nezbytné pro rychlé a přesné hodnocení tisíců spermií ve vzorku pomocí průtokové cytometrie (Hossain et al. 2011). Pro výzkum kvality ejakulátu se využívá řada fluorescenčních sond detekujících stav akrosomu, kapacitační status spermií, mitochondriální aktivitu buněk, stav chromatinu, apoptotické změny buněk i oxidativní stres buněk. V rámci jednoho testu jsme tedy oproti výše popsaným nepřímým metodám schopni získat komplexní hodnocení odebraného spermatu z jediného vzorku (Martínez-Pastor et al. 2010).

V metodické části práce budeme využívat dvě sondy pro hodnocení oxidačního stresu buněk. Jedná se o 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (H<sub>2</sub>DCFDA) a CellROX Deep Red.

#### 3.6.2.3.1 H<sub>2</sub>DCFDA

H<sub>2</sub>DCFDA patří k nejstarším a nejvíce používaným sondám pro hodnocení produkce ROS v buňkách. Sonda H<sub>2</sub>DCFDA se využívá k intracelulárnímu měření koncentrace ROS. Marker se po inkubaci se spermiemi dostává skrz membránu do buněk a pomocí esteráz se naváže na acetátové konce membránových fosfolipidů. Po navázání na membránu vzniká dichlorodihydrofluorescein (H<sub>2</sub>DCF). V přítomnosti hydrogen peroxidu v buňce je H<sub>2</sub>DCF oxidován pomocí peroxidáz na fluorescenční 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) (Lançoni et al. 2017). Ačkoliv není citlivý na přítomnost superoxidů v buňce, může je detekovat nepřímo. Kyslíkové radikály započnou v buňce děje, vedoucí ke vzniku peroxidů a peroxylových radikálů, které vedou k oxidaci meziprojektu H<sub>2</sub>DCF na fluorescenční DCF. Ty vyzařují zelené fluorescenční světlo. Dle intenzity světelného signálu jsou vzorky vyhodnoceny pomocí fluorescenční průtokové cytometrie nebo fluorescenční mikroskopie. Maximální excitační vlnová délka H<sub>2</sub>DCFDA je 494 nm a jeho emitační maximum je 512 nm (Martínez-Pastor et al. 2010). Barva musí být skladována v -5 °C až -20 °C. Kromě teploty je také třeba ji skladovat ve tmě. Na rozdíl od CellROX není tato barva fixovatelná, proto je nutné testy provést ihned po přípravě vzorku.

#### 3.6.2.3.2 CellROX Deep Red

Jelikož se fluorescenční sonda CellROX Deep Red začala vyrábět před několika lety, nebyla zatím použita ve větší množství studií detekce ROS na spermiích zvířat. Ze získaných dat však zatím vypadá, jako spolehlivý marker oxidačního stresu. Celeghini et al. (2019) potvrdila, že vyšší hladiny ROS byly pomocí tohoto markeru zjištěny u málo plodných býků. Velkou výhodou této metody je také možnost analyzovat vzorky kromě průtokové cytometrie také fluorescenční mikroskopii nebo spektrofotometrií (Rodrigues 2015)

CellROX v redukovaném stavu vykazuje nulovou nebo pouze velice nízkou míru fluorescence. Barva po inkubaci s buňkami proniká přes membránu a zůstává v cytoplazmě. Ve chvíli, kdy dojde k oxidaci produktu, stává se silně fluorescenčním. Excitační maximum této sondy je 644 nm a emisní maximum je 665 nm. Sonda detekuje současně superoxidové i hydroxylové radikály, které často mohou za poškození membrán buněk i DNA, a tím pádem i za sníženou schopnost oplození spermií (Celeghini et al. 2019). Superoxidové radikály jsou produkovány hlavně mitochondriemi. CellROX však vykazuje větší citlivost k hydroxylovým



radikálům, které vznikají v cytoplazmě buněk reakcí superoxidů a peroxidů vodíku (Rodriguez 2015).

Aby nedošlo k vyčerpání fluorescenčního potenciálu sondy, musí vzorky co nejméně přijít do kontaktu se světlem. CellROX je však fixovatelný pomocí paraformaldehydu, díky čemuž je zvýšena vypovídající hodnota výsledků i po časové prodlevě. Musí však být skladován v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Analýzu míry oxidačního stresu můžeme provádět společně s testováním viability buněk. Dobré výsledky mají jak vzorky, které vykazují vyšší koncentraci ROS *in vivo*, tak i vzorky, u nichž byl oxidativní stres navozen v laboratoři například pomocí tert-butyl hydroperoxidu (TBHP). Ten katalyzuje reakci peroxidu vodíku s kationtem kovu za vzniku hydroxylových radikálů (Lançoni et al. 2017).

## 4 Materiál a metody

V experimentu byly využity vzorky býčích, kančích i lidských spermií. Odběr býčího ejakulátu byl proveden v inseminačním centru býků ISB Zásmuky CRV (Kolín, ČR). Humánní vzorky byly získány na základě spolupráce s IVF klinikou. Odběry kančího ejakulátu byly zajištěny v chovu přeštických černostrakatých prasat ve Výzkumném ústavu živočišné výroby v Kostelci nad Orlicí (VÚŽV v.v.i., Kostelec nad Orlicí, ČR).

Pro hodnocení koncentrace a motility spermií ve vzorku byl využit systém počítačem řízené analýzy spermií (computer assisted sperm analyzer – CASA, ISAS Proiser). Pro pilotní experimenty s cílem výběru správných koncentrací fluorescenčních sond bylo použito hodnocení vzorků pod fluorescenčním mikroskopem. Hodnocení efektu dextranu v mrazicím médiu následně bylo prováděno na experimentálně vyrobených ID spermií kanců v rámci projektu TAČR.

### 4.1.1 Použité reagensy a chemikálie

V experimentu byl k promývání vzorků použit 1x koncentrovaný fosfátem pufovaný fyziologický roztok PBS o koncentracích 10 mM  $\text{PO}_4^{3-}$ , 137 mM NaCl a 2,7 mM KCl (BP66110, Thermo Fisher Scientific, USA), a také 1x koncentrovaný molární roztok PBS s polyvinilalkoholem 0,1 % (PVA) (9002-89-5, Thermo Fisher Scientific, USA). Vzorek pozitivní kontroly byl inkubován s roztokem 250  $\mu\text{M}$  Tert-butyl-hydroperoxidu (TBHP) (158127, Sigma-Aldrich, Německo). Jako markery pro hodnocení ROS byly zvoleny 2.5 mM roztok CellROX Deep Red v dimethylsulfoxidu (DMSO) (C10422, Thermo Fisher Scientific, USA) a  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (D399, Thermo Fisher Scientific, USA). K fixaci vzorků značených pomocí CellROX Deep Red byl použit 2% paraformaldehyd (PFA) naředěný ze 4% PFA (158127, Sigma-Aldrich, Německo). K vizualizaci jader buněk byl použit 4',6-diamidin-2-fenylindol společně s barvou VECTASHIELD (H-1200-10, Vector laboratories, USA). Pro získání dat o viabilitě buněk se použilo fluorochromu Zombie Ultra Violet dye (Zombie UV™ Fixable Viability Dye, 423108, Biolegend, USA).

### 4.1.2 Vzorky spermií využité v experimentu a jejich příprava

V experimentu byly využity vzorky býčích a lidských spermií, kryokonzervované v mrazicím médiu obsahujícím glycerol, a kančí spermie, na kterých byl testován pozitivní efekt média obohaceného o dextran na parametry spermií po rozmrazení.

Vzorky býčích spermií byly kryokonzervovány standardní metodou zavedenou na ISB. Minimální koncentrace spermií v čerstvých vzorcích byla po odběru  $0,7 \times 10^9/\text{ml}$  a podíl motilních spermií ve vzorku přesahoval 70 %. Dávky byly následně naředěny kryokonzervačním médiem Andromed (Minitübe) na koncentraci  $120 \times 10^6$  spermií ve vzorku. Takto připravená suspenze byla plněna do pejet o objemu 0,25 ml. Následně byly pejety ekvilibrovány po 2 hodiny v 5 °C. Samotná kryokonzervace dávek byla zajištěna počítačovým systémem DigitCool® (IMV Technologies, L'Aigle, France). Pejety byly ihned

po kryokonzervaci uloženy do tekutého dusíku a jejich analýza probíhala nejdříve po osmi dnech (Šimoník et al. 2019).

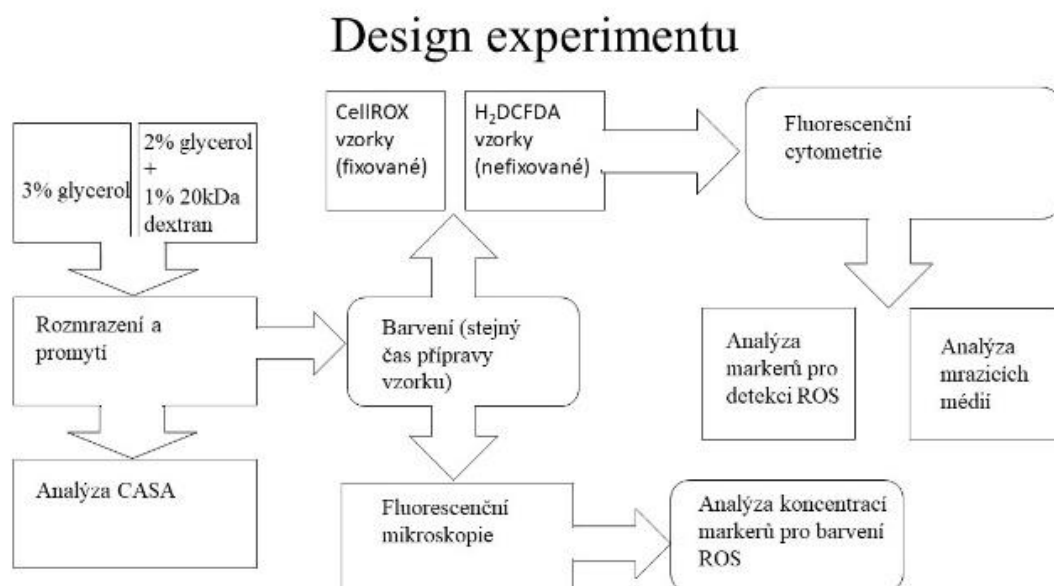
Vzorky humánních spermií byly kryokonzervovány pomocí přípravku CryoSperm™ (11010010, Cooper Surgical, Dánsko), které se do koncentrovaného vzorku spermií přidávalo po kapkách a zahřáté na pokojovou teplotu. Po každém naředění byl vzorek promíchán. Tento postup byl opakován, dokud vzorek nebyl naředěn v poměru 1:1. Směs se následně nechala inkubovat v pokojové teplotě po dobu 10 minut a po této době byla plněna do vialek o objemu 5 ml. Ty byly vloženy do duté trubice ponořené v tekutém dusíku a po dobu 30 minut inkubovány v úrovni pod hladinou tekutého dusíku. Nakonec byly zkumavky ponořeny do tekutého dusíku (CryoSperm ORIGIO, 2020).

