

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Hodnocení funkčních parametrů kryokonzervovaných
pohlavních buněk pomocí průtokové cytometrie**

Diplomová práce

Bc. Laura Viol

Reprodukční biotechnologie

Ing. Martina Janošíková, PhD.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Hodnocení funkčních parametrů kryokonzervovaných pohlavních buněk pomocí průtokové cytometrie" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21.4.2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní Ing. Martině Janošíkové, PhD. za odborné vedení mé práce a cenné rady, které mi poskytovala. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Kristýně Petričákové za trpělivé rady, vedení laboratorní práce a poskytnutí materiálů, mé rodině za podporu po celou dobu mého studia a rovněž také přátelům.

Hodnocení funkčních parametrů kryokonzervovaných pohlavních buněk pomocí průtokové cytometrie

Souhrn

Průtoková cytometrie se stala velmi významnou součástí hodnocení kvality ejakulátu při přípravě inseminačních dávek. Cílem této diplomové práce bylo hodnocení funkčních parametrů spermií kohoutů plemene Česká zlatá kropenatá ($n=4$) s přidavkem komerčních ředidel - Poultry media[®], Raptac[®] a NeXcell[®], používaných pro krátkodobou konzervaci, a permabilního kryoprotektantu NMA o koncentraci 9% .

Pomocí CASA iSperm[®] (Aidmics Biotechnology Co., Ltd, Taipei, Taiwan) byla hodnocena motilita a koncentrace spermií před mrazením (BFRM) a bezprostředně po rozmrazení (THWM). Po rozmrazení následovalo hodnocení funkčních parametrů spermií v průtokovém cytometru (Novocyte 3000[®], Acea Biosciences, Agilent, Santa Clara, California, USA). V prvním experimentu bylo hodnoceno procentuální zastoupení buněk s nepoškozenou plazmatickou membránou (PMI), s poškozením akrozomu (ACRD), s poškozením plazmatické membrány (PMD) a s poškozením akrozomu i cytoplazmatické membrány (PAD).

Nejvyšší hodnoty THWM byly naměřeny při použití ředidla Poultry media[®], naopak nejnižší při použití ředidla NeXcell[®] ($p < 0,05$). Co se týče PMI, nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití ředidla Raptac[®]. V porovnání se vzorky, které byly naředěny Poultry media[®], se obě naměřené hodnoty od sebe navzájem statisticky nelišily ($p < 0,05$). Při aplikaci ředidla NeXcell[®] bylo dosaženo nejhorších výsledků ($p < 0,05$). Nejvyšší hodnoty PMD byly detekovány při použití ředidla NeXcell[®], nejvyšší ACRD u ředidla Poultry media[®]. Nejvíce buněk s PAD bylo zjištěno ve vzorcích s ředidlem NeXcell[®] ($p < 0,05$).

Druhá část experimentu byla zaměřena na porovnání funkčních parametrů spermií při použití dvou různých fluorescenčních barviv - MitoTracker Deep Red[®] a CellRox Deep Red[®]. Všechny sledované hodnoty se od sebe statisticky významně nelišily ($p < 0,05$).

Klíčová slova: hodnocení spermií, pohlavní buňky, CASA, propidium iodide, průtoková cytometrie

Evaluation of functional parameters of cryopreserved sex cells using flow cytometry

Summary

Flow cytometry has become a very important part of ejaculate quality evaluation when preparing insemination doses. The aim of this diploma thesis was to evaluate the functional parameters of sperm of roosters of the Czech Golden Speckled breed (n=4) with the addition of commercial extenders - Poultry media[®], Raptac[®] and NeXcell[®] used for short-term preservation and a permeable cryoprotectant NMA with the concentration of 9%.

Sperm motility and concentration before freezing (BFRM) and immediately after thawing (THWM) were assessed using CASA iSperm[®] (Aidmics Biotechnology Co., Ltd, Taipei, Thailand). After thawing, the functional parameters of the sperm cells were evaluated in a flow cytometer (Novocyte 3000[®], Acea Biosciences, Agilent, Santa Clara, California, USA). In the first experiment, the percentage of cells with intact plasma membrane (PMI), with acrosome damage (ACRD), plasma membrane damage (PMD) and with both acrosome and cytoplasmic membrane damage (PAD) was evaluated.

The highest THWM values were measured when the extender Poultry media[®] was used, while the lowest values were measured when the extender NeXcell[®] was used ($p < 0,05$). Regarding PMI, the best results were obtained using the extender Raptac[®]. Compared to the samples that were diluted with Poultry media[®], both measured values were not statistically different from each other ($p < 0,05$). The worst results were achieved when NeXcell[®] was applied ($p < 0,05$). The highest PMD values were detected using extender NeXcell[®], the highest ACRD with extender Poultry media[®]. The most cells with PAD were found in samples with extender NeXcell[®] ($p < 0,05$).

The second part of the experiment was focused on comparing the functional parameters of sperm cells using two different fluorescent dyes - MitoTracker Deep Red[®] and CellRox Deep Red[®]. All observed values were not statistically significantly different from each other ($p < 0,05$).

Key words: sperm evaluation, germ cells, CASA, propidium iodide, flow cytometry

Obsah

1	Úvod	1
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Ředidla ejakulátu	3
3.1.1	Všeobecné složky ředidel	3
3.1.1.1	Vaječný žloutek	3
3.1.1.2	Mléko	4
3.1.1.3	Sójový lecitin	4
3.1.2	Antioxidanty	5
3.1.2.1	Enzymatické antioxidanty	5
3.1.2.2	Neenzymatické antioxidanty	6
3.2	Kryokonzervace pohlavních buněk	6
3.1.1	Kryoprotektanty a jejich vlastnosti	7
3.1.2	Možnosti poškození buněk v procesu kryokonzervace	8
3.3	Hodnocení ejakulátu	8
3.3.1	Struktura spermie	9
3.3.2	Hodnocení ejakulátu pomocí CASA	9
3.4	Hodnocení ejakulátu pomocí průtokové cytometrie	12
3.4.1	Specifická barviva pro průtokovou cytometrii	15
3.4.1.1	Význam a funkce barviv	15
3.4.1.2	Barviva pro inseminační dávku velkých hospodářských zvířat	21
3.4.1.3	Barviva pro inseminační dávku malých hospodářských zvířat	23
3.4.1.4	Barviva pro inseminační dávku drůbeže	23
3.5	Porovnání hodnocení ejakulátu pomocí průtokové cytometrie a CASA	24
4	Metodika	26
4.1	Experiment 1	26
4.1.1	Zvířata zařazená do experimentu	26
4.1.2	Odběr spermatu	26
4.1.3	Zpracování inseminační dávky a hodnocení pomocí CASA	26
4.1.4	Hodnocení průtokovým cytometrem	27
4.2	Experiment 2	29
5	Statistická analýza dat	30
5.1	Experiment 1	30
5.2	Experiment 2	30

6	Výsledky	31
6.1	Experiment 1	31
6.1.1	Výsledky CASA - motilita	31
6.1.2	Výsledky průtokové cytometrie	32
6.1.2.1	Základní charakteristika výsledků průtokové cytometrie	32
6.1.2.2	Procentuální zastoupení životaschopných spermií po rozmrazení	33
6.1.2.3	Procentuální zastoupení spermií s poškozenou plazmatickou membránou, poškozeným akrozomem, a poškozením akrozomu i cytoplazmatické membrány	34
6.2	Experiment 2	38
6.2.1	Zjištění mitochondriální aktivity spermií pomocí průtokového cytometru	38
6.2.1.1	Porovnání barviv MitoTracker Deep Red™ & CellRox Deep Red™	38
7	Diskuze	40
8	Závěr	42
9	Literatura	43
10	Seznam obrázků, tabulek a grafů	52

1 Úvod

Umělá inseminace se stala významným nástrojem zlepšování genetického potenciálu hospodářských zvířat, a tedy i prostředkem pro maximální genetický zisk. Odebraný ejakulát lze uchovávat mrazený i několik desítek let v tekutém dusíku, případně chlazený po dobu několika dní. Tato možnost reprodukce umožňuje využití plemenů z jiných zemí, zamezuje rozšiřování pohlavních chorob, umožňuje získání velkého množství potomků od plemene, a zároveň je ekonomicky velmi výhodná (Lemma 2011).

Pro zařazení plemenů do plemenitby je třeba hodnotit parametry jeho ejakulátu pro zjištění jeho kvality a oplozeníschopnosti. Ejakulát lze hodnotit makroskopicky a mikroskopicky. Pro mikroskopické hodnocení jsou dnes již vynalezeny přístroje pro maximální objektivitu výsledků. Mezi tyto přístroje lze řadit průtokový cytometr a CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). S jejich pomocí lze objektivně vyhodnocovat motilitu (pohyblivost), koncentraci a další parametry morfologie spermií (Gillan et al. 2005).

U inseminace čerstvým spermatem platí, že v praxi se ejakulát hodnotí pouze subjektivně inseminačním technikem. Pro tyto případy byl vynalezen zcela přenosný polní systém CASA, díky kterému lze ejakulát zhodnotit ihned po odběru a před následnou inseminací. Důkladnější hodnocení se poté děje v laboratoři s použitím průtokového cytometru (Broekhuijse et al. 2011).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit použití fluorescenčních barviv MitoTracker Deep Red® a CellRox Deep Red® při hodnocení funkčních parametrů spermatických buněk pomocí průtokové cytometrie, vypracování rešerše o výhodách průtokové cytometrie v praxi, a porovnání cytometrie s CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).

Vědecká hypotéza

Hypotézou práce byl předpoklad, že lze detekovat průkazné rozdíly ve funkčních parametrech spermií v inseminačních dávkách hospodářských zvířat po rozmrazení pomocí průtokové cytometrie ve vztahu k typu zvoleného ředidla a kryoprotektivního agens.

3 Literární rešerše

3.1 Ředidla ejakulátu

Reprodukce je zásadní pro všechny živočichy, neboť zajišťuje pokračování existence druhu. Během historie se vyvíjely různé metody jako umělá inseminace a oplodnění *in vitro*.

