

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Predikce fertilizační schopnosti inseminačních dávek
malých přežvýkavců pomocí CASA a jiných laboratorních
in vitro analýz**

Bakalářská práce

Hana Riedlingová

Chov hospodářských zvířat

Ing. Filipp Georgijevič Savvulidi, Ph.D.

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 20. dubna 2023

Poděkování

Velké poděkování si zaslouží vedoucí mé bakalářské práce pan Ing. Filipp Georgijevič Savvulidi, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost v průběhu zpracování této práce. Děkuji též své rodině za podporu během studia. Vážím si možnosti studijního pobytu na Wageningen University & Research v Nizozemsku, který mi dodal inspiraci.

Predikce fertilizační schopnosti inseminačních dávek malých přežvýkavců pomocí CASA a jiných laboratorních *in vitro* analýz

Souhrn

Tato bakalářská práce shrnula běžně používané laboratorní *in vitro* analýzy pro předpověď fertilizační schopnosti inseminačních dávek ovcí a koz. Pro uvedení do problematiky byly definovány pojmy umělá inseminace (AI), ejakulát, jeho složení a odběr, proces kapacitace a fertilizace. Zmíněno bylo též zpracování ejakulátu, které je zásadní pro správnou výrobu inseminačních dávek (ID) a může značně ovlivnit jejich kvalitu a oplozovací schopnost. Dále se práce zabývala proteomikou spermií, která přímo souvisí se správným fungováním spermií.

Pozornost byla především věnována samotnému hodnocení inseminačních dávek v laboratoři před a po zmrazení v tekutém dusíku. V práci byly představeny specifické vlastnosti spermií i přístrojové metody, jako je CASA a průtoková cytometrie. Byly diskutovány principy fungování a výhody a nevýhody těchto metod. Přístroj CASA analyzuje pohyblivost spermií, která vysoce koreluje s plodností spermatu. Dalším způsobem objektivního hodnocení vzorků spermií je průtoková cytometrie analyzující vlastnosti, které mohou souviset s polní plodností. Oproti polním testům (*in vivo*) jsou laboratorní analýzy (*in vitro*) ekonomicky i časově výhodnější. V posledních letech proto dochází k jejich zdokonalení a častějšímu využívání.

Kvalitní inseminační dávky jsou předpokladem pro dosažení požadované plodnosti. Výběr nejkvalitnějších vzorků již v laboratoři by zlepšil výslednou plodnost a zefektivnil celý proces.

Samotná otázka výběru laboratorní *in vitro* analýzy, která by nejvíce korelovala s testy *in vivo*, však zůstává neobjasněna. Výsledky zkoumaných studií naznačují, že výběr jediné laboratorní metody pro stanovení fertilizační schopnosti ID je problematický a málo spolehlivý. Hodnocení více parametrů a kombinace laboratorních metod může přinést přesnější výsledek. Studie naznačují, že pohyblivost a životaschopnost jsou vlastnosti, které vykazují nejsilnější korelaci s oplozovací schopností spermií. Měření pomocí přístroje CASA umožňuje analýzu více parametrů pohyblivosti, zatímco průtoková cytometrie zachycuje více dalších vlastností spermií. Tyto metody jsou považovány za nejlepší dostupné nástroje pro předpověď oplozovací schopnosti inseminačních dávek. Pro dosažení uspokojujících výsledků v budoucnu je však nutné jejich zdokonalení a lepší pochopení související problematiky.

Klíčová slova: inseminace, ID beranů, ID kozlů, průtoková cytometrie, CASA, proteomika, přežitelnost

Prediction of the fertilizing capacity of small ruminants insemination doses by means of CASA and other laboratory-based *in vitro* assays

Summary

This bachelor thesis reviewed commonly used laboratory *in vitro* assays for the prediction of fertilizing ability of insemination doses in sheep and goats. The terms artificial insemination (AI), ejaculate, its composition and collection, and the process of capacitation and fertilization were defined to introduce the subject. The work also focused on the processing of the ejaculate, which is essential for the correct production of insemination doses (ID) and can significantly influence their quality and fertilization capacity. Furthermore, the thesis dealt with sperm proteomics, which is directly related to the proper functioning of spermatozoa.

The review mainly focused on the actual evaluation of insemination doses in the laboratory before and after freezing in liquid nitrogen. It introduced the specific properties of spermatozoa as well as instrumental methods used for their analysis, such as CASA and flow cytometry. The principles of operation and the advantages and disadvantages of these methods were discussed. CASA instrument analyses sperm motility, which highly correlates with sperm fertility. Another way of objectively evaluating semen samples is flow cytometry which analyses sperm characteristics that may be related to field fertility. Compared to field tests (*in vivo*), laboratory analyses (*in vitro*) are more economical and time-efficient. They have therefore been improved and increasingly used in recent years.

Quality insemination doses are a prerequisite for achieving the desired fertility. Selecting the best quality samples already in the laboratory would improve the resulting fertility and make the whole process more efficient.

However, the actual question of the choice of the laboratory *in vitro* assay that correlates most closely with *in vivo* tests remains unresolved. Results of the reviewed studies indicate that selecting a single laboratory method to determine the fertilizing capacity of ID is problematic and unreliable. Assessing multiple parameters and combining laboratory methods can bring a more accurate result. The studies suggest that motility and viability are the characteristics that show the strongest correlation with sperm fertilization capacity. CASA instrument enables the analysis of multiple motility parameters, while flow cytometry captures multiple other sperm properties. These methods are considered the best available instruments for predicting the fertilizing ability of insemination doses. However, their improvement and a better understanding of the issues involved are necessary to achieve satisfactory results in the future.

Keywords: insemination, ram ID, goat ID, flow cytometry, CASA, proteomics, survivability

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Umělá inseminace	10
3.1.1 Malí přežvýkavci	10
3.1.2 Metody umělé inseminace	11
3.2 Složení ejakulátu	12
3.2.1 Ejakulát	12
3.2.2 Spermie	13
3.2.3 Semenná plazma	14
3.3 Kapacitace	15
3.4 Fertilizace	15
3.5 Metody odběru ejakulátu	16
3.5.1 Umělá vagína	16
3.5.2 Elektroejakulace.....	17
3.5.3 Manipulace s odebraným ejakulátem	17
3.6 In vitro vyhodnocení ejakulátu	18
3.6.1 Koncentrace	19
3.6.2 Progresivní motilita spermií.....	19
3.6.3 Hromadný vířivý pohyb.....	20
3.7 Zpracování ejakulátu	21
3.7.1 Ředění ejakulátu.....	21
3.7.2 Mrazení spermatu.....	22
3.7.3 Rozmrazování spermatu.....	24
3.8 Hodnocení rozmrazeného spermatu	25
3.9 Objektivní hodnocení pohyblivosti spermií	25
3.9.1 CASA	25
3.9.2 Parametry	26
3.9.3 Limity.....	27
3.9.4 Budoucnost	28
3.10 Cytometrie	29
3.10.1 Průtoková cytometrie.....	29
3.10.2 Zobrazovací cytometrie	34
3.10.3 Limity.....	34
3.10.4 Budoucnost	34
3.11 Morfologie spermií	35
3.12 Morfometrické vyšetření spermatu	37
3.12.1 CASMA	37
3.12.2 CASMA-F.....	37
3.13 Proteomika	38
3.14 Transkriptomika spermií	39
4 Závěr	41
5 Literatura	42

1 Úvod

Reprodukční biotechnologie jsou důležitým nástrojem pro genetické zlepšování populace, protože umožňují zvýšit genovou frekvenci jedinců s lepším genotypem. Mezi nejznámější reprodukční biotechnologie patří umělá inseminace. Z důvodu jejího širokého využívání dochází ke snížení genetické variability v populaci kvůli nízkému počtu potřebných samců, možné šíření genetických defektů a chorob a zvýšení koeficientu příbuzenské plemenitby (Faigl et al. 2012). Obtížná může být také identifikace říje (Bergstein-Galan et al. 2017). Přesto tato metoda asistované reprodukce přináší chovatelům mnoho výhod. Díky využití technik indukce a synchronizace říje chovatel zná předpokládaný termín porodu u svých samic a může tak racionálně rozvrhnout pracovní sílu a zkrátit období mezi porody. Navíc se zabráňuje přenosu nemocí, protože zdravotní stav samců využívaných pro umělou inseminaci je přísně kontrolován.

Pro dosažení požadované plodnosti je nezbytný kvalitní ejakulát a z něj zpracované inseminační dávky. Testování plodnosti samců pomocí páření nebo umělé reprodukce (*in vivo*) je nákladné a časově náročné a umožňuje testovat pouze omezený počet samců. Laboratorní metody netrpí těmito nevýhodami a k testování různých aspektů kvality spermatu a inseminačních dávek bylo navrženo několik metod, z nichž některé byly korelovány s polní plodností (Larsson & Rodríguez-Martínez 2000).

Predikce fertilizační schopnosti inseminačních dávek je zásadní pro zajištění přijatelné plodnosti oplozených samic. Z tohoto důvodu byla v posledních letech provedena řada studií s cílem vyvinout metodu, která dokáže nejlépe předpovědět oplozovací schopnost inseminačních dávek.

Se zvyšováním světové populace výrazně roste poptávka po ovčích a kozích produktech. Tito malí přežvýkavci se snadno chovají, vyžadují relativně malé počáteční investice a mají krátký generační interval, což zemědělcům přináší rychlou návratnost investic. V době nedostatku zboží a surovin mohou ovce a kozy poskytovat vysoce kvalitní živočišné produkty, jako je mléko, maso a vlna, a vytvářet tak velký potenciál pro zemědělce a průmyslová odvětví (González-Marín et al. 2021). Proto je poslední dobou věnována čím dál větší pozornost reprodukčním technologiím u malých přežvýkavců. K úspěšné umělé inseminaci jsou nezbytné objektivní laboratorní analýzy spermatu, které budou schopny předpovědět oplozovací schopnost inseminačních dávek.

Metoda hodnocení inseminačních dávek, která by vysoce (ideálně úplně) korelovala s polní plodností, by zefektivnila celý proces umělé inseminace, z důvodu využití pouze vysoce kvalitních ID. Fertilizační schopnost spermií však nezávisí pouze na jedné vlastnosti a významnou roli hraje mnoho různých faktorů, včetně samotné samice.

2 Cíl práce

Kvalita inseminačních dávek (ID) používaných v umělé inseminaci malých přežvýkavců hraje klíčovou roli pro její celkovou úspěšnost. S pojmem „kvalita inseminačních dávek“ těsně souvisí jejich fertilizační schopnost. Dnes jsou k dispozici desítky laboratorních *in vitro* analýz (computer-assisted semen analysis – CASA a jiné), z nichž každý vyhodnocuje jen některý dílčí ukazatel kvality ID. Obrovskou výhodou je, že *in vitro* analýzy jsou mnohem levnější a rychlejší ve srovnání s testy *in vivo* (polní testy). Vzhledem k extrémně složité biologické podstatě procesu oplodnění však žádná z laboratorních *in vitro* analýz není schopna bezpečně předpovědět fertilizační schopnost inseminační dávky. Současné použití více laboratorních *in vitro* analýz může zlepšit předpověď. Cílem této práce proto bylo podat přehled laboratorních *in vitro* analýz za účelem výběru těch, které nejvíce souvisí s fertilizační schopností ID beranů a kozlů.

3 Literární rešerše

3.1 Umělá inseminace

Umělá inseminace (AI) je proces, při kterém se spermie ručně vkládají do reprodukčního traktu samice. Tento postup je považován za nejstarší biotechnologii používanou v chovu zvířat a za jednu z účinných strategií genetického zlepšování a zvyšování reprodukční výkonnosti hospodářských zvířat (Morotti et al. 2016).

Použití umělé inseminace bylo původně zavedeno z hygienických důvodů, aby se zabránilo šíření pohlavních a nepohlavních chorob. Chovatelé rychle shledali výhodu také v rychlém zavedení cenných genů do populace s cílem zlepšení produkce. Po dostupnosti kryokonzervovaného spermatu byly ekonomické výhody poskytované vyšší mírou plodnosti a zrychleným genetickým pokrokem ještě výraznější. Snížením počtu spermií v inseminační dávce bylo možné zvýšit počet inseminací a genetická hodnota potomků se enormně zvýšila. Tím došlo k zefektivnění šlechtitelských programů. Umělá inseminace se nejvíce využívá u mléčného skotu (Faigl et al. 2012).

Salamon & Maxwell (1995) konstatují, že konzervace spermatu zajímá chovatele hospodářských zvířat od doby, kdy se začalo uvažovat o umělé inseminaci (AI). První pokusy o umělou inseminaci zahrnovaly pouze krátké časové prodlevy mezi odběrem spermatu a jeho přenosem do příjemkyní, protože spermie mají mimo reprodukční trakt při okolních teplotách pouze omezenou dobu přežití. Rozsáhlé programy umělé inseminace hospodářských zvířat ve 20. století vyžadovaly uchování spermií v umělých podmínkách po delší dobu. Toho bylo možné dosáhnout metodami, které snižovaly nebo zastavily metabolismus spermií, a tím prodloužily jejich oplozovací schopnost.

3.1.1 Malí přežvýkavci

V Jižní Americe a Austrálii je umělá inseminace široce rozšířená i v chovech malých přežvýkavců (ovce a kozy). Na rozdíl od Severní Ameriky a západní Evropy, kde se umělá inseminace u těchto druhů využívá výrazně méně kvůli vysokým nákladům na indukci a synchronizaci říje, manipulaci a inseminaci ovcí a koz na rozdíl od přirozeného způsobu plemenitby. Umělá inseminace však pro chovatele přináší mnoho výhod. Díky využití technik indukce a synchronizace říje chovatel zná předpokládaný termín porodů u svých samic. Navíc se zabraňuje přenosu nemocí, protože zdravotní stav samců využívaných pro umělou inseminaci je přísně kontrolován. Přísná selekce a nízký počet požadovaných samců pro umělou inseminaci zapříčinilo snížení genetické variability, možné šíření genetických defektů a chorob a zvýšení koeficientu příbuzenské plemenitby (Faigl et al. 2012).

Pro umělou inseminace malých přežvýkavců se běžně využívá čerstvého spermatu vzhledem k nízké plodnosti, které se obvykle dosahuje po použití zmrazeného spermatu (Faigl et al. 2012). Kryokonzervace spermatu je však důležitým nástrojem pro zušlechťování či zachování plemen různých druhů, včetně malých přežvýkavců. Proto je snahou optimalizovat postupy kryokonzervace (Jiménez-Rabadán et al. 2016).

Baldassarre (2016) uvádí, že čerstvé sperma je upřednostňovanou metodou zpracování, pokud je ve stádě přítomen samec, a to zejména v období plemenitby, kdy je produkce a kvalita

spermatu na vrcholu. Pokud má být ejakulát použit okamžitě a u většího množství samic, lze provést inseminaci čistým spermatem. Baldassarre (2016) dále popisuje, že pokud je třeba sperma použít u několika samic a/nebo interval mezi odběrem a inseminací bude delší než 1 hodina, mělo by být naředěno pomocí izotonického a pufovaného ředidla (např. komerční médium pro výplach embryí, médium s puforem HEPES 199). Chlazené sperma je strategií volby za okolností, kdy je konkrétní samec sdílen s chovateli nacházejícími se v relativně blízkém okolí nebo je jim sperma prodáváno. V takových případech bude inseminátor cestovat z jedné farmy na druhou, přičemž sperma bude skladováno při teplotě okolo 4 °C, což umožňuje jeho použití do 24 hodin od odběru při zachování vysoké plodnosti. K uchování spermatu během chlazení byla úspěšně použita různá ředidla, od sterilizovaného (UHT) 2% tučného mléka až po komerční ředidla (např. INRA96, IMV, Francie). Nakonec je zmrazené sperma upřednostňovanou volbou v případech, kdy je požadováno dlouhodobé uchování (např. pro uvádění samčího spermatu na trh, rozdílné využití spermatu v jednotlivých sezónách a zajištění uchování genetiky v případě úhynu zvířete). Silva & Gadella (2006) varují, že kryokonzervace může způsobit rozsáhlé poškození integrity plazmatické membrány spermií a přivodit významné ztráty plodnosti stáda, protože tento parametr přímo souvisí s procesem oplození.

Problém, který se pojí s používáním umělé inseminace, je uchování spermatu. S rozvojem AI ve 20. století bylo nutné přepravovat sperma z místa odběru na místo, kde bylo sperma využito. Mimo jiné bylo zapotřebí pokrýt velké množství samic během delšího časového období nebo v různých ročních podmínkách. To vše vyžadovalo uchování spermatu v umělých podmínkách (Maxwell & Salamon 1993). Konkrétně se jedná o skladování semene v tekutém (nezmrazeném) stavu, za použití snížených teplot nebo jiných prostředků ke snížení metabolismu spermií, a uchování ve zmrazeném stavu při teplotě pod bodem mrazu (Maxwell & Salamon 1993).

3.1.2 Metody umělé inseminace

Metody umělé inseminace u malých přežvýkavců se liší v porovnání s metodami využívanými u skotu. Důvodem jsou anatomické rozdíly mezi těmito druhy. Vzhledem k malým rozměrům ovcí a koz není možné provést rektální palpaci k upevnění děložního hrdla pro aplikátor spermatu nebo průchod Foleyho katétru do dělohy (Bergstein-Galan et al. 2017). Dle Baldassarre (2016) obecně platí, že způsob uložení spermatu určuje preferovaná metoda inseminace. Lze konstatovat, že čím je sperma poškozenější, tím hlouběji je třeba sperma uložit, aby bylo dosaženo přijatelné míry oplození. Hluboká vaginální inseminace je většinou vyhrazena pro čerstvé sperma, zatímco intracervikální inseminace se používá pro chlazené a zmrazené sperma. Pro dosažení vysoké míry zabřeznutí (> 70 %) u zmrazeného spermatu je však nutné nitroděložní (intrauterinní) uložení spermatu. U ovcí je účinná intrauterinní inseminace možná pouze pomocí laparoskopie. Laparoskopická intrauterinní inseminace byla poprvé popsána v 80. letech 20. století v Austrálii (Killen & Caffery 1982). Tato metoda je účinná, ale nákladná, časově náročná, vyžaduje technickou zdatnost a anestezii a je omezen počet použití u dané samice (Evans & Maxwell 1987). Tento postup také vyvolává obavy o welfare zvířat, která jsou inseminována pomocí chirurgické intrauterinní inseminace (Banner 1995; King et al. 2004).

Shiple et al. (2007) popisuje, že ovce mají složitý kanál děložního hrdla, který je přibližně 7 cm dlouhý s řadou 6 až 8 dozadu obrácených kanálků, které znesnadňují až znemožňují transcervikální inseminaci, protože s děložním hrdlem nelze manipulovat *per rectum* jako u krávy. Použití čerstvého spermatu, vaginální a cervikální depozice může vést k přijatelné míře zabřeznutí, pokud je použita vhodná dávka spermatu.

Lepších výsledků v zabřezávání může být dosaženo laparoskopickou intrauterinní nebo transcervikální inseminací, čímž se předejde problému s transportem spermií přes děložní hrdlo a možné stárnutí spermií v děložním traktu samice, dojde k vyšší šanci oplodnění vajíček a ke snížení embryonálních ztrát (Maxwell & Salamon 1993).