Analýza modifikací kryokonzervačních médií byla provedena na kančích spermiích přeštického černostrakatého plemene. Po odběru byla pomocí centrifugace odstraněna semenná plazma a ejakulát byl naředěn v médiu Androhep (ředidlo na kančí semeno, 0547c, Selko Praha s.r.o., ČR) a inkubován po dobu 18-20 hodin při teplotě 17°C. Po odmytí média pomocí centrifugace 300 x g po dobu 10 minut byly vzorky naředěny kryokonzervačním médiem obsahujícím 20 g fuktózy, 0,352 g hydrogenuhličitanu sodného, 0,035 g L-cysteinu, 80 ml plazmy vaječného žloutku, 3 976 g detergentu Equex STM, antibiotika Penicilin, Spectinomycin, Streptomycin a 272 ml purifikované MilliQ vody. Toto kryokonzervační médium bylo modifikováno dle experimentálního schématu. Připravená suspenze poté byla plněna do pejet o objemu 0,5 mL (006926, IMV Technologies, Francie) a ekvilibrována po dobu 2 hodin ve 4 °C. Následně byly vzorky 20 minut horizontálně kryokonzervovány v parách tekutého dusíku 4 cm nad jeho hladinou v upraveném polystyrenovém boxu, který byl předem vytemperován.

Na těchto dávkách byl hodnocen efekt dextranu v mrazicím médiu na viabilitu a zmírnění oxidačního stresu rozmrazených dávek spermií. Analyzovány byly vzorky pocházející od šesti kanců přeštického černostrakatého plemene. První sada šesti ID byla před uložením do tekutého dusíku inkubována v mrazicím médiu, obsahujícím kryoprotektant 3% glycerol. Druhá skupina vzorků byla kryokonzervována ve 2% glycerolu s přídatkem 1% 20 kDa dextranu. V rámci této skupiny bylo hodnoceno 16 pejet. Referenční vzorky, i vzorky s modifikovaným kryoprotektantem v mrazicím médiu, byly testovány pro každého odebraného samce a při inkubaci s oběma fluorescenčními sondami pro hodnocení ROS.

### 4.1.3 Příprava a zpracování vzorků

Pro zjednodušení je na obrázku 6. vyobrazena posloupnost jednotlivých kroků experimentu. Protokol pro přípravu vzorků ke hodnocení průtokovým cytometrem je přiložen v samostatné příloze 1.



**Obrázek 6: Design experimentu**

Vzorky spermií býků a kanců v pejetách byly po vyjmutí z mrazicího kontejneru rozmrazeny inkubací ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 30 sekund. ID lidských spermií byly zmrazeny ve větších objemech. K jejich rozmrazení byl využit inkubátor, ve kterém se vzorky nechaly ve 37 °C po dobu 10 minut. Po rozmrazení byly vzorky centrifugovány při pokojové teplotě na 300 x g po dobu 5 minut. Následně byly vzorky naředěny PBS o teplotě 37 °C. Tento oplach byl dvakrát opakován. Po odsání supernatantu po druhém stočení byl ze vzorku koncentrovaných spermií odebrán alikvot, ze kterého byla zjištěna koncentrace a motilita spermií. Následně byly vzorky, dle získaných hodnot z CASA, naředěny pomocí PBS na výslednou koncentraci  $5 \times 10^6$  až  $10 \times 10^6$  spermií/mL.

Takto vytvořený kontrolní vzorek negativní kontroly byl využit k analýze, jako referenční hodnota k sondami značeným vzorkům pro případ, že by došlo k jejich znečištění. Také bylo tímto způsobem vyfiltrováno záření způsobené autofluorescencí, která vzniká přirozeným vyzařováním světla některých buněčných struktur (Martínez-Pastor et al. 2010). U přípravy pozitivní kontroly byly po promytí a stočení vzorků spermie naředěny 200 µl 250 µM TBHP. Ten je stabilnější, než například peroxid vodíku (Fatemi et al. 2012; Celeghini et al. 2019). Takto připravený vzorek byl inkubován ve 37 °C po dobu 10 minut. U pozitivní kontroly byl předpokládán vysoký oxidační stres spermií. Zkumavky následně byly opět dvakrát centrifugovány a dvakrát ředěny PBS do 500 µl, aby byl vzorek očištěn od zbytků TBHP.

Následně byly všechny vzorky inkubovány s fluorescenčními próbami. Pro přípravu vzorků ke světelné mikroskopii značením pomocí H<sub>2</sub>DCFDA byly testovány roztoky suspenze PBS a spermii o různé koncentraci barevného markeru (1 μM, 5 μM, 20 μM, 100 μM, 200 μM a 700 μM). Podobně byly testovány také vzorky značené sondou CellROX (1 μM, 2 μM, 4 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM a 50 μM). Při následné analýze na průtokovém cytometru se po vyhodnocení analýze výsledků z mikroskopu pracovalo již pouze z koncentracemi 5 μM, 10 μM, 20 μM a konečná analýza efektu dextranu v mrazicím médiu byla testována na vzorcích 5 μM roztoků pro obě fluorescenční sondy.

Při hodnocení průtokovým cytometrem byla společně s těmito markery inkubována 100x naředěná Zombie UV dye, která je díky své afinitě k DNA schopna penetrovat do buněk. Děje se tak ale pouze při narušení jejich plazmatické membrány. Obarvené buňky tedy díky ztrátě integrity membrány byly považovány za mrtvé spermie (Warnes 2016). Pro přípravu vzorků o 500 μl a 5 μM koncentraci barevných sond ve vzorku byly připraveny roztoky:

448,5 μl vzorku s PBS + 2,5 μl H<sub>2</sub>DCFDA + 49 μl Zombie UV dye

450 μl vzorku s PBS + 1 μl CellROX + 49 μl Zombie UV dye

Inkubace vzorků s H<sub>2</sub>DCFDA pro pozorování mikroskopem následně trvala 15 minut při pokojové teplotě a bez přístupu světla. Vzorky H<sub>2</sub>DCFDA se Zombie dye a vzorky CellROXu, využitě k průtokové cytometrii, se při pokojové teplotě bez přístupu světla nechaly inkubovat po dobu 30 minut. Následně byly zkumavky opět dvakrát centrifugovány a dvakrát promyty. Po odstranění supernatantu byly vzorky obsahující CellROX fixovány pomocí 200 μl 2% PFA. Suspenze se opět nechala inkubovat při pokojové teplotě a bez přístupu světla po dobu 15 minut. Po uplynutí doby pro fixaci byl paraformaldehyd ze vzorku odmyt opět dvounásobným stočením a dvounásobným promytím. Fixované vzorky byly promývány roztokem PBS/PVA, díky kterému bylo zabráněno slepování buněk po fixaci.

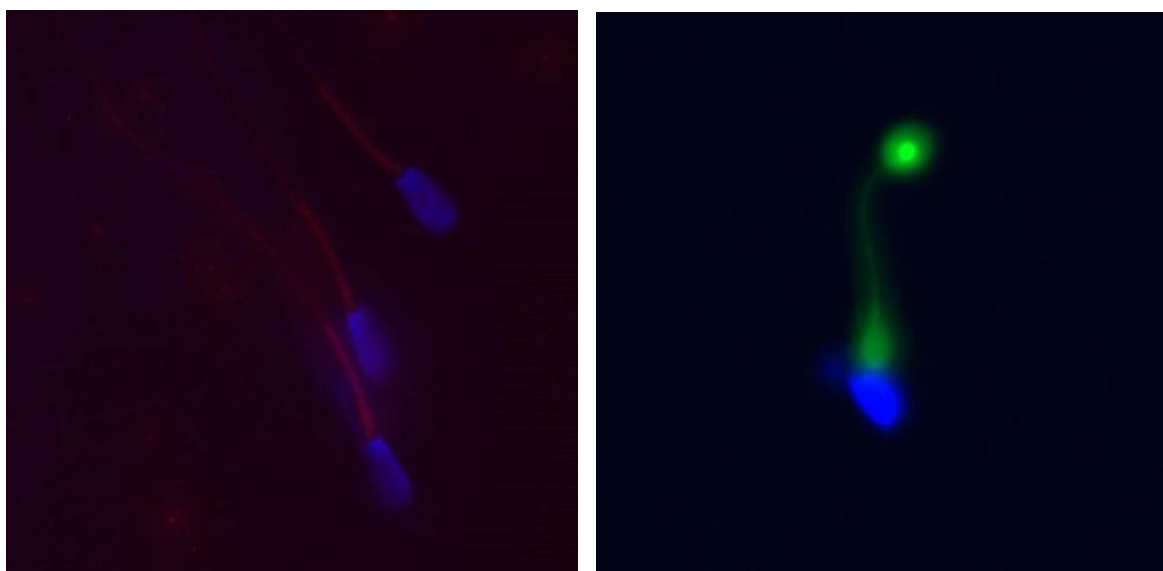
#### **4.1.4 Analýza vzorků fluorescenčním mikroskopem**

Pro hodnocení fluorescenčním mikroskopem bylo na podložní sklíčko připraveno 9 μl vzorku a 3 μl roztoku DAPI a VECTASHIELD. DAPI je fluorescenční barva s excitací UV světla do hodnoty 358 nm a emisním maximem 461 nm. Je schopná proniknout buněčnou membránou a váže se na DNA v oblasti s více AT páry. DAPI byla fixována pomocí PFA, nebo v nefixovatelných vzorcích aplikována společně s barvou VECTASHIELD, která zabraňuje masivnímu vysvěcování této sondy ve vzorku (Warnes 2016).

Po přidání těchto prób se vzorek přikryl krycím sklíčkem a zafixoval bezbarvým lakem po okrajích krycího sklíčka. Takto připravené vzorky následně byly hodnoceny pod fluorescenčním mikroskopem.

Nejprve se pod světelným mikroskopem zaměřila vrstva spermii pod desetinasobným zvětšením. Následně se uzavřela clona pro světlo a vzorek byl sledován přes filtr UV-2A. Tento filtr má excitační vlnové délky mezi 330-380 nm a emisní vlnovou délku v rozmezí 400-420 nm. Díky barvě DAPI byly na tomto filtru pozorovány modře značené hlavičky spermii.

Následně byly sledovány pouze spermie značené H<sub>2</sub>DCFDA s patologickou produkcí ROS přes filtr propouštějící zelené vlnové délky světla B-2A s excitačními vlnovými délkami v rozmezí 450-490 nm a emisní vlnovou délkou v rozmezí 500-515 nm. Na filtr červeného světla CY-5 s excitační vlnovou délkou v rozmezí 450-490 nm a emisní vlnovou délkou mezi 672-712 nm, byly snímány ve dvacetinásobném až šedesátinásobném zvětšení vzorky značené pomocí CellROX Deep Red. Vzorek musel být analyzován pomocí PC programu, jelikož mikroskop nebyl schopen promítnout snímanou oblast do okuláru. Ke snímání vzorku byla využita závěrka 70 ms v programu NIS-Elements AR, který umí skládat obraz zaznamenaný pod filtrem UV-2A a pod filtrem CY-5. Na obrázku 7. vlevo vidíme výstup z mikroskopu, kdy byla patrná všechna modře obarvená jádra buněk a zároveň červeně a zeleně značené spermie pod oxidačním stresem.



**Obrázek 7: Výstupní fotografie z měření fluorescenčním mikroskopem**

Vlevo:barveno CellROX Deep Red (emitační maximum 665 nm) 20 μM + DAPI (emitační maximum 455 nm), zvětšení 60x –DAPI značí všechny hlavičky spermií. Spermie na obrázku pod oxidačním stresem mají pomocí CellROX červeně značené ocásky. Vyšší intenzita signálu značí spermie s větší zátěží ROS.