Kryokonzervace spermatu a umělé oplodnění umožnily celosvětovou distribuci a použití požadovaných genetických linií. Během posledních 65 let byla média pro skladování neustále revidována, základní složky ovšem zůstaly většinou nezměněny. Jedná se o vaječný žloutek a/nebo mléko a glycerol, které představují nepostradatelnou složku média pro uchování spermií ve chlazeném nebo mrazeném stavu (Manjunath 2012).

Umělá inseminace se provádí čerstvým anebo mrazeným spermatem. U inseminace čerstvým spermatem se spermie uchovávají při nižší teplotě, která je individuální pro každý druh zvířete. U ptačích druhů nejsou techniky asistované reprodukce využity v takové míře jako u savců. U ptačího spermatu dochází po odběru spermatu k rychlé ztrátě funkcí spermií, proto se u těchto spermií nejčastěji volí cesta inseminace zředěným spermatem skladovaným buď při pokojové teplotě, nebo chlazeným a skladovaným po dobu kratší než 24 hodin (Partyka & Nizański 2022).

Ředidla ejakulátu byla vyvinuta k ochraně spermií před škodlivými faktory, jako je osmotický šok, oxidační stres nebo poškození buněk ledovými krystaly. Ejakulát musí být uchován v médiu obsahujícím ředidla, která zachovávají kvalitu ejakulátu během chlazení a kryokonzervace, udržují metabolické procesy spermií a kontrolují pH média během a po rozmrazení. Ředidla stabilizují vlastnosti, morfologii, motilitu, integritu membrán i akrozomu spermií, a tím je chrání. Musí poskytovat energetické substráty (ATP), antioxidanty pro snížení oxidačního stresu, antibiotika pro prevenci bakteriální kontaminace a udržovat pH na 6,8–7,2 (Bustani & Baiee 2021).

Existuje mnoho komerčně dostupných ředidel, která se liší zejména v poměru základních složek, podílu glycerolu, pufrů, obsahu antibiotik atd.

3.1.1 Všeobecné složky ředidel

3.1.1.1 Vaječný žloutek

Ředidlo na bázi vaječného žloutku se běžně používá v chlazeném a mrazeném spermatu. Představuje rezervoár cholesterolu a fosfolipidů, které pomáhají chránit plazmatickou membránu spermií a akrozom před kryogenním poškozením, a zabraňuje ztrátě membránových fosfolipidů během procesu zmrazování. Protein vaječného žloutku má hydrofobní vlastnosti, kvůli kterým nemůže proniknout membránou spermií. Nízkodenzitní lipoprotein (LDL) udržuje membránové fosfolipidy během kryokonzervace. Ukázalo se, že spermie jsou během zmrazení chráněny sekvestrací proteinů vázajících lipidy z LDL

ve vaječném žloutku. Mimo to obsahuje další lipidy, sacharidy, a minerální látky. Potvrdilo se ovšem, že LDL jsou aktivní složky zodpovědné za ochranu spermií (Bustani & Baiee 2021).

Pro skot jsou nejběžnější komerčně používaná ředidla na bázi vaječného žloutku Botu-Bov[®], BullXcell[®], Bovidyl[®], Triladyl[®] (Raheja et al. 2018).

U kohoutů, a všeobecně u ptačích spermií, je obecně uznáván vaječný žloutek jako účinná látka v ředidlech. Protože je nejvýznamnější aniontová složka ptačí semenné plazmy kyselina glutamová, stala se standardní složkou ředidel ptačích spermií (Getachew 2016).

3.1.1.2 Mléko

Ředidla na bázi mléka jsou pro ochranu spermií stejně účinná jako ředidla na bázi vaječného žloutku. Pro konzervaci ejakulátu se používá odstředěné nebo plnotučné mléko. Mají stejná složení: vodu, bílkoviny, cukry, lipidy a minerální látky. Odstředěné mléko má však <0,1 % lipidů, jelikož je ale stejně účinné jako plnotučné mléko, vyplývá z toho, že lipidy nejsou složkou odpovědnou za ochranu poskytovanou mlékem. Kaseinové micely budou zřejmě hlavní ochrannou složkou úspěšně chránící spermie hřebců, kozlů, beranů a býků při 4-5 °C. Kromě toho mohou kaseinové micely chránit býčí spermie během zmrazení v přítomnosti glycerolu, není však známo, jak kaseinové micely chrání spermie během skladování. Kromě toho přidání laktózy k ředidlu obsahujícímu kaseiny zlepšilo účinnost ředidla během zmrazení býčích spermií (Manjunath 2012). Laktóza je hydrofilní a nemůže difundovat buněčnou stěnou spermií, což chrání buněčnou stěnu a zabraňuje mrazovému šoku. Mléko se pro zmrazení savčích spermií většinou kombinuje s arabinózou, fruktózou nebo vaječným žloutkem (Bustani & Baiee 2021).

Pro hřebce jsou používaná ředidla na mléčné bázi např. Sanalac[®], pro skot je běžně komerčně dostupný Laciphos[®] (Raheja et al. 2018.; Hernández-Avilés et al. 2021).

3.1.1.3 Sójový lecitin

Sójový lecitin je alternativou vaječného žloutku, a byl úspěšně použit pro kryokonzervaci spermatu. V současné době se vědci domnívají, že ředidla bez živočišných složek mohou snížit riziko kontaminace přenášené živočišným zdrojem. Sójový lecitin lze proto použít jako alternativu k ředidlům na bázi mléka nebo vaječného žloutku pro kryokonzervaci spermatu. Aktivní složky sójového lecitinu a vaječného žloutku jsou zcela totožné. Těmito složkami jsou kyselina olejová, kyselina palmitová, kyselina stearová a fosfatidylcholin. Zabraňují mrazovému šoku zředěného semene. Převažující fosfolipidy ve většině savčích biologických membrán mohou spermiím propůjčit fyzikální stabilitu. Na základě výsledků výzkumů je zřejmé, že ředidlo obsahující sójový lecitin je pravděpodobně nejlepším ředidlem spermatu u býků (Bustani & Baiee 2021).

3.1.2 Antioxidanty

Různé studie odhalily významný podíl oxidačního stresu (OS), který je definován jako nerovnováha v redoxním stavu těla. Je způsoben buď příliš vysokými hladinami oxidantů nebo naopak nedostatkem antioxidantů (Aitken & Baker 2006, Bollwein & Bittner 2018, Pintus & Ros Santaella 2021).

Při nadměrné produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) nebo při selhávání antioxidantní aktivity je narušena rovnováha mezi oxidací a redukcí, a dojde k OS. Spermie jsou na OS velmi citlivé, protože obsahují velmi nízké hladiny enzymatických antioxidantů, které nejsou dostačující k ochraně spermií před vysokými hladinami ROS, a cytoplazma má mizivé množství enzymů schopných je neutralizovat. Nerovnováha mezi oxidanty a antioxidanty ve spermiích vede k metabolickým poruchám. ROS se dělí na kyslíkové radikály (hydroxylový, oxidu dusnatého, superoxidového aniontu) a neradikálové deriváty (peroxid vodíku, peroxydusitanový anion, kyselina chlorná). Spermie je produkuje v malém množství, a jsou důležité pro iniciaci kapacity spermií, regulaci zrání spermií a posílení buněčných signálních drah. Je tedy důležité vyrovnat redoxní potenciál antioxidanty (Kowalczyk 2021).

Spermie jsou chráněny různými antioxidanty a antioxidantními enzymy v semenné plazmě i v samotných buňkách, aby se zabránilo oxidačnímu poškození. Například vitamin E může zneškodnit volné radikály peroxyly a alkoxyly, které vznikají u peroxidace lipidů a Mn^{2+} , zvyšuje pohyblivost spermií, životaschopnost, zlepšuje kapacitaci a akrozomové reakce snížením oxidačního stresu (Bansal & Bilaspuri 2010).

Peroxidace lipidů je důležitým aspektem oxidačního stresu, který zkracuje životnost spermií in vitro a zároveň ovlivňuje uchování spermatu pro umělou inseminaci. Antioxidanty, které působí jako lapače volných radikálů, byly proto navrženy jako přísady do ředidel ejakulátu pro zlepšení konzervace spermatu. Serin je podmíněně neesenciální aminokyselina, která hraje důležitou biologickou roli od syntézy proteinů po buněčnou signalizaci. Přídavek serinu může snížit oxidační stres a zvýšit aktivitu antioxidantních enzymů (Chankitisakul et al. 2022).

3.1.2.1 Enzymatické antioxidanty

Enzymatické antioxidanty jsou také jinak známé jako přírodní antioxidanty. Neutralizují přebytek ROS a zabraňují poškození buněčné struktury. Skládají se ze superoxiddismutázy, katalázy, glutathionperoxidázy a glutathionreduktázy (Bansal & Bilaspuri 2010). Enzym superoxiddismutáza (SOD) v cytoplazmě a v mitochondriích je zodpovědný za spojení dvou molekul superoxidového aniontu (O_2^-) do jedné z molekul peroxidu vodíku (H_2O_2), a kataláza (CAT) a glutathionperoxidáza (GSH-Px) převádí H_2O_2 na H_2O a O_2 . Jejich antioxidantní kapacita se však mění s kvalitou spermatu, a také během procesu zmrazování a rozmrazování. Takové změny v enzymových aktivitách ve spermatu a také vztah (pozitivní nebo negativní) s kvalitou spermií mohou být způsobeny oxidačním stresem, protože enzymy jsou využívány

v nadměrném množství k ochraně nebo udržení kvality spermatu, nebo proto, že enzymy nemají kapacitu udržovat kvalitu spermií (Allai et al. 2018).

3.1.2.2 Neenzymatické antioxidanty

Neenzymatické antioxidanty jsou také známé jako syntetické antioxidanty. Řadí se sem například koenzym Q10, který je přítomen v mitochondriích spermií a hraje zásadní roli při produkci energie. Q10 inhibuje tvorbu superoxidu. Trehalóza nebo taurin jsou důležité antioxidanty v případě aerobního prostředí a mrazu. Trehalóza poskytuje lepší kryoprotekci po rozmrazení. Její použití u beraních, býčích a myších spermií výrazně zlepšilo fertilizační schopnost (Bansal & Bilaspuri 2010).