Používání spermatu tříděného podle pohlaví při umělé reprodukci se již dlouho propaguje jako žádoucí nástroj ke zvýšení reprodukční účinnosti, zejména v mléčném průmyslu, kde samci mají jen malou nebo žádnou obchodní hodnotu. Třídění podle pohlaví bylo úspěšně zaznamenáno u jiných přežvýkavců (skotu, ovcí a jelenovitých), ale zatím ne u koz. Očekává se však, že tuto technologii bude možné stejně efektivně provádět i u spermatu koz, protože rozdíl v hmotnosti DNA X a Y je u nich ve stejném rozmezí (3-4 %), jak uvádí Baldassarre (2016). Pravděpodobně nejnáročnější překážkou pro využití sexovaného spermatu u ovcí a koz je nalezení reprodukčního centra, které by nabízelo tuto službu u malých přežvýkavců, protože většina z nich pracuje nepřetržitě s tříděním spermatu skotu podle pohlaví (Baldassarre 2016).

3.2 Složení ejakulátu

3.2.1 Ejakulát

Bearden et al. (2004) charakterizují ejakulát jako výměšek pohlavních žláz samce obsahující spermatické buňky a tekutinu z přídatných pohlavních žláz. Bearden et al. (2004) také uvádí, že objem ejakulátu berana se pohybuje v rozmezí od 0,75 do 1,2 ml o motilitě 60 až 80 % při koncentraci přibližně 2 miliardy spermií/ml. Očekává se, že přibližně 60-70 % spermatických buněk ve spermatu vykazuje progresivní motilitu s průměrnou rychlostí 6 mm/minuta. Ve vysoce kvalitním spermatu má 80-90 % spermatických buněk normální morfologii. Koncentrace, motilita a morfologie jsou důležitá kritéria v hodnocení spermatu před použitím v umělé inseminaci (Amiridis & Cseh 2012).

Ax et al. (2000a) dodávají, že beraní sperma je mléčně bílé nebo světle krémové barvy. Růžové zbarvení indikuje přítomnost krve, pravděpodobně v důsledku zranění, a je proto nežádoucí. Kontaminaci nebo infekci reprodukčního traktu berana značí šedé a hnědé zbarvení. Při použití elektroejakulátoru k odběru spermatu mohou berani močit a tím zhoršit kvalitu odběru. Takto poškozený ejakulát se vyznačuje silným zápachem, žlutou barvou a zředěnou koncentrací. Kontaminované vzorky je třeba zlikvidovat. Použitá metoda odběru přímo ovlivňuje objem spermatu. Větších objemů je dosahováno elektroejakulací ve srovnání s odběry do umělé vagíny (AV). Objem ejakulátu je také ovlivněn věkem a zdravotním stavem konkrétního samce, ročním obdobím, dovednostmi sběrače spermatu a frekvencí odběru. Objem spermatu se pohybuje od 0,5 do 2,0 ml u dospělých zvířat a 0,5-0,7 ml u mladých beranů.

Sperma kozlů je šedavě bílé až žluté a jeho barva se liší více než u spermatu beranů. Varianty barev jsou pozorovány i mezi jednotlivými samci a mezi ejakuláty téhož samce. Objem ejakulátu je 1,0 ml s rozmezím od 0,5 do 1,2 ml (Ax et al. 2000).

Hodnota koncentrace spermatu se liší na základě plemene, věku, krmení a sezóny, proto se údaje v různých publikacích liší. Field & Taylor (2008) uvádí koncentraci spermií v ejakulátu berana v rozmezí od $2,0 \times 10^9$ do $3,0 \times 10^9$ spermií/ml, zatímco dle Ax et al. (2000a) beraní ejakulát obsahuje $3,5 \times 10^9$ až $6,0 \times 10^9$ spermií/ml. Koncentrace spermií kozlů je $2,0 \times 10^9$ až $3,5 \times 10^9$ spermií/ml (Field & Taylor 2008). Jiná práce (Ax et al. 2000a) uvádí u kozlů rozmezí od $2,5 \times 10^9$ do $5,0 \times 10^9$ spermií/ml.

Ejakulát malých přežvýkavců se vyznačuje malým objemem a vysokou koncentrací spermií a celkový počet spermií potřebných na inseminační dávku je u ovcí a koz vyšší než například u skotu (Sullivan 1970; Maxwell & Evans 1987; Shamsuddin et al. 2001). Maxwell & Evans (1987) také uvádí, že počet spermií potřebných pro umělou inseminaci závisí mimo jiné na místě zavedení spermatu do pohlavního ústrojí samice (vaginální, cervikální nebo intrauterinní) a typu použitého spermatu (čerstvé, chlazené nebo zmrazené). Čím blíže je sperma v místě uložení k místu oplodnění, tím nižší je objem spermatu potřebný pro AI. Kromě toho musí být celkový počet pohyblivých spermií obvykle větší při použití zmrazeného spermatu ve srovnání s chlazeným spermatem (Macías et al. 2020).

3.2.2 Spermie

Spermie (spermatické buňky) jsou samčí gamety nacházející se v ejakulátu samců. Tato buněčná suspenze obsahuje kromě spermií také sekrety z přídatných pohlavních žláz samčího pohlavního traktu. Tekutá část této suspenze se nazývá semenná plazma. Spermie jsou tvořeny v semenotvorných kanálcích varlat, kde se nachází řady buněk v různém stádiu vývoje, od zárodečných buněk po samčí gamety (Garner & Hafez 2000).

Plně vyvinutá spermatická buňka se dělí na hlavičku, střední část a bičík obsahující aparát nezbytný pro motilitu. Spermatická buňka přežvýkavců dosahuje délky 60-70 μ . Hlavička je zploštělá, okolo 4 μ široká a 0,5 μ silná, dlouhá 8-10 μ (Bearden et al. 2004). Celá spermatická buňka je obklopena plazmatickou membránou (plazmalemou). Jádro se nachází uvnitř hlavičky a u malých přežvýkavců je zploštělé. Přední část hlavičky obklopuje akrozom, což je oblast tvořící čepičku nad půlkou až třemi čtvrtinami plochy hlavičky spermie a vzniká z akrozomálních granul a vezikul mladé spermatidy (Nicander & Bane 1966). Bičík je rozdělen na střední, hlavní a koncovou část (Garner & Hafez 2000).

Bearden et al. (2004) zdůrazňují, že mezi důležité součásti hlavičky patří jádro obsahující genetickou informaci, postnukleární čepička pokrývající zadní část jádra a akrozom. Akrozom obsahuje enzymy potřebné pro průnik do *corona radiata* a *zona pellucida*. Nepoškozený akrozom je zásadní pro úspěšné oplození vajíčka. Během stárnutí spermatické buňky se akrozom postupně uvolňuje od hlavičky.

Místo, kde se bičík připojuje k hlavičce, se nazývá implantační oblast a obsahuje proximální centriolu. Během procesu fertilizace bývá hlavička a bičík spermie v tomto úseku rozdělena. Podobné oddělení je někdy vidět u tepelně poškozeného spermatu. Střední, zesílená část bičíku je lokalizována těsně za proximální centriolou. Tato část zahrnuje mitochondriální pouzdro obsahující enzymy pro přeměnu fruktózy a dalších energetických substrátů na vysokoenergetické sloučeniny, které může spermie využít. Hlavní a koncová část bičíku se liší tím, že koncová část neobsahuje ochranný plášť. Hlavním rysem bičíku je axiální vlákno. Axiální vlákno je svazek drobných fibril, který začíná u proximálního centriolu a prochází

celým bičíkem. Střední pár malých filament je obklopen kruhem devíti párů malých fibril. Devět větších fibril obklopuje kruh devíti párů malých fibril přes velkou část délky bičíku. Kontrakce těchto fibril způsobují kmitání bičíku, které pohání spermie dopředu (Bearden et al. 2004).

Graham & Mocé (2005) vysvětlují, že složitost spermií je částečně dána tím, že každá spermie je vícekomorová buňka, která musí mít mnoho různých vlastností, aby byla schopna oplodnit oocyt (vejíčko). Každá spermie musí mít: pohyblivost; aktivní mitochondrie, které dodávají energii nezbytnou pro pohyblivost; neporušené akrozomální membrány, které jsou schopny procházet kapacitními změnami, a tím umožnit akrozomální reakci ve správný okamžik; receptory, které umožňují buňce navázat se na *zona pellucida* a na *oolemmu* (obal oocyty); plazmatické membrány, které umožňují splynutí s *oolemmou* a jádro, které je schopné správné dekonkondenzace, jaderné reorganizace a genetického výkonu pro udržení zygotického a embryonálního vývoje.

3.2.3 Semenná plazma

Tekutá součást spermatu se nazývá semenná plazma. Nejvíce se na její tvorbě podílejí přídatné pohlavní žlázy, malé množství tekutiny je součástí koncentráту spermií, který pochází z nadvarlat a chámovodů. Semenná plazma slouží jako pufrovací živné médium, které pozastavuje a udržuje plodnost spermií. Obsahuje proteiny, anorganické ionty, pufrovací látky, energetické substráty a další organické komponenty. Sodík a chlor jsou hlavními anorganickými ionty v semenné plazmě. Anorganické látky spolu s organickými látkami pomáhají udržet stálý osmotický tlak, který je optimální pro přežití spermií (Bearden et al. 2004).

Kromě anorganických iontů se v semenné plazmě nacházejí organické ionty, které slouží jako pufrovací činidla. Hlavním organickým iontem je hydrogenuhličitan, který chrání sperma před změnami pH. Protože se pufry v semenné plazmě nevyskytují v dostatečném množství, aby zabránily snižování pH při skladování spermatu, musí být přidána kvalitní ředidla zajišťující dostatečnou pufrovací kapacitu pro dlouhodobé skladování (Bearden et al. 2004). Největší zastoupení ve spermatu dle hmotnosti tvoří bílkoviny, a právě ty mají majoritní vliv na funkci spermií (Evans & Maxwell 1987).

Bearden et al. (2004) uvádí, že semenná plazma obsahuje několik organických sloučenin, které slouží primárně jako energetické substráty pro spermie. Mezi hlavní patří fruktóza, sorbitol a glycerylfosforylcholin (GPC). Jsou jedinečné v tom, že se jinde v těle nenacházejí v podstatném množství. Fruktózu mohou spermie využít jako energetický substrát za anaerobních podmínek skladování a aerobních podmínek vyskytujících se v samičím pohlavním traktu. Sorbitol a GPC jsou využitelné pouze za aerobních podmínek. Vedlejší produkt anaerobního metabolismu fruktózy, kyselina mléčná, se hromadí ve skladovaném spermatu a teoreticky může být použit jako energetický substrát, pokud je umístěn v aerobních podmínkách. Ve spermatu býků a beranů se fruktóza nachází ve vysokých koncentracích, ale její množství je výrazně nižší ve spermatu kanců a hřebců. Inositol a kyselina citrónová nejsou používány jako energetické substráty, ale nacházejí se v semenné plazmě v poměrně vysokých koncentracích oproti jiným částem těla.

Poiani (2006) konstatuje, že semenná plazma hraje důležitou roli při ovlivňování motility spermií a udržování jejich životaschopnosti v děloze. Mimo jiné také poskytuje energetické substráty, které řídí oxidativní fosforylaci, stabilizují plazmatickou membránu spermií, zabraňují předčasné kapacitaci a akrozomové reakci spermií vyskytujících se v děloze. Dle Leahyho & De Graafa (2012) se zdá, že semenná plazma působí jako ochranné médium při zpracování spermií beranů *in vitro*. Důvody tohoto rozdílného účinku mohou být zapříčiněny vlivem hlavních proteinů semenné plazmy přežvýkavců, BSP proteiny.

Složení semenné plazmy se u různých druhů liší v závislosti na relativním podílu velikosti přídatných pohlavních žláz (Mann 1964). Vezikulární žláza je u malých přežvýkavců velká, ale prostata, ampula a bulbouretrální žlázy jsou relativně malé nebo rozptýlené, takže produkují koncentrovaný ejakulát o malém objemu (Maxwell et al. 2007).

3.3 Kapacitace

Spermie musí setrvat určitou dobu v samičím pohlavním ústrojí a podstoupit změny, aby byla schopna proniknout do vajíčka a oplodnit jej. Tento proces nazývaný kapacitace zřejmě probíhá v istmické části vejcovodu. Během kapacitace dojde k modifikaci nebo odstranění povrchových složek spermie způsobené sekrety pohlavního traktu, což způsobuje destabilizaci fosfolipidové dvojvrstvy a umožňuje akrozomální aktivaci. Dále dochází k úbytku cholesterolu na povrchu spermie, posměnění glykosaminoglycinů a změnám iontů při průchodu spermií pohlavním traktem samice. Tímto způsobem kapacitace zabraňuje předčasné aktivaci akrozomu, dokud spermie nedosáhne místa oplodnění a nedostane se do kontaktu s vajíčkem (Hafez & Hafez 2000). Důležitou roli v tomto procesu u přežvýkavců hraje heparin a různé proteiny semenné plazmy, které se vážou na fosfolipidy na membráně spermatu (Desnoyers & Manjunath 1992; Therien et al. 1995).

3.4 Fertilizace

Proces oplodnění (fertilizace) začíná navázáním spermie na vajíčko a jeho následným proniknutím dovnitř a spojením jader spermatické a vaječné buňky. Výsledná diploidní buňka nesoucí genetickou informaci nově vzniklého jedince se nazývá zygota (Bearden et al. 2004). Bearden et al. (2004) zdůrazňují, že aby se spermie stala schopnou úspěšného oplození, potřebuje projít procesem kapacitace.

García-Vázquez et al. (2016) konstatují, že po přirozené nebo umělé inseminaci je cílem spermií dostat se do místa oplození. Pouze část ze všech spermií v reprodukčním traktu samice se k vajíčku dostane a jen jedna spermie je schopná vajíčko oplodnit. Úspěšnost spermie při dosažení místa oplodnění a samostatné oplodnění vajíčka závisí na některých jejích vlastnostech (tj. dobrá pohyblivost, odpovídající morfologie a normální stav DNA).

Je známo, že ejakulát se skládá z různých subpopulací spermií. Tyto subpopulace se vyznačují rozdíly v pohyblivosti, stavu fragmentace DNA, morfologii nebo tvaru a velikosti, citlivosti na signální molekuly a mnoha dalších vlastnostech důležitých pro úspěšnou fertilizaci (Holt & Fazeli 2016). Mattner (1966) uvádí, že u přežvýkavců je děložní krček rezervoárem, kde dochází ke shlukování spermií a jejich postupné migraci do dělohy a vejcovodů. Pro abnormální spermie je děložní krček místem, který nejsou schopny překonat.

Prvním krokem v procesu oplození je penetrace spermií skrz buňky *corona radiata* za působení dvou enzymů – hyaluronidázy a penetračního enzymu, které jsou obsaženy v hlavičce spermií. Na *zona pellucida* se nachází zonální protein 3 (ZP3), který spouští akrozomální reakci potřebnou k navázání spermií na tento glykoproteinový obal vajíčka. Sekrece akrosinu z hlavičky spermií umožní penetraci *zóny pellucidy*, proniknutí do její extracelulární matrix a do perivitelinního prostoru, kde spermií splyne s vitelinní membránou. V ten okamžik splynou s vitelinní membránou i kortikální granule a vyprázdní svůj obsah do perivitelinního prostoru, čímž dojde ke spuštění reakce *zóny pellucidy*, která znemožní proniknutí dalších spermií do vajíčka (polyspermie). Po proniknutí spermií do cytoplazmy dochází k vitelinnímu bloku, děj podobný reakci *zóny pellucidy*, který se také podílí na zabránění vzniku polyspermie. Uvnitř cytoplazmy dochází k oddělení bičíku od hlavičky spermií. Samčí a samičí prvojádra se formují a následně splynou za vzniku zygoty, čímž je dokončeno oplodnění (Bearden et al. 2004).

3.5 Metody odběru ejakulátu

Wulster-Radcliffe et al. (2001) popisují, že prvním důležitým krokem kryokonzervace je odběr ejakulátu. Pro odběr ejakulátu beranů a kozlů jsou využívány dvě hlavní metody. Používanější metodou je odběr pomocí umělé vagíny, na kterou si však musí samec zvyknout. Jiménez-Rabadán et al. (2016) upozorňuje, že pro netréované jedince je vhodnější druhá metoda, která využívá elektroejakulátor. U této metody byla ovšem zjištěna horší snášenlivost u kozlů. Elektroejakulace u nich ovlivňuje složení semenné plazmy a snižuje schopnost spermií přežít konzervaci (Jiménez-Rabadán et al. 2016).

3.5.1 Umělá vagína

Umělá vagína svým tvarem, teplotou i tlakem imituje prostředí přirozené vagíny (viz Obrázek 1). Jedná se o nejrychlejší a nejhygieničtější variantu odběru z dostupných metod (Bearden et al. 2004). Ax et al. (2000b) popisují umělou vagínu jako hadici o délce 20-25 cm a průměru 5 až 7 cm obsahující pryžovou vložku. Také zdůrazňují, že je důležité mít vložku promazanou lubrikantem. Když samec nasedá na samici/atrapu nebo fantom (umělá konstrukce), jeho penis je jemně veden dovnitř umělé vagíny. Vnitřní teplota umělé vagíny by se měla pohybovat okolo 40 °C (Chang & Walton 1940; Bergstein-Galan et al. 2017). Je důležité zajistit, aby byla skleněná sběrná zkumavka teplá (37 °C) a nezpůsobila spermiím chladový šok. Samci většinou skáčou na fantom a následně ejakulují (Bearden et al. 2004). Pro tyto účely může být použita i připoutaná samice (Althouse 2007). Jedinci musí být vycvičeni k použití umělé vagíny, ale většinou není obtížné je to naučit. Nejlepší je ejakulát odebírat na vrcholu připouštěcí sezóny, hodnotí Ax et al. (2000b). Velký důraz je kladen na hygienu během celého procesu. Po odběru ejakulátu je zapotřebí umělou vagínu řádně umýt a sterilizovat. Shipley et al. (2007) konstatují, že ejakulát získaný při odběru do umělé vagíny obvykle neobsahuje nadměrné množství sekretu přídatných žláz, a proto je považován za kvalitnější než ejakulát odebraný pomocí elektroejakulátoru.



Obrázek 1: Jednotlivé části umělé vagíny (zdroj: archiv autorky)

3.5.2 Elektroejakulace

Elektroejakulace je upřednostňována u samců, jejichž sperma nemůže být z určitých důvodů odebráno do umělé vagíny. Jedná se o situace, kdy je samec zraněný a nemůže na umělou figurínu vyskočit, projevuje nižší sexuální aktivity vzhledem k věku, nebo jiné důvody, které zamezují použití umělé vagíny. Semeno by tímto způsobem nemělo být odebíráno samcům, kteří neprojevují normální sexuální chování nebo nejsou schopni ejakulace, protože tyto nežádoucí vlastnosti mohou být způsobeny geneticky, a tedy by mohly být přeneseny na potomstvo. Elektroejakulace u beranů a kozlů může být provedena ve stoje nebo vleže na stole. Někteří berani při této metodě nereagují, jiní poskytují semeno nízké kvality (Bearden 2004). Brindley (1981) popisuje, že použití elektroejakulace spočívá v podávání elektrických pulzů o nízkém napětí a proudu do samčího rekta pomocí transrektální sondy vybavené elektrodami. To vyvolá erekci penisu, emisi semene a nakonec ejakulaci. Ačkoli je tato technika snadno použitelná a účinná, může být pro samce stresující a bolestivá (Staford et al. 1996; Bath 1998; Orihuela et al. 2009).