Vpravo: barveno H<sub>2</sub>DCFDA (emitační maximum 512 nm) 200 μM + DAPI, zvětšení 60 x; Na obrázku je vidět nezralá spermie s odlučující se cytoplazmatickou kapkou na ocásku se zátěží ROS. H<sub>2</sub>DCFDA zeleně barví celou hlavičku i ocásek spermie.

Dle výsledků z mikroskopu bylo vyhodnoceno, že ideální koncentrace obou barev pro značení vzorků jsou 5 μM, 10 μM, 20 μM a maximálně 50 μM. Ve vyšších koncentracích barviva byl zachycen příliš intenzivní signál pozadí vzorku, jak vidíme na obrázku 7. vpravo u vzorku barveného 200 μM H<sub>2</sub>DCFDA. Zároveň je z obrázku 7. patrná selektivita markerů pro značení pouze buněk podléhajících oxidačnímu stresu. Na průtokovém cytometru jsou buňky vždy osvětleny ve velmi krátkém čase, proto bylo potřeba ověřit mechanismus značení pomocí sond na fluorescenčním mikroskopu.

#### **4.1.5 Analýza vzorků průtokovou cytometrií**

Vzorky pro průtokovou cytometrii byly nachystané dle kapitoly 4.1.2. Z každého vzorku bylo odebráno 200  $\mu$ l suspenze. Roztok byl cytometrem nasáván do doby, než bylo analyzováno  $30 \times 10^3$  objektů ve vzorku.

Analýza vzorků byla prováděna pomocí průtokového cytometru BD LSR Fortessa™ (BD Biosciences, USA). V DIVA softwaru bylo před měřením provedeno standardní nastavení cytometru. Mimo měření parametrů FSC a SSC se nastavila také analýza kanálem pro Fluoresceinisothiokyanát (FIT-C) s excitační vlnovou délkou 494 nm pro analýzu H<sub>2</sub>DCFDA, kanálem Pacific Blue s excitační vlnovou délkou 410 nm a emisní vlnovou délkou 455 nm pro hodnocení barvy Zombie dye a Allophycocyaninovým kanálem (APC) s excitační vlnovou délkou 630 nm a emisní vlnovou délkou 661 nm pro hodnocení vzorků značených sondou CellROX.

Následně byla naměřená data vyhodnocena ve FlowJo (FlowJo LLC, USA) a exportována k dalšímu hodnocení. Exportované tabulky obsahovaly data o počtech analyzovaných spermií a procentuálním zastoupení spermií v jednotlivých kvadrantech, dle hodnocení signálu jednotlivých sond. Z těchto dat byly programem vytvořené histogramy i bodové grafy, díky kterým bylo zjednodušeno hodnocení výsledků.

#### **4.1.6 Statistická analýza**

Statistická analýza dat byla vypracována v programu STATISTICA 12 CZ (StatSoft CR s.r.o.). Pro oba markery byla vypočtena jednofaktorová ANOVA, kdy třídícím faktorem bylo využité mrazící médium a závislými faktory procentuální zastoupení buněk v jednotlivých kvadrantech dle viability buněk a jejich zátěže ROS. Jako statisticky významné byly brány rozdíly v datech, kdy  $P < 0,05$ .

## 5 Výsledky

Samotnému hodnocení vzorků pomocí průtokové cytometrie předcházelo po rozmrazení příslušných vzorků hodnocení motility spermií pomocí CASA. Data získaná o koncentraci inseminačních dávek sloužila k vytvoření vzorků o podobné koncentraci ( $1 - 10 \times 10^6$  buněk/mL) pro následující analýzu. Následně byly získané hodnoty motility spermií využity k hodnocení kvality vzorků po rozmrazení.

Po zpracování vzorků výše popsanou metodikou byla pomocí průtokového cytometru provedena simultánní analýza viability a zátěže ROS u spermií. Takto získaná data byla využita k hodnocení rozdílů ve využití fluorescenčních markerů i rozdílů v médiích modifikovaných dle experimentálního designu.

### 5.1 Hodnocení CASA

V tabulce níže jsou shrnuta data, získaná z měření jednotlivých vzorků po jejich rozmrazení a odmytí mrazicích médií.

**Tabulka 1: Výsledky hodnocení motility spermií**

Druh	Jedinec	Ředidlo	Progresivní motilita	Celková motilita
K anec	1.	3% glycerol	2%	3%
		2% glycerol + 1% 20 kDa dextran	0%	4%
	2.	3% glycerol	0%	7%
		2% glycerol + 1% 20 kDa dextran	0%	2%
	3.	3% glycerol	1%	10%
		2% glycerol + 1% 20 kDa dextran	3%	8%
	4.	3% glycerol	1%	2%
		2% glycerol + 1% 20 kDa dextran	0%	0%
	5.	3% glycerol	0%	0%
		2% glycerol + 1% 20 kDa dextran	0%	0%
	6.	3% glycerol	0%	2%
		2% glycerol + 1% 20 kDa dextran	0%	0%

\* statisticky signifikantní rozdíly mezi v motilitě samců na hladině významnost  $p = 0,05$  jsou v tabulce vyznačeny indexy

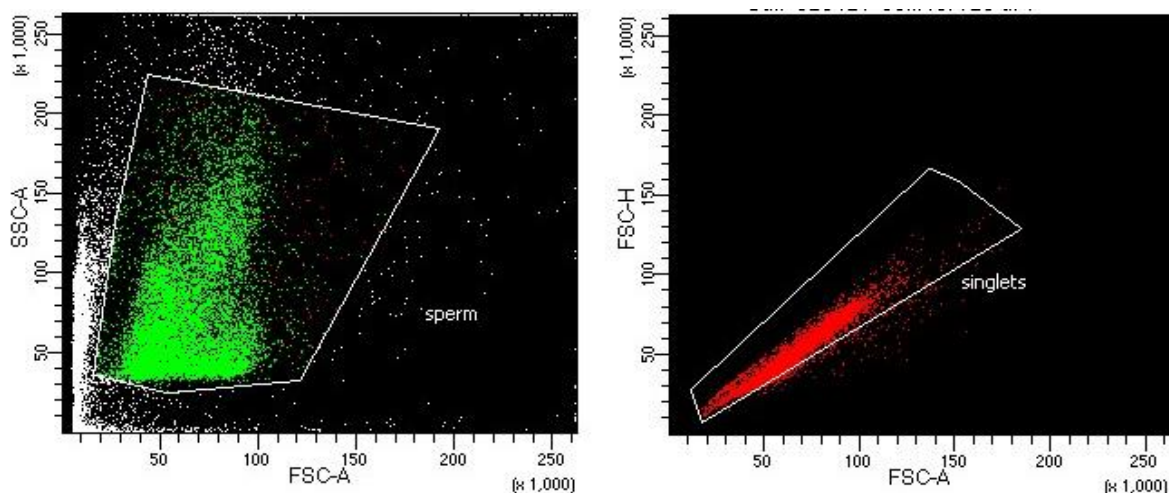
Vzorky spermií kanců dosahovaly obecně velmi nízkých hodnot celkové i progresivní motility. U kontrolní varianty ředidla s obsahem permeabilních kryoprotektantů byla v některých případech naměřena vyšší motilita než u média s dextranem. Mezi naměřenými



hodnotami motility vzorků kryokonzervovaných v obou médiích však nebyl zaznamenán na hladině významnosti  $p < 0,05$  statisticky významný rozdíl.

## 5.2 Hodnocení průtokovým cytometrem

Grafickými výstupy z hodnocení průtokového cytometru byly cytogramy a histogramy. Obrázek 8. zobrazuje primární výstupy obdobné pro všechny analyzované vzorky.



### Obrázek 8: Dot ploty pro selekci jednotlivých spermií

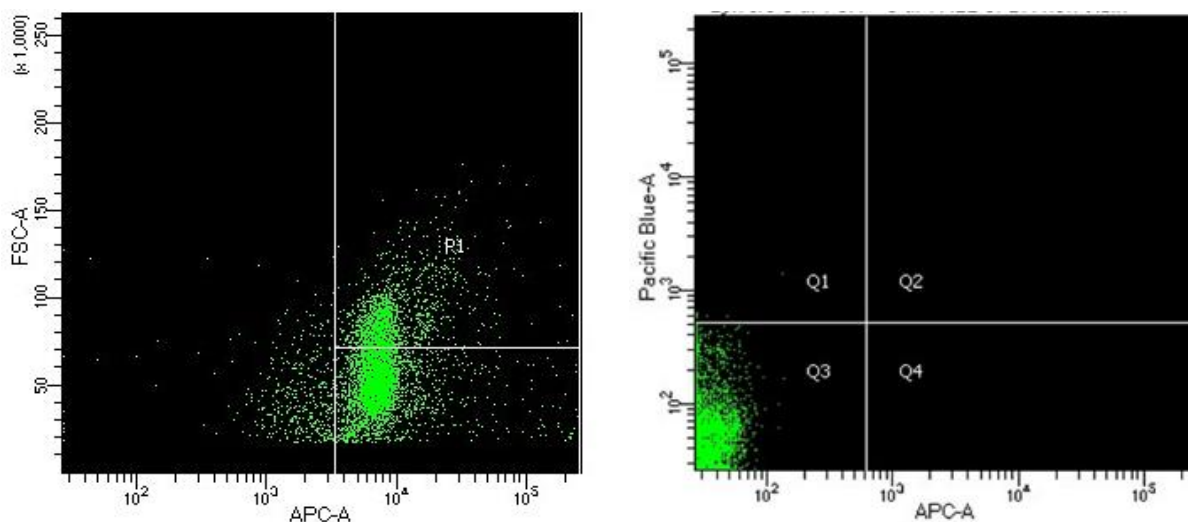
Vlevo: Cytogram FSC-A/SSC-A zachycuje veškeré objekty, které při měření prošly cytometrem. Zakreslená brána ohraničuje buňky, které velikostí odpovídají spermiím.; Vpravo: Cytogram FSC-A/FSC-H se zakreslenou bránou pro selekci jednotlivých spermatických buněk.)

Cytogram na obrázku 8. vlevo zobrazuje veškeré objekty, které byly cytometrem zaznamenány při průchodu flow cell. Dle velikosti buněk a jejich granularity byla do obrázku zakreslena oblast, pomocí které byly selektovány buňky, velikostí odpovídající spermiím, k další analýze. Dle hodnocení plochy a výšky signálu z průtokového cytometru byly na cytogramu na obrázku 8. vpravo vybrány pouze samostatné spermie. Tato selekce byla počátečním krokem všech hodnocení průtokového cytometru.

### 5.2.1 Nastavení metodiky pro býčí spermie

Referenční vzorky býčích spermií po rozmrazení vykazovaly 59 % pohybujících se spermií a 33 % spermií s progresivní motilitou.