Aminokyseliny (AMK) vlastní důležité antioxidační vlastnosti a jsou přítomny v semenné plazmě. Bylo prokázáno, že suplementace ředidel pomocí AMK, např. taurinu, hypotaurinu, prolinu, glutaminu, glycinu, histidinu a cysteinu, snížila fragmentaci DNA a zlepšila motilitu, životaschopnost a integritu membrány beraních spermií po rozmrazení (Allai et al. 2018).

3.2 Kryokonzervace pohlavních buněk

První pokusy o kryokonzervaci spermatu byly provedeny přibližně před 200 lety. Zpočátku byla snaha uchovat spermie ochlazením ve sněhu. Ve 20. století přišel vědecký pokrok v podobě objevu kryoprotektivních vlastností glycerolu. Od tohoto objevu došlo k rapidnímu zlepšení technik kryokonzervace, díky čemuž bylo možné úspěšně odchovávat potomstvo po kryokonzervovaných spermiích především u skotu, prasat, koní či ovcí. Důsledkem bylo vystavení kryobank, a to v 60. letech pro skot a v 70. letech pro člověka. Navzdory mnoha úspěchům se stále hledá metoda, která by opravdu optimálně zaručila životaschopnost spermií po kryokonzervaci u různých druhů živočichů (Hezavehei et al. 2018).

Kryokonzervace (neboli zmrazení) pohlavních buněk je jedním z nejdůležitějších postupů v biotechnologiích asistované reprodukce. U některých hospodářských zvířat má použití kryokonzervovaného spermatu tolik výhod, že se stal v mnoha případech nepostradatelným (Yáñez-Ortiz et al. 2021).

Takové dlouhodobé uchovávání buněk je možné, pokud je metabolismus buněk zcela zastaven, a to se děje u skladování buněk při -196 stupních Celsia v kapalném dusíku. Při této teplotě není zjištělná biochemická aktivita, protože není dostatek tepelné energie pro chemické reakce, a není přítomna kapalná voda, která je potřeba k metabolickým procesům (Mocé et al. 2016).

Pro zlepšení kvality spermií a fertilizační schopnosti po rozmrazení se do inseminační dávky přidávají enzymatické i neenzymatické antioxidanty a kryoprotektiva (Yáñez-Ortiz et al. 2021).

3.1.1 Kryoprotektanty a jejich vlastnosti

Kryoprotektivní činidla mají nepostradatelnou úlohu v procesu kryokonzervace, protože chrání buňku před negativními vlivy při mrazení. Můžeme je rozdělit dle schopnosti procházet plazmatickou membránou na permeabilní (propustné) a nepermeabilní (nepropustné) (Mocé et al. 2016).

Kryoprotektiva snižují bod mrazu v intra- i extracelulárním prostoru, penetrují a interagují s cytoplazmatickými složkami, a vytvářejí ochrannou vrstvu kolem membrán spermií. (Hezavehej et al. 2018). U většiny druhů se používají mrazící média, která obsahují jak propustné, tak nepropustné kryoprotektanty, aby ochránily buňku z vnitřního i vnějšího prostředí (Yánez-Ortiz et al. 2021).

Mezi propustné kryoprotektanty se řadí glycerol, dimethylsulfoxid, dimethylacetaldehyd, propylenglykol a ethylenglykol. Tyto látky jsou propustné plazmatickou membránou a nahrazují vodu ve spermatu, ve větší míře, tzn. při vyšších koncentracích, se ovšem potvrdila jejich toxicita, a oplozovací schopnost spermií se dramaticky snížila při vysoké koncentraci těchto kryoprotektantů v mrazícím médiu. Nepropustné kryoprotektanty jako trehalóza, rafinóza, sacharóza, citrát vaječného žloutku, albumin, polyethylenglykol a polyvinylpyrrolidon jsou látky, které neprocházejí plazmatickou membránou. Mezi nejnověji objevené kryoprotektanty se řadí sójový lecitin a lipoprotein s nízkou hustotou (LDL), které mají vlastnosti pomáhající proti ROS (Shahverdi et al. 2015; Hezavehej et al. 2018).

Glycerol je nejvíce používaný kryoprotektant řadící se mezi propustné kryoprotektanty. Působí v lipidové dvojvrstvě membrány, a tím mění rychlost membránové difúze, což vede ke snížení koncentrace elektrolytů a smrštění objemu spermií, aby gamety byly schopny odolávat nízkým teplotám. Udává se, že glycerol je nejvíce účinný propustný kryoprotektant, a alternativně se zjistilo, že například u prasat došlo ke zlepšení udržení motility spermií a integrity akorozómu při použití kombinace trehalózy a glycerolu než při použití samotného glycerolu. Stejně výsledky se dostavily i u beranů, kde se na rozdíl od skotu žádné zlepšení nedetekovalo (Yánez-Ortiz et al. 2021).

Dodnes se provádějí studie, které zkoumají ideální složení ředidel pro kryokonzervaci vzhledem k variabilitě ejakulátu jednotlivých druhů živočichů. Většina obsahuje kolem 20 % vaječného žloutku a 3–5 % glycerolu jako ideální poměr mezi intra – a extracelulárními kryoprotektanty (Yánez-Ortiz et al. 2021).

Dle studie Bergeron & Manjunath (2006) je výhodné použití vaječného žloutku v přítomnosti lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL), díky nimž je žloutek schopen navázat se na plazmatickou membránu a vytvářet ochrannou vrstvu, která lipidovou dvojvrstvu stabilizuje. LDL obsahuje přibližně 20 % fosfolipidů, a může se k buněčné membráně a malým proteinům v seminální plazmě tak připojit, a tímto zachovat kvalitu spermatu Shahverdi et al. (2015).

Trendy v dnešní době jsou však spíše zaměřeny na hledání alternativ k vaječnému žloutku z důvodu možné bakteriální kontaminace látek živočišného původu. Právě takovouto

nahrázkou by mohl být sójový lecitin. Výsledky, konkrétně v mrazení býčího spermatu, jsou však rozporuplné. Dle studie Aires et al. (2003) došlo při používání lecitinu ke zvýšení pohyblivosti o 19 % oproti vaječnému žloutku, ale výsledky jiných studií nepotvrdily ovlivnění motility nebo existenci negativního účinku (Crespilho et al. 2012).

3.1.2 Možnosti poškození buněk v procesu kryokonzervace

Pokud by nebyl přítomen žádný kryoprotektant, docházelo by k destrukci buněčných organel, a následné smrti buňky důsledkem chladového šoku a indukce tvorby ledových krystalů. To se může stát oxidací buněčných sloučenin, ale také narušením a poškozením buněčných struktur (DNA, akrozóm, plazmatická membrána), a to vše vede ke snížení plodnosti. Například reaktivní formy kyslíku, jako peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidové anionty (O_2^-) a hydroxylové radikály (OH^-), způsobují apoptózu, peroxidaci membránových lipidů, narušení mitochondrií a poškození DNA. Integritu plazmatické membrány mohou snížit změny ve složení sacharidů, změny v obsahu a umístění proteinů např. iontových kanálů během kryokonzervace (Hezavehej et al. 2018). Teplota kolem -10 stupňů Celsia je kritická vzhledem k hrozícímu zamrznutí intracelulární tekutiny, a následnému narušení buněčných struktur mechanickým namáháním tvorby ledových krystalů. Při -5 °C intra- a extracelulární tekutiny nezamrzávají, a přetrvávají v podchlazené metastabilitě. Mezi -5 a -10 °C se v extracelulární tekutině tvoří led a intracelulární voda zůstává podchlazená, v tomto případě dochází k dehydrataci buňky. Pokud toto nastane, musí být zamrznání spermii dostatečně pomalé, aby nedošlo k zmrazení intracelulární tekutiny, ale dostatečně rychlé, aby se buňka nedostala do hyperosmotického stavu. Přílišná dehydratace vede k membránovému kolapsu. Nejvhodnější rychlost zmrazování je rychlost, která umožňuje zmrazení extracelulární tekutiny bez tvorby intracelulárního ledu. Optimální rychlost se liší dle druhu (Medeiros et al. 2002).

Další poškození buňky během procesu kryokonzervace může nastat kvůli příliš vysoké koncentraci glycerolu. V prasečích spermii docházelo k výraznému snížení fluidity specifických domén plazmatické membrány, a u hřebců způsobila koncentrace glycerolu nad 3,5 % depolymerizaci F-aktinu, který je nepostradatelný pro integritu cytoskeletu buňky (Yáñez-Ortiz et al. 2021).

3.3 Hodnocení ejakulátu

Pro oplodnění oocyty musí ejakulát (spermie) disponovat určitými vlastnostmi, které dokáže jen hrstka laboratorních technik objektivně analyzovat (Dolník et al. 2019).

V testech používaných pro hodnocení kvality vzorku ejakulátu před inseminací se tradičně kontroluje procentuální počet pohyblivých spermii a koncentrace spermii v jednotlivých vzorcích. Tyto testy se provádějí subjektivně nebo pomocí počítače, a jsou schopny předpovědět plodnost vzorku. Dále se pak hodnotí další parametry pomocí průtokové cytometrie (Gillan et al. 2005).

Motilita spermií je jedním z nejčastěji analyzovaných ukazatelů kvality a oplozovací schopnosti ejakulátu po kryokonzervaci (Singh et al. 2021). Pohyblivost, neboli motilita spermií, je ukazatelem pro strukturně a funkčně zdravé spermie – lze tedy dle motility odhadnout, zda má většina spermií neporušenou plazmatickou membránu a normální morfologii či nikoliv. Pohyblivost by se měla vyhodnocovat co nejrychleji po odběru spermatu. Nedávné studie ukázaly, že koncentrace spermií nepoukazuje na kvalitu spermatu, nýbrž závisí na velikosti varlat, a může být ovlivněna i častým odběrem samce (v průměru se uvádí 1,2 miliard/ml u býků, 2,0 miliard/ml u beranů a 150 miliard/ml u hřebců) (Moradpour 2019).