3.5.3 Manipulace s odebraným ejakulátem

Ax et al. (2000b) popisují, že po odběru je skleněná zkumavka obsahující ejakulát uložena do vodní lázně o teplotě 30 °C, dokud vzorek nedosáhne této teploty. S odebraným ejakulátem je potřeba zacházet opatrně, aby nedošlo k tepelnému a chladovému šoku, kontaminaci vodou, dezinfekčními prostředky, slunečním zářením, vzduchem a dalšími faktory, které by mohly snížit životaschopnost spermií (Faigl et al. 2012). Zvýšením teploty nad 40 °C spermie snižují svou metabolickou aktivitu, čímž je negativně ovlivněna jejich životaschopnost (Sabés-Alsina et al. 2016). Všechny nádoby, které přicházejí do kontaktu se spermatem, by měly být plastové nebo skleněné a vyčištěny laboratorními čistícími prostředky (Shiple et al. 2007).

3.6 *In vitro* vyhodnocení ejakulátu

Farrel et al. (1998) zdůrazňují, že kvalitativní a kvantitativní parametry ejakulátu by měly být vyhodnoceny co nejdříve po odběru. Standardní metodou hodnocení plodnosti samců, kromě přímého hodnocení jejich schopnosti oplodnit samice, je vyšetření ejakulátu. Žádný test přesně nepředpovídá plodnost vzorku ejakulátu, nicméně zkoumání různých fyzikálních vlastností může určit větší potenciál plodnosti. Hodnotí se vzhled, objem, koncentrace, motilita, morfologie a kvalita ejakulátu (Ax et al. 2000a).

Faigl et al. (2012) doplňují, že sofistikovanější hodnocení zahrnuje testy tepelné odolnosti, akrozomální integrity, schopnosti spermií pohybovat se v různých médiích (např. cervikální hlen, plavání v médiích), test hypoosmotického bobtnání, oplodnění *in vitro* (IVF) a počítačové hodnocení motility (Computer Assisted Semen Analyses – CASA). Amann & Hammerstedt v roce 2000 správně předpověděli, jak bude kvalita spermatu hodnocena v budoucnu. Základní úroveň by mělo být mikroskopické hodnocení, a to buď vizuálně pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem nebo s využitím jednoduchého počítačového systému (systém CASA), který by řešil otázky, zda je většina spermií progresivně pohyblivá a zda má vysoké procento spermií normální morfologii (nízký výskyt tvarových znaků, o nichž je známo, že jsou spojeny s neplodností). Dnes by se v rámci sekundárního screeningu testovaly jednotlivé spermie průtokovou cytometrickou analýzou. Lepší sekundární screening by mohl využívat nové přístroje a techniky k hodnocení pohybu a morfologie spermií ve vlhkém preparátu současně s vícesondovým hodnocením biochemických vlastností (Amann & Hammerstedt 2000). Konkrétně by testy měly schopnost poskytovat podrobné informace o specifických vlastnostech spermií, jako je akrozomální integrita, integrita plazmatické membrány a mitochondriální membránový potenciál (Ax et al. 2000a).

Bylo učiněno mnoho pokusů o korelaci výsledků výše uvedených *in vitro* testů a plodnosti samic oplodněných hodnoceným spermatem. Oplozovací schopnost však nezávisí na jediném parametru spermatu, ale také na plodnosti samice (plemeni), typu říje (přirozená nebo hormonálně manipulovaná), ročním období a místě uložení spermatu (Faigl et al. 2012). V důsledku toho nejsou v případě hodnocených ejakulátů vhodných k použití korelace mezi testy *in vitro* a plodností tak vysoké. Nedávno shromážděné údaje získané metodou CASA u lidí a zvířat však naznačují korelaci mezi některými parametry pohyblivosti spermatu a plodností po umělém oplodnění (Farrel et al. 1998; Zhang et al. 1998; Januskauskas et al. 2003; WHO 2010).

Množství spermií a objem ejakulátu určují, kolik samic může být z daného odběru oplozeno (Ax et al. 2000a). U ejakulátu kozla je požadovaná motilita spermií vyšší než 80 % a zastoupení více než 85 % morfologicky normálních spermií (Bulgin 1992). Beraní sperma s pohyblivostí větší než 85 % a obsahem méně než 10 % abnormálních spermií je považováno za vysoce kvalitní (Ax et al. 2000b). Oplozovací schopnost však nezávisí pouze na těchto dvou parametrech. Celkové množství živých spermií na jednu inseminaci je důležitější než procento abnormálních spermií. Neschopnost jediné spermie proniknout do *zona pellucida* vajíčka je považována za jeden z limitujících faktorů plodnosti ejakulátu (Ax et al. 2000b).

Ejakulát je zpracován tak, aby byl použit jako čerstvý, zchlazený, nebo zmrazený. U koz se častěji využívá čerstvé a chlazené sperma, zatímco v chovu ovcí se upřednostňuje sperma

zmrazené. Typická inseminační dávka používaná pro intracervikální nebo intrauterinní inseminaci obsahuje až 200×10^6 spermií v množství do 0,25 ml (Ax et al. 2000b).

3.6.1 Koncentrace

Koncentrace spermií je měřena pomocí hemacytometru, kolorimetru nebo spektrofotometru. Hemacytometr je mikroskopické sklíčko s přesně rýhovanými komůrkami. Počet spermií v komůrce se počítá ručně při zvětšení 200 až 400 \times (Martins et al. 2016). Jedná se o velmi časově náročnou, avšak přesnou metodu. Tento způsob měření může být nahrazen spektrofotometrem nebo kolorimetrem, který bude kalibrován na hemacytometr. Výhodou těchto technik je jejich přesnost a rychlost. Pro stanovení koncentrace spermií je vhodným nástrojem spektrofotometr, který je kalibrován na 550 nm (viz Obrázek 2). Roztok používaný pro ředění ejakulátu je 2,9% citrát sodný a 5 ml 10% formalínu na litr. Spektrofotometry však nejsou přesné s kontaminovaným spermatem a použití zakalených ředidel (extenderů) před odhadem koncentrace může také zkreslit výsledek (Ax et al. 2000a). Měření koncentrace spermií pomocí kolorimetru se nevyužívá u spermatu kozlů kvůli barevným odchylkám (Ax et al. 2000a).



Obrázek 2: Spektrofotometr (zdroj: archiv autorky)

3.6.2 Progresivní motilita spermií

Motilita (pohyblivost) vzorku je vyjadřována jako procento buněk, které jsou pohyblivé vlastní silou. Progresivně pohyblivá spermie je taková, která se pohybuje nebo postupuje z jednoho bodu do druhého víceméně přímočaře. Většina ejakulátů vykazuje jiné typy

pohyblivosti. Patří mezi ně jak krouživý pohyb, tak pohyb způsobený abnormalitou bičíku a vibrační nebo kolébavý pohyb často spojený se stárnutím (Ax et al. 2000a). Arruda et al. (2005) prohlašují, že subjektivní analýza pohybu spermií byla jednou z prvních technik používaných pro hodnocení spermatu a je stále nejpoužívanější, především v terénu.

Bearden et al. (2004) považují progresivní motilitu za nejdůležitější individuální test kvality, protože plodnost vysoce koreluje s počtem pohyblivých spermií. Yániz ve své studii (2015) došel k závěru, že berani s vysokou a nízkou plodností mají jasné rozdíly v morfometrických a kinematických subpopulacích spermií a že nejkonzistentnějšími ukazateli plodnosti jsou celková progresivní motilita a podíl spermií s velkou a dlouhou hlavičkou přítomných v ejakulátu.

Varner et al. (1991) vysvětlují, že pro hodnocení motility spermií se nejčastěji používá světelná mikroskopická analýza spermií při zvětšení 200-400×. Měření se provádí s čerstvým ejakulátem a následně po přidání extenderu. Hodnocení syrového ejakulátu je ukazatelem výkonnosti spermií ve vlastní tekutině přídatných pohlavních žláz. Měření v této formě může být znesnadněno vysokou koncentrací spermií, což komplikuje rozeznání jednotlivých znaků pohyblivosti. K překonání tohoto omezení by mělo být sperma zředěno v kvalitním extenderu na koncentraci 25×10^6 spermií/ml, konkrétně v pufru citrátu sodném, doplňují Martins et al. (2016). Kasimanickam et al. (2007) ve své studii ředili sperma beranů na koncentraci 50×10^6 a 200×10^6 spermií/, přičemž lepších výsledků (strukturální, funkční a pohybové parametry) během doby skladování dosahovalo sperma ředěné do vyšší koncentrace.

Mezi parametry motility patří: procento pohyblivých spermií (normální hodnoty od 70 do 90 %), procento progresivně pohyblivých spermií, rychlost spermií (na základě stupnice od 0 do 4), dlouhověkost pohybu v čerstvém ejakulátu (při pokojové teplotě 20-25 °C) a ve spermatu po použití extenderu (při pokojové teplotě, nebo v chladu 4-6 °C). Přidání extenderu může mírně ovlivnit motilitu, obvykle zvýšením rychlosti spermií. Obecně se spermie ve zředěném spermatu pohybují v dlouhém polokruhovém vzorci. Po přidání extenderu mohou spermie vykazovat krouživé pohyby, které většinou po 5-10 minutách odezní. Pokud spermie plavou v těsném kruhu, znamená to, že mohly být vystaveny chladovému šoku. Kmitavý pohyb je spojován se stárnutím a vysycháním spermatických buněk (Ax et al. 2000a).

Verstegen et al. (2002) však varují před hlavními omezeními této metody, kterými jsou subjektivita, nízká opakovatelnost a malý počet analyzovaných buněk. Kromě těchto omezení mohou výsledky ovlivnit některé vnější faktory a efektivní hodnocení vzorku je časově náročné. Vysoká subjektivita analýzy při použití hodnocení optickou mikroskopií podnítila vývoj automatizovaných systémů pro počítačovou analýzu spermatu (CASA).

3.6.3 Hromadný vířivý pohyb

Mezi metody hodnocení motility, které se v praxi běžně používají, patří také hodnocení hromadného vířivého pohybu (mass motility). Tato technika hodnotí trojrozměrný kolektivní vlnový pohyb skupiny spermií v neředěném, nativním ejakulátu. Jedná se o rychlou, snadno proveditelnou, levnou metodu hodnocení pohyblivosti spermií, která předpovídá jejich oplozovací schopnost, což ji činí velmi atraktivní pro využití v praxi (David et al. 2008; David et al. 2015). Ve studii David et al. (2015) byla kapka 5 μ l čerstvého ejakulátu nanášena na předehřáté skleněné sklíčko (≈ 37 °C) a okraj kapky byl pozorován při malém zvětšení

(objektiv 10×) na tepelně řízeném stolku mikroskopu s fázovým kontrastem. Pozorování na okrajích kapky umožňuje posoudit rychlé vlnění černých vln a vírů na šedém pozadí, které se označuje jako hromadný vířivý pohyb spermií.

Intenzita pohybu vln a vírů na okraji vzorku se hodnotí podle stupnice od 0 (žádný pohyb) do 5 (velmi rychlý vířivý pohyb) na základě původní metody popsané Evansem a Maxwelllem (1987). David et al. (2015) zjistili, že s nárůstem skóre pohyblivosti spermií u ejakulátů beranů se ve všech studovaných centrech umělé inseminace zvýšila i míra bahnění. Tyto výsledky naznačují, že hmotnostní pohyblivost spermií obecně předpovídá oplozovací schopnost jednotlivých beraních ejakulátů. Navzdory tomu je účinnost hodnocení hromadné vířivého pohybu používaného pro zajištění kvality spermatu v praxi omezena jeho subjektivitou (Rodríguez-Martínez 2003). Existuje několik studií, které se zabývají vývojem matematických modelů pro hodnocení vířivých pohybů (Degond et al. 2014; Degond & Yu 2015). Další vývoj těchto objektivních metod a experimentální aplikace ke stanovení potenciálních korelací s plodností je nezbytný, aby se zjistilo, zda tato metoda poskytuje výhodu oproti tradiční subjektivní analýze hromadného vířivého pohybu spermií (Van de Hoek et al. 2022).

3.7 Zpracování ejakulátu

Leahy & De Graaf (2012) vysvětlují, že proces zpracování ejakulátu se skládá z ředění, chlazení, zmrazování, opětovného zahřívání a případného třídění podle pohlaví. Některé laboratoře do procesu zahrnují i mytí spermií, kdy dojde k odstranění semenné plazmy s cílem zlepšit kvalitu rozmrazeného spermatu (Leahy & De Graaf 2012; Roof et al. 2012). Mytí spermií je však časově náročné a může způsobit jejich poškození (Miro et al. 2009). Při procesu ředění čerstvého ejakulátu extenderem dochází k současnému snížení koncentrace semenné plazmy (Höfner et al. 2020). *In vitro* manipulace se spermiemi však může negativně ovlivnit jejich oplozovací schopnost tím, že může dojít ke změně proteinů na povrchu spermií a ke snížení množství semenné plazmy v prostředí spermií (Leahy & De Graaf 2012). Předpokládá se, že část poškození během zpracování ejakulátu může být způsobena také nadměrným ředěním, o kterém je známo, že vede k zastavení motility spermií, metabolické aktivity a fertilizačního potenciálu. Tento jev byl označen jako „efekt ředění“ (Mann 1964) a lze jej zvrátit přidáním semenné plazmy (Maxwell & Johnson 1999). Účinnost metody se však liší, konstatují Leahy & De Graaf (2012).

3.7.1 Ředění ejakulátu

Shipley et al. (2007) prohlašují, že pro lepší manipulaci a měření je výhodnější ejakulát naředit. Mimo jiné ředění poskytuje spermiím vhodné prostředí pro uchování během manipulace a následného procesu inseminace. Motilita a koncentrace určují poměr ředění ejakulátu. Vzorek, který má skóre 5 v pohybu i koncentraci, může být ředěn až v poměru 4 : 1 (ředidlo : ejakulát). Většina ejakulátů se ředí v poměru 2 : 1 ve prospěch ředidla. Ejakulát s hodnotou 2 by se neměl ředit a měl by být použit pouze v čerstvém stavu. Lze použít přírodní nebo syntetické ředidlo. Kravské mléko je nejčastěji používaným přírodním ředidlem. Běžně používanými syntetickými ředidly je fruktóza, kyselina citronová, tris(hydroxymethyl)aminomethan, vaječný žloutek a destilovaná voda. Ředidlo i ejakulát

by měly mít při ředění stejnou teplotu (30 °C). Přidání ředidla do spermatu snižuje šok pro spermie. Nikdy by se nemělo přidávat sperma do ředidla. Směs by měla být následně mírně promíchána a mělo by dojít k vyhodnocení spermatu, aby se potvrdila životaschopnost spermií (Ax et al. 2000a).

Ejakulát kozlů je méně koncentrované oproti beranímu, poměr ředění je proto nižší. Když se pro ředění použije vaječný žloutek, přidané množství u ejakulátu kozlů je výrazně nižší než v případě ředění beraního spermatu (14 ml vs 2,5 ml). Semenná plazma kozlů se odstředí centrifugací spermatu. Tato metoda vyžaduje stanovení koncentrace spermií v odstředěném vzorku před zředěním (Ax et al. 2000a).

3.7.2 Mrazení spermatu

Existuje mnoho protokolů pro zmrazení spermatu malých přežvýkavců. Byly popsány jednostupňové a dvoustupňové metody, ale vzhledem k jednoduchosti se nejčastěji používá metoda jednostupňová. Sperma se zředí kryoprotektantem na konečný stupeň předmrazení při 30 °C. Poté se pejetý (slámky) naloží do vodní lázně a pomalu zchladí na 5 °C umístěním do chladničky po dobu 1,5 až 2 hodin. Chlazení je obdobím adaptace spermií na snížený metabolismus (Salamon & Maxwell 2000). V závislosti na laboratoři nebo ředidle se sperma poté buď zmrazí nad dusíkovými parami (4 cm pro 0,25 ml slámky nebo 6 cm pro 0,5 ml slámky) na zchlazeném (5 °C) stojanu, nebo se ponechá v chladničce ještě několik hodin, aby došlo k ekvilibraci. Po 8 až 10 minutách v páře se sperma ponoří do kapalného dusíku (teplota -195,8 °C) a odtud se uloží do goblet, které se vloží do kontejneru s kapalným dusíkem ke skladování (Bearden et al. 2004), jak je znázorněno na Obrázku 3. Sperma lze také zmrazit v peletách pomocí bloku suchého ledu, do kterého byly pomocí kovové tyče vyraženy prohlubně, do nichž se napipetuje naředěné sperma o objemu 0,1-0,15 ml. Tato technika nevyžaduje drahé nebo sofistikované vybavení, ale označení a identitu spermatu je obtížnější zachovat (Shipley et al. 2007).

Tradičně se za ekvilibraci považuje celková doba, po kterou zůstávají spermie před zmrazením v kontaktu s glycerolem, během níž proniká do spermatické buňky a vytváří vyváženou intracelulární a extracelulární koncentraci. Ekvilibrace zahrnuje rovnováhu koncentrací nejen glycerolu, ale i ostatních osmoticky aktivních složek ředidla. Glycerol se podílí na některých nežádoucích jevech, ke kterým dochází během ekvilibrace, jako jsou změny struktury a biochemické integrity spermií a urychlení akrozomové reakce. Ačkoli je lze ve světle ostatních příznivých kryogenních vlastností glycerolu přehlížet, je třeba také zmínit, že toto médium může do jisté míry nepříznivě ovlivňovat plodnost (Salamon & Maxwell 2000).



Obrázek 3: Uložení inseminačních dávek v kontejneru s tekutým dusíkem při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (zdroj: archiv autorky)

3.7.2.1 Komplikace při mrazení spermatu

Chelucci et al. (2015) upozorňují na fakt, že spermatické buňky podléhají biochemickým a funkčním změnám v důsledku dlouhodobého skladování spermií, což omezuje jejich schopnost oplodnění. Akrozom, jádro, mitochondrie, axonema a plazmatická membrána jsou také ovlivněny rychlými teplotními změnami, jako je chladový šok, tvorba a rozpouštění ledových krystalků během procesu zmrazování a rozmrazování (O'Connell et al. 2002; Nur et al. 2010). Komplikací může být také oxidační stres, ke kterému jsou náchylné membrány spermií z důvodu vysokého obsahu polynenasycených mastných kyselin (Chelucci et al. 2015). Tremellen (2008) vysvětluje, že oxidační stres nastává, když produkce potenciálně destruktivních reaktivních forem kyslíku (ROS) překročí přirozenou antioxidační obranu těla, což vede k poškození buněk. ROS, definované jako ionty kyslíku, volné radikály a peroxidy, jsou generovány spermiemi a semennými leukocyty ve spermatu a způsobují neplodnost dvěma klíčovými mechanismy. Za prvé poškozují membránu spermií, čímž snižují jejich pohyblivost a schopnost splynout s oocytem. Za druhé, ROS mohou měnit DNA spermií, což vede k přenosu defektní otcovské DNA na plod. Aby se zabránilo intracelulární krystalizaci a oxidativnímu stresu, sperma se běžně ředí kryoprotektivním extendrem.

Zmrazování kozího spermatu je poněkud náročné kvůli přítomnosti sekretů bulbouretrálních žláz (lipáz), které v interakci s vaječným žloutkem a mlékem vytvářejí látky toxické pro spermií. To vedlo k potřebě vyvinout alternativní metody zmrazování, při nichž se sperma buď odstředí, aby se odstranila semenná plazma před zředěním ve standardních extenderch (např. 20% vaječný žloutek), nebo se použijí nízké koncentrace vaječného žloutku

(2 %), což může potenciálně vést k nedostatečné ochraně membrán spermií. Stejně tak sperma beranů vyžaduje zmrazení s extenderem obsahujícím snížené množství vaječného žloutku (~8 %), aby spermie co nejlépe přežily. V poslední době byly vyvinuty komerční extendery bez složek živočišného původu (mléko nebo vaječný žloutek) s cílem zvýšit hygienickou bezpečnost při zpracování spermatu (např. BioXcell® od společnosti IMV, Francie; AndroMed® od společnosti Minitube, Německo). Ačkoli byly tyto extendery původně vyvinuty pro skot, ukázalo se, že jsou velmi užitečné i pro konzervaci spermatu malých přežvýkavců, aniž by bylo nutné sperma před přidáním extenderu odstředovat (Baldassarre 2016).