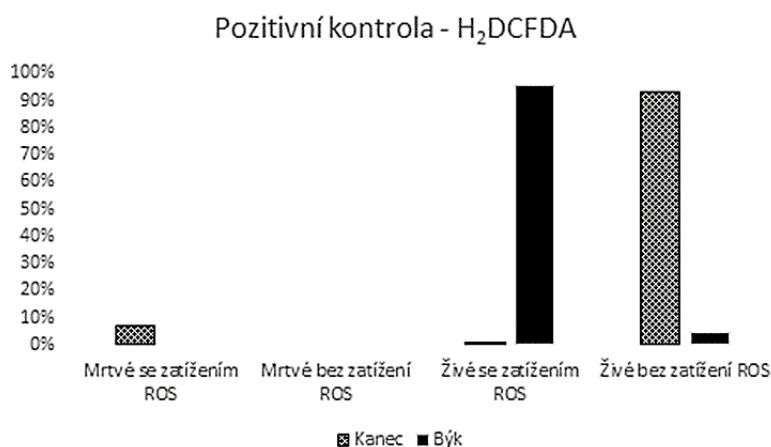
Pro optimalizaci metodiky hodnocení vzorků na průtokovém cytometru bylo důležité vyhodnocení vzorků pozitivní a negativní kontroly. Vzorky pozitivní kontroly byly inkubovány s TBHP. Ten měl vyvolat v *in vitro* podmínkách oxidační stres převážné většiny buněk. Na obrázku 9. vlevo lze pozorovat pozitivní signál stresovaných buněk po značení buněk sondou CellROX. Na obrázku 9. vpravo je zobrazen cytogram vzorku spermií, které nebyly inkubovány s žádnou fluorescenční próbou.



**Obrázek 9: Vzorky pozitivní a negativní kontroly spermíí býků po barvení sondou CellROX**

Vlevo: Cytogram APC-A/FSC-A zobrazuje pozitivní signál sondy CellROX u většiny buněk ve vzorku. Svislou čarou jsou odděleny buňky bez oxidačního stresu.; Vpravo: APC-A/Pacific Blue-A zobrazuje neobarvené buňky negativní kontroly bez světelného signálu odpovídajícího sondami značeným buňkám.

Kde bylo k detekci ROS využito H<sub>2</sub>DCFDA, byly výsledky pozitivní kontroly provedené na býčích spermíích podobné, jako při značení buněk sondou CellROX. Takto byla ověřena jejich správnost. Dle vyhodnocení pozitivní kontroly spermíí kanců však většina buněk nebyla zatěžována ROS. Porovnání dvou vyhodnocení pozitivních kontrol, značených H<sub>2</sub>DCFDA je zobrazeno na grafu obrázku 10.

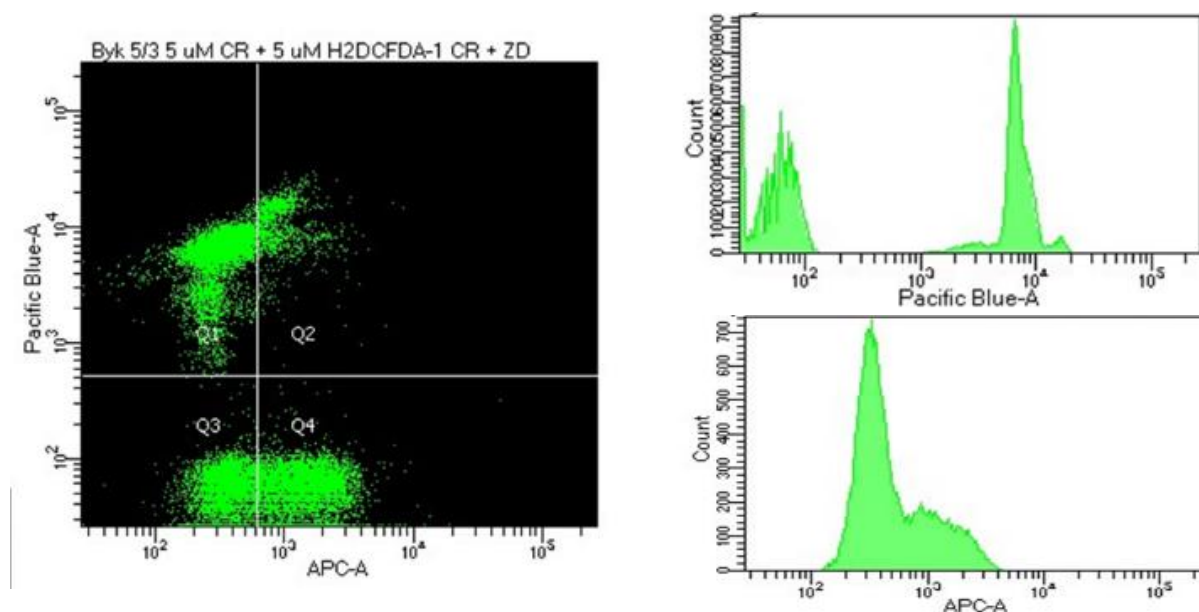


**Obrázek 10: Porovnání H<sub>2</sub>DCFDA barvených vzorků pozitivních kontrol býka a kance na hladině významnosti  $p < 0,05$**

Vzorek pozitivní kontroly býčích spermíí na obrázku 10. obsahoval dle hodnocení pomocí H<sub>2</sub>DCFDA více jak 90 % ROS zatěžovaných buněk. Pozitivní kontrola na referenčních

vzorcích kančích spermii však vykazovala téměř stejné procento ROS nezátěžených buněk i po inkubaci s TBHP. Jednalo se tedy o signifikantní rozdíly mezi vzorky ( $p < 0,05$ ).

Po vyhodnocení pozitivní i negativní kontroly byly analyzovány vzorky značené sondami pro hodnocení viability buněk a zátěže ROS. Na obrázku 11. je zobrazen výstupní cytogram měření a histogramy intenzity signálu v jednotlivých kanálech cytometru.



**Obrázek 11: Výstupy analýzy cytometru pro viabilitu a zátěž ROS býčích spermii**

Vlevo: cytogram APC-A/Pacific Blue A; Q1- mrtvé spermie bez zátěže ROS, Q2 – mrtvé spermie se zátěží ROS, Q3 – živé spermie bez zátěže ROS, Q4 – živé spermie se zátěží ROS.; Vpravo: Histogramy intenzity světelného signálu buněk pro viabilitu (Pacific Blue) a zátěž ROS (APC).

Cytogram na obrázku 11. je pomocí mřížky rozdělen na čtyři kvadranty. Mrtvé spermie bez zátěže ROS tvoří 49,5 % jednotlivých spermii vzorku, zatímco živé spermie se zátěží ROS 24,6 % vzorku. Polovinu vzorku tedy tvoří mrtvé spermie, jejichž signál má vyšší intenzitu než signál zaznamenaný od živých spermii, jak můžeme vidět na histogramu na obrázku 11. vpravo nahoře. Z histogramu pro zátěž ROS na obrázku 11. vpravo dole je patrné, že stresované spermie tvoří pouze 30 % všech spermii ve vzorku. Intenzita signálu většiny buněk zde odpovídá zařazení do kvadrantu Q3, kde jsou spermie nezátěžované oxidačním stresem.

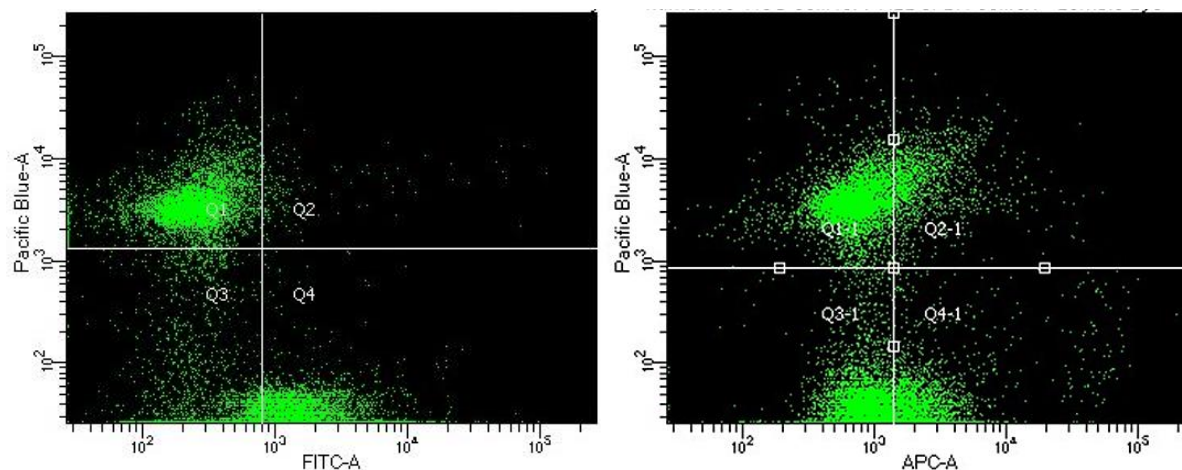
Analýza viability a zátěže ROS býčích spermii byla, s 5  $\mu$ M koncentracemi markerů pro oxidační stres i sondy Zombie dye, třikrát opakována s obdobnými výsledky.

### 5.2.2 Nastavení metodiky pro humánní spermie

Referenční vzorek rozmrazených humánních spermií dle hodnocení CASA vykazoval 59 % pohybujících se spermií a 30 % spermií s progresivní motilitou.

V rámci metodiky byly opět nejprve vyhodnoceny vzorky negativní a pozitivní kontroly. Negativní kontrola, ředěná PBS, opět neemitovala signály o intenzitě světla, která by byla zaznamenána námi vybranými kanály. Tento vzorek však sloužil k ujištění, že jsou skutečně hodnoceny vzorky spermií. Dle negativní kontroly tvořily jednotlivé spermatické buňky 77 % všech objektů v hodnoceném vzorku.

Analýza zátěže ROS a viability lidských spermií ve vzorku je zobrazena na obrázku 12.



**Obrázek 12: Hodnocení viability a zátěže ROS lidských spermií po barvení H<sub>2</sub>DCFDA (vlevo) a CellROX Deep Red (vpravo)**

Vlevo: Cytogram FITC-A/Pacific Blue-A zobrazuje populaci mrtvých buněk bez zatížení ROS a živých buněk bez i se zatížením ROS.

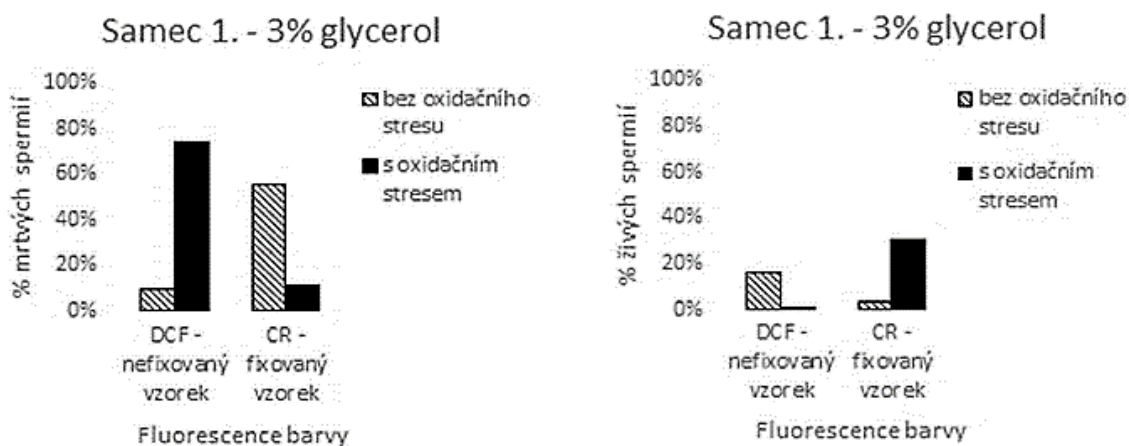
Vpravo: Cytogram APC-A/Pacific Blue-A, dle kterého není rozdělení buněk do jednotlivých kvadrantů tak jednoznačné.