Často se můžeme setkat s názvem životaschopnost spermie. To je ovšem nepřesný termín, protože není jasně stanovená hranice mezi živou a neživou spermií. Termín životaschopná spermie je častěji spojený s intaktní plazmatickou membránou, protože je klíčová pro interakci s oocytem, než s motilitou (Hossain et al. 2011).

Moderní technologie (jako CASA a průtoková cytometrie) výrazně vylepšily objektivitu a přesnost v hodnocení kvality spermií, a těsná korelace hodnot, získaných pomocí těchto technologií, zajistila výrazný posun v zajištění kvalitních inseminačních dávek a určení vhodných plemenků do chovu, protože každá z nich hodnotí důležitou část pro zajištění oplození schopných spermií (DeJarnette et al. 2021).

3.3.1 Struktura spermie

Spermie mají dvě hlavní části – hlavičku a bičík. Hlavička spermie obsahuje haploidní jádro s vysoce zhuštěným chromatinem, který nese dědičnou informaci v DNA. Nad jádrem, v apikální části hlavičky, se nachází vnitrobuněčná organela tzv. akrozom (Teves & Roldan 2022; Bianchi & Wright 2020). Akrozom obsahuje exocytotické granule s enzymy, které po uvolnění pomáhají spermiím proniknout do oocytu během oplodnění. Bičík se připojuje k hlavičce spermie přes krček (spojovací oddíl), který zahrnuje typické nebo atypické proximální a distální centrioly. Bičík má tři rozpoznatelné oblasti: střední část, hlavní část a koncovou část. Střední část obsahuje mitochondrie, které generují ATP prostřednictvím oxidativní fosforylace, zatímco hlavní část může vytvářet ATP prostřednictvím glykolýzy (Teves & Roldan 2022).

3.3.2 Hodnocení ejakulátu pomocí CASA

Pomocí CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) hodnotíme motilitu a charakteristiku spermií. Od konce 70. let, kdy byly vynalezeny první CASA systémy, je díky jim minimalizována subjektivita, která nastává při manuálním hodnocení motility. Jejich objektivita je dána optickou mikroskopií a 2D videomikrografií – CASA (Martínez-Pastor 2021).

Základními součástmi této technologie jsou: mikroskop pro vizualizaci vzorku, digitální kamera pro snímání obrázků a počítač se specializovaným softwarem pro analýzu pohybu spermií. Principem systémů CASA založených na mikroskopii je, že série po sobě jdoucích snímků pohyblivých spermií ve statickém zorném poli je pořízována algoritmy počítačového

softwaru, které pak skenují sekvence snímků, aby identifikovaly jednotlivé spermie a sledovaly jejich progresi napříč polem (Vincent et al. 2012).

CASA má vícero názvosloví pro upřesnění označení, co se ve skutečnosti zrovna hodnotí:

- CASA–Conc – hodnocení koncentrace,
- CASA–Mot – hodnocení motility,
- CASA–Morph – hodnocení morfologie (Boe–Hansen & Satake 2019).

V současnosti se preferují tyto modernější termíny, ale CASA – Morph je známa jako CASMA a pro CASA–Mot se používá všeobecný termín CASA (Martínez-Pastor 2021).

Systémy CASA tedy nehodnotí pouze motilitu a progresivní motilitu spermií, ale i laterální posun hlavičky, průměrnou rychlost dráhy, ohnutí bičíku nebo proximální kapku (Kamphuis et al. 2020). Motilita je vyjádřena v procentech, a je definována jako počet pohyblivých buněk dělený celkovým počtem analyzovaných buněk. Buňka je považována za pohyblivou, pokud její průměrná rychlost přímky (VSL) splnila nebo překročila parametr minimální rychlosti pohybu (Madhuri et al. 2012). Podle Sundararamana et al. (2012) je například pro skot minimální parametr 4,4 μ m/s. Progresivní motilita je definována jako populace buněk, které se aktivně pohybují vpřed, a je rovněž vyjádřena v procentech.

CASMA (Computer Aided Sperm Morphology Analysis) analyzuje veškeré hlavní části spermií jako hlavičku, akrozóm, střední část a bičík. Předpokladem je použití správné techniky barvení (nejlépe izotonické a izosmotické barvivo a čisté pozadí pro analýzu) (van der Horst 2021). Vzorky, ve kterých se jako ředilo používalo mléko, vyžadují zbarvení fluorescenčními barvivy, aby bylo možné správně rozlišit spermie od jiných částic (Brito et al. 2016).

Až do vynálezu technologie CASA–Mot (Computer Assisted Semen Analysis for Motility) byla analýza motility velmi subjektivní. Nyní je systém široce používán v klinických a výzkumných laboratořích. CASA–Mot je používána nejen k hodnocení celkové motility, ale i progresivní motility. Je možné využít různá nastavení systému a různou snímkovou frekvenci, která je nejdůležitější proměnnou, protože dokáže rekonstruovat pohybovou křivku spermií, a umožní tedy správný výpočet hodnot pro různé pohybové proměnné, jako je například VCL (celková dráha, kterou spermie zdolá za určitý čas, v μ m/s) (Gacem et al. 2020).

Tyto kinematické parametry jsou analyzovány pomocí sady na měření polohy spolu s veškerou historií stop. Po změření jsou k dispozici jako databázový soubor pro následnou analýzu. V běžných populačních statistikách se analýza motility měří pět vteřin na jednu spermii, obecně totiž platí, že pro pomalejší spermie jsou délky stop delší než pro rychlejší spermie (Valverde et al. 2019).

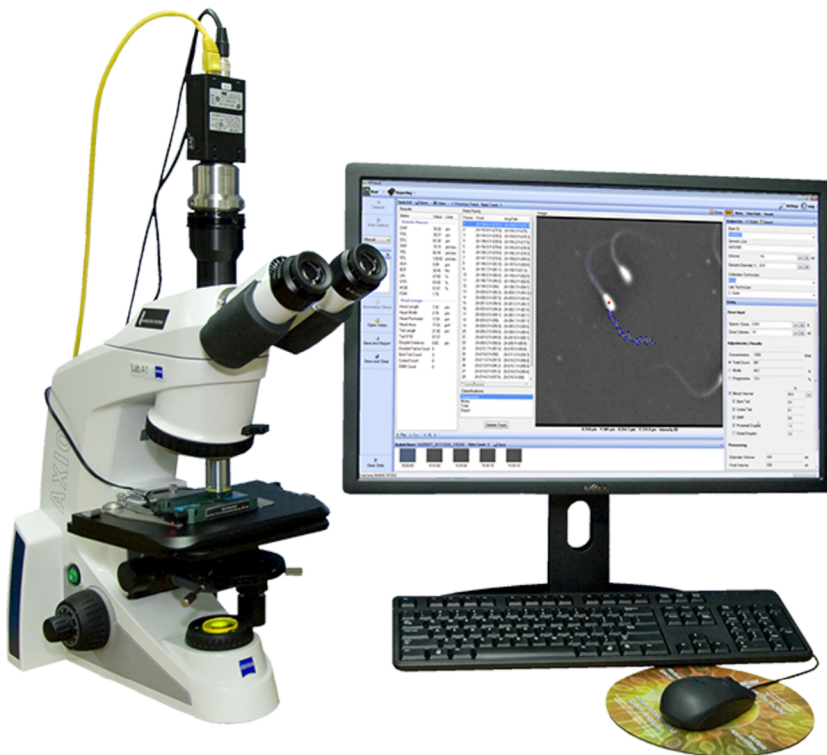
V současné době existuje více než tucet systémů CASA pro analýzu spermií. Systémy si jsou velice podobné, liší se hlavně v použitém hardwaru (mikroskopické nastavení) a softwaru (zpracování obrazu a analýza dat) (Brito et al. 2016).

Ve studii Baláži et al. (2020) se sperma např. naředilo fyziologickým roztokem, bylo vloženo do standardní komůrky analýzy a zkoumáno mikroskopem.

Obecně se dá říci, že klasický CASA systém provádí analýzu pohybu prostřednictvím čtyř hlavních kroků: zachycení obrazové sekvence spermií, detekce objektu, sledování objektu a výpočet charakteristik pohybu jako:

- křivočará rychlost (VCL) – průměrná rychlost nebo rychlost pro všechny pohyblivé dráhy, stejně jako VSL se vypočítává pouze pro pohyblivé buňky
- průměrná rychlost dráhy (VAP) – měří se v $\mu\text{m/s}$, je to průměrná rychlost po vyhlazené dráze buňky
- rychlost přímé čáry (VSL) – měří se v $\mu\text{m/s}$ a je definována jako průměrná rychlost měřená v přímce od začátku do konce dráhy, je to míra progresu buňky vpřed
- linearita křivočaré dráhy (LIN) - vyhodnocuje se na konci každé pohyblivé dráhy
- přímost průměrné dráhy (STR) – hodnocena v %, míra pohybu VCL ze strany na stranu.

Analýza pohybu je zachycena mikroskopem se speciálním osvětlením světlého pole, a díky speciálnímu softwaru nebo algoritmu je možné jej vyhodnotit (Amann & Waberski 2014/Elsayed et al. 2015/Madhuri et al. 2012). Většina systémů CASA používá software k detekci hlavičky spermie a vytvoření centrálního bodu na hlavičce (centroid), který je využíván k sledování dráhy (Brito et al. 2016).



Obrázek 1: CASA (dostupné z www.imv-technologies.com)

3.4 Hodnocení ejakulátu pomocí průtokové cytometrie

První průtokový cytometr se datuje do 70. let minulého století. Širší využití tohoto přístroje bylo umožněno díky rozvoji mikroskopických analýz a schopnosti usnadňovat diferenciaci specifických buněčných populací od jiných buněk pomocí fluorescenčních barviv. Poprvé byla tato technologie při analýze spermií využita k detekci DNA (Dolník et al. 2019). Průtokový cytometr se stal důležitý tím, že umožňuje analýzu struktur a funkcí obrovského počtu spermií (více jak 10 000) za velmi krátký čas, a mezi největší výhody se také řadí, že je schopen hodnotit více struktur jedné buňky současně (Quirino et al. 2022).