Faktem je, že úspěšná kryokonzervace spermatu beranů a kozlů je však stále v nedohlednu, protože značné procento spermií nepřežije proces zmrazení a rozmrazení. Spermie jsou během kryokonzervace zničeny v důsledku různých koncentrací kryoprotektivních chemikálií a v případě, že sperma není chlazeno optimální rychlostí chlazení. Proto je pro úspěšné zmrazení spermií beranů zásadní znát optimální rychlost chlazení s protokoly zmrazování a rozmrazování pro maximální obnovu životaschopných a funkčních spermatických buněk (Saha et al. 2022). Definice optimálních protokolů kryokonzervace je cílem studií i u kozlů (Anghel et al. 2010; Jiménez-Rabadán et al. 2013, Zanganeh et al. 2013)

3.7.3 Rozmrazování spermatu

Salamon & Maxwell (2000) zdůrazňují, že při postupu zmrazování a rozmrazování je fáze zahřívání pro přežití spermií stejně důležitá jako fáze chlazení. Spermie, které přežily zchlazení na -196 °C, stále čelí výzvě zahřívání a rozmrazování, a musí tedy překonat dvojnásobek kritické teplotní zóny (-15 °C až -60 °C). Na přežitelnost spermií má vliv jak rychlost ochlazování, tak rozmrazování (Mazur 1985). Účinek závisí na tom, zda byla rychlost ochlazování dostatečně vysoká, aby vyvolala nitrobuněčné zmrznutí, nebo dostatečně nízká, aby došlo k dehydrataci buněk. V prvním případě je nutné rychlé rozmrazení, aby se zabránilo rekrystalizaci případného vnitrobuněčného ledu přítomného ve spermiích. Spermie rozmrazované vyšší rychlostí mohou být také kratší dobu vystaveny působení koncentrovaného roztoku a kryoprotektiva (glycerolu) a obnovení intracelulární a extracelulární rovnováhy je rychlejší než při pomalém rozmrazování.

Dle studie vědeckého týmu Söderquist et al. (1997) vede pomalé rozmrazování (35 °C po dobu 12 s) k 63 % motilitě spermií po rozmrazení a 52 % integritě membrány. Rychlé rozmrazování (70 °C po dobu 5 s) vede k vyšší pohyblivosti spermií po rozmrazení a k vyšší integritě membrán (67 %, resp. 50 %). Několik studií naopak prokázalo, že delší doba rozmrazování je vhodnější než doba kratší (Almquist et al. 1982; Gaillard & Kupferschmied 1982). Pejeta se obvykle rozmrazuje ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C na 12-30 sekund (Foote 1999). Tuli et al. (1991) ve své studii varují, že při teplotách vyšších než 37 °C se teplota a čas stávají výrazně nebezpečnějšími, protože tyto vysoké teploty mohou při nesprávném postupu rozmrazování vést k masivnímu úhynu spermií. Jednotlivé ejakuláty spermií beranů jsou vhodné pro konzervaci a inseminaci pouze tehdy, pokud je procento spermií pohybujících se vpřed vyšší než 40 % po rozmrazení a 30 % po 5-6 hodinách inkubace (Evans & Maxwell 1987).

Obecně platí, že po zmrazení a rozmrazení odumírá zhruba 40-50 % populace spermií (Watson 2000, Saha et al. 2022). Přežitelnost může být snížena z 85,6 na 34,3 %

u rozmrazených spermií kozlů. Zatímco sperma beranů po rozmrazení může obsahovat velký podíl pohyblivých buněk (40-60 %), pouze asi 20-30 % z nich je fyziologicky aktivních (Salamon & Maxwell 2000; Watson 2000; Medeiros et al. 2002).

3.8 Hodnocení rozmrazeného spermatu

Bearden et al. (2004) vysvětlují, že předchozí testy byly prováděny za účelem zjištění, zda je ejakulát dostatečně kvalitní pro zpracování. Další hodnocení následuje po rozmrazení spermatu. Míra přežitelnosti semene po zmrazování a rozmrazování ejakulátu různých samců a různých odběrů od stejného samce se značně liší. K úspěšné umělé inseminaci je zapotřebí dostatečné množství pohyblivých spermií v inseminační dávce. Proto je přesné hodnocení spermatu po zmrazení a rozmrazení zásadní pro úspěšnost zabřezávání samic.

3.9 Objektivní hodnocení pohyblivosti spermií

Bylo vyvinuto několik postupů pro objektivní hodnocení pohyblivosti spermií (Holt 1995). Jedná se o časověnou fotomikrografii, videomikrografii s přehráváním po jednotlivých snímcích, spektrofotometrii a počítačovou analýzu. V referenčních laboratořích se jako objektivní způsob hodnocení motility spermií používá systém počítačové analýzy spermatu (Computer Assisted Semen Analysis – CASA).

3.9.1 CASA

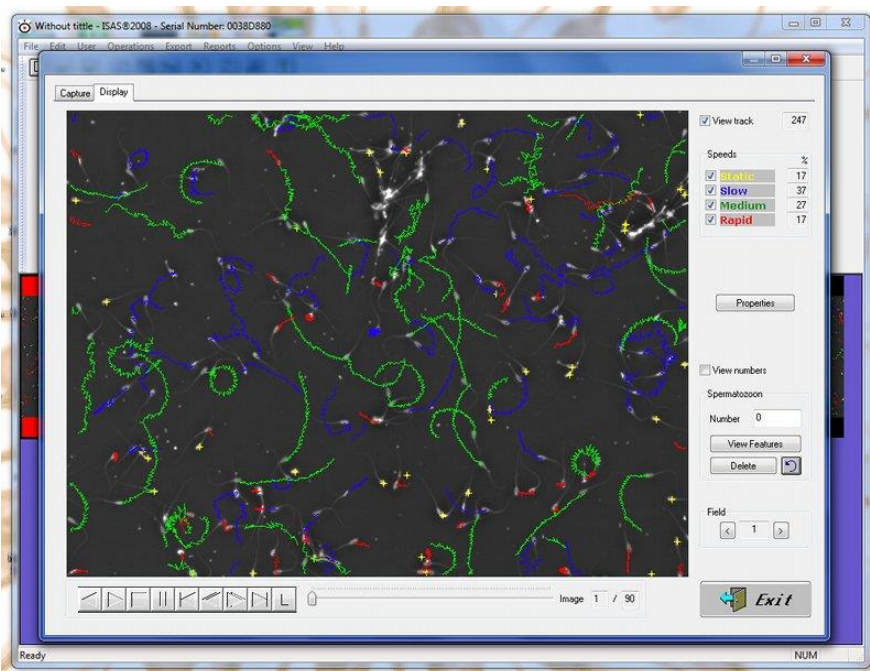
Počítačem řízená analýza spermií (Computer Assisted Semen Analysis – CASA) byla poprvé popsána Dottem a Fosterem (1979). Systémy CASA se obvykle skládají z mikroskopu s fázovým kontrastem propojeného s počítačem se speciálním softwarem pro získávání obrazu a analýzu dat (Egeberg et al. 2013). Tato metoda poskytuje prostředky pro objektivní klasifikaci dané populace spermií (viz Obrázek 4). Za použití digitálních snímků dráhy každé spermatické buňky umožňuje přístroj CASA pomocí algoritmů zpracování analyzovat pohybové vlastnosti spermií a také některé proměnné (např. linearita), které silně korelují s plodností, jak udávají Verstegen et al. (2002). I když jsou systémy CASA vynikajícími výzkumnými nástroji, je sporné, zda se budou v dohledné době používat v rutinním zpracování (Ax et al. 2000a).

Motilita je široce považována za jednu z nejdůležitějších charakteristik spojených s oplozovací schopností spermií (Tsakmakidis 2010). Amann & Waberski (2014) ale upozorňují, že CASA nedokáže přesně předpovědět plodnost, která bude získána se vzorkem spermatu. Pokud jsou však současné systémy CASA pečlivě validovány, poskytují informace důležité pro zajištění kvality spermatu plánovaného pro uvedení na trh a pro pochopení rozmanitosti reakcí spermií na změny mikroprostředí ve výzkumu.

Aplikace barviva (Hoechst 333420), které je adsorbováno DNA v hlavičkách spermií, a využití ultrafialového stroboskopického světla umožňuje systému CASA počítat nepohyblivé spermie a sledovat a analyzovat vzorce pohyblivosti motilních spermií i v ředidle plnotučného mléka. Pohyblivost obarvených spermií byla porovnána s pohyblivostí neobarvených spermií stejných ejakulátů a nebyl zaznamenán žádný nepříznivý vliv barvení (Ax et al. 2000a).

Arruda et al. (2011) zdůrazňují, že hlavní výzvou při používání systému CASA je standardizace laboratorního nastavení, což dokládá vysoká variabilita výsledků různých

výzkumných skupin. Jedním z příkladů této výzvy je použití předem definované koncentrace spermií (25 až 50×10^6 spermií/ml) pro analýzu, zejména čerstvého ejakulátu, který je koncentrovanější než zmrazené sperma. Mimo jiné mohou být cizí částice (s podobnou velikostí jako hlavička spermie) v nastavcích rozpoznány systémem jako spermie, což může ovlivnit výsledky. Mezi některé automatické analyzátory patří systém IDENT, který je založen na barvení DNA spermií fluorescenčními sondami (Hoechst 33342), což snižuje chybovost při hodnocení spermií a poskytuje spolehlivější výsledky (Arruda et al. 2011).



Obrázek 4: Hodnocení pohyblivosti spermií pomocí CASA (zdroj: <https://proiser.com/semensperm-analysis/casa-systems-sperm-analyzers/isasv1-sperm-analyzer/>)

3.9.2 Parametry

Popis pohyblivosti pomocí CASA zahrnuje: křivočará rychlost (VCL), průměrná dráhová rychlost (VAP), přímočará rychlost (VSL), amplituda bočního posunu hlavičky (ALH), linearita (LIN), křížová frekvence rytmu (BCF), střední úhlové posunutí (MAN), oblast hlavičky sledované spermie, doba sledování každé spermie (Ax et al. 2000a). Verstegen et al. (2002) doplňují, že dalším parametrem je přímočarost (STR), která je definovaná jako průměrná hodnota poměru VSL/VAP v procentech a odhaduje blízkost dráhy spermatické buňky k přímce, přičemž hodnota 100 % odpovídá optimálnímu stavu. Linearita (LIN) značí průměrnou hodnotu poměru VSL/VCL v procentech a odhaduje blízkost křivočaré trajektorie spermatické buňky k přímce. Tyto parametry CASA byly modelovány a matematicky zpřesněny tak, aby co nejlépe popisovaly parametry pohybu každé spermie při jejím průchodu mikroskopickým polem.

Měření parametrů CASA je citlivé na variabilitu vzorku spermií, stejně jako na použitý systém, frekvenci pořizování snímků, druh, koncentraci spermií, teplotní analýzu, zkušenosti pozorovatele (Mortimer 2000) a použitý hardware a software (Castellini et al. 2011). Frekvence

(12, 25, 50, 100, 200 Hz) pořizování obrazu je jednou z nejdůležitějších konfigurací zařízení, stejně jako hloubka komory, která může ovlivnit odhad koncentrace spermií, projevy motility v důsledku omezení posunu nebo vést k interakcím mezi buňkami a stěnami komory (Verstegen et al. 2002).

Studie Santolarieho et al. (2015) prováděná na beranech prokázala významný ($P < 0,05$) vztah mezi životaschopností spermií a plodností ejakulátu. Plodnost se zvýšila s každým zvýšením životaschopnosti o jednotku (faktorem 1,01) a VCL (faktorem 1,02). Ve zmiňované studii bylo také zjištěno, že integrita membrán spermií a VCL mají prediktivní schopnost pro plnou plodnost, i když omezenou, zatímco struktura populace spermií a statická fragmentace DNA s plnou plodností nesouvisí. V souladu s těmito výsledky je i studie Vicente-Fiela et al. (2014), ve které bylo pozorováno, že spermie beranů s vysokou plodností vykazovaly vyšší životaschopnost, VCL a VSL než spermie beranů s nízkou plodností.

Sánchez-Partida et al. (1999) hodnotili vztah mezi charakteristikami motility rozmražených spermií analyzovanými metodou CASA a plodností po umělé inseminaci u bahnic a dospěli k závěru, že objektivní analýza motility spermií v podmínkách *in vitro* inkubace pomáhá nalézt parametry, které by mohly souviset s plodností. Smith et al. (1998) uvedli významnou korelaci parametrů motility CASA a plodnosti v terénu. Robayo et al. (2008) navíc zkoumali vztah mezi vzorci motility CASA a migrací spermií berana v cervikálním hleny ovce a uvedli, že VCL a VAP jsou jediné kinematické parametry spermií, které pozitivně korelují se schopností spermií migrovat v cervikálním hleny ovce. Toto zjištění by naznačovalo, že specifické kinematické parametry propůjčující spermii schopnost kolonizovat a migrovat epitelovým hlenem, mohou být důležitým determinantem pro proces oplození. CASA je dobrým přístrojem pro identifikaci kvalitních ejakulátů i v případě kozlů (Cox et al. 2006; Dorado et al. 2010a, Dorado et al. 2010b).

3.9.3 Limity

I přes již zmíněnou vysokou přesnost, spolehlivost a rychlost dosaženou pomocí zařízení CASA (Matos et al. 2008; Amann & Waberski 2014), je pozorován nesoulad v počtu narozených zvířat, pokud je toto počítačové hodnocení prováděno samostatně. K tomu dochází z důvodu, že pohyblivost spermií je pouze jedním ze základních a nezbytných předpokladů pro úspěšné dokončení biologické funkce spermie a oplodnění oocyty (Graham & Mocé 2005). Amann & Waberski (2014) souhlasí, že zatím není jasné, které charakteristiky pohybu spermií, stanovené systémem CASA, jsou schopny předpovědět jejich fertilizační schopnost.

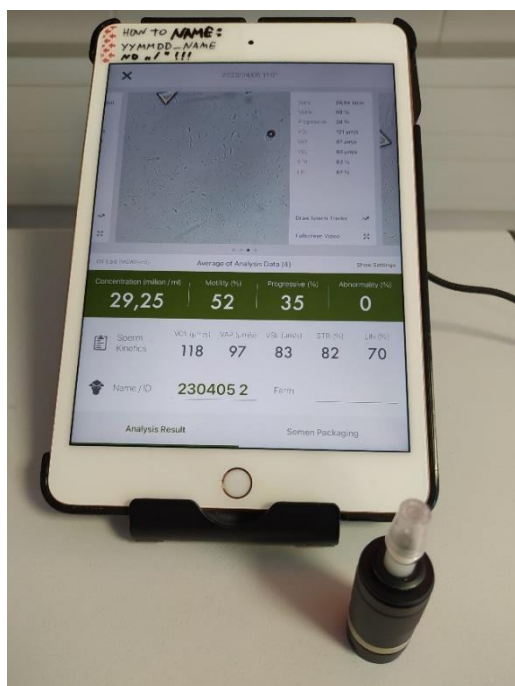
Absence univerzálních standardů nastavení komplikuje porovnávání výsledků mezi různými laboratořemi, což znamená, že systém CASA je užitečný pouze pro hodnocení kinetických charakteristik v rámci laboratoře (Castellini et al. 2011). Amann & Waberski (2014) upozorňují, že jakékoli měření pomocí CASA může reflektovat pouze stav spermií v daném okamžiku, kdy jsou suspendovány v syntetickém médiu v omezeném prostoru. Médium (nebo dřívější zpracování spermatických buněk) může ovlivnit výsledné hodnoty jakéhokoli měřeného parametru a prostorová omezení komory pro vzorky ovlivňují pohyb spermií.

3.9.4 Budoucnost

Mortimer et al. (2015) shrnují, že CASA má obrovský potenciál jako výzkumný nástroj v reprodukční toxikologii, v živočišné výrobě a pro klinické analýzy u lidí. Není pochyb o tom, že systémy CASA bude potřeba v budoucnosti důkladně testovat a přizpůsobit je rozdílným potřebám laboratoří pro klinickou andrologii u lidí, laboratoří pro chov domácích zvířat a laboratoří pro testování a výzkum reprodukční toxikologie. Kromě toho budou muset zahrnovat také funkční testy kvality spermatu, které pomohou při kvantifikaci relativní plodnosti, a ne pouze měřit popisné parametry spermatu jako takového.

Naléhavé zlepšení technologie CASA se musí týkat morfologické analýzy spermií a také začlenění testů funkce spermií do platforem. Budoucí systémy CASA by mohly zajistit lepší klinický význam analýzy spermatu tím, že by integrovaly automatizovanou analýzu parametrů spermatu a hodnocení funkčnosti spermií a možná i začlenění molekulárně biologických aspektů analýzy spermatu do databáze se specializovanými statistickými analytickými schopnostmi. Tento typ přístupu by mohl být přijat také pro oblast chovu domácích zvířat, aby bylo možné lépe předpovídat relativní plodnost samců (Mortimer et al. 2015).

Wabersi et al. (2022) se ve své práci zaměřují na hodnocení mobilního přístroje CASA. Pokrok v multifunkčních postupech chytrých technologií totiž vedl k vývoji přenosných systémů CASA ve spojení s mobilními telefony nebo tablety (iSperm mCASA, která je zobrazena na Obrázku 5). Je pozoruhodné, že tato zařízení poskytují téměř identické kinematické veličiny jako standardní systémy a zahrnují také měření koncentrace spermií. Mobilní systémy CASA jsou široce prodávány pro „domácí testování“ pohyblivosti a koncentrace spermií v lidských vzorcích (Kobori et al. 2016; Agarwal et al., 2018, Cheon et al., 2019). Pro použití u domácích zvířat jsou mobilní systémy určeny především pro kontrolu kvality spermatu na farmách před šlechtěním nebo tam, kde nejsou dostupné stolní systémy CASA (Waberski et al. 2022).



Obrázek 5: Přístroj iSperm mCASA (zdroj: archiv autorky)

3.10 Cytometrie

Laboratorní testy, které se používají k posouzení kvality vzorku spermatu před jeho použitím k umělé inseminaci, tradičně zahrnují hodnocení procenta pohyblivých spermií (buď subjektivně, nebo pomocí počítače), procenta spermií s normální morfologií a koncentrace v jednotkové dávce. Hlavním cílem všech analýz spermatu je přesně, objektivně, rychle a levně předpovědět plodnost vzorku. Nicméně běžně používané laboratorní testy často těmito kritériím nevyhovují a nemají dobrou korelaci s oplozovací schopností spermií (Gillan et al. 2005).