Z obou cytogramů na obrázku 12. jsou patrné podobné výsledky z hlediska hodnocení viability spermií. V obou případech bylo hodnoceno 35 % mrtvých buněk s vyšší intenzitou signálu pro kanál Pacific Blue. Dle analýzy při značení H<sub>2</sub>DCFDA však bylo vyhodnoceno 46 % spermií zatížených ROS, z čehož 45 % tvořily živé spermie. Analýza po značení CellROX oproti tomu ukazuje pouze 29 % stresovaných spermií, z čehož tvoří 22 % živé spermie.

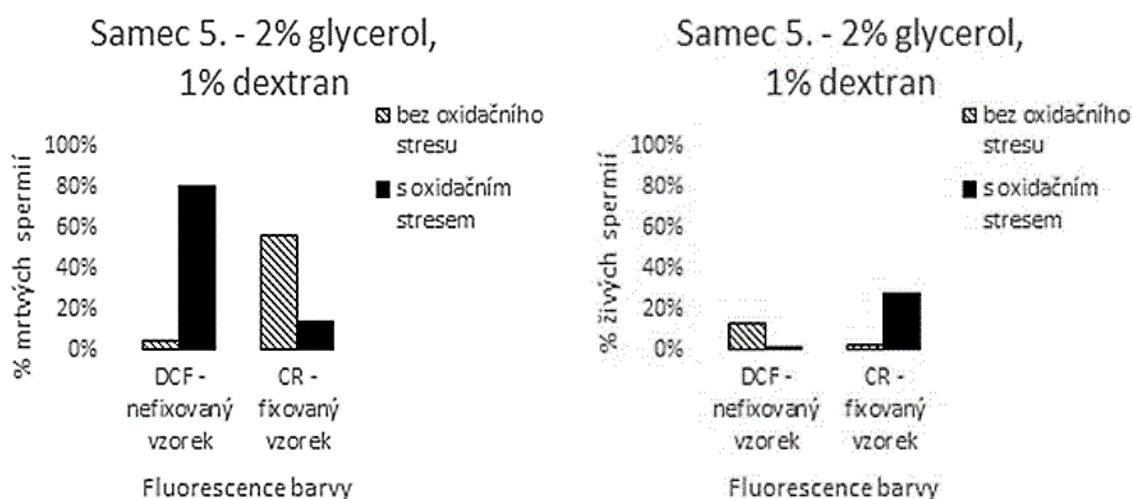
### 5.2.3 Nastavení metodiky pro kančí spermie a její aplikace na hodnocení rozdílů v modifikovaných médiích pro kryokonzervaci

V rámci nastavení metodiky byly opět nejdříve provedeny negativní i pozitivní kontroly referenčních vzorků kančích spermií s glycerolem. Vzorek negativní kontroly vždy ukazoval, že více jak 70 % hodnocených objektů ve vzorku je tvořeno jednotlivými spermii. Vzorek pozitivní kontroly, značený sondou CellROX ukázal, že 93,8 % buněk ve vzorku je tvořeno mrtvými spermii pod zátěží ROS. Z hlediska oxidační zátěže se tedy shodovala s pozitivními kontrolami na spermiih býků. Pozitivní kontrola H<sub>2</sub>DCFDA je v porovnání s výsledky býčích spermií hodnocena na obrázku 10. v kapitole 5.2.1.

Grafy hodnocení ROS a viability spermií byly zpracované na základě dat procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých kvadrantech cytogramů, získaných z průtokové cytometrie.



**Obrázek 14: Grafy hodnocení ROS a viability spermií při inkubaci se sondami H<sub>2</sub>DCFDA a CellROX Deep Red u standardního média**  
Variabilita výsledků po značení vzorků jednotlivými sondami byla hodnocena na hladině významnosti  $p < 0,05$  jako signifikantní.



**Obrázek 13: Grafy hodnocení ROS a viability spermií při inkubaci se sondami H<sub>2</sub>DCFDA a CellROX Deep Red u modifikovaného média**  
Variabilita výsledků po značení vzorků jednotlivými sondami byla hodnocena na hladině významnosti  $p < 0,05$  jako signifikantní.

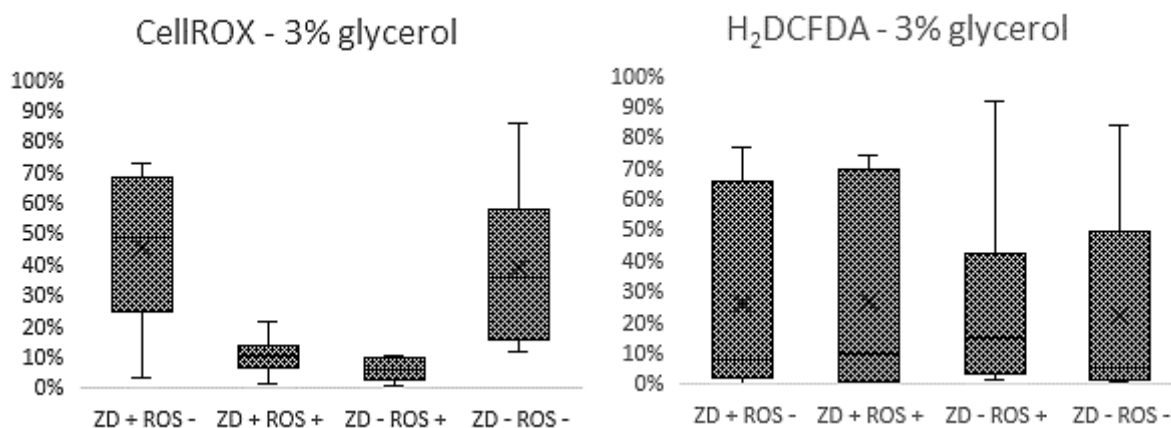
Na obrázku 13. a 14. jsou zobrazeny graficky zpracované výstupy hodnocení dvou fluorescenčních markerů, využitých v této studii pro hodnocení ROS, u referenčního a modifikovaného média. Grafy nalevo uvádí počty spermií, které emitovaly signál při označení sondou Zombie dye. Grafy napravo naopak zobrazují spermie, u nichž signál zaznamenán nebyl.

Ačkoliv se v každém z případů na obrázku 13. a 14. jednalo vždy o stejný vzorek, pouze inkubovaný s různými sondami, výsledky positivity spermií se dle využitého fluorescenčního markeru značně lišily. Příprava obou vzorků byla časově shodná, avšak vzorky značené H<sub>2</sub>DCFDA nebyly fixované. V případě, že byla porovnávána data z obou médií, značená vždy



stejným markerem, se mezi sebou v tomto případě signifikantně nelišilo ( $p < 0,05$ ) procentuální zastoupení buněk v jednotlivých kvadrantech.

Na obrázku 15. jsou zpracovány krabicové grafy variability výsledků pro hodnocení šesti kanců, jejichž inseminační dávky byly kryokonzervovány v médiu se 3% glycerolem.



**Obrázek 15: Grafy variability naměřených hodnot fluorescenční sondy CellROX a H<sub>2</sub>DCFDA (ZD – Zombie dye; + pozitivní signál; - bez signálu)**

Variabilita výsledků po značení vzorků jednotlivými sondami byla hodnocena na hladině významnosti  $p < 0,05$  jako signifikantní.

V obou případech hodnocení referenčních vzorků na obrázku 15. byla zaznamenána poměrně vysoká variabilita ve výsledcích měření viability a ROS zátěže spermii. U hodnocení buněk značených pomocí CellROX však vysoká variabilita byla patrná pouze u skupin živých a mrtvých spermii bez zátěže ROS. Měření naopak bylo poměrně přesné v případě skupin, kde byl zachycen pozitivní signál fluorescenční sondy CellROX. Maximální a minimální hodnoty se v těchto skupinách liší pouze o 20 %, a to se jedná o extrémní hodnoty v rámci naměřených dat. Směrodatné odchylky, zahrnující 95 % naměřených hodnot vzorku, však byly v tomto případě v rozsahu nižším než 10 %.

Variabilita výsledků vzorků značených H<sub>2</sub>DCFDA byla vyšší ve všech sledovaných parametrech. Rozdíl mezi maximální a minimální naměřenou hodnotou je u skupiny mrtvých spermii zatížených vysokou produkcí ROS 90 %. I ve skupinách živých a mrtvých spermii bez signálu sondy hodnotící ROS, dosahovala variabilita naměřených výsledků v případě značení H<sub>2</sub>DCFDA signifikantně vyšších hodnot než v případě značení sondou CellROX ( $p < 0,05$ ).

Variabilita výsledků vzorků značených H<sub>2</sub>DCFDA v médiu s 3% glycerolem dala vzniknout předpokladu pro výsledek matematického hodnocení analýzy rozptylu. Rozptyl hodnot v rámci hodnocení skupin vzorků byl velmi vysoký, a proto by mohlo dojít k chybnému vyhodnocení matematického testování ANOVA a vyvrácení platící nulové hypotézy.

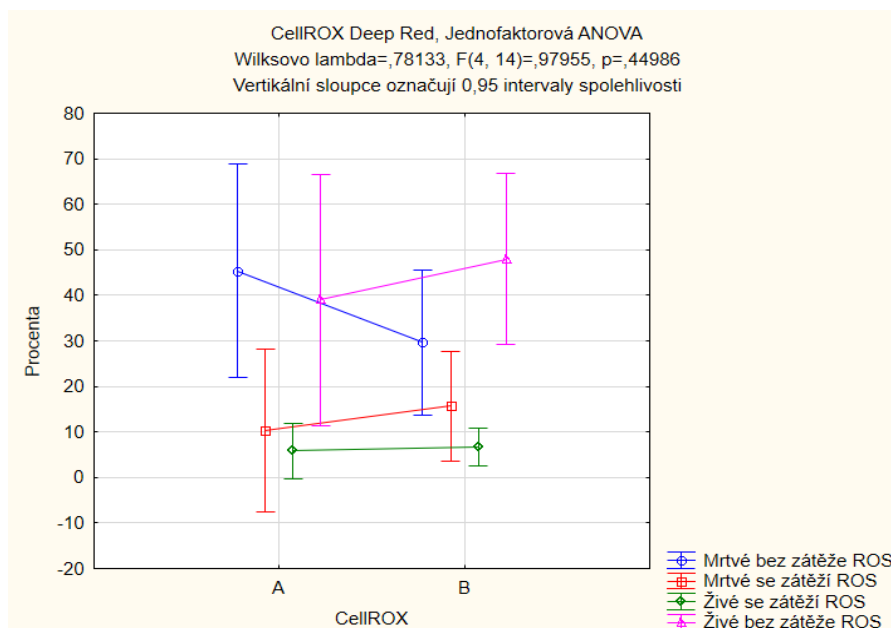
#### 5.2.4 Statistická analýza efektu kryoprotektantů

K hodnocení dat naměřených u obou fluorescenčních sond bylo využito jednofaktorové ANOVY. Na hladině významnosti 0,05 tedy byla testována nulová hypotéza říkající, že počet spermii, zastoupených v Q1, Q2, Q3 a Q4, je pro obě mrazicí média stejný. Alternativní hypotéza tvrdila, že alespoň jedna dvojice hodnot počtu spermii zastoupených ve čtyřech

kvadrantech se od sebe v obou médiích liší. Jelikož analyzovaná data pocházela ze skupin vzorků kryokonzervovaných s 3% glycerolem i s 2% glycerolem a 1% 20 kDa dextranem, bylo by k potvrzení pozitivního efektu média s přidavkem dextransu třeba vyvrátit nulovou hypotézu. Pro analýzu byl použit Wilksův test.