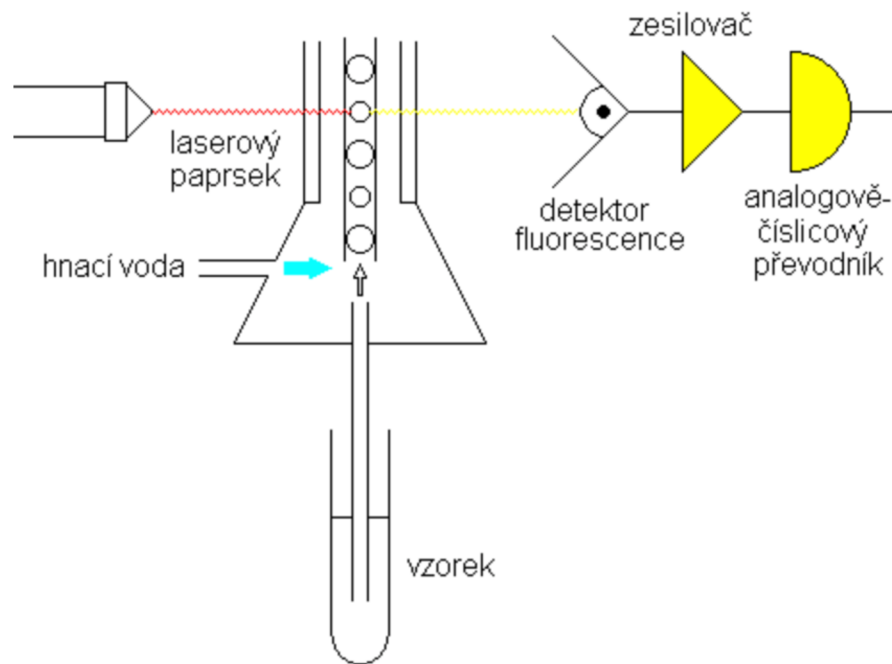
Průtoková cytometrie je významný nástroj (viz obr. 2) pro detailní analýzu komplexních populací v krátkém časovém období. Je to přístroj schopný měřit fyzikální charakteristiky buňky, jako například velikost a zrnitost (Adan et al. 2017). Z historického hlediska byl průtokový cytometr původně pouze jednoparametrový přístroj hodnotící velikost buněk. Nyní je schopen vyhodnocovat až dvacet parametrů současně (Wilkerson 2012).



Obrázek 2: Cytometr Novocyte 3000, Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, California, USA (foto: autor)

Jedná se o technologii, která se skládá z více systémů – těmi jsou fluidita, optika a elektronika (viz obr. 1). Pro funkční fluidní systém je zapotřebí kapalina, obvykle pufrovaný fyziologický roztok, která vzorek dopraví na záchytný bod laserů, kde je analyzován, a také vzorek zaostří pro optický systém. Optický systém je tvořen lasery a fotodiodami, které rychle

analyzují jednotlivé buňky na základě fluorescenčních světelných signálů. Rozptyl světla se měří ve dvou směrech – FSC (Forward Scatter), který poukáže na relativní velikost buňky, a SSC (Side Scatter), který udává zrnitost buňky. Součástí průtokového cytometru je také řada dichroických a pásmových filtrů, které udávají vlnovou délku světla a detekují ji. Poslední systém, elektronický systém, zachycuje signály z detektorů a převádí je na digitální signály, které jsou čitelné počítačem. Pro fluorescenci se ejakulát připravuje pomocí fluorescenčních proteinů a fluorescenčních barviv (McKinnon 2019).



Obrázek 3: Princip průtokové cytometrie (dostupné z www.infekce.lf1.cuni.cz)

Protože většina fluorescenčních barviv slouží pro analýzu somatických buněk a ne pro spermie, jsou před použitím nezbytné testy a validace u každého druhu buněk, u kterých se testuje jejich dopad, či souvislost s plodností a funkcí spermií (Boe–Hansen & Satake 2019).

Hodnocení spermií průtokovým cytometrem je založeno na zředění ejakulátu fyziologickým roztokem, a následným přidáváním fluorescenčních barviv dle druhu zvířete a typu analyzovaných parametrů (Baláži et al. 2020).

Průtoková cytometrie je vhodná k ověření různých hypotéz, jako například toxickému dopadu glycerolu jako součásti kryoprotektantních látek, ale právě také k multiparametrické analýze, kde se zjišťuje mitochondriální funkce buňky, oxidativní stres, poškození DNA, integrita akrozómu a integrita plazmatické membrány (Purdy et al. 2021). Akrozomální integrita je nezbytná pro průnik spermií zónou pellucidu, a tudíž nezbytná pro úspěšné oplození. Mitochondrie jsou u spermie umístěné v jejich střední části, a podílejí se na zrání spermií a ochraně před poškozením důsledkem kryokonzervace. Hrají klíčovou roli v tvorbě ATP, funkci membrány a pohyblivosti spermie (Hossain et al. 2011).

Mezi poškození DNA řadíme různé typy poškození, jako je fragmentace DNA, abnormální nahuštění chromatinu a chromozomální aberace. Chromatin je v jádře během spermatogeneze zhuštěný, a je postupně navinut na histony s protaminy. Tato struktura dodává spermii stabilitu chromatinu, která je nezbytná pro plodnost spermií. Hlavní důvody vzniku fragmentace DNA a poškození chromatinu jsou vysoké hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS). Tyto vysoké hladiny reaktivních forem kyslíku vedou k oxidačnímu stresu (OS) tím, že přemohou antioxidační obranu semenné plazmy, která obsahuje antioxidanty, a zajišťuje spermii ochranné prostředí a dostatečnou výživu. Buňky, které se podílejí na vzniku ROS, jsou abnormální spermie a leukocyty, nejčastěji neutrofilů, které můžeme nacházet v ejakulátu. Příliš velký OS koreluje se sníženou koncentrací a motilitou spermií. Abnormální spermie se mohou „přimíchat“ k vyzrálým spermii během transportu ze semenotvorných kanálků do nadvarlete, a tím poškozovat zdravé buňky jejich vyšší hladinou ROS. Spermie jsou velmi náchylné na oxidační stres díky nízké přítomnosti cytoplazmy, velkému množství polynenasycených mastných kyselin v plazmatické membráně a slabému obrannému mechanismu vůči OS (Sharma et al. 2021).

Dalším důležitým parametrem hodnocení, který lze detekovat průtokovým cytometrem, je počet spermií, který je důležitý pro tvorbu inseminační dávky s požadovanou koncentrací spermií v ejakulátu. Zjistíme tak i produkční schopnost varlat (Dolník et al. 2019). Některé studie, jako například dle Svorádová et al. 2019, používají průtokový cytometr pouze k hodnocení podílu apoptotických a nekrotických spermií v ejakulátu.

Postupem času se několik studií a laboratoří zaměřilo na vývoj multiparametrických testů. Například Peňa (2016) nastavil čtyřbarevný panel pro analýzu tří parametrů – permeabilitu plazmatické membrány, integritu membrány a mitochondriální potenciál, nebo permeabilitu plazmatické membrány, integritu membrány a oxidační stres.

Torres et al. (2016) představili čtyřbarevný panel pro analýzu tří struktur v kančích spermii, a to cytoplazmy, poškození akrozómu a mitochondriálních membrán za současného použití DNA – markerů k vyloučení buněčných zbytků z analýzy. DNA – markery použili ve své studii i Peňa et al. (2016).

Ve studii od Jäkel et al. (2021) byly nastaveny dva čtyřbarevné panely pro hodnocení tří parametrů současně v kančích spermii. Testovaly se permeabilita plazmatické membrány, fluidita a poškození akrozómu, nebo přívál vápníku, mitochondriální membránový potenciál a životaschopnost. I v této studii za pomoci DNA – markerů.

V nedávné době, v roce 2022, se uplatnil čtyřbarevný panel k analýze poškození akrozómu, stavu plazmatické membrány a mitochondriální aktivity dle protokolu na chlazené a zmrazené kančí sperma (Gonzalez – Castro et al. 2022).

Můžeme logicky předpokládat, že vícebarevné (tři a více barev) průtokové cytometry mají několik výhod oproti jednobarevným průtokovým cytometrům, které mohou být důležité v analýze ejakulátu (Bucher et al. 2019). Například u skotu jsou studie na vícebarevnou průtokovou cytometrii vzácné, ale Nagy et al. (2003) navrhli trojkombinaci barvení propidium iodidem, SYBR – 14 a PE – PNA pro detekci integrity plazmatické membrány a akrozómu.

Hallap et al. (2005) použili ve své studii další trojkombinaci fluorescenčních barviv, a to Merocyanine 540, Yo – Pro 1 a Hoechst 33342, která analyzuje destabilizaci plazmatické membrány během kryokonzervace.

Kanno et al. (2016) upravili tříbarevný test publikovaný Nagyem et al. (2003) na čtyřbarevný test použitím barviv propidium iodide, SYBR – 14, PE – PNA a Mito Tracker Deep Red™ pro kombinovanou analýzu vitality spermií, akrozomálního stavu a mitochondriálního membránového potenciálu.

S dobou se ale samozřejmě sortiment fluorescenčních markerů pro vícebarevnou průtokovou cytometrii zlepšuje, rozšířil se například o fialově vyzařující Calcein Violet AM, který je indikátorem pro intracelulární esterázovou aktivitu, a červeně vyzařující cyaninové barvivo 1,1',3,3',3'- hexamethylindodicarbocyanine iodide (Bucher et al. 2019).