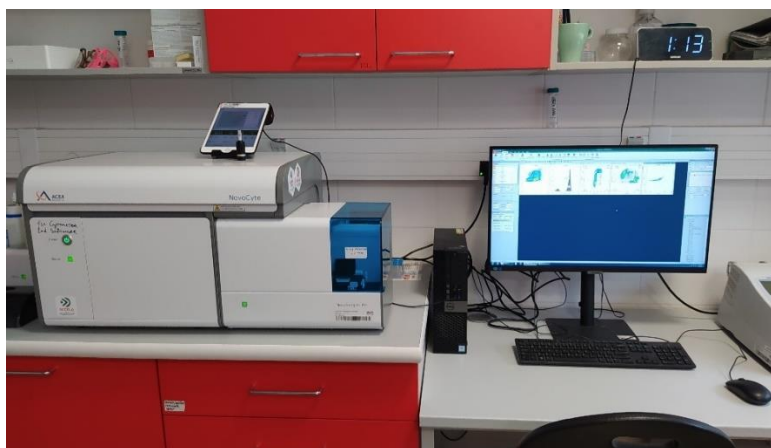
Spermie jsou komplexní buňky, které musí splňovat mnoho atributů (motilita, neporušený akrozom, schopnost vázat se na *zona pellucida* a další vlastnosti zajišťující fertilitu), aby byly schopné oplodnit oocyt. Spermie mohou být neplodné z různých důvodů. Proto byla snaha vyvinout efektivnější laboratorní testy, které by dané parametry vzaly v úvahu a hodnotily více parametrů najednou. K tomuto účelu byla vyvinuta analýza průtokovou cytometrií, která je objektivní a vysoce opakovatelnou metodou (Graham 2001, Martins et al. 2016). Umožňuje také proteomickou analýzu na úrovni jednotlivých buněk, což je velice důležitá schopnost, protože ejakulát je heterogenní vzorek a průměrné hodnoty mohou zakrývat významné biologické informace (Ortega-Ferrusola et al. 2017a).

Výsledky studie Johnson et al. (1995) ukazují, že nalezení jediného testu k vyhodnocení fertilizačního potenciálu spermií je stále těžko uchopitelné. Použití několika testů v kombinaci, jako je motilita, akrozomální integrita a fluorescenční hodnocení integrity membrány, by však přidalo významnou důvěryhodnost k odhadu funkce spermií.

3.10.1 Průtoková cytometrie

Funkční kapacitu spermií lze hodnotit pomocí průtokové cytometrie (viz Obrázek 6), která umožňuje stanovit životaschopnost a integritu buněk, a to s přesnějšími výsledky a v kratším čase ve srovnání s dřívějšími mikroskopickými technikami (Graham 2001; Cordelli et al. 2005; Gillan et al. 2005; Hossain et al. 2011). Průtokový cytometr dokáže během několika minut získat údaje o všech subpopulacích ve vzorku, takže je ideální pro hodnocení heterogenních populací, jako jsou spermie (Gillan et al. 2005). Analýza pomocí fluorescenční cytometrie je objektivní, přesná a vysoce opakovatelná (Ax. et al. 2000a; Martins et al. 2016). Limitujícím faktorem pro její rutinní využívání v komerčních laboratořích je však cena zařízení a také požadavek na zkušenou obsluhu (Martins et al. 2016).

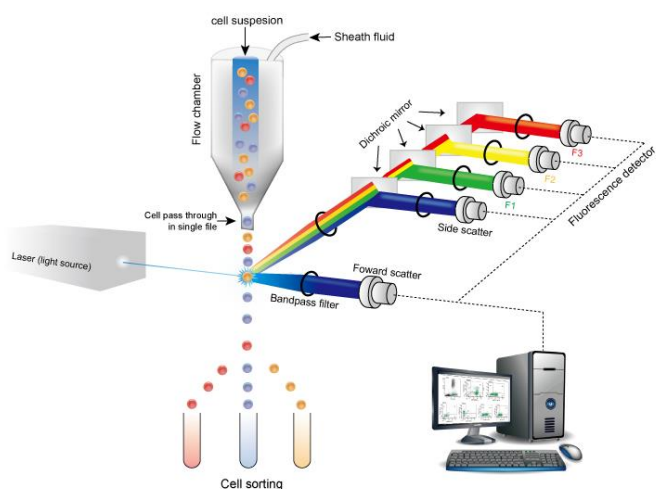
Tato metoda umožňuje změřit 50 000 buněk za méně než 1 minutu a vyhodnotit více fluorescenčních barviv spojených s jednotlivými spermii (Graham 2001). Tato vlastnost má pro analýzu spermatu další výhodu, protože jen málo parametrů jednotlivých spermií vykazuje významnou korelaci s plodností *in vivo* u spermatu v přijatelném rozmezí normality (Larsson & Rodríguez-Martínez 2000) a čím více parametrů spermií lze testovat, tím přesnější je předpověď plodnosti (Amman & Hammerstedt 1993).



Obrázek 6: Průtokový cytometr NovoCyte® 3000 (zdroj: archiv autorky)

3.10.1.1 Princip

Graham (2001) vysvětluje, že při analýzách pomocí průtokové cytometrie se spermie obarví fluorochromem a množství barviva, které každá spermie přijme, je měřeno průtokovým cytometrem. Spermie ve vzorku jsou vstříknuty do uzavřeného kanálu, kterým protéká tekutina (viz Obrázek 7). Jakmile tekutina obsahující buňky opustí uzavřený kanál, rozpadne se na jednotlivé kapky, z nichž každá obsahuje jednu buňku. Proud kapek prochází paprskem laseru, který způsobí fluorescenci všech fluorescenčních skvrn spojených se spermii. Fotonásobiče spojené s filtry, které propouštějí pouze specifické vlnové délky světla, umožňují určit, zda daná kapka obsahuje buňku či nikoli. Pokud kapka buňku obsahuje, je možné definovat, s jakými specifickými skvrnami a v jakém množství je tato buňka spojena. Protože fluorescenční sondy, které nejsou spojeny s buňkami, nejsou detekovány průtokovým cytometrem, není třeba barviva před analýzou ze vzorku vymývat. Gillan et al. (2005) konstatují, že analýza je objektivní, má vysokou úroveň opakovatelnosti a její výhodou je také možnost pracovat s malými vzorky. Průtoková cytometrie má také schopnost detekovat značení více fluorochromy spojenými s jednotlivými spermii, což znamená, že lze současně hodnotit více než jeden atribut spermií.



Obrázek 7: Princip průtokové cytometrie (zdroj: <https://www.creative-bioarray.com/support/principle-of-the-flow-cytometry.htm>)

3.10.1.2 Parametry

Průtoková cytometrie byla vyvinuta pro současné hodnocení životaschopnosti spermií, akrozomální integrity, mitochondriální funkce, stavu kapacity, fluidity membrán a stavu DNA (Graham et al. 1990; Graham 2001; Gillan et al. 2005; Hossain et al. 2011). Neustále se vyvíjejí nová fluorescenční barviva a techniky, které mají potenciální využití pro průtokové cytometrické hodnocení spermií (Gillan et al. 2005).

3.10.1.2.1 Životaschopnost spermií

Analýza životaschopnosti buněk je založena na integritě plazmazické membrány spermií. K fluorescenčnímu barvení spermií za účelem stanovení životaschopnosti lze přistupovat dvěma způsoby: fluorochromy používané k označení životaschopných buněk a fluorochromy používané k označení neživotaschopných buněk. Použití průtokového cytometru ke stanovení podílu životaschopných kančích spermií bylo vyvinuto několika laboratořemi v 80. letech 20. století. Resli et al. (1983) použili fluorescein diacetát (FDA), Garner et al. (1986) ve své studii použili 6karboxyfluorescein diacetát (CFDA) nebo byly později využívány 6karboxymethylfluorescein diacetát (CMFDA) a kalcein acetomethylester (CAM) (Donoghue et al. 1995), které bývají stabilnější než původní FDA. Barviva FDA, CFDA, CMFDA a CAM vstupují do spermií přes membránu a v životaschopných buňkách jsou esterázami přeměněny na nepropustnou fluorescenční sloučeninu, která se uchovává v cytoplazmě (Gillan et al. 2005).

Neživotaschopné buňky mohou být určeny pomocí membránově nepropustných barviv nukleových kyselin, které pozitivně identifikují mrtvé spermie penetrací do buněk s poškozenými membránami. Neporušená plazmatická membrána zabrání těmto produktům proniknout do spermie a obarvit jádro. Běžně používaná barviva zahrnují fenantridiny. Jedná se například o propidium jodid (PI; Matyus et al. 1984), ethidium homodimer-1 (EthD-1; Althouse & Hopkins 1995), kyanin Yo-Pro (Kavak et al. 2003) a bizbenzimidazol Hoechst 33258 (Gundersen & Shapiro 1984). Wilhelm et al. porovnávali plodnost kryokonzervovaných spermií hřebců s řadou laboratorních hodnocení kvality spermatu a zjistili, že životaschopnost, hodnocená průtokovou cytometrií pomocí PI, byla jediným laboratorním testem, který koreloval s plodností hřebců ($r = 0,68$). Významný vztah mezi životaschopností spermií a plodností byl také pozorován ve studiích Vicente-Fiely et al. (2014) a Santolarieho et al. (2015), které byly prováděny u beranů.

Garner et al. (1994) konstatují, že v poslední době se staly populárními membránou propustné DNA fluorochromy, jako je SYBR-14, které značí životaschopné buňky s funkčními iontovými pumpami. Hodnocení životaschopnosti spermií pomocí barvení nukleovými kyselinami je považováno za méně variabilní než barvení na bázi enzymů a DNA spermií je považována za vhodnější buněčný cíl díky své barvicí schopnosti a rovnoměrnosti barvení (Garner et al. 1996).

Fluorescenční sondy, jako je H33258, které vyžadují průtokovou cytometrickou analýzu s laserem pracujícím v ultrafialovém světle, se používají méně často, protože tato funkce není standardní součástí menších analytických přístrojů. Jednou z alternativ je však použití fluorometru. Fluorometr je relativně levné přenosné zařízení, které umožňuje rychlou analýzu vzorku. Januskauskas et al. (2001) použili H33258 k detekci neživotaschopných býčích spermií pomocí fluorometru a zjistili negativní korelaci mezi procentem poškozených buněk a pln

plodností ($r = -0,57$). Další možností jsou fluorescenční nástavce pro zařízení pro počítačovou analýzu spermatu. Například fluorescenční funkce IDENT přístroje Hamilton-Thorne IVOS umožňuje barvení pomocí H33258, díky čemuž je možné posoudit životaschopnost spermií spolu s jejich pohyblivostí. Fluorochromy používané k hodnocení životaschopnosti spermií oběma přístupy lze použít ve vzájemné kombinaci. Například při použití CFDA spolu s PI lze identifikovat tři populace buněk: živé, které jsou zbarveny zeleně, mrtvé, které jsou červené, a třetí populaci, která je obarvena oběma barvami a představuje odumírající spermie (Gillan et al. 2005). Harrison & Vickers (1990) použili tuto kombinaci s fluorescenčním mikroskopem a zjistili, že je účinným indikátorem životaschopnosti čerstvých, inkubovaných nebo chladem šokovaných spermií kance a berana.

V současnosti je jednou z nejběžněji používaných kombinací barvení životaschopnosti SYBR-14 a PI, komerčně prodávané jako LIVE/DEAD Sperm Viability Kit. Oba fluorochromy se zaměřují na stejnou buněčnou složku, což eliminuje nejednoznačnost, která může nastat, když jsou cíleny na samostatné složky. Při použití v kombinaci jádra živých spermií fluoreskují zeleně (SYBR-14) a degenerující buňky, které ztratily integritu membrány, se barví červeně (PI). Tato technika barvení byla použita u řady druhů, včetně berana (Garner & Johnson 1995). Barvení životaschopnosti lze také použít v kombinaci s barvami pro hodnocení dalších složek funkce spermií průtokovou cytometrií (Gillan et al. 2005). Ve studiích Christensena (2002) a Mocého & Grahama (2008) životaschopnost spermií vysoce korelovala s plodností.

3.10.1.2.2 Akrozomální integrita

Integrita akrozomu se měří pomocí lektinů (*Pisum sativum agglutinin* – PSA nebo *Arachis hypogaea agglutinin* – PNA) konjugovaných s fluorescencí. PSA je lektin z rostliny hrachu, který se váže na α -manózu a α -galaktózu v akrozomální matrix. Protože PSA nemůže proniknout neporušenou akrozomální membránou, obarví pouze poškozené spermie (Cross et al. 1986). Kontakt barviv s akrozomální matrix vyvolává zelenou fluorescenci (Graham et al. 1990; Graham 2001; Hossain et al. 2011). PNA je lektin z podzemnice olejné, který se váže na β -galaktózové části spojené s vnější akrozomální membránou fixovaných spermií, což indikuje buňky s neporušeným akrozomem (Mortimer et al. 1987). Předpokládá se, že *Arachis hypogaea agglutinin* vykazuje méně nespecifické vazby na jiné oblasti spermatické buňky, což vede některé pracovníky k upřednostňování tohoto aglutininu před PSA (Graham 2001). Výsledky těchto analýz umožňují identifikovat skupiny buněk s poškozenými nebo neporušenými plazmatickými membránami a/nebo akrozomy, shrnují Martins et al. (2016). Další metodou detekce akrozomální integrity je LysoTracker™ Green DND-26, který je specifický pro acidotropní orgány, jako je akrozom (Gillan et al. 2005).

3.10.1.2.3 Mitochondriální funkce

Spermie přežvýkavců se vyznačují vysokou schopností oxidativní respirace a nenarušená mitochondriální respirace je důležitá proto, aby spermie mohly úspěšně proniknout přes děložní hrdlo a zachovaly si vysokou úroveň oplozovací schopnosti. Poškození mitochondrií může významně přispívat ke špatné plodnosti pozorované po umělé inseminaci do děložního hrdla zmrazeným spermatem a může vysvětlovat zlepšení plodnosti, když se děložní hrdlo obejde a spermie se vloží přímo do dělohy (Faigl et al. 2012).

Pro hodnocení mitochondriální funkce spermií byly použity fluorochromy, Rhodamin 123 (R123) a MitoTrackerTM (MITO). Tyto fluorochromy jsou transportovány do mitochondrií během aktivního dýchání a jejich akumulace v mitochondriích způsobuje zelenou fluorescenci. Bylo zjištěno, že mitochondriální funkce dobře koreluje mezi oběma použitými metodami (R123 a MITO) a také s hodnocením životaschopnosti pomocí SYBR-14 a mikroskopickým odhadem pohyblivosti (Gillan et al. 2005). Fluorochrom JC-1 je lipofilní kationtové fluorescenční karbokyaninové barvivo, které umožňuje odlišit buňky s vysokou mitochondriální funkcí (oranžové zbarvení) od spermií se slabou mitochondriální funkcí (zelené zbarvení), což poskytuje přesnější odhad procenta spermií s vysokou mitochondriální funkcí v populaci spermií (Graham et al. 1990; Gravance et al. 2001).

3.10.1.2.4 Stav kapacity a fluidity membrán spermií

Kapacitní stav byl hodnocen pomocí změn zprostředkovaných vápníkem za použití fluorescenčního antibiotika chlortetracyklinu (CTC). Neutrální a nekomplexovaný CTC prochází buněčnou membránou spermií a vstupuje do intracelulárních prostor obsahujících volný vápník (Tsien 1989). Po vstupu do intracelulárních prostor se CTC negativně nabíjí a váže vápník, čímž se stává více fluorescenčním. Komplex CTC a vápníku se přednostně váže na hydrofobní oblasti, jako je buněčná membrána, což vede ke vzniku barevných vzorů charakteristických pro nekapacitované (F-), kapacitované (B-) a akrozomálně reagující (AR) spermie. Pozorování vzorů barvení CTC se rutinně provádí pomocí fluorescenční mikroskopie (Saling & Storey 1979) a Maxwell a Johnson (1997) ho upravili pro průtokový cytometr.

Gillan et al. (1997) pomocí fluorescenčního mikroskopu zjistili, že rozmrazené beraní spermie obsahují více buněk B-vzoru než čerstvé spermie a že se čerstvé a rozmrazené spermie chovají odlišně při koinkubaci s monovrstvami epiteliálních buněk oviduktu (OECM), jak prokázala studie Gillan et al. (2000). Rozmrazené spermie se okamžitě vázaly na OECM a začaly se uvolňovat po dvouhodinové inkubaci. Avšak pouze malá část čerstvých spermií se navázala na OECM okamžitě, přičemž jejich podíl se zvýšil na maximum po 2 hodinách a poté se postupně uvolňovaly. Změněný stav membrány rozmrazených spermií může ovlivnit jejich interakci se samičím reprodukčním traktem, a tím i plodnost.

Ke zkoumání fosfolipidových změn probíhajících v plazmatické membráně spermií lze použít také inkorporační techniky využívající značené fosfolipidové analogy a vazebné proteiny. Například 6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)aminokaproyl (C6NBD)-fosfolipidy jsou indikátory fosfolipidové asymetrie v plazmatické membráně spermie (Gadella et al. 1999).

3.10.1.2.5 Stav DNA

Průtoková cytometrie může také detekovat abnormality ve struktuře chromatinu (DNA) a monitorovat reakce během kapacity spermií, což poskytuje informace o dlouhověkosti a výkonnosti buněk (Cordelli et al. 2005; Hossain et al. 2011). Martins et al. (2016) dodávají, že průtokový cytometr je schopen rozpoznat spermie po kapacitaci, kdy dochází k odtoku cholesterolu z plazmatické membrány do semenné plazmy, což vede ke zvýšení tekutosti plazmatické membrány. Touto technikou lze také zjistit zvýšení intracelulárního volného vápníku potřebného pro kapacitaci spermií.

Stav DNA spermií lze určit pomocí metachromatických vlastností akridinové oranže (AO) v testu struktury chromatinu ve spermatu (SCSA[®]) (Evenson et al. 1980). Normální vývoj

spermii vede k chromatinové struktuře, ve které je DNA plně odolná vůči denaturaci. DNA spermii s abnormální strukturou chromatinu je však k denaturaci náchylná a rozsah této abnormality je detekován pomocí SCSA[®]. AO interkaluje dvouvláknovou DNA (nativní) fluoreskující zeleně, zatímco jednovláknová DNA (denaturovaná) fluoreskuje červeně. Poměr červené k celkové fluorescenci lze určit průtokovou cytometrií za účelem získání indexu normality/abnormality (Gillan et al. 2005). Gillan et al. (2005) dále dospěli k závěru, že tato metoda má potenciál eliminovat některé samce s nízkou plodností a může být prediktivní pro samce s vysokou plodností.

3.10.2 Zobrazovací cytometrie

Zobrazovací průtoková cytometrie (IFC) kombinuje fluorescenční mikroskopii a vysokokapacitní možnosti průtokové cytometrie, což zjednodušuje zpracování dat při zobrazování jednotlivých buněk, avšak za cenu omezené prostorové informace (Gupta et al. 2019). Tato metoda vyřešila výzvy spojené se zobrazováním buněk v průtoku zahrnující dosažení dostatečné citlivosti fluorescence, vytvoření snímků s vysokým prostorovým rozlišením, kombinaci fluorescenčního zobrazování s jinými způsoby zobrazování, jako je světlé pole (procházející světlo) nebo tmavé pole (rozptýlené světlo), a zobrazování všech buněk v průtoku.

Systém kombinuje přesnou metodu elektronického sledování pohybujících se buněk s multispektrálním zobrazovacím systémem s vysokým rozlišením, který umožňuje získat několik snímků každé buňky v různých režimech zobrazování. Dnešní komerční provedení pořizuje současně šest snímků každé buňky s fluorescenční citlivostí srovnatelnou s běžnou průtokovou cytometrií a kvalitou obrazu 40× až 60× mikroskopie (Basiji et al. 2007).

3.10.3 Limity

Navzdory výhodám průtokové cytometrie, jako je rychlost a přesnost výsledků, informace o populaci spermii v heterogenním vzorku a možnost použití malých objemů vzorků, je stále omezená kvůli vysoké ceně zařízení a potřebě zkušené obsluhy. Přestože je k dispozici kompaktní zařízení pro snadnou přepravu, má zařízení omezený počet optických filtrů, upozorňují Martins et al. (2016).