Tabulky vyhodnocení ANOVY jsou k dispozici v samostatné Příloze 2. Grafické vyhodnocení jednofaktorové ANOVY pro analýzu médií vzorků barvených H<sub>2</sub>DCFDA je přiloženo v samostatné příloze 3. Z vyhodnocení dat bylo dle hodnoty p ( $p < 0,046$ ) při značení sondou H<sub>2</sub>DCFDA zřejmé, že se s 5% možností chyby potvrdila alternativní hypotéza, která tvrdila, že alespoň mezi dvěma skupinami spermií v jednotlivých kvadrantech je signifikantní rozdíl v počtech spermií mezi médii. Už při vyhodnocování předchozích výsledků však bylo předpokládáno, že u ANOVY by mohla být zamítnuta platná nulová hypotéza.

Jelikož se výsledky testů pro hodnocení rozptylu pro obě sondy signifikantně lišily, bylo pro analýzu využito pouze hodnocení vzorků značených pomocí sondy CellROX. Tyto vzorky byly totiž fixované. Ve výsledcích by tedy neměla být promítnuta proměnlivost způsobená časem přípravy vzorků. Grafický výstup z hodnocení vidět na obrázku 16.



**Obrázek 16: Jednofaktorová ANOVA vzorků značených CellROX pro hodnocení pozitivní efektu dextranem modifikovaného média**

(Popis varinta: A = 3% glycerol; B = 2% glycerol a 1% dextran)

Z obrázku 16. je patrné, že i vzorky značené CellROX vykazovaly vysokou variabilitu výsledků. Jelikož p hodnota Wilksova testu vyšla 0,45, byla s 5% pravděpodobností chyby potvrzena nulová hypotéza, která nepředpokládala významné rozdíly v parametrech viability a zátěže ROS u spermií, kryokonzervovaných v různých médiích.

I přes vysokou variabilitu výsledků spermií kanců, hodnocení pomocí jednofaktorové ANOVY neprokázalo statisticky významnou závislost mezi využitím standardního a modifikovaného kryoprotektantu a parametry viability a zátěže ROS.

## 6 Diskuze

Volné kyslíkové radikály mají důležitou roli pro iniciaci a fyziologický průběh dějů kapacitace, hyperaktivace, akrosomální reakce a vazby spermií na zonu pellucidu (de Lamirande et al. 1997). Proces kryokonzervace však spermiím způsobuje značný osmotický i chemický stres, vedoucí k vysoké produkci ROS. Ta může vést v extrémních případech až k apoptóze buněk (Cai et al. 1998).

H<sub>2</sub>DCFDA byl využit v mnoha studiích, hodnotících oxidační stres a také inovovaná mrazicí média (Guthrie & Welch 2006; Martínez-Pastor et al. 2010; Kim et al. 2011). V těchto studiích byla v případě čerstvého spermatu vyhodnocena 4% pozitivita spermií pro zátěž ROS (Guthrie & Welch 2006; Kim et al. 2011). Kim et al. (2006) ve své práci také publikoval, že zátěž ROS se u kryokonzervovaných spermií po rozmrazení u živých buněk zvedla. V naší studii byla však data, získaná po označení vzorků sondou H<sub>2</sub>DCFDA, značně nekonzistentní. Hodnoty jednotlivých vzorků pro živé spermie zatížené ROS, vykazovaly až 90% rozptyl. Pro konečné zamítnutí využití H<sub>2</sub>DCFDA ke značení vzorků byl zásadní výsledek testu pozitivní kontroly, provedeného na spermiích kanců. Díky inkubaci s TBHP by měla většina buněk vykazovat pozitivitu k zátěži ROS, nicméně dle našeho výsledku bylo nad 92 % spermií ve vzorku nezatíženo oxidačním stresem. Ačkoliv tedy statistická analýza ukázala, v případě značení pomocí H<sub>2</sub>DCFDA, rozdíl ve zkoumaných hodnotách, nebyla kvůli výše popsaným důvodům brána za průkaznou.

Značnou variabilitu naměřených hodnot si můžeme vysvětlovat individualitou jedinců nebo inkubací spermií v různých mrazicích médiích (Yeste 2016). Větší přesnosti však vždy dosahovaly vzorky, značené pomocí CellROX. Tato sonda byla na spermiích poprvé využita v roce 2015 při experimentu, zkoumajícím hladiny ROS při zvýšení teploty varlat beranů (Rodrigues et al. 2015). V rámci této studie byla prokázána efektivita sondy pro měření ROS *in vivo* a *in vitro*. Z těchto důvodů byl CellROX vyhodnocen jako signifikantně lepší pro následnou analýzu inovace mrazicích médií ( $p < 0,05$ ). Další hodnocení se opíralo o data získaná ze vzorků jím značených.

Kryokonzervace spermií je již dlouho známý proces. Pojí se s ní však celá řada věcí, které musí být vyřešeny. Nejlepších výsledků dosahují po kryokonzervaci u hospodářských zvířat spermie býků, u nichž je tento způsob uchování ID nejvíce rozšířen. I přesto je však po rozmrazení poškozeno 50 % - 60 % spermií ve vzorku (Barbas & Mascarenhas 2008). Vzorky býčích spermií byly nicméně zpracovány dle zavedeného protokolu, který je využíván k přípravě kryokonzervovaných ID po celém světě (Šimoník et al. 2019).

Spermie kanců jsou díky velkému obsahu polynenasycených mastných kyselin nejnáchylnější ke změnám probíhajícím v průběhu kryokonzervace vzorků. Ačkoliv již několik desítek let probíhá výzkum metodiky kryokonzervace spermií kanců, dosud se nepodařilo tento postup optimalizovat (Yeste 2016). Proto jsou tyto ID u prasat využívány pouze sporadicky (Holt 2000).

Ve dnešní době je také kladen důraz na vylepšení kryokonzervačních médií u málo prošlechtěných druhů, které nedosahují reprodukčního potenciálu zvířat ve velkochovech (Rozkot et al. 2010; Šichtař et al. 2019). Proměnlivost výsledků v naší studii mohla být způsobena právě tím, že byly testovány vzorky spermií přeštických černostrakatých kanců.



Toto plemeno tvoří českou genovou rezervu, což znemožňuje jeho intenzivní šlechtění a může mít dopad na rozmnožovací potenciál a potažmo také na individuální kryotoleranci samců, zakódovanou v DNA jedince (Thurston et al. 2002; Rozkot et al. 2010). Oproti standardně chovaným plemenům je také možné testovat pouze malé množství samců. Studie kvality rozmrazených spermií jiných plemen kanců však také ukazují na vysokou variabilitu výsledků mezi jedinci i u různých odběrů jednoho samce (Medrano 1998; Hernandez et al. 2007).

V práci Harder (2018), která zkoumala ke kryokonzervaci relativně odolnější humánní spermie, bylo při inkubaci s dextranem dosaženo nulové hodnoty motility spermií po rozmrazení. To však pravděpodobně nesouviselo s efektem dextranu, ale zvoleného kryokonzervačního protokolu. V naší studii nedošlo po rozmrazení k úplné ztrátě pohyblivosti ve všech vzorcích spermií kanců, nicméně vzorky odebrané býkům dosahovaly při podobné zátěži ROS i srovnatelných hodnotách viability, výrazně vyšší motility. Nízké hodnoty motility kančích vzorků mohly být způsobeny mimo procesu kryokonzervace rozebíraného výše, také nízkými hladinami antioxidantů ve vzorku. V průběhu kryokonzervace se zvedá hladina peroxidů vodíku ve vzorku (Guthrie & Welch 2006). Kanci však v ejakulátu mají pouze malé množství katalázy, a ta nestačí k neutralizaci vyšších hladin peroxidu vodíku v buňce (Kim et al. 2011).

Gloria et al. (2019) ve své studii na vzorcích spermií drůbeže prokázala, že při úplné náhradě glycerolu dextranem je možné dosáhnout lepší integrity membrán buněk po rozmrazení. Také studie Viudes de Castro et al. (2021) se zabývala pozitivním efektem dextranu na králičích spermiích a dokázala zlepšenou integritu akrosomu spermií ošetřených dextranem. Nezaznamenala však zásadní změnu v motilitě spermií.

Dextran, oproti nízkomolárnímu glycerolu, nemůže penetrovat do buněk, a proto není schopen zabránit tvorbě intracelulárních krystalů v průběhu kryokonzervace. Jako nepermabilní kryoprotektant naopak tvoří vodíkové můstky s koncovými fosfáty vnější vrstvy plazmatické membrány. Jelikož má ve své struktuře hodně koncových -OH skupin, vytváří tímto způsobem ochranný obal kolem buňky. Při kombinaci permeabilního a nepermeabilního kryoprotektantu v mrazicím Ringerově roztoku tak byla zaznamenána vyšší motilita i integrita membrán spermií ve vzorku (Kundu et al. 2002).

Referenční vzorky kanců byly v naší studii kryokonzervované ve 3% glycerolu. Jedná se nejvíce využívanou koncentraci tohoto permeabilního kryoprotektantu pro získání největšího procenta přeživších spermií po rozmrazení vzorků u prošlechtěných plemen prasat (Hernandez et al. 2007). K analýze modifikovaných vzorků byl použit 20 kDa dextran, který by oproti menším molekulám neměl pronikat do buněk a negativně ovlivňovat jejich metabolismus a potažmo i motilitu a viabilitu buněk (Kundu et al. 2002; Gloria et al. 2019). Námi provedené statistické šetření na spermiích kanců však neprokázalo signifikantní rozdíly mezi referenčními vzorky a vzorky kryokonzervovanými i s 2% glycerolem a 1% 20 kDa dextranem ( $p < 0,05$ ).

Efekt na výsledky studie mohla mít mimo námi využitou koncentraci dextranu, také jeho čistota. Firma Pharmacosmos však vyrábí dextran nejvyšší čistoty, který je využíván například ke kryokonzervaci kmenových buněk (Pasha et al. 2017). Gloria et al. (2019) ve své studii tento produkt využila a potvrdila s ním pozitivní přínos dextranu v mrazicích médiích spermií krocanů.

Dalším faktorem, který mohl ovlivnit výsledky studie byl vysoký počet centrifugací, který byl využíván při zpracování vzorků. Kančí spermie byly centrifugovány již při přípravě pejet inseminačních dávek ke kryokonzervaci. Aitken & Clarkson (1988) ve své studii potvrdili negativní efekt stáčení na produkci ROS při zpracování čerstvého ejakulátu. Zpracování vzorků po jejich rozmrazení tak může dále zvyšovat koncentrace produkovaných ROS a negativní efekt na buňky ve vzorku. Využití centrifugace se však při přípravě vzorků k hodnocení nelze vyhnout.

Pro optimalizaci analýzy ROS pomocí CellROX, a také pro rozšíření metodiky na další druhy, a tím podpoření experimentální práce na paralelních i budoucích projektech, byly využity vzorky spermií býků a lidí. Celeghini et al. (2019) prokázala pomocí CellROX Deep Red pravděpodobný efekt patologické hladiny ROS spermií býků na schopnost zabřezávání samic. Býčí spermie jsou k poškození, způsobenému teplotním šokem více náchylné než spermie lidské. Ani kvalita lidských spermií však po rozmrazení nedosahuje uspokojivých hodnot (Agarwal & Said 2005). Právě vysoká produkce ROS je přitom jeden z faktorů, které mohou způsobit idiopatickou infertilitu samců (Agarwal & Deepinder 2009).