Všeobecně se v laboratořích prosadily dvou – nebo třílaserové průtokové cytometry na základě cenové dostupnosti. Důvodem, proč jsou vícebarevné přístupy hodnocení v buněčné biologii a medicíně pořád omezené, souvisí se spektrálním překrýváním. Proto je jedním z nejdůležitějších kroků při vývoji vícebarevných testů korekce překrytí (Quirino et al. 2022).

3.4.1 Specifická barviva pro průtokovou cytometrii

Vzorky do průtokového cytometru se obarvují různými fluorescenčními barvivami dle vlastností, které chceme zjistit. Když jednotlivé spermie proudí skrz flow cell, jsou vybudeny fluochromy lasery, a vyzařované světlo o různých vlnových délkách je detekováno různými optickými filtry a detektory. Jak již bylo výše řečeno, většina barviv byla vytvořena pro hodnocení somatických buněk, a ne buněk pohlavních, proto je naprosto zásadní prověřením každé barvy u každého druhu i buněčného typu a provedení testů kvůli jejím případným účinkům na funkci spermií a tím i na fertilitu (Boe-Hansen & Satake 2019).

3.4.1.1 Význam a funkce barviv

Fluorescenční barviva mají různé funkce k detekování buněk. Mezi nejvýznamnější parametry analyzované průtokovým cytometrem u spermatických buněk pomocí fluochromů se řadí stupeň poškození plazmatické membrány, integrita akrozomu, mitochondriální membránový potenciál, reaktivní formy kyslíku a detekce genetické informace (DNA) (Boe-Hansen & Satake 2019).

3.4.1.1.1 Barvy detekující mitochondriální membránový potenciál a reaktivní formy kyslíku

Savčí spermie mají typicky mezi 50 a 75 mitochondriemi. Mitochondrie spermií vykazují zvláštní vlastnosti, jsou to „elektrárny“ buňky, mají klíčovou roli pro udržení homeostázy buňky a jsou zásadní nejen pro motilitu spermií, ale také pro hyperaktivaci, kapacitaci, akrozomovou reakci a fertilizaci. Jsou výlučně přítomny ve střední části, těsně ovinuté kolem

axonémy. Během spermiogeneze se mitochondrie seřadí od konce ke konci a spirálovitě se obalí kolem bičíku, aby vytvořily tlusté mitochondriální pouzdro těsně pod vnější plazmatickou membránou buňky (Barbagallo et al. 2020).

Většina barviv používaných při hodnocení mitochondriálního membránového potenciálu difunduje do živých buněk a hromadí se v mitochondriích (Hossain et al. 2011).

Mitochondriální membránový potenciál (MMP) poukazuje na schopnost mitochondrií vytvářet adenosintrifosfát (ATP). Tento děj úzce souvisí s pohyblivostí a životaschopností spermií (Peña et al. 2016).

MMP generovaný protonovými pumpami (komplexy I, III a IV) je zásadní složkou v procesu ukládání energie během oxidační fosforylace. Spolu s protonovým gradientem tvoří transmembránový potenciál vodíkových iontů, který je využit k výrobě ATP. Hladiny MMP a ATP v buňce jsou udržovány relativně stabilní, ačkoli existují omezené fluktuace obou těchto faktorů, které mohou nastat v důsledku normální fyziologické aktivity. Trvalé změny obou faktorů však mohou být škodlivé. Dlouhodobý pokles nebo vzestup MMP oproti normálním hladinám může vyvolat nežádoucí ztrátu životaschopnosti buněk, a být příčinou různých patologií. Kromě jiných faktorů hraje MMP klíčovou roli v mitochondriální homeostáze prostřednictvím selektivní eliminace dysfunkčních mitochondrií. Je také hnací silou pro transport iontů (jiných než H⁺) a proteinů, které jsou nezbytné pro zdravé mitochondriální fungování (Zorova et al. 2018)

Kyslík ve své dvouatomové formě je v podstatě redukován, aby se udrželo buněčné dýchání a přežití. Toto snížení vede k tvorbě vysoce reaktivních kyslíkových metabolitů nebo reaktivních kyslíkových forem (ROS), které ovlivňují různé buněčné funkce. Na normálních fyziologických úrovních jsou ROS zásadní pro životně důležité reprodukční funkce, jako je spermatogeneze, udržení životaschopnosti spermií a zprostředkování zrání, hyperaktivace, kapacita a pohyblivosti spermií a také akrozomové reakce (AR). Přebytek ROS je eliminován organizovaným působením antioxidantů. Když je však rovnováha mezi tvorbou ROS a antioxidační kapacitou narušena ve prospěch oxidantů, nekontrolovaná tvorba ROS způsobí oxidační stres (OS), který nepříznivě ovlivňuje morfologii a funkci spermií prostřednictvím peroxidace lipidů, fragmentace DNA a apoptózy. Tato kapitola zdůrazňuje endogenní tvorbu ROS v samčím reprodukčním traktu a jejich fyziologickou roli při zprostředkování funkcí spermií (Dutta et al. 2020).

Mitochondrie spermií řídí četné funkce, a jsou považovány za charakteristické znaky intaktnosti spermií. U lidí a koní je známo, že mitochondrie defektních spermií jsou hlavním zdrojem reaktivních forem kyslíku (ROS). Jedním z dějů, vysvětlujících stárnutí a později smrt spermie během konzervace, je peroxidace lipidů, což je oxidativní poškození vysoce nenasycených lipidů tvořící membránu spermií, čímž dojde k oxidačnímu stresu. Mitochondrie jsou považovány za nejcitlivější orgány ve spermiích ohledně změn vyvolané kryokonzervací. Narušení mitochondriálního elektronového transportního řetězce indukuje produkci mitochondriální ROS (Davila et al. 2015).

Ve studii Neila-Montero et al. (2021), která probíhala na beraních spermiích, bylo zjištěno, že za pomoci vyšších otáček při centrifugaci, která není normálním protokolem při

hodnocení beraních spermií, ale u některých druhů se provádí, bylo dosaženo snížení subpopulace spermií s intenzivním obsahem superoxidových aniontů v populaci viabilních spermií. Bylo to vyloženo jako negativní účinek, protože produkce superoxidových aniontů může spíše poukázat na intenzivní mitochondriální aktivitu než na oxidační stres. ROS může být lokalizován na mitochondriích, ale může být také nalezen v jádře jako potenciální induktor poškození DNA.

Produkce ATP je nezbytná pro udržení motility spermií. Spermie jsou schopny získat energii dvěma cestami, a to buď oxidační fosforylací v mitochondriích, nebo glykolýzou. Způsoby produkce primární energie podporující oplodnění se u jednotlivých druhů zvířat liší (Setiawan et al. 2021).

Windsor (1997) zjistil, že u beraního spermatu glykolytická inhibice neovlivnila fertilitu, a vychází se tedy z toho, že pro oplodnění je nutná oxidační fosforylace funkčních mitochondrií.

Henning et al. (2022) zjistili, že při experimentální inhibici glykolýzy došlo po uskladnění spermatu k opětovanému nastolení motility a mitochondriální funkce a tím dokázali, že kančí spermie jsou plně závislé na funkční glykolýze. Ze studie Nesci et al. (2020) vyplynulo, že kančí spermie využívají z 95 % glykolýzu pro získání energie.

U býčích spermií je oxidační fosforylace převládající cestou, protože v tomto případě by vysoká aktivita glykolytické dráhy udržovala intracelulární pH příliš nízké pro kapacitaci spermií. Vejcovod krávy má velmi nízkou koncentraci glukózy, což umožňuje pokračování kapacity (Storey 2008).

U hřebců bylo zjištěno, že se glukózový transport během kapacity nezmění, což potvrdilo, že energetické nároky spermií nejsou pokryty glykolytickými cestami, ale použitím oxidační fosforylace (Gibb & Aitken 2015).

Kohoutí spermie využívají obě cesty k bičíkovému pohybu, jak glykolýzu, tak mitochondriální oxidaci (Setiawan et al. 2021). Procentuální zastoupení drah pro motilitu spermií ovšem doteď není prozkoumáno (Matsuzaki & Sasanami 2022).

Mnoho autorů studií ovšem dospělo k různým závěrům, co se týče hlavní biochemické dráhy pro poskytnutí energie. Podle studií, které byly provedeny na několika druzích živočichů, bylo zřejmé, že nelze učinit jednoznačný závěr. Obě dráhy se vzájemně nevylučují, a spermie vykazují takovou všestrannost ve svém metabolismu, že mohou kombinovat obě dráhy, dle dostupných substrátů v samičím genitálním traktu (Barbagallo et al. 2020).

3.4.1.1.1.1 JC – 1

Při barvení JC – 1 platí to, že spermie, které vykazují vysoký MMP, vyzařují oranžovou fluorescenci, zatímco spermie s nízkým MMP svítí zeleně (Sutovsky 2015). Jeho hlavní výhodou je tedy schopnost rozlišovat mezi vysokým a nízkým MMP. V případě kryokonzervace a následného rozmrazení ovšem nefunguje správně, pravděpodobně kvůli interakci s ředidly (Hallap et al. 2005). Hlavní nevýhodou tohoto barviva je, že k vyhodnocení je potřeba dvou fluorescenčních detektorů, proto se ve vícebarevných experimentech průtokové cytometrie

příliš nepoužívá (Hossain et al. 2011). JC – 1 reflektuje MMP a je považována za citlivější k jemným změnám v MMP (Peña et al. 2016).

3.4.1.1.1.2 MitoTracker Deep Red™

MitoTracker Deep Red™ je široce používané barvivo pro analýzu MMP. K rozpoznání této barvy je potřeba pouze jeden fluorescenční detektor, což patří k jeho výhodám. Nevýhodou ovšem je, že k vyhodnocení je menší stolní průtokový cytometr s 488nm laserem zcela nedostačující (Hossain et al. 2011).

V poslední době jsou barviva MitoTracker dostupná ve více barvách, a poskytují tím alternativu pro použití ve vícebarevných experimentech. MitoTracker Deep Red™ pasivně difunduje přes membránu, a váže se na thioly v aktivních mitochondriích (Peña et al. 2016).