3.10.4 Budoucnost

Analýza spermatu je stále založena na světelné mikroskopii pro hodnocení počtu spermii, pohyblivosti, morfologie a integrity membrán na základě testů vylučujících barvivo. Mnoho případů samčí neplodnosti zůstává nedagnostikováno. Nedávný vývoj v biologii spermii umožňuje nové způsoby zkoumání a diagnostiky této idiopatické neplodnosti. Odhaluje se proteom spermii a rozšiřují se také znalosti o funkčnosti spermii (Ortega-Ferrusola et al. 2017b).

Jsou popsány nedávné pokroky v cytometrii, které umožňují vícenásobné analýzy v rámci jedné buňky v kombinaci s výkonnými statistickými nástroji, jako rozšiřující se podoblast ve spermatologii. Větší využívání pokročilých průtokových cytometrů v andrologických laboratořích umožní rychlý rozvoj multiparametrické, vícebarevné průtokové cytometrie, která

rozšíří klinické aplikace a výzkumné možnosti proteomických přístupů založených na průtokové cytometrii, zejména v podoborech klinické andrologie a biotechnologie spermií (Ortega-Ferrusola et al. 2017b). Kromě toho vývoj výpočetní průtokové cytometrie (Levine et al. 2015; Saeys et al. 2016) aplikované na analýzu spermií usnadní interpretaci dat a získávání dalších informací z každé konkrétní analýzy. Tento přístup byl nedávno aplikován na studii ejakulátu hřebců, kterou hodnotil vědecký tým Ortega-Ferrusola et al. (2017a). Své uplatnění najde i v chovech dalších hospodářských zvířat, kde testy pomocí průtokové cytometrie založené nebo doplněné proteomickými testy do značné míry zlepší kvalitu dávek, čímž se výrazně zvýší ziskovost tohoto odvětví (Ortega-Ferrusola et al. 2017b).

Implementace multiparametrická a výpočetní průtokové cytometrie kombinuje možnosti detekce více proteinů se studiem funkčnosti proteinů na úrovni jedné buňky. To povede k rychlému rozšíření našich znalostí o biologii spermií s využitím v reprodukční medicíně a biotechnologiích, uzavírá Ortega-Ferrusola et al. (2017b).

Roste potřeba přenosných, levných a bezúdržbových platform průtokové cytometrie pro diagnostiku a monitorování kvality spermatu. Vývoj mobilních zařízení, zejména fotoaparátů v mobilních telefonech, umožnil vznik několika nákladově efektivních a v terénu přenosných zobrazovacích technologií, včetně optofluidní mikroskopie bez objektivu a optofluidní fluorescenční zobrazovací cytometrie založené na mobilních telefonech (Cui et al. 2008; Zhu et al. 2011). Tato miniaturizovaná a automatizovaná platforma na bázi mikrofluidů, tzv. „laboratoř na čipu“ (lab-on-a-chip flow cytometry), poskytuje chvályhodnou kvalitu obrazu a v některých případech dokonce trojrozměrné zobrazení buněk (Bishara et al. 2012; Lapsley et al. 2013; Wei et al. 2013). Tyto systémy jsou však nejvhodnější pro relativně malý objem vzorku (Han et al. 2016). Současným úkolem výzkumníků je snížení nákladů a zvýšení výkonu systémů průtokové cytometrie (Lapsley et al. 2013).

3.11 Morfologie spermií

Morfologie spermií je vedle pohyblivosti jednou z charakteristik, které vysoce korelují s plodností (Arruda et al. 2011). Kruger & Coetzee (1999) konstatují, že hodnocení morfologie spermií podle přísných kritérií je jednoduchá a nákladově efektivní metoda, která může být použita jako každodenní pomůcka pro lékaře a vědce při přijímání správných klinických rozhodnutí.

Každý ejakulát obsahuje určité množství abnormálních spermií. Pokud se takové spermie vyskytují v rozmezí 8-10 %, nemají nepříznivý vliv na plodnost. V případě, že množství abnormálních spermií přesahuje 25 % celkového množství spermií v ejakulátu, lze očekávat zhoršení fertility, vysvětluje Bearden (2004). Morfologické abnormality mají největší vztah k plodnosti hospodářských zvířat. Procento abnormálních spermií se u malých přežvýkavců mění podle sezóny. Vyšší počet abnormálních spermií je pozorován na jaře, přičemž jejich množství klesá s blížícím se obdobím rozmnožování (Ax et al. 2000a).

Abnormální spermie lze klasifikovat jako spermie obsahující abnormální hlavičky (primární abnormality), cytoplazmatické kapénky (sekundární abnormality) a abnormální bičíky (terciální abnormality). Kategorie abnormálních hlaviček zahrnuje asymetrické, zužující se, hruškovité, obří, mikro a dvojité hlavy. Mezi abnormální bičíky se řadí zvětšené, zlomené, ohnuté, nitkovité, zkrácené, s dvojitou střední částí, spolu se stočenými, smyčkovými

a dvojitými bičíky. Spermie s abnormalitami bičíku jsou většinou nepohyblivé nebo vykazují sníženou pohyblivost. Cytoplazmatické kapénky jsou tvořeny na krčku spermií během spermiogeneze a obvykle se ztrácejí během dozrávání v nadvarleti. Pokud jsou takové spermie přítomny v ejakulátu, jsou považovány za nezralé a neschopné oplození (Ax et al. 2000a). Abnormální spermie je možné členit také na základě jejich předpokládaného původu (Milovanov 1940; Blom 1950). V tomto systému jsou vady, které se objevují během spermatogeneze, považovány za primární a vady, které se vyvinou po spermiogenezi, za sekundární (Chenoweth 2005).

Stres působí na nárůst abnormalit spermií. Nejprve se projeví zvýšením počtu spermií s cytoplazmatickými kapénkami, které jsou známkou toho, že proces zrání nebyl úspěšně dokončen (Bearden et al. 2004). Dle Axe et al. (2000a) tepelný stres způsobuje vysoký počet poškozených spermií. Období vysoké okolní teploty v kombinaci s vysokou vlhkostí může způsobit sterilitu samce po dobu až šesti týdnů.

De Paz et al. (2011) zdůrazňují, že přesnost hodnocení morfologie spermií závisí na pečlivé přípravě, fixaci a barvení spermií. Jednou z hlavních technik hodnocení morfologických vlastností spermií je analýza stěru spermatu na sklíčku. Pro hodnocení pod mikroskopem lze použít různé metody barvení (ružový bengál, giemsa, 3% eosin, červené kongo, eosin-nigrosin, modifikovaná Karrasova metoda) nebo metodu zvlhčené komory (Papa et al. 1988; CBRA 2013). Je možné také použít Wrightovo a Williamsovo barvení. Obarvené preparáty se zkoumají pod mikroskopem za velkého zvětšení (400×). Zkoumá se nejméně 150 spermií, přičemž abnormální spermie se rozdělují do 5 kategorií: bezbičíkaté, abnormální hlavičky, abnormální ocásky, abnormální útvary (formace) bičíku s proximální cytoplazmou, abnormální útvary bičíku s distální kapénkou (Ax et al. 2000a).

Morfologie spermií může být vyhodnocena dvěma způsoby. Prvním z nich je stanovení relativního podílu buněk v rámci předem definované morfologické kategorie a posouzení vlivu abnormálních forem na oplozovací schopnost vzorku spermatu (de Paz et al. 2011). Druhým způsobem je výpočet základních morfologických rozměrů spermií (jedná se o hlavičku, akrozom, střední část a další části spermie) a definováním základních buněčných biotypů pomocí statistických technik, které umožňují analyzovat oplozovací potenciál spermií (Kruger & Coetzee 1999).

Problém s různými parametry spermatu spočívá v absenci jednotné prahové hodnoty v literatuře, která by stanovovala fertilitu a subfertilitu. Byly však učiněny pokusy o stanovení prahové hodnoty morfologie spermií. Studie Krugera et al. (1988) měla za cíl korelovat procento normálních spermií vyhodnocených různými pozorovateli s počítačovou metodou IVOS (analyzátor morfologie spermií). Výsledky se významně nelišily a bylo zjištěno, že počítač poskytuje vynikající opakovatelnost normálních a abnormálních buněk.

3.12 Morfometrické vyšetření spermatu

3.12.1 CASMA

Nedostatečná objektivita při hodnocení morfologie spermií byla podnětem k vývoji počítačové analýzy morfometrie spermií (CASMA či ASMA), která umožňuje objektivní analýzu rozměrů hlavičky spermie (Gravance et al. 1995). Měření maximálního a minimálního průměru hlavičky spermie, procenta akrozomu (plocha akrozomu dělená plochou hlavičky) a elipsového faktoru (minimální průměr hlavičky dělený maximálním) slouží ke klasifikaci buněk podle jejich tvaru na: normální (pravidelný tvar hlavičky), zúžené, kulaté, makro a amorfní mikro (nepravidelná hlavička), dodávají Hirai et al. (2001) a Arruda et al. (2011). Systémy CASMA mají potenciál poskytovat objektivní, přesná a precizní měření spermií, avšak měření získaná ze stejného vzorku různými přístroji se mohou výrazně lišit (De Paz et al. 2011). Toto tvrzení potvrzují studie Hirai et al. (2001) a Arruda et al. (2011), které konstatují, že CASMA vykazuje velké rozdíly ve výsledcích (11 až 23 %). Může to být způsobeno několika faktory, jako je příprava vzorku (fixace a barvení buněk před hodnocením), složitost analýzy ve srovnání s jinými automatizovanými metodami a omezený počet spermií hodnocených v jednom poli.

Studie na kozlech prováděná Hidalgem et al. (2007) ukázala, že rozdíly v morfometrických měřeních spermií jsou pravděpodobně biomarkerem souvisejícím s potenciálem plodnosti a abnormální strukturou chromatinu. Vztah mezi plodností a morfometrií hlavičky u beraních spermií se liší v závislosti na metodice měření. Podle Krugera a Coetzee (1999) se nejlepších výsledků dosahuje při použití světelného mikroskopu s digitální kamerou a konvenční analýzy obrazu.

3.12.2 CASMA-F

Nedávno byla vyvinuta automatická metoda hodnocení morfometrie spermií CASMA-F, která kombinuje fluorescenční mikroskopii a analýzu obrazu s otevřeným softwarem (Yániz et al. 2012). Tato metoda omezuje faktory s potenciálním vlivem na morfometrické výsledky. Fluorescenční barvení zlepšuje kontrast mezi spermií a pozadím ve srovnání s tradičními metodami barvení a specificky označuje jádro spermie. Dobrý kontrast mezi spermií a pozadím umožňuje přesnější výběr hranic spermatických buněk a usnadňuje automatizaci morfometrie spermií. Specifické značení jádra buněk je důležité také proto, že umožňuje snadnější oddělení sousedních spermií a zvýšení koncentrace spermií s cílem zkrátit čas potřebný k jejich morfometrii. Pomocí CASMA-F lze úspěšně barvit spermie různých druhů stejnou fluorescenční sondou, což umožňuje přímé srovnání mezi druhy (Vicente-Fiel et al. 2013a, Vicente-Fiel et al. 2013b). Vicente-Fiel et al. (2014) při své studii naměřili u beranů s vysokou plodností větší plochu jader spermií, jejich obvod a délku ($P < 0,05$) stanovenou pomocí CASMA-F. Spermie s velkou a dlouhou hlavičkou byly přítomny v ejakulátu beranů s vyšší plodností i v případě studie Yánize et al (2015).

3.13 Proteomika

Proteomika je věda zabývající se studiem proteinů v genomu. Je považována za klíčovou oblast rozvíjejícího se výzkumu v postgenomické éře (Brewis 1999; Aebersold & Mann 2003; Tyers & Mann 2003). Vzhledem ke skutečnosti, že proteiny, konkrétně interakce proteinů s proteiny, jsou zodpovědné za buněčné funkce, je pro získání nových poznatků o těchto procesech rozhodující, aby byla provedena komplexní a systematická identifikace a kvantifikace proteinů exprimovaných v buňkách a tkáních. Na rozdíl od genomu není proteom stálou vlastností organismu, ale může se lišit například v důsledku stavu onemocnění, jak ve své studii popisují Banks et al. (2001). Pokroky v oblasti dvourozměrné elektroforézy pro separaci proteinů a zejména hmotnostní spektrometrie pro sekvenování peptidů, která usnadňuje identifikaci proteinů, vedly k rychlému rozšíření této oblasti v celém biomedicinském výzkumu (Blackstock & Weir 1999; Pandley & Mann 2000). Brewis & Wong (1999) a Pixton et al. (2004) míní, že spermie jsou vhodným typem buněk pro proteomické studie, protože jsou transkripčně neaktivní. Díky této vlastnosti se u nich neuvažuje o syntéze nových proteinů, jak je tomu známo u zralých buněk. Vzhledem k neschopnosti spermií syntetizovat proteiny *de novo* jsou hlavní funkce spermií, jako je motilita a kapacitace, přísně regulovány, což zahrnuje redoxně závislou tyrozinofosforylaci proteinů spermií (O'Flaherty 2015). Selhání těchto systémů však vede k oxidačnímu stresu a buněčné smrti (Morielli & O'Flaherty 2015).

Přesný odhad plodnosti beranů je nezbytný pro šlechtitelský průmysl za účelem snížení neplodnosti samců související s problémy s počítím. Z těchto faktorů spermií, které se nedají kompenzovat, je pravděpodobnější, že souvisí s řadou vnitřních determinant, včetně poškození nebo abnormalit v DNA, stavu chromatinu (Rathke et al. 2014), protaminových proteinových markerů a molekul RNA, jako jsou malé nekódující RNA (Dogan et al. 2015; Capra et al. 2017), které souvisejí s plodností samců. U nekompenzovatelné plodnosti nejsou molekulární defekty spermií zjištěné běžnými metodami. Výsledky nedávných studií naznačují, že existují základní faktory spojené se samčí plodností, a to pomocí vysoce výkonného omického výzkumu, který objasňuje odlišné transkriptomické, metabolické, genomické a proteomické biomarkery (Menezes et al. 2019; Hitit et al. 2020; Menezes et al. 2020; Özbek et al. 2021).

Výsledky studií zaměřených na kvantitativní proteomiku spermií naznačily, že množství proteinů souvisí s kvalitou spermií, plodností, kapacitací a akrozomovou reakcí (Netherton et al. 2018; Panner Selvam et al. 2019). Proteomické profilování spermií i semenné plazmy poukázalo na význam proteinových markerů spojených s fenotypy plodnosti a zmrazitelnosti spermií (Dogan et al. 2015; Aslam et al. 2019; Gomes et al. 2020). Také ve studii Pini et al. (2016) byly proteomy spermií, semenné plazmy a proteomické profily spermií berana (Zhu et al. 2020) stanoveny jako související s markery plodnosti spermií.

Studie Hitit et al. (2021) se zabývala existencí potenciálních proteinových markerů pro hodnocení kvality spermatu a odhad oplozovací schopnosti spermií beranů. Proteiny hojněji identifikované u spermií beranů s vyšší plodností (94,5±2,8 %) se převážně podílely na motilitě (GO:0001539, GO:0005929, GO:0060294). Protein akrozomální membrány SPACA3, který je uváděn jako biomarker plodnosti byl nejvíce regulovaným proteinem u beranů s vyšší plodností. U této skupiny beranů bylo také zjištěno vyšší zastoupení proteinů HADHA (hydroxyacyl-CoA dehydrogenáza/3-ketoacyl-CoA thioláza/enoyl-CoA hydratáza,

podjednotka A) a HADHB (hydroxyacyl-CoA dehydrogenáza/3-ketoacyl-CoA thioláza/enoyl-CoA hydratáza, podjednotka B), které se podílejí na produkci ATP (Asghari et al. 2017). Zatímco množství proteinu HADHA bylo již dříve pozitivně spojováno s plodností kanců, existuje také názor, že se jedná o biomarker plodnosti u beranů, protože malé množství tohoto proteinu v kryokonzervovaných spermích je spojeno s nižší pohyblivostí spermií ve srovnání s čerstvými vzorky (Peris-Frau et al. 2019).

Hitit et al. (2021) také zaznamenali vyšší zastoupení enolázy 1 (ENO1) ve spermatu beranů s vyšší plodností. Tento protein hraje důležitou roli v metabolickém procesu monokarboxylových kyselin a je zapojen do dráhy glykolýzy/glukoneogeneze (KEGG:00010). Kromě ENO1 se aldoláza A (ALDOA) a ENO4 podílejí na degradaci mastných kyselin, a mohou tak být důležitými proteiny ve spermích pro regulaci tvorby energie, a tedy i plodnosti beranů. U skupiny beranů s nižší plodností (89.4 ± 7.2 %) se ve větší míře vyskytoval protein mitochondriálního pyruvátového přenašeče 2 (MPC2), který souvisí s aktivací procesu pyruvátového metabolismu. Tato skutečnost naznačuje, že i pyruvát by mohl být důležitý pro oplozovací schopnost spermií beranů.

Ve studii Zhu et al. (2020) bylo zkoumáno složení proteinů spermií beranů a kozlů. Proteiny identifikované ve spermích malých přežvýkavců se podílejí především na metabolických drahách pro tvorbu energie a snižování oxidačního stresu. Konkrétně vyšší množství proteinů spermií u beranů souvisí s imunitní ochrannou a kapacitací aktivitou, zatímco proteiny, které inhibují kapacitaci spermií, vykazují větší množství u kozlů. Ukazuje se, že pro dosažení vysoké kvality zmrazených spermií by se kryokonzervace spermií u kozlů měla lišit od kryokonzervace u beranů. Kromě toho by tyto rozdílné proteiny mohly být cílem výzkumu pro zlepšení umělé inseminace.

3.14 Transkriptomika spermií

Nová studie Donnellana et al. (2022) se zaměřila na hodnocení exprese mRNA a miRNA ve spermích býků s cílem vysvětlit variabilitu v jejich plodnosti. I když centra umělé inseminace provádějí důkladné laboratorní kontroly kvality spermatu, především na základě pohyblivosti a morfologických parametrů spermií po rozmrazení, býci se mohou stále výrazně lišit ve své plodnosti v terénu. Mezi býky používanými komerčně pro AI, kteří prošli rutinními kontrolami kvality spermatu, mohou být až 25% rozdíly v míře početí (Larson & Miller 2000). Navzdory různým vícerozměrným a statistickým přístupům, které byly vyvinuty, žádný jednotlivý test ani kombinace testů nedokáže spolehlivě a konzistentně předpovědět plodnost v terénu. To je zřejmé z prací Sellema et al. (2015) i Bernecice et al. (2021), kteří dokázali vysvětlit přibližně 40 %, resp. 47 % variability plodnosti holštýnských býků pomocí hodnocení parametrů založených na průtokové cytometrii a CASA. Nedávná studie Narudy et al. (2020) zvýšila vysvětlenou variabilitu v polní plodnosti býků na 59 % přidáním měření intracelulárních metabolitů a vybraných stopových prvků (jako jsou aminokyseliny, Fe a Zn) ve spermích norských červených býků. To naznačuje, že další faktory, jako jsou specifické biochemické a/nebo molekulární charakteristiky spermií, by mohly vysvětlit část zbývající variability a jejich hodnocení by mohlo zlepšit předpověď plodnosti býků (Donnellan et al. 2022).