Oxidační zátěž ejakulátu lidí je nyní testována například technologií OxiSperm (Halotech), která analyzuje množství superoxidových radikálů v ejakulátu pomocí přeměny chloridu nitro blue tetrazolium (NBT) na modré krystaly nerozpustné ve vodě (Halotech 2021). CellROX Deep Red je však schopen detekovat superoxidové aniony i hydroxylové radikály přímo v jednotlivých buňkách (Celeghini et al. 2019). V porovnání s technikou OxiSperm/Halotech by tedy využití sondy CellROX zaručovalo přesnější a v přepočtu na počet hodnocených buněk také levnější analýzu.

Jelikož je k hodnocení patofyziologických procesů buněk úspěšně možné využít fixovatelný marker, mohla by se metoda hodnocení ROS pomocí fluorescenčního mikroskopu a průtokové cytometrie začít standardně využívat pro hodnocení reprodukčních vlastností různých živočišných druhů i v centrech asistované reprodukce (Celeghini et al. 2019; ThermoFisher Scientific 2020).

## 7 Závěr

V rámci této diplomové práce byly v části literární rešerše detailně představeny fyziologické i patofyziologické procesy, kterými ROS ovlivňují metabolismus spermatických buněk. Rovnováha koncentrací ROS a antioxidantů je brána za nezbytnou pro udržení homeostázy organismu, a tedy i zdravého rozmnožovacího potenciálu. Narušení této rovnováhy vnějšími i vnitřními vlivy může vést ke snížené fertilitě samce. Proto byly v práci představeny některé ze způsobů přímých i nepřímých metod pro testování koncentrace ROS. Nejefektivnějším způsobem detekce oxidační zátěže je průtoková cytometrie. Tento způsob hodnocení byl využit také v rámci experimentální části práce.

- V experimentu byla zahrnuta analýza výhod využití CellROX Deep Red oproti 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetátu (H<sub>2</sub>DCFDA). Díky možnosti fixovat sondu CellROX ve vzorku, byly vzorky hodnoceny s vyšší přesností. Vypovídající hodnota výsledků pro testování ROS tak byla signifikantně vyšší než při značení H<sub>2</sub>DCFDA. Tato metoda hodnocení oxidační zátěže buněk by mohla mít potenciál rozšířit se i do center asistované reprodukce.
- Hlavním cílem této práce bylo prokázat pozitivní efekt média obohaceného o dextran na zvýšenou viabilitu a fyziologickou produkci ROS ve spermiích. Nebyl však zjištěn signifikantní rozdíl těchto parametrů při kryokonzervaci různými médii. Nicméně se podařilo ustanovit metodiku, která bude využita v dalších experimentech současných i budoucích projektů.

## 8 Literatura

- Aitken, RJ. 2017. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction and Development* **84**(10):1039–1052.
- Aitken RJ, Baker M, O'Bryan M. 2004. Shedding light on chemiluminescence: The application of chemiluminescence in diagnostic andrology. *Journal of andrology* **25**:455-465.
- Aitken RJ, Clarskson JS. 1988. Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Defining the Efficacy of Sperm Preparation Techniques. *Journal of Andrology* **9**(6):367–376.
- Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW. 1993. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* **35**(3): 302-315.
- Aitken RJ, Fisher HM. 1997. Comparative analysis of the ability of precursors germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. *Journal of Experimental Zoology* **277**:390-400.
- Amann RP, Veeramachaneni DNR. 2007. Cryptorchidism in common eutherian mammals. *Reproduction* **133**(3):541–561.
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology* **8**(5):338-48.
- Alves MBR, et al. 2015. An Efficient Technique to Detect Sperm Reactive Oxygen Species: The CellRox Deep Red® Fluorescent Probe *Biochem Physiol* **4**:157-160.
- Agarwal A, Deepinder F. 2009. Determination of seminal oxidants (reactive oxygen species). *Infertility in the Male*. Pages 618-632 in Lipshultz L, Howards S, Niederberger C, editors. Cambridge University Press, Cambridge.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma R. 2016. Leukocytospermia Quantitation (ENDTZ) Test. *Andrological Evaluation of Male Infertility: a Laboratory Guide*. Springer International Publishing. E-book.
- Agarwal A, Gupta S, Sikka S. 2006. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **18**:325–332.
- Agarwal A, Qiu E, Sharma R. 2017. Laboratory assessment of oxidative stress in semen. *Arab journal of urology* **16**(1):77–86.
- Agarwal A, Said TM. 2005. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU International* **95**:503–507.
- Aydemir B, Onaran I, Kiziler AR, Alici B, Akyolcu MC. 2008. The influence of oxidative damage on viscosity of seminal fluid in infertile men. *Journal of andrology* **29**(1):41-46.

- Bansal AK, Bilaspuri GS. 2011. Impact of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions (e 686137) DOI:10.4061/2011/686137.
- Barbas JP, Mascarenhas RD. 2008. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* **10**(1):49-62.
- Bedford JM. 1975. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. *Handbook of Physiology*. Pages 139-162 in Hamilton DW, Greep R, editors. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bize I, Santander G, Cabello P, Driscoll D, Sharpe C. 1991. Hydrogen Peroxide is Involved in Hamster Sperm Capacitation in Vitro. *Biology of Reproduction* **44**(3):398-403.
- Bungum M, Bungum L, Giwercman A. 2011. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian Journal of Andrology* **13**(1):69-75.
- Cai J, Yang J, Jones D. 1998. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1366**(1-2):139-149.
- Calvin HI, Bedford JM. 1971. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *Journal of reproduction and fertility* **13**:65-75.
- Celeghini ECC, Alves MBR, de Arruda RP, de Rezende GM, Florez-Rodriguez SA, de Sá Filho MF. 2019 Efficiency of CellROX deep red® and CellROX orange® fluorescent probes in identifying reactive oxygen species in sperm samples from high and low fertility bulls. *Animal Biotechnology* **32**(1):77-83.
- Cross N, Morales P, Overstreet J, Hanson F. 1986. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human-sperm. *Gamete Res* **15**:213-26.
- CryoSperm™ (2020) ORIGIO, Instructions for Use: Europe/rest of world Available from: <https://coopersurgical.marketport.net> (accessed March 2020).
- Davey HM, Jones A, Shaw AD, Kell DB. 1999. Variable selection and multivariate methods for the identification of microorganisms by flow cytometry. *Cytometry* **35**(2):162-168.
- Dikalov SI, Li W, Mehranpour P, Wang SS, Zafari AM. 2007. Production of extracellular superoxide by human lymphoblast cell lines: comparison of electron spin resonance techniques and cytochrome C reduction assay. *Biochemical Pharmacology* **73**(7):972-980.
- Dymkowska D. 2016. Oxidative damage of the vascular endothelium in type 2 diabetes - the role of mitochondria and NAD(P)H oxidase. *Postepy biochemii* **62**:116-126.
- de Lamirande E, Gagnon C. 1993. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radical Biology and Medicine* **14**(2):157-166.
- de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of reproduction* **2**:48-54.
- el-Demiry MIM, Hargreave TB, Busuttil A, James K, Ritchie AW, Chisolm GD. 1985. Lymphocyte sub-populations in the male genital tract. *BJU International* **57**:769-774.

- El-Osta H, Circu ML. 2016. Mitochondrial ROS and Apoptosis. Mitochondrial Mechanisms of Degeneration and Repair in Parkinson's Disease, Springer International Publishing. E-book.
- Endtz AW. 1974. A rapid staining method for differentiating granulocytes from "germinal cells" in papanicolaou-stained semen. *Acta Cytology* **18**:2–7.
- Eskiocak S, Gozen AS, Taskiran A, Kilic AS, Eskiocak M, Gulen S. 2006. Effect of psychological stress on the L-arginine-nitric oxide pathway and semen quality. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **39**(5): 581-588.
- Evenson DP, Melamed MR. 1983. Rapid Analysis of Normal and Abnormal Cell Types in Human Semen and Testis Biopsies by Flow Cytometry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **31**:248–253.
- Evenson DP, Wixon R. 2005. Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Toxicology and Applied Pharmacology* **207**(2):532-537.
- Fatemi N et al. 2012. Effect of tertiary-butyl hydroperoxide (TBHP)-induced oxidative stress on mice sperm quality and testis histopathology. *Andrologia* **45**(4):232–239.
- Gao DY, Mazur P, Critser JK. 1997. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. Reproductive tissue banking. Academic press, San Diego.
- Gloria A, Toscani T, Robbe D, Parrillo S, De Amicis I, Contri A. 2019. Cryopreservation of turkey spermatozoa without permeant cryoprotectants. *Animal Reproduction Scientific*. (e 106218) DOI: 10.1016/j.anireprosci.2019.106218.
- Graham J. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science* **68**:239–247.
- Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, LeLannou D. 1995. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* **103**:17–20.
- Guerriero G, Trocchia S, Abdel-Gawad FK, Ciarcia G. 2014. Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation. *Frontiers in endocrinology* **5**:56-60.
- Guthrie HD, Welch GR. 2006. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science* **84**(8):2089-2100.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, London.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Halotech. 2021. Principles of the method OxiSperm. Available from: <https://www.halotechdna.com> (Accessed April 2020).

- Harder FBN. 2018. Effect of Dextran on Cryopreservation of Human Spermatozoa [MSc. Thesis]. Health and Society Malmö University, Malmö.
- Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC, Ames BN. 1998. DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:288-293.
- Henkel RR. 2011. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian journal of andrology* **13**(1):43–52.
- Hernandez M, Roca J, Gil MA, Vazquez JM, Martinez EA. 2007. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology* **67**:1436–1445.
- Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C. 2001. Tyrosine nitration in human spermatozoa: a physiological function of peroxynitrite, the reaction product of nitric oxide and superoxide. *Molecular Human Reproduction* **7**(10):913-921.
- Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* **62**(1-3):3-22.
- Hossain MS, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP, Rodriguez-Martinez H. 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian Journal of Andrology* **13**(3):406-19.
- Khosrowbeygi A, Zarghami N. 2007. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **77**(2):117-121.
- Kim S, Lee YJ, Kim YJ. 2011. Changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of liquid boar semen stored at 15 °C. *Animal Reproduction Science* **124**(1-2):118-124.
- Kundu CN, Chakrabarty J, Dutta P, Bhattacharyya D, Ghosh A, Majumder GC. 2002. Effect of dextran on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reproduction* **123**(6):907-913.
- Lançon R, de Arruda RP, Rodrigues Alves MB et al. 2017. Validation of the CellRox Deep Red® fluorescent probe to oxidative stress assessment in equine spermatozoa. *Animal Reproduction* **14**(2):437-441.
- Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Alvarez-Rodríguez M, Alvarez M, Anel L, de Paz P. 2010. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reproduction of Domestic Animals* **45**(2):67-78.
- McKinnon KM. 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocol Immunology* **120**:5.1.1-5.1.11.
- Medrano A. 1998. The importance of individual variation in boar semen cryopreservation. [Ph.D. Thesis], University of London, London.

- Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ, Agarwal A. 2004. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction* **19**(1):129–138.
- Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, Mardani M. 2005. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reproduction Biomedicine Online* **11**(2):198-205.
- Pasha R, Elmoazzen H, Pineault N. 2017. Development and testing of a stepwise thaw and dilute protocol for cryopreserved umbilical cord blood units. *Transfusion* **57**(7):1744-1754.
- Puppel K, Kapusta A, Kuczyńska B. 2014. The etiology of oxidative stress in the various species of animals, a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **95**(11):2179–2184.
- Pursel VG, Johnson LA. 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with 933 concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science* **40**:99-102.
- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* **61**:673–690.
- Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF, Scheper T. 2001. Flow cytometry in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**(3-4):350–360.
- Rodríguez-Martínez H. 2003. Laboratory Semen Assessment and Prediction of Fertility: still Utopia? *Reproduction in Domestic Animals* **38**(4):312–318.
- Rodríguez H, Ohanian C, Bustos-Obregon E. 1985. Nuclear chromatin decondensation of spermatozoa in vitro: a method for evaluating the fertilizing ability of ovine semen. *International Journal of Andrology* **8**(2):147–158.
- Rowley T. 2012. Flow Cytometry - A Survey and the Basics. *Materials and Methods* **2**:125.
- Rozeboom KJ. 2000. Evaluating boar semen quality. *Animal Science Facts: Extension Swine Husbandry*. North Carolina St. University, North Carolina.
- Rozkot M, Frydrychová S, Lustyková A, Lipenský J. 2010. Pohnutá historie a současnost přeštického černostrakatého prasete. *Náš chov* **70**(9):14 – 16.
- Rybář R, Faldíková L, Machatková M, Rubes J. 2004. Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in the Czech Republic. *Veterinary Medicine - Czech* **49**(1):1–8.
- Sabeti P, Pourmasumi S, Rahiminia T, Akyash F, Talebi AR. 2016. Etiologies of sperm oxidative stress. *International journal of reproductive biomedicine* **14**(4):231–240.
- Saleh RA, Agarwal A. 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* **23**:737–752.



- Sanocka D, Kurpisz M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive biology and endocrinology* **2**:12(1-7).
- Saravia F, Wallgrena M, Nagy S, Johannisson A, Rodriguez Martinez H. 2005. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology* **63**(5):1320-33.
- Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiyagarajan A, Agarwal A. 2010. TUNEL as a Test for Sperm DNA Damage in the Evaluation of Male Infertility. *Urology* **76**(6):1380–1386.
- Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* **82**(2):291–295.
- Šichtař J, Šimoník O, Bubeníčková F, Svobodová J, Nehasilová A. 2019. Improvement in Semen Conservation of the Indigenous Czech Endangered Old Kladruber Horse: Special Focus on the Type of Extender and Packaging System. *Journal of Equine Veterinary Science* **72**:101-107.
- Šimoník O, Šichtař J, Beran J, Maňásková-Postlerová P, Tůmová L, Doležalová M, Folková P, Stádník L, Rajmon R. 2019. Low Density Lipoprotein - important player in increasing cryoprotective efficiency of soybean lecithin-based bull semen extenders. *Animal Reproduction* **16**:267-276.
- ThermoFisher Scientific. 2020. Molecular probes for mitochondria. Available from: <https://www.thermofisher.com> (Accessed November 2020).
- Thurston LM, Siggins K, Mileham AJ, Watson PF, Holt WV. 2002. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biology of Reproduction* **66**:545-554.
- Tunc O, Tremellen K. 2009. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *Journal of assisted reproduction and genetics* **26**(9-10):537–544.
- Uysal O, Bucak MN. 2007. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Veterinaria Brno* **76**(3):383–390.
- Viudes de Castro MP, Talav'an AG, Vicente JS. 2021. Evaluation of dextran for rabbit sperm cryopreservation: Effect on frozen–thawed rabbit sperm quality variables and reproductive performance. *Animal Reproduction Science* (e106714) DOI: 10.1016/j.anireprosci.2021.106714.
- Waberski D, Riesenbeck A, Schulze M, Weitze KF, Johnson L. 2019. Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology* **137**:2-7.
- Wagner H, Cheng JW, Ko EY. 2017. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab Journal of Urology* **16**(1):35-43.
- Warnes G. 2016. Viability of cell lines. Blizard Institute of Cell and Molecular Science. Available from: <http://www.icms.qmul.ac.uk> (accessed March 2021).

- Wolff H & Anderson DJ. 1988. Evaluation of granulocyte elastase as a seminal plasma marker for leukocytospermia, Supported by the Fearing Research Laboratory Endowment and National Institutes of Health grants AI 23669 and CA42738. *Fertility and Sterility* **50**(1):129–132.
- Yeste M. 2016. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* **85**(1):47–64.
- Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel V. 1993. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: Relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biology of reproduction* **49**:89-94.
- Zhang Y, Dai M, Yuan Z. 2018. Methods for Detection of Reactive Oxygen Species. *Analytical Methods* **10**:4625-4638.
- Zorn B, Virant-Klun I, Meden-Vrtovec H. 2000. Semen granulocyte elastase: its relevance for the diagnosis and prognosis of silent genital tract inflammation. *Human Reproduction* **9**:1978–1984.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

**ANOVA** - Analysis of variance

**ATP** - Adenosintrifosfát

**cAMP** - cyklický 3',5'-adenosinmonofosfát

**CASA** - Computer Assisted Sperm Analysis

**CAT** - Kataláza

**DAPI** - 4',6-diamidin-2-fenylindol

**DNA** - Deoxyribonukleová kyselina

**ELISA** - enzyme-linked immuno sorbent assay

**FITC** - Fluorescein isothiokyanát

**FSC** - forward scatter

**GPX** - Glutathion peroxidáza

**H<sub>2</sub>DCFDA** - 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát

**ID** – inseminační dávka

**MDA** - malondialdehyd

**NADPH** - Nikotinamidadenindinukleotid

**NOS** - NO syntáza

**NOX** - NADPH oxidázový systém

**ROS** - Reactive Oxygen Species

**SCSA** - sperm chromatine structure assay

**SOD** - Superoxid dismutáza

**SSC** - side scatter

**TAČR** – Technologická agentura České republiky

**TBHP** - tert-Butyl hydroperoxid

**TUNEL** - terminal deoxynucleotidyl tranferase dUTP nick end labeling



# 10 Samostatné přílohy

## Příloha 1

### Protokol pro přípravu vzorků pro výzkum zatížení ROS a viability buněk

#### Vzorky:

1. Volný vzorek spermií naředěný PBS
2. Vzorky značené H<sub>2</sub>DCFDA byly připraveny v poměru:  
448,5 µl vzorku s PBS + 2,5 µl H<sub>2</sub>DCFDA + 49 µl Zombie UV dye
3. Vzorky značené CellROX Deep Red byly připraveny v poměru:  
450 µl vzorku s PBS + 1 µl CellROX + 49 µl Zombie UV dye

#### Zpracování vzorků:

1. Rozmrazení pejet ve vodní lázni (37 °C, 30 s) a vylití do zkumavek
2. Centrifugace 300 rcf, 5 minut (2x opakovat promytí PBS zahřátým na 37 °C)
3. Po odsání supernatantu kontrola motility a koncentrace spermií pomocí CASA
4. Naředění vzorků zahřátým PBS do 500 µl

#### Značení sondami Cellrox, H<sub>2</sub>DCFDA:

7. Zahřání barviva na pokojovou teplotu a jeho zvortexování
8. Značení vzorků

450 µl vzorku s PBS + 1 µl CellROX + 49 µl Zombie UV dye  
448,5 µl vzorku s PBS + 2,5 µl H<sub>2</sub>DCFDA + 49 µl Zombie UV dye

9. Inkubace vzorků v pokojové teplotě ve tmě po dobu 30 minut
10. Centrifugace 300 rcf, 5 minut, doředění PbS do 500 µl (opakujeme 2x)
11. Vzorky značené H<sub>2</sub>DCFDA jsou takto připravené k analýze

#### Fixace vzorků značených CellROX:

12. Odsání supernatantu po centrifugaci a přidání 200 µl 2% paraformaldehydu zahřátého na pokojovou teplotu
13. Inkubace vzorků v pokojové teplotě a ve tmě po dobu 30 minut
14. Centrifugace 300 rcf, 5 minut, odsání supernatantu a naředění PBS do 500 µl (opakování 2x)
15. Vzorky značené CellROX jsou takto připravené k analýze

## Příloha 2

### Tabulky výsledků jednofaktorové ANOVY

**Tabulka 1: Wilksův test pro hodnocení středních hodnot proměnných při barvení H<sub>2</sub>DCFDA**

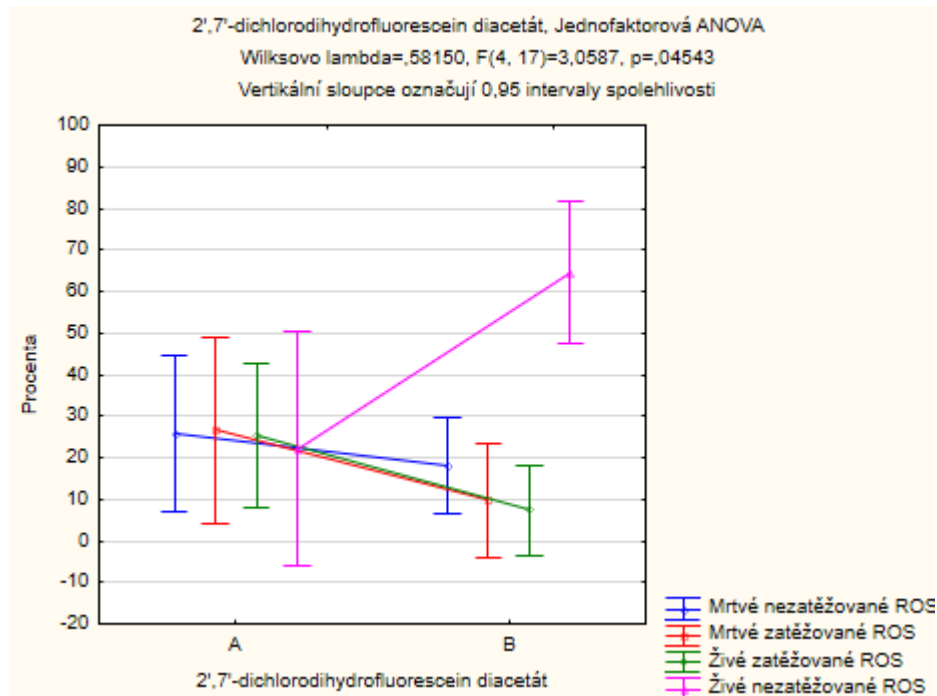
Vícerozměrné testy významnosti (H <sub>2</sub> DCFDA) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy						
Efekt	Test	Hodnota	F	Efekt SV	Chyba SV	p
Abs. člen	Wilksův	0,00004	106337,9	4	17	0
Ředidlo-varianta	Wilksův	0,581792	3,1	4	17	0,045603

**Tabulka 2: Wilksův test pro hodnocení středních hodnot proměnných při barvení CellROX**

Vícerozměrné testy významnosti (CellROX) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy						
Efekt	Test	Hodnota	F	Efekt SV	Chyba SV	p
Abs. člen	Wilksův	0,000016	214672,5	4	14	0
Ředidlo-varianta	Wilksův	0,781332	1	4	14	0,449869

### Příloha 3

#### Výsledek hodnocení jednofaktorové ANOVY vzorků inkubovaných s různými médii při barvení H<sub>2</sub>DCFDA



**Obrázek 1: Jednofaktorová ANOVA vzorků značených H<sub>2</sub>DCFDA pro hodnocení pozitivní efektu dextranskem modifikovaného média**  
(Popis varinta: A = 3% glycerol; B = 2% glycerol a 1% dextran)