Peña et al. (2016) hodnotili přítomnost populace mrtvých buněk s vysokým MMP. Vysvětlilo se to tím, že MitoTracker DR dokáže detekovat mitochondriální hmotu (rovnováha mezi tvorbou a degradací mitochondrií), i když ne tak specificky jako JC-1. Je tedy vhodné kombinovat MitoTracker DR s barvivem, které detekuje životaschopnost spermií.

3.4.1.1.1.3 Rhodamin 123

K detekci buněk s membránovým potenciálem lze použít například barvivo rhodamin 123 (R123). Pokud mitochondriální membránový potenciál postrádají, proniká do buněk DiBAC4 (Quirino et al. 2022). DiBAC4 reaguje poměrně pomalu na změny membránového potenciálu, a dříve byl široce využíván v průtokové cytometrii. Je užitečný zejména při měření membránové hyperpolarizace indukované akcí ATP dependentních K⁺ kanálů (Yamada et al. 2001). Po depolarizaci buněčné membrány se záporně nabitý oxonol (DiBAC4 je lipofilní, negativně nabitá oxonolová barva) přesune z extracelulárního média do cytosolu. Zvýšením intracelulární koncentrace barviva se zvýší i jeho vazby na buněčné membrány a dojde k emisi fluorescence (Wolff et al. 2003).

Jiná studie zabývající se kohoutím spermatem používala k detekci funkčních mitochondrií i propidium iodide (PI) společně s jinou fluorescenční barvou. Spermie, které mají aktivní mitochondrie, byly rozpoznány díky pozitivnímu signálu barvy rhodamin 123, a naopak, pokud byla detekce barvy propidium iodide, znamenalo to nefunkčnost mitochondriálního membránového potenciálu (Raei et al. 2022).

Nevýhoda R123 je jeho vyplavování z buňky, pokud mitochondrie zaznamenávají ztráty MMP, což omezuje jeho použití, když je energetický stav ovlivněn mitochondriemi. Dále není zcela spolehlivý kvůli jeho nízké citlivosti a přítomnosti několika energeticky vazebných míst na mitochondriích (Hallap et al. 2005).

3.4.1.1.1.4 CellRox Deep Red™

Barvivo CellRox Deep Red™ je barvivo, které se používá k detekci reaktivních forem kyslíku (ROS) ve spermích, které mají za následek oxidační stres (OS). Toto barvivo je oxidováno, pokud dochází k buněčnému OS, a vykazuje excitaci při 640/655 nm. Pokud nedochází k ROS, zůstává CellRox ve svém počátečním stavu a nevyzařuje žádnou fluorescenci (Bianchi et al. 2015).

Ve studii Davila et al. (2015) byly zkoumány účinky přerušení toku elektronů v mitochondriích hřebců ve dvou specifických bodech (komplex I a komplex II). Pomocí CellRox se hodnotil ROS. Inhibicí komplexů I a II se snížil ROS, a to přesto, že komplex I a II jsou považovány za hlavní zdroje ROS. Vychází se tedy z toho, že CellROX je citlivá hlavně na superoxidový anion. Vysvětlení je takové, že narušením elektronového transportního řetězce se mitochondriální potenciál zhroutí a superoxid již není produkován kvůli přerušení přenosu a následnému úniku elektronů.

3.4.1.1.2 Barvy detekující integritu plazmatické membrány a akrozómu

3.4.1.1.2.1 Propidium iodide

Integrita membrány se běžně posuzuje pomocí propidium iodidu (PI), který se váže na DNA, ale není schopen proniknout, pokud membrána zůstává neporušená a funkční. Pro zlepšení přesnosti identifikace spermíí, které nepřijaly PI, se přidává další barvivo, které proniká všemi buňkami bez ohledu na stav membrány. Tyto barvy jsou například SYBR 14 a Hoechst 33342 (Herickhoff & Gonzalez-Castro 2019). Nejčastěji používaná kombinace je PI se SYBR 14, při které životaschopné buňky zeleně fluoreskují, zatímco poškozené buňky červeně (Hossain et al. 2011).

3.4.1.1.2.2 SYBR - 14

SYBR – 14 a PI jsou široce používané sondy pro hodnocení integrity membrány spermíí. Tato barva je membránové permeantní barvivo nukleové kyseliny. Obě tyto barvy jsou DNA vazebné sondy. Tato kombinace barev rozlišuje pouze mezi živými a mrtvými spermii, neodhaluje ale stav poškození membrány. Detekce jemnějších změn na plazmatické membráně vyžaduje jemnější sondy. Například merocyanin 540 umožňuje hodnocení fluidity membrány a pomocí Yo Pro – 1 lze analyzovat i mírné zvýšení permeability membrány spermie (Peña et al. 2016).

3.4.1.1.2.3 Yo Pro – 1

Yo Pro – 1 se standartně používá v kombinaci s PI i s Hoechst 33342. Tyto páry umožňují detekci změn na membránách spermíí v mnohem časnějším stádiích než SYBR – 14/PI, a lépe korelují s motilitou a rychlostí spermíí (Peña et al. 2016).

3.4.1.1.2.4 Annexin V

Apoptotické změny buněk se detekují pomocí Annexinu V, ke kterému se opět přidává propidium iodide. Pokud jsou buňky negativní na Annexin i PI, jsou to buňky plně životaschopné. Pokud jsou pozitivní na Annexin V, řadí se mezi časně apoptotické, pokud jsou pozdně apoptotické, jsou pozitivní na Annexin V i PI. Pokud již jsou úplně nekrotické, jsou pozitivní pouze na PI. Buňky, které se řadí mezi pozdně apoptotické a nekrotické, jsou zařazeny do mrtvých buněk (Raei et al. 2022).

3.4.1.1.2.5 ARD

Ve světě analýzy průtokovým cytometrem se objevila ještě další barviva vhodná ke stanovení charakteristik membrány. Patří mezi ně aminová reaktivní barviva (ARD), která komunikuje pouze s aminy na povrchu plazmatické membrány funkčních buněk. Pokud je membrána intaktní, ARD reaguje s volnými aminy uvnitř buňky a zvyšuje se záření, které slouží k analýze vitálních buněk. Tato ARD barviva jsou dostupná v různých barvách s úzkým spektrem, a patří mezi ně například Zombie, Ghost Dyes a MitoTracker Deep Red™ (Boe–Hansen & Satake 2019).

3.4.1.1.2.6 PNA/PSA

Akrozomální integrita se velmi dobře hodnotí pomocí rostlinných lektinů, které mají vysokou homogenost ke glykanům v intaktním akrozomu před kapacitací a akrozomální exocytózou. Proto se fluorescenčně konjugované lektiny PNA (*Arachis hypogea*) a PSA (*Pisum sativum*) mohou vázat na abnormální akrozomy s odkrytými akrozomálními membránami nebo složkami cytoplazmy, ale i na akrozomy, u kterých proběhla předčasně kapacitace, a akrozomy, u kterých došlo k mechanickému poškození během manipulace a odběru ejakulátu (Sutovsky, 2015).

3.4.1.1.3 Barvy detekující poškozenou DNA

3.4.1.1.3.1 Akridinová oranž

Jedním z nejpoužívanějších barviv pro označení poškozené DNA je akridinová oranž (AO). V případě přítomnosti intaktní dvouvláknové DNA se excituje zelené záření, pokud se detekuje jednovláknová DNA, excituje AO červenou fluorescenci (Partyka et al. 2010). Může se zkombinovat s LIVE/DEAD Fixable Blue Stain, což je sada, která se používá k analýze vitality buněk před fixací a permeabilizací, která je nutná pro intracelulární barvení protilátek atd.

Tímto způsobem lze snadno a jednoduše rozlišit populace spermií podle integrity plazmatické membrány. Je však nutno předtím odstranit semennou plazmu, aby se zabránilo nespecifické vazbě barviva na proteiny semenné plazmy. Když se však tato metoda barvení porovnávala s použitím dvou nezávislých barviv, a to propidium iodide pro označení integrity

plazmatické membrány a konvenční SCSA, nebyly zjištěny žádné významné rozdíly ve výsledcích (Da Costa et al. 2021).

3.4.1.1.3.2 Hoechst 33342

Hoechst 33342 je velmi často používanou barvou pro detekci DNA ve spermích. Právě barvivo Hoechst 33342 má velkou schopnost odlišit spermie, které nesou chromozóm X od spermii nesoucí chromozóm Y, na základě jejich vazby na DNA (Boe–Hansen & Satake 2019). Touto schopností lze spermie oddělit průtokovým tříděním, a tak lze provádět sexace spermií. Nedá se ovšem říci, že selekce tímto způsobem je zcela bezpečná a je třeba vzít v úvahu potenciaální zdravotní riziko, protože většina barviv na bázi nukleových kyselin je mutagenní (Garner, 2009).

Většina technik, které se dnes používají pro hodnocení integrity DNA, je známa již desítky let, ale proběhly u nich zásadní změny vedoucí ke zdokonalení. V případě SCSA, techniky, která byla vyvinuta v druhé polovině 20. století, došlo k drobným změnám ohledně jaderné denaturace (Da Costa et al. 2021).

Test SCSA (sperm chromatin structure assay) poskytuje stabilní statistická data s přesností a opakovatelností rychlým a neobjektivním měřením průtokovým cytometrem – je to velmi účinný test integrity DNA u spermií. SCSA je teoreticky nepřímý test. Analyzuje sklon DNA spermatických buněk k poškození způsobeném kyselou denaturací, která se detekuje metachromatickým barvivem akridinová oranž (AO). Metoda je založena na tom, že buňky, které obsahují dvouvláknovou DNA, vyzařují zelenou fluorescenci, pokud se akridinová oranž váže na poškozenou jednovláknovou DNA, červenou fluorescenci. Uvádí se, že přesnost tohoto testu je 100 % (Sharma et al. 2021).