Byla provedena řada studií, které se snažily rozluštit úlohu mRNA v plodnosti býků a uváděly souvislosti s expresí určitých mRNA s kvalitou spermatu a mírou zabřeznutí

plemeníků, jako jsou transkripty genů CRISP2, CCT8 a PEBP1 (Arangasamy et al. 2011), AK1, IB5, TIMP2 a PLCz1 (Kasimanickam et al. 2012), PRM1 (Ganguly et al. 2013), ADIPOQ, AR1 a AR2 (Kasimanickam et al. 2013), BMP2 a TRADD (Parthipan et al. 2017), AQP7 (Kasimanickam et al. 2017) nebo CB1 a FAAH (Kumar et al. 2018). V nedávné studii využívající metodu RNA-seq Card a jeho kolegové identifikovali 3 227, respektive 5 366 transkriptů, které jsou ve spermiích rozdílně exprimovány mezi populacemi býků s vysokou a nízkou plodností (Card et al. 2017).

MiRNA fungují zejména při potlačování RNA a posttranskripční regulaci genové exprese. Podobně jako u mRNA byla identifikována rozdílná exprese miRNA mezi býky, kteří se liší z hlediska plodnosti, například bta-miR-502-5p a bta-miR-1249-3p (Fagerlind et al. 2015) nebo bta-miR-15a a bta-miR-29b (Menezes et al. 2020). Capra et al. (2017) identifikovali 83 rozdílně exprimovaných miRNA mezi býky s vysokou a nízkou pohyblivostí spermií, přičemž tyto miRNA cílí na biologické dráhy související s apoptózou. Nedávno Turri et al. (2021) uvedli 13 diferenciálně exprimovaných miRNA mezi býky s nízkou a vysokou plodností, přičemž miR-423-3p byla vysoce exprimována mezi býky s nízkou plodností, o níž je známo, že je spojena s těžkou astenozoospermií u lidských spermií. Ve stejné studii měla miR-191 zvýšenou expresi u býků s vysokou plodností a již dříve byla pozitivně spojena s mírou oplození blastocyst (Xu et al. 2020).

Cílem studie Donnellana et al. (2022) bylo identifikovat rozdílně exprimované mRNA a miRNA ve spermiích populace býků se spolehlivě odlišnou plodností. Mezi seznamem nejvíce exprimovaných mRNA bylo pět již popsáno v předchozích publikacích: transkripty genů PRM1, CHMP5, CCDC18, HMBG4 a KIF5C (Card et al. 2013; Card et al. 2017; Selvaraju et al. 2017). Nejvíce exprimované miRNA identifikované v této studii jsou podobné těm, které popsali Sellem et al. (2020), přičemž nejvíce exprimovanou miRNA je bta-miR-100 a 13 z 20 miRNA je společných pro obě studie. Toto překrytí dvou studií využívajících zcela nezávislé skupiny býků dodává zjištěním na validitě. Stejně jako v případě mRNA-seq odhalila analýza miRNA pouze 13 rozdílně exprimovaných miRNA. Nicméně několik z těchto miRNA je v souvislosti s plodností obzvláště důležitých. Zejména bta-miR-155, měla zvýšenou expresi ve varlatech kuřat s nízkou pohyblivostí spermií (Liu et al. 2018). Podobně i ve studii Donnellana et al. (2022) byla tato miRNA u býků s vysokou plodností snížena. Na základě hodnocení mRNA a miRNA ze spermií stejných jedinců v této studii je zdůrazněna důležitá účast PRM1 a miRNA na plodnosti býků. Jejich začlenění jako biomarkerů do profylaktického screeningu spermatu býků poskytne další vhled do biologie nevysvětlitelných rozdílů v polní plodnosti mezi býky vykazujícími přijatelné funkční a morfologické charakteristiky spermií. Hodnocení spermií pomocí transkriptomiky může být využito i v případě malých přežvýkavců, jak potvrzuje studie Warra et al. (2023).

4 Závěr

- Ovce a kozy se významně podílejí na celosvětové produkci masa, mléka, vlny a kůže. V neustále rostoucí světové populaci hrají malí přežvýkavci významnou roli především pro ekonomiky rozvojových zemí, a to zejména těch, které mají drsné klimatické podmínky nebo neúrodnou půdu. Zlepšení umělé inseminace je proto žádoucí nejen u skotu, kde je umělá inseminace běžně využívanou praktikou. U ovcí a koz může také významně přispět k lepší ekonomice a zajištění dostatku potravin nejen v rozvojových zemích.
- Znalost oplozovací schopnosti inseminačních dávek již v laboratoři by umožnila využívat k umělé inseminaci pouze kvalitní materiál, který by zajistil vysokou úspěšnost zabřezávání a zefektivnil celý proces. Za tímto účelem je prováděno mnoho studií. Přesné predikce fertilizační schopnosti ID pomocí *in vitro* analýz však ještě nebylo dosaženo. Výzkumníci citovaní v této práci se shodují, že hodnocení více parametrů spermií najednou zvyšuje přesnost predikce fertilizační schopnosti daných vzorků spermatu.
- Motilitu a životaschopnost spermií lze však považovat za vlastnosti, které vysoce korelují s oplozením. Výsledky zkoumaných studií naznačují, že dnes využívané přístroje CASA a průtoková cytometrie mohou k předpovědi významně pomoci. Je však zapotřebí dalších studií, zdokonalení dnes používaných přístrojů a zlepšení jejich finanční dostupnosti pro širší využití. Mám v plánu se touto problematikou zabývat i nadále v mé navazující diplomové práci.

5 Literatura

- Aebersold R, Mann M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**:198-207.
- Agarwal A, Selvam MKP, Sharma R, Master K, Sharma A, Gupta S, Henkel R. 2018. Home sperm testing device versus laboratory sperm quality analyzer: comparison of motile sperm concentration. *Fertility and Sterility* **110**:1277-1284.
- Almquist JO, Grube KE, Rosenberger JL. 1982. Effect of thawing time on fertility of bovine spermatozoa in French straws. *Journal of Dairy Science* **65**:824-827.
- Althouse G. 2007. Artificial Insemination. Pages 159-169 in Schatten H, Constantinescu GM, editors. *Comparative reproductive biology*. Blackwell Publishing, Iowa.
- Althouse GC, Hopkins SM. 1995. Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. *Theriogenology* **43**:595-603.
- Amann RP, Hammerstedt RH. 1993. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. *Journal of Andrology* **14**:397-406.
- Amann RP, Waberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* **81**:5-17.
- Amiridis GS, Cseh S. 2012. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science* **130**:152-161.
- Anghel A, Zamfirescu S, Dragomir C, Nadolu D, Elena S, Florica B. 2010. The effects of antioxidants on the cytological parameters of cryopreserved buck semen. *Romanian Biotechnological Letters* **15**:26-32.
- Arangasamy A, Kasimanickam VR, DeJarnette JM, Kasimanickam RK. 2011. Association of CRISP2, CCT8, PEBP1 mRNA abundance in sperm and sire conception rate in Holstein bulls. *Theriogenology* **76**:570-577.
- Arruda RP, Celeghini EC, Andrade AFC, Garcia AR, Nascimento J, Raphael CF, Souza LWO. 2005. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada 166-179.
- Arruda RP, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira LZ, Nascimento J, Silva DF, Affonso FJ, Lemes KM, Jaimes JD. 2011. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **35**:145-151.
- Asghari A, Marashi SA, Ansari-Pour N. 2017. A sperm-specific proteome-scale metabolic network model identifies non-glycolytic genes for energy deficiency in asthenozoospermia. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **63**:100-112.
- Aslam MK, Kumaresan A, Yadav S, Mohanty TK, Datta TK. 2019. Comparative proteomic analysis of high-and low-fertile buffalo bull spermatozoa for identification of fertility-associated proteins. *Reproduction in Domestic Animals* **54**:786-794.

- Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. 2000a. Semen Evaluation. Pages 365-375 in Hafez B, Hafez ESE, editors. *Reproduction in farm animals seventh edition*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Ax RL, Dally MR, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. 2000b. Artificial Insemination. Pages 376-389 in Hafez B, Hafez ESE, editors. *Reproduction in farm animals seventh edition*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Baldassarre H. 2016. Advanced Reproductive Technologies in Small Ruminants in Seneda MM, Silva-Santos KC, Marinho LSR, editors. *Biotechnology of Animal Reproduction*. Nova Science Publishers, Inc., New York.
- Banks RE, Dunn MJ, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Blackstock W, Pappin DJ, Selby PJ. 2000. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *The Lancet* **356**:1749-1756.
- Banner M. 1995. Report on Secretary of State's Working Party on the Ethical Implications of Advanced Breeding Techniques for Farm Animals HMSO.
- Basiji DA, Ortyn WE, Liang L, Venkatachalam V, Morrissey P. 2007. Cellular image analysis and imaging by flow cytometry. *Clinics in Laboratory Medicine* **27**:653-670.
- Bath GF. 1998. Management of pain in production animals. *Applied Animal Behaviour Science* **59**: 147-156.
- Bearden HJ, Fuquay JW, Willard ST. 2004. *Applied animal reproduction sixth edition*. Pearson Education Upper Saddle River, New Jersey.
- Bergstein-Galan TG, Busato EM, Abreu ACM, Weiss RR. 2017. Artificial Insemination and Embryo Transfer in Small Ruminants. *Reproduction Biotechnology in Farm Animals* 181-199.
- Bergstein-Galan TG, Weiss RR, Bertol MAF, Abreu ACMR, Busato E, Kozicki LE, Bicudo SD. 2017. Quality and fertility of frozen ovine spermatozoa from epididymides stored at room temperature (18–25 °C) for up to 48 h post mortem. *Theriogenology* **96**:69-75.
- Bernećić NC, Donnellan E, O'Callaghan E, Kupisiewicz K, O'Meara C, Weldon K, Lonergan P, Kenny DA, Fair S. 2021. Comprehensive functional analysis reveals that acrosome integrity and viability are key variables distinguishing artificial insemination bulls of varying fertility. *Journal of Dairy Science* **104**:11226-11241.
- Bishara W, Isikman SO, Ozcan A. 2012. Lensfree optofluidic microscopy and tomography. *Annals of Biomedical Engineering* **40**:251-262.
- Blackstock WP, Weir MP. 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends in Biotechnology* **17**:121-127.
- Blom E. 1950. Interpretation of spermatid cytology in bulls. *Fertility and Sterility* **1**:223-230.
- Brewis IA, Wong CH. 1999. Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *Reviews of Reproduction* **4**:135-142.
- Brewis IA. 1999. Proteomics in reproductive research: the potential importance of proteomics to research in reproduction. *Human Reproduction* **14**:2927-2929.

- Brindley GS. 1981. Electroejaculation: its technique, neurological implications and uses. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **44**: 9-18.
- Bulgin MS. 1992. Ram breeding soundness and SFT form. *Proceedings of the Society for theriogenology* 210-215.
- Capra E, Turri F, Lazzari B, Cremonesi P, Gliozzi TM, Fojadelli I, Stella A, Pizzi F. 2017. Small RNA sequencing of cryopreserved semen from single bull revealed altered miRNAs and piRNAs expression between High-and Low-motile sperm populations. *BMC genomics* **18**:1-12.
- Card CJ, Anderson EJ, Zamberlan S, Krieger KE, Kaproth M, Sartini BL. 2013. Cryopreserved bovine spermatozoal transcript profile as revealed by high-throughput ribonucleic acid sequencing. *Biology of Reproduction* **88**:49,1-9.
- Card CJ, Krieger KE, Kaproth M, Sartini BL. 2017. Oligo-dT selected spermatozoal transcript profiles differ among higher and lower fertility dairy sires. *Animal Reproduction Science* **177**:105-123.
- Card CJ, Krieger KE, Kaproth M, Sartini BL. 2017. Oligo-dT selected spermatozoal transcript profiles differ among higher and lower fertility dairy sires. *Animal Reproduction Science* **177**:105-123.
- Castellini C, Dal Bosco A, Ruggeri S, Collodel G. 2011. What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis?. *Fertility and Sterility* **96**:24-27.
- Cbra. 2013. *Manual Para Exame Andrológico de Sêmen Animal*. Belo Horizonte 104.
- Cordelli E, Eleuteri P, Leter G, Rescia M, Spanò M. 2005. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. *Contraception* **72**:273-279.
- Cox JF, Alfaro V, Montenegro V, Rodriguez-Martinez H. 2006. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology* **66**:860-867.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. 1986. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research* **15**:213-226.
- Cui X, Lee LM, Heng X, Zhong W, Sternberg PW, Psaltis D, Yang C. 2008. Lensless high-resolution on-chip optofluidic microscopes for *Caenorhabditis elegans* and cell imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**:10670-10675.
- David I, Kohnke P, Lagriffoul G, Praud O, Plouarboué F, Degond P, Druart X. 2015. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Animal Reproduction Science* **161**:75-81.
- David I, Robert-Granié C, Manfredi E, Lagriffoul G, Bodin L. 2008. Environmental and genetic variation factors of artificial insemination success in French dairy sheep. *Animal* **2**:979-986.

- de Paz P, Mata-Campuzano M, Tizado EJ, Álvarez M, Álvarez-Rodríguez M, Herraes P, Anel L. 2011. The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition and analysis used. *Theriogenology* **76**:1313-1325.
- Degond P, Dimarco G, Mac TBN, Wang N. 2014. Macroscopic models of collective motion with repulsion. arXiv:1404.4886.
- Degond P, Yu H. 2015. Self-organized hydrodynamics in an annular domain: Modal analysis and nonlinear effects. *Mathematical Models and Methods in Applied Sciences* **25**:495-519.
- Desnoyers L, Manjunath P. 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *Journal of Biological Chemistry* **267**:10149-10155.
- Dogan S, Vargovic P, Oliveira R, Belser LE, Kaya A, Moura A, Sutovsky P, Parrish J, Topper E, Memili E. 2015. Sperm protamine-status correlates to the fertility of breeding bulls. *Biology of Reproduction* **92**:92, 1-9.
- Donnellan EM, et al. 2022. Identification of differentially expressed mRNAs and miRNAs in spermatozoa of bulls of varying fertility. *Frontiers in Veterinary Science* **9**:993561.
- Donoghue AM, Garner DL, Donoghue DJ, Johnson LA. 1995. Viability assessment of turkey sperm using fluorescent staining and flow cytometry. *Poultry Science* **74**:1191-1200.
- Dorado J, Molina I, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M. 2010b. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. *Theriogenology* **74**:795-804.
- Dorado J, Munoz-Serrano A, Hidalgo M. 2010a. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Animal Reproduction Science* **121**:115-123.
- Dott HM, Foster GCA. 1979. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer. *Reproduction* **55**:161-166.
- Egeberg DL, Kjærulff S, Hansen C, Petersen JH, Glensbjerg M, Skakkebæk NE, Jørgensen N, Almstrup K. 2013. Image cytometer method for automated assessment of human spermatozoa concentration. *Andrology* **1**:615-623.
- Evans G, Maxwell WC. 1987. Salamons' artificial insemination of sheep and goats. Butterworths, Sydney.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* **210**:1131-1133.
- Fagerlind M, Stålhammar H, Olsson B, Klinga-Levan K. 2015. Expression of miRNAs in Bull Spermatozoa Correlates with Fertility Rates. *Reproduction in Domestic Animals* **50**:587-594.
- Faigl V, Vass N, Jávora A, Kulcsár M, Solti L, Amiridis G, Cseh S. 2012. Artificial insemination of small ruminants – A review. *Acta Veterinaria Hungarica* **60**:115-129.

- Farrel PB, Presicce GA, Brackett CC, Foote RH. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer assisted sperm analyses (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* **49**:871–879.
- Field TG, Taylor RE. 2008. *Scientific Farm Animal Production: An Introduction to Animal Science*. Prentice Hall, New Jersey.
- Foote RH. 1999. Artificial insemination from the origins up to today. In *Proceedings of the International Symposium. From the first artificial insemination to the modern reproduction biotechnologies: traditional ways and the new frontiers of animal production*. Reggio Emilia, Italy.
- Gadella BM, Miller NGA, Colenbrander B, Van Golde LMG, Harrison RAP. 1999. Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: Elimination of labeling artifacts. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* **53**:108-125.
- Gaillard C, Kupferschmied H. 1982. Thawing time and nonreturn rate of bovine semen frozen in fine French straws. *Theriogenology* **18**:487-495.
- Ganguly I, Gaur GK, Kumar S, Mandal DK, Kumar M, Singh U, Kumar S, Sharma A. 2013. Differential expression of protamine 1 and 2 genes in mature spermatozoa of normal and motility impaired semen producing crossbred Frieswal (HF×Sahiwal) bulls. *Research in Veterinary Science* **94**:256-262.
- García-Vázquez FA, Gadea J, Matás C, Holt WV. 2016. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian Journal of Andrology* **18**:844-850.
- Garner DL, Dobrinsky JR, Welch GR, Johnson LA. 1996. Porcine sperm viability, oocyte fertilization and embryo development after staining spermatozoa with SYBR-14. *Theriogenology* **45**:1103-1113.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. Pages 96-109 in Hafez B, Hafez ESE, editors. *Reproduction in farm animals 7th edition*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL, Haugland RP. 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *Journal of Andrology* **15**:620-629.
- Garner DL, Johnson LA. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction* **53**:276-284.
- Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM. 1986. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction* **34**:127-138.
- Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development* **9**:481-488.

- Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. 2000. The interaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa with oviducal epithelial cells *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development* **12**:237-244.
- Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* **63**:445-457.
- Gomes FP, Park R, Viana AG, Fernandez-Costa C, Topper E, Kaya A, Memili E, Yates JR, Moura AA. 2020. Protein signatures of seminal plasma from bulls with contrasting frozen-thawed sperm viability. *Scientific Reports* **10**:14661.
- González-Marín C, Góngora CE, Moreno JF, Vishwanath R. 2021. Small ruminant SexedULTRA™ sperm sex-sorting: Status report and recent developments. *Theriogenology* **162**:67-73.
- Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH. 1990. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction* **43**:55-64.
- Graham JK, Mocé E. 2005. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* **64**:492-504.
- Graham JK. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science* **68**:239-247.
- Gravance CG, Garner DL, Miller MG, Berger T. 2000. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function☆. *Reproductive Toxicology* **15**:5-10.
- Gravance CG, Lewis KM, Casey PJ. 1995. Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. *Theriogenology* **44**:989-1002.
- Gundersen GG, Shapiro BM. 1984. Sperm surface proteins persist after fertilization. *The Journal of Cell Biology* **99**:1343-1353.
- Gupta A, et al. 2019. Deep learning in image cytometry: a review. *Cytometry Part A* **95**:366-380.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. Fertilization and Cleavage. Pages 110-125 in Hafez B, Hafez ESE, editors. *Reproduction in farm animals 7th edition*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Han Y, Gu Y, Zhang AC, Lo YH. 2016. Imaging technologies for flow cytometry. *Lab on a Chip* **16**:4639-4647.
- Harrison RAP, Vickers SE. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Reproduction* **88**:343-352.
- Hidalgo M, Rodriguez I, Dorado JM. 2007. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Animal Reproduction Science* **100**:61-72.

- Hirai M, Boersma A, Hoeflich A, Wolf E, Föll J, Aumüller R, Braun J. 2001. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *Journal of Andrology* **22**:104-110.
- Hitit M, et al. 2021. Proteomic fertility markers in ram sperm. *Animal Reproduction Science* **235**.
- Hitit M, Ugur MR, Dinh TTN, Sajeev D, Kaya A, Topper E, Tan W, Memili E. 2020. Cellular and functional physiopathology of bull sperm with altered sperm freezability. *Frontiers in Veterinary Science* **7**:581137.
- Höfner L, Luther AM, Waberski D. 2020. The role of seminal plasma in the liquid storage of spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **220**:106290.
- Holt WV, Fazeli A. 2016. Sperm selection in the female mammalian reproductive tract. Focus on the oviduct: hypotheses, mechanisms, and new opportunities. *Theriogenology* **85**:105-112.
- Holt WV. 1995. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reproduction in Domestic Animals* **31**:17-24.
- 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**:406-419.
- Chang MC, Walton A. 1940. The effects of low temperature and acclimatization on the respiratory activity and survival of ram spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society B:Biological Sciences* **129**:517-527.
- Chelucci S, Pasciu V, Succu S, Addis D, Leoni GG, Manca ME, Naitana S, Berlinguer F. 2015. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology* **83**:1064-1074.
- Chenoweth PJ. 2005. Genetic sperm defects. *Theriogenology* **64**:457-468.
- Cheon WH, Park HJ, Park MJ, Lim MY, Park JH, Kang BJ, Park NC. 2019. Validation of a smartphone-based, computer-assisted sperm analysis system compared with laboratory-based manual microscopic semen analysis and computer-assisted semen analysis. *Investigative and Clinical Urology* **60**:380-387.
- Christensen P. 2002. Danish semen analysis: fertility vs. quality tests. Proc. 19th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod. Natl. Assoc. Anim. Breeders, Columbia.
- Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 2001. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology* **55**:947-961.
- Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* **60**:743-758.

- Jiménez-Rabadán P, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Álvaro-García PJ, Del Olmo E, Pérez-Guzmán MD, Fernández-Santos MR, Garde JJ, Soler, A. J. 2013. Improved cryopreservation protocol for Blanca-Celtibérica buck semen collected by electroejaculation. *Cryobiology* **67**:251-257.
- Jiménez-Rabadán P, Soler AJ, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Iniesta-Cuerda M, Fernández-Santos MR, Montoro V, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ. 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science* **167**:103-108.
- Johnson LA, Maxwell WMC, Dobrinsky JR, Welch GR. 1995. Staining sperm for viability assessment. *Reproduction in Domestic Animals* **31**:37-47.
- Kasimanickam R, Kasimanickam V, Pelzer KD, Dascanio JJ. 2007. Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4 °C. *Animal Reproduction Science* **101**:60-73.
- Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Arangasamy A, Kastelic JP. 2017. Associations of hypoosmotic swelling test, relative sperm volume shift, aquaporin7 mRNA abundance and bull fertility estimates. *Theriogenology* **89**:162-168.
- Kasimanickam V, Kasimanickam R, Arangasamy A, Saberivand A, Stevenson JS, Kastelic JP. 2012. Association between mRNA abundance of functional sperm function proteins and fertility of Holstein bulls. *Theriogenology* **78**:2007-2019.
- Kasimanickam VR, Kasimanickam RK, Kastelic JP, Stevenson JS. 2013. Associations of adiponectin and fertility estimates in Holstein bulls. *Theriogenology* **79**:766-777.
- Kavak A, Johannisson A, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H, Aidnik M, Einarsson S. 2003. Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science* **76**:205-216.
- Killen ID, Caffery GJ. 1982. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. *Australian Veterinary Journal* **59**:95.
- King ME, McKelvey WAC, Dingwall WS, Matthews KP, Gebbie FE, Mylne MJA, Stewart E, Robinson JJ. 2004. Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. *Theriogenology* **62**:1236-1244.
- Kobori Y, Pfanner P, Prins GS, Niederberger C. 2016. Novel device for male infertility screening with single-ball lens microscope and smartphone. *Fertility and Sterility* **106**:574-578.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. 1988. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* **49**:112-117.
- Kruger TF, Coetzee K. 1999. The role of sperm morphology in assisted reproduction. *Human Reproduction Update* **5**:172-178.

- Kumar V, Kumaresan A, Nag P, Kumar P, Datta TK, Baithalu RK, Mohanty TK. 2018. Transcriptional abundance of type-1 endocannabinoid receptor (CB1) and fatty acid amide hydrolase (FAAH) in bull spermatozoa: Relationship with field fertility. *Theriogenology* **114**:252-257.
- Lapsley MI, Wang L, Huang TJ. 2013. On-chip flow cytometry: where is it now and where is it going?. *Biomarkers in Medicine* **7**:75-78.
- Larson JL, Miller DJ. 2000. Can relative spermatozoal galactosyltransferase activity be predictive of dairy bull fertility?. *Journal of Dairy Science* **83**:2473-2479.
- Larsson B, Rodríguez-Martínez H. 2000. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility?. *Animal Reproduction Science* **60**:327-336.
- Leahy T, De Graaf SP. 2012. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. *Reproduction in Domestic Animals* **47**:207-213.
- Levine JH, et al. 2015. Data-driven phenotypic dissection of AML reveals progenitor-like cells that correlate with prognosis. *Cell* **162**:184-197.
- Liu Y, Sun Y, Li Y, Bai H, Xu S, Xu H, Ni A, Yang N, Chen J. 2018. Identification and differential expression of microRNAs in the testis of chicken with high and low sperm motility. *Theriogenology* **122**:94-101.
- Macías A, Martín E, Laviña A, Ferrer LM, Lidón I, Rebollar R, Tejedor MT. 2020. Cervical artificial insemination in sheep: sperm volume and concentration using an antiretrograde flow device. *Animal Reproduction Science* **221**:106551.
- Mann T. 1964. *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. Methuen & Co, London.
- Martins MIM, Souza FF, Souza AK, Morotti F. 2016. *Methods and Advances in Semen Analysis in Seneda MM, Silva-Santos KC, Marinho LSR, editors. Biotechnology of Animal Reproduction*. Nova Science Publishers, Inc., New York.
- Matos DL, Araújo AA, Roberto IG, Toniolli R. 2008. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim* **32**:225-232.
- Mattner PE. 1966. Formation and retention of the spermatozoan reservoir in the cervix of the ruminant. *Nature* **212**:1479-1480.
- Matyus L, Szabo G, Resli I, Gaspar R, Damjanovich S. 1984. Flow cytometric analysis of viability of bull sperm cells. *Acta Biochimica et Biophysica; Academiae Scientiarum Hungaricae* **19**:209-214.
- Maxwell WM, Salamon S. 1993. Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction, Fertility and Development* **5**:613-638.
- Maxwell WMC, De Graaf SP, Ghaoui REH, Evans G. 2007. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society of Reproduction and Fertility supplement* **64**:13-38.

- Maxwell WMC, Johnson LA. 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* **46**:408-418.
- Maxwell WMC, Johnson LA. 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* **52**:1353-1362.
- Mazur P. 1985. Basic concepts in freezing cells. Oak Ridge National Lab., USA.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology* **57**:327-344.
- Menezes EB, Velho ALC, Santos F, Dinh T, Kaya A, Topper E, Moura AA, Memili E. 2019. Uncovering sperm metabolome to discover biomarkers for bull fertility. *BMC Genomics* **20**:1-16.
- Menezes ES, et al. 2020. Sperm miR-15a and miR-29b are associated with bull fertility. *Andrologia* 52 (e13412) DOI: 10.1111/and.13412.
- Milovanov VK. 1940. Artificial insemination of farm animals. Seljhozgiz, Moscow.
- Miró J, Taberner E, Rivera M, Peña A, Medrano A, Rigau T, Peñalba A. 2009. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. *Theriogenology* **72**:1017-1022.
- Mocé E, Graham JK. 2008. *In vitro* evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science* **105**:104-118.
- Morielli T, O'Flaherty C. 2015. Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa. *Reproduction* **149**:113-123.
- Morotti F, Barreiros TRR, Blaschi W, Dos Santos GMG. 2016. Advances of Artificial Insemination in Cattle in Seneda MM, Silva-Santos KC, Marinho LSR, editors. *Biotechnology of Animal Reproduction*. Nova Science Publishers, Inc., New York.
- Mortimer D, Curtis EF, Miller RG. 1987. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *Reproduction* **81**:127-135.
- Mortimer ST, Van der Horst G, Mortimer D. 2015. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology* **17**:545-553.
- Mortimer ST. 2000. CASA—practical aspects. *Journal of andrology* **21**:515-524.
- Narud B, et al. 2020. Differences in sperm functionality and intracellular metabolites in Norwegian Red bulls of contrasting fertility. *Theriogenology* **157**:24-32.
- Netherton JK, Hetherington L, Ogle RA, Velkov T, Baker MA. 2018. Proteomic analysis of good-and poor-quality human sperm demonstrates that several proteins are routinely aberrantly regulated. *Biology of Reproduction* **99**:395-408.
- Nicander L, Bane A. 1966. Fine structure of the sperm head in some mammals, with particular reference to the acrosome and the subacrosomal substance. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* **72**:496-515.

- Nur Z, Zik B, Ustuner B, Sagirkaya H, Ozguden CG. 2010. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology* **73**:1267-1275.
- O'Flaherty C. 2015. Redox regulation of mammalian sperm capacitation. *Asian Journal of Andrology* **17**:583-590.
- O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction* **17**:704-709.
- Orihuela A, Aguirre V, Hernandez C, Flores-Perez I, Vázquez R. 2009. Breaking down the effect of electro-ejaculation on the serum cortisol response, heart and respiratory rates in hair sheep (*Ovis aries*). *Journal of Animal and Veterinary Advances* **8**:1968-1972.
- Ortega-Ferrusola C, et al. 2017a. Computational flow cytometry reveals that cryopreservation induces spermptosis but subpopulations of spermatozoa may experience capacitation-like changes. *Reproduction* **153**:293-304.
- Ortega-Ferrusola C, Gil MC, Rodríguez-Martínez H, Anel L, Peña FJ, Martín-Muñoz P. 2017b. Flow cytometry in Spermatology: A bright future ahead. *Reproduction in Domestic Animals* **52**:921-931.
- Özbek M, Hitit M, Kaya A, Jousan FD, Memili E. 2021. Sperm functional genome associated with bull fertility. *Frontiers in Veterinary Science* **8**:610888.
- Pandey A, Mann M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**:837-846.
- Panner Selvam MK, Agarwal A, Pushparaj PN. 2019. A quantitative global proteomics approach to understanding the functional pathways dysregulated in the spermatozoa of asthenozoospermic testicular cancer patients. *Andrology* **7**:454-462.
- Papa FO, Alvarenga MA, Bicudo SD, Lopes MD, Ramires PRN. 1988. Coloração espermática segundo Karras modificado pelo emprego do Barbatimão (*Sthyphnodendrum barbatiman*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **40**:115-123.
- Parthipan S, Selvaraju S, Somashekar L, Arangasamy A, Sivaram M, Ravindra JP. 2017. Spermatozoal transcripts expression levels are predictive of semen quality and conception rate in bulls (*Bos taurus*). *Theriogenology* **98**:41-49.
- Peris-Frau P, Martín-Maestro A, Iniesta-Cuerda M, Sánchez-Ajofrín I, Mateos-Hernández L, Garde JJ, Villar M, Soler AJ. 2019. Freezing–thawing procedures remodel the proteome of ram sperm before and after in vitro capacitation. *International Journal of Molecular Sciences* **20**:4596.
- Pini T, Leahy T, Soleilhavoup C, Tsikis G, Labas V, Combes-Soia L, Harichaux G, Rickard JP, Druart X, De Graaf SP. 2016. Proteomic investigation of ram spermatozoa and the proteins conferred by seminal plasma. *Journal of proteome research* **15**:3700-3711.
- Pixton KL, Deeks ED, Flesch FM, Moseley FL, Björndahl L, Ashton PR, Barratt CL, Brewis IA. 2004. Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: Case report. *Human Reproduction* **19**:1438-1447.

- Poiani A. 2006. Complexity of seminal fluid: a review. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **60**:289-310.
- Rathke C, Baarends WM, Awe S, Renkawitz-Pohl R. 2014. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1839**:155-168.
- Resli I, Gaspar R, Szabo G, Matyus L, Damjanovich S. 1983. Biophysical analysis of fertility of sperm cells. *Magyar Allatorvosok Lapja* **38**:38-41.
- Robayo I, Montenegro V, Valdés C, Cox JF. 2008. CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reproduction in Domestic Animals* **43**:393-399.
- Rodríguez-Martínez H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?. *Reproduction in Domestic Animals* **38**:312-318.
- Roof DJ, Bowley S, Price LL, Matsas DJ. 2012. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology* **77**:412-420.
- Sabés-Alsina M, Tallo-Parra O, Mogas MT, Morrell JM, Lopez-Bejar M. 2016. Heat stress has an effect on motility and metabolic activity of rabbit spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **173**:18-23.
- Saeyns Y, Van Gassen S, Lambrecht BN. 2016. Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. *Nature Reviews Immunology* **16**:449-462.
- Saha A, Asaduzzaman M, Bari FY. 2022. Cryopreservation techniques for ram sperm. *Veterinary Medicine International* **2022**.
- Salamon S, Maxwell WMC. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science* **37**:185-249.
- Salamon S, Maxwell WMC. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* **62**:77-111.
- Saling PM, Storey BT. 1979. Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *The Journal of Cell Biology* **83**:544-555.
- Sánchez-Partida LG, Windsor DP, Eppleston J, Setchell BP, Maxwell WC. 1999. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *Journal of Andrology* **20**:280-288.
- Santolaria P, Vicente-Fiel S, Palacín I, Fantova E, Blasco ME, Silvestre MA, Yániz JL. 2015. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction Science* **163**:82-88.

- Sellem E, Broekhuijse MLWJ, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, Koenen EPC. 2015. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology* **84**:1447-1454.
- Sellem E, et al. 2020. A comprehensive overview of bull sperm-borne small non-coding RNAs and their diversity across breeds. *Epigenetics & Chromatin* **13**:1-28.
- Selvaraju S, Parthipan S, Somashekar L, Kolte AP, Binsila BK, Arangasamy A, Ravindra JP. 2017. Occurrence and functional significance of the transcriptome in bovine (*Bos taurus*) spermatozoa. *Sci. Rep.* **7**:42392.
- Shamsuddin M, Amiri Y, Bhuiyan MMU. 2000. Characteristics of buck semen with regard to ejaculate numbers, collection intervals, diluents and preservation periods. *Reproduction in Domestic Animals* **35**:53-57.
- ShIPLEY CFB, Buckrell BC, Mylne MJA, Pollard J, Hunton JR. 2007. Artificial insemination and embryo transfer in sheep. Pages 629-641 in Youngquist RS, Threlfall WR, editors. *Current therapy in large animal theriogenology*. Saunders, Missouri.
- Schatten H, Constantinescu GM. 2008. *Comparative reproductive biology*. Blackwell Publishing, Iowa.
- Silva PFN, Gadella BM. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* **65**:958-978.
- Smith JF, Parr J, Murray GR, Clarke AG, McDonald RM, Duganzich DM. 1998. Relationship between laboratory measures of ram sperm competence and field fertility. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* **58**:181-185.
- Stafford KJ, Spoorenberg J, West DM, Vermunt JJ, Petrie N, Lawoko CRO. 1996. The effect of electro-ejaculation on aversive behaviour and plasma cortisol concentration in rams. *New Zealand Veterinary Journal* **44**:95-98.
- Sullivan JJ. 1970. Sperm numbers required for optimum breeding efficiency in cattle. *Proc. 3rd tech. Conf. A.I. Reprod., Chicago*.
- Therien I, Bleau G, Manjunath P. 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biology of Reproduction* **52**:1372-1379.
- Tremellen K. 2008. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human Reproduction Update* **14**:243-258.
- Tsakmakidis IA. 2010. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminant Research* **92**:126-130.
- Tsien RY. 1989. Fluorescent indicators of ion concentrations. *Methods in Cell Biology* **30**:127-156.
- Tuli RK, Schmidt-Baulain R, Holtz W. 1991. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. *Animal Reproduction Science* **25**:125-131.

- Turri F, Capra E, Lazzari B, Cremonesi P, Stella A, Pizzi F. 2021. A combined flow cytometric semen analysis and miRNA profiling as a tool to discriminate between high-and low-fertility bulls. *Frontiers in Veterinary Science* **8**:703101.
- Tyers M, Mann M. 2003. From genomics to proteomics. *Nature* **422**:193-197.
- Van de Hoek M, Rickard JP, de Graaf SP. 2022. Motility Assessment of Ram Spermatozoa. *Biology* **11**:1715.
- Varner DD, Schumacher J, Blanchard TL, Johnson L. 1991. Diseases and management of breeding stallions. American Veterinary Publications, Goleta.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* **57**:149-179.
- Vicente-Fiel S, Palacín I, Santolaria P, Fantova E, Quintín-Casorrán FJ, Sevilla-Mur E, Yániz JL. 2014. In vitro assessment of sperm quality from rams of high and low field fertility. *Animal Reproduction Science* **146**:15-20.
- Vicente-Fiel S, Palacín I, Santolaria P, Hidalgo CO, Silvestre MA, Arrebola F, Yániz JL. 2013a. A comparative study of the sperm nuclear morphometry in cattle, goat, sheep, and pigs using a new computer-assisted method (CASMA-F). *Theriogenology* **79**:436-442.
- Vicente-Fiel S, Palacín I, Santolaria P, Yániz JL. 2013b. A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). *Animal Reproduction Science* **139**:182-189.
- Waberski D, Suarez SS, Henning H. 2022. Assessment of sperm motility in livestock: Perspectives based on sperm swimming conditions *in vivo*. *Animal Reproduction Science* **246**:106849.
- Warr S, Pini T, de Graaf SP, Rickard JP. 2023. Molecular insights to the sperm–cervix interaction and the consequences for cryopreserved sperm. *Biology of Reproduction* **108**:183-196.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* **60**:481-492.
- Wei Q, McLeod E, Qi H, Wan Z, Sun R, Ozcan A. 2013. On-chip cytometry using plasmonic nanoparticle enhanced lensfree holography. *Scientific Reports* **3**:1699.
- Wilhelm KM, Graham JK, Squires EL. 1996. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology* **46**:559-578.
- World Health Organization. 2010. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, fifth edition. World Health Organization, Geneva.
- Wulster-Radcliffe MC, Williams MA, Stellflug JN, Lewis GS. 2001. Artificial vagina vs a vaginal collection vial for collecting semen from rams. *Journal of Animal Science* **79**:2964-2967.

- Xu H, et al. 2020. MicroRNA expression profile analysis in sperm reveals hsa-mir-191 as an auspicious omen of in vitro fertilization. *BMC Genomics* **21**:1-9.
- Yániz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Sánchez-Nadal JA, Santolaria P. 2015. Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Animal Reproduction Science* **156**:128-134.
- Yániz JL, Vicente-Fiel S, Capistrós S, Palacín I, Santolaria P. 2012. Automatic evaluation of ram sperm morphometry. *Theriogenology* **77**:1343-1350.
- Zanganeh Z, Zhandi M, Zare-Shahneh A, Najafi A, Nabi MM, Mohammadi-Sangcheshmeh A. 2013. Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation?. *Small Ruminant Research* **114**:120-125.
- Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H. 1998. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *International Journal of Andrology* **21**:207-216.
- Zhu H, Mavandadi S, Coskun AF, Yaglidere O, Ozcan A. 2011. Optofluidic fluorescent imaging cytometry on a cell phone. *Analytical Chemistry* **83**:6641-6647.
- Zhu W, et al. 2020. Identification of proteomic markers for ram spermatozoa motility using a tandem mass tag (TMT) approach. *Journal of Proteomics* **210**:103438.
- Zhu W, et al. 2020. Proteomic characterization and comparison of ram (*Ovis aries*) and buck (*Capra hircus*) spermatozoa proteome using a data independent acquisition mass spectrometry (DIA-MS) approach. *PLoS One* **15** (e0228656) DOI: 10.1371/journal.pone.0228656.