Dalším testem pro analýzu DNA je TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated deoxyuridine triphosphate – nick end labelling). Původně byla tato metoda vyvinuta pro analýzu poškození DNA v somatických buňkách, později byla upravena pro použití na spermích. Spočívá v přidání fluoresceinovaného dUTP na 3'-OH konec fragmentů DNA pomocí polymerázy deoxynukleotidyltransferázy, která tento děj katalyzuje. Tímto testem se ukazuje procento buněk s poškozenou DNA. Buňky jsou obarveny pomocí barvy obsažené v hotovém kitu, a po odstranění supernatantu se přidává barva propidium iodide (Sharma et al. 2021).

3.4.1.2 Barviva pro inseminační dávku velkých hospodářských zvířat

3.4.1.2.1 Býci

Ve studii Bucher et al. (2019), která se zabývala hodnocením ejakulátu býků, byl využit již zmiňovaný test SCSA pro hodnocení fragmentace DNA u spermií. Jako fluorescenční markery byly použity Calcein Violet AM, který sloužil jako marker pro životaschopnost buněk. Esterázově aktivní buňky vyzařovaly fialové světlo. Dále PI, který sloužil k detekci intaktní nebo poškozené plazmatické membrány na základě presence nebo absence červeného světla, PE –

PNA lektin hodnotící akrozomální stav tím, že se barva naváže na vnější akrozomální membránu spermií, a buňky s poškozeným akrozomem vykazují oranžovou fluorescenci. Barva Fluo4 AM detekuje koncentraci volného intracelulárního Ca^{2+} a dle koncentrace se vyznačuje zelená fluorescencí nízkou nebo vysokou intenzitou. Nakonec bylo použito barvivo DilC1 pro analýzu subpopulací spermií a mitochondriálního membránového potenciálu (MMP). Buňky s vysokou MMP svítily intenzivně červeně.

V další studii hodnotící býčí ejakulát byly použity PI pro hodnocení plazmatické membrány, PNA pro hodnocení integrity akrozomu, CellTrace Calcein pro analýzu esterázové aktivity, MitoProbe DilC1 pro hodnocení MMP a Fluo – 4 AM hodnotící procento živých spermií na základě koncentrace intracelulárního vápníku (Ibanescu et al. 2020).

Při dalším výzkumu inseminační dávky býků se hodnotila životaschopnost spermií pomocí kitu live/dead (SYBR – 14 a PI) a pro analýzu životaschopných spermií bylo použito procento zeleně zbarvených spermií. Tentokrát se ovšem kondenzace chromatinu (analýza DNA) stanovila barvením s CMA3 a Yo Pro – 1. Životaschopné spermie byly pozitivní na CMA3 a negativní na Yo Pro – 1, neživotaschopné spermie byly pozitivní na CMA3 i Yo Pro – 1 (Llavanera et al. 2021).

3.4.1.2.2 Hřebci

K hodnocení mitochondriální funkce spermií hřebců pomocí průtokové cytometrie se nejčastěji používají sondy JC – 1 (5,5',6,6' – tetrachlor – 1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolyl carbocyanin iodine) a barviva MitoTracker. Hřebčí spermie jsou vysoce závislé na mitochondriální produkci ATP, mitochondriální porucha vede k rychlé smrti spermie. V závislosti na aktivitě mitochondrií generují spermie velké množství ROS, proto jsou mitochondrie v hřebčích spermiích citlivými indikátory stresu spermií během celého procesu kryokonzervace (Peña et al. 2016).

Dále jsou pro hřebce používány kombinace barev ARD, jako Live/dead, Zombie Green a Mitotracker Deep Red™ pro stanovení vitality spermií a mitochondriálního membránového potenciálu (Boe-Hansen & Satake 2019).

Již v roce 2003 byly použity barvy jako SYBR – 14, PI a JC – 1, v té době jako poměrně nová metoda barvení pro vyhodnocování parametrů spermií na průtokovém cytometru, a jak výše uvedené studie dokazují, tyto barvy se osvědčily dodnes (Love et al. 2003).

V jedné z nejnovějších studií ohledně hodnocení ROS v hřebčích spermiích byla použita sonda dihydroethidia, buněčně permeabilní sonda, která excituje fluorescenci po oxidaci superoxidovým aniontem. Jak již bylo uvedeno, mrtvé buňky produkují ROS, proto se vzorky obarvily barvou SytoxGreen, která prochází pouze poškozenými membránami. Po detekování neživotaschopných buněk se tato populace odstranila a následně se analyzovalo ROS v životaschopných buňkách (Bulkeley et al. 2022).

3.4.1.3 Barviva pro inseminační dávku malých hospodářských zvířat

3.4.1.3.1 Kanci

Při hodnocení kančího spermatu jsou standardem fluorescenční membránově prostupná barviva SYBR – 14 a Hoechst 33342 (H–42) (Boe–Hansen & Satake 2019).

Pro analýzu dalších membránových parametrů, jako např. změn spojené s apoptózou, lze používat CFDA, ethidium homodimer – 1, cyanine Yo – Pro 1 a Hoechst 33258. Yo – Pro 1 je v buňce detekovatelný pouze tehdy, pokud je plazmatická membrána nestabilní, například při poškození nebo apoptóze. Toto barvivo je použito ve velkém počtu studií kančích spermií. Používá se také v kombinaci s merocyaninem 540, který hodnotí fluiditu plazmatické membrány - lipofilní molekuly se vážou na vnější vrstvu membrány a je nepropustný v případě nepoškozené membrány. V kombinaci se tato barviva používají ke ztotožnění vitálních kančích spermií s poškozenými lipidy v plazmatické membráně (Boe–Hansen & Satake 2019).

K detekování MMP se u kanců velmi často používá barvivo JC – 1.

3.4.1.3.2 Berani

Při analýzách beraního spermatu se běžně používá PSA pro integritu akrozomu. Hodnotící počty spermií excitující zelenou fluorescenci pro zaznamenání spermií s intaktními a poškozenými akrozomy. Pro zjištění MMP byly použity barvy R123 a PI. Pokud byly spermie pozitivní pro R123 a negativní pro PI, byly hodnoceny jako buňky s aktivními mitochondriemi. Pro zjištění apoptotických změn v buňkách byly využity Annexin V a PI. Jako index těchto změn se hodnotila externalizace fosfatidylserinu, což je typický fosfolipid vnitřního listu plazmatické membrány. Pro analýzu poškození DNA byl použit SCASA test dle postupů jako u průtokové cytometrie pomocí barviva AO (Asadzadeh et al. 2021).

V dalším experimentu hodnotící beraní inseminační dávku se akrozomální stav hodnotil rovněž PSA lektinem, a integrita plazmatické membrány pomocí kombinace Annexin V a PI. Barvivem Hoechst33342 se provádělo několik pokusů založených na různých koncentracích barviva a různě dlouhé době působení barviva na spermie. Po barvení bylo možno analyzovat motilitu, rychlost pohybu, stav akrozomu, integritu membrány (Bo Quan et al. 2015).

3.4.1.4 Barviva pro inseminační dávku drůbeže

3.4.1.4.1 Kohouti

Ve studii Partyka et al. (2010) byla hodnocena integrita plazmatické membrány spermií pomocí fluorescenčních sond SYBR-14 a PI, poškození akrozomu pomocí lektinu PNA a procento živých spermií s funkčními mitochondriemi se stanovilo Rhodaminem 123 a PI.

V další studii, která se také zabývala hodnocením kvality kohoutích spermií pomocí průtokového cytometru, byla pro analýzu použita barviva Hoechst-33342 (identifikace přítomnosti DNA), PI (detekce poškození plazmatické membrány) a PNA lektin (analýza poškození akrozomu) jako nejvhodnější (Petričáková et al. 2022).

Pro zjištění MMP spermií drůbeže se většinou používá Rhodamin 123 s PI. Rhodamin 123 je transportován do nitra funkčních mitochondrií. Z toho vyplývá, že spermie s funkčními mitochondriemi jsou pozitivní na Rhodamin 123 a negativní na obsah PI (Shahverdi et al. 2015).

V studii Shahverdi et al. (2015) se hodnotila detekce MMP pomocí barviva R123 a detekce intaktnosti plazmatické membrány v korelaci k apoptotickým stádiím buňky pomocí Annexinu V – FITC a PI u kohoutích spermií na průtokovém cytometru.

Stejnou metodu barvení pohlavních buněk kohoutů zvolila i studie Fattah et al. (2017), kdy byl použit R123 pro MMP a Annexin V s PI pro zjištění životaschopnosti buňky nebo její apoptotické či nekrotické stádium.

Další studie, zabývající se hodnocením ejakulátu kohoutů pomocí průtokového citometru, zvolila taktéž R123 k detekci MMP. Pro hodnocení plazmatické membrány byla zvolena klasická kombinace barviv SYBR – 14 a PI. Pro analýzu akrozomálního stavu bylo taktéž zvoleno nejpoužívanější barvivo PNA. Pro zjištění obsahu DNA v buňkách byla použita akridinová oranž (AO) (Partyka et al. 2010).

3.4.1.4.2 Krocani

Kombinace barev SYBR – 14 a PI se používala již v prvních studiích, a používá se dodnes u ejakulátu krocánů. Již tehdy se využívala k detekci živých a mrtvých spermií (Donoghue et al. 1995).

I v novodobé studii Christensen et al. (2013) byly použity barviva SYBR-14 a PI pro stanovení živých a mrtvých spermií.

Kromě běžných fluorescenčních barviv se ve studii Słowińska et al. (2018) barvily spermie pomocí barviva Muse, které označilo mrtvé buňky tak, že proniklo přes nefunkční plazmatickou membránu. Produkce ROS byla stanovena Muse Oxidative Stress kitem, který je založen na přítomnosti dihydroethidiu (DHE). DHE oxiduje po reakci se superoxidovými anionty a vzniká fluor-ethidium bromid vázající DNA, který poté červeně fluoreskuje. MMP byla stanovena pomocí MitoPotential Dye, lipofilním barvivem, které funguje jako indikátor buněčné smrti.

3.5 Porovnání hodnocení ejakulátu pomocí průtokové cytometrie a CASA

Systémy CASA a průtokový cytometr jsou moderní a velmi praktické technologie objektivního hodnocení ejakulátu. Většina studií, jako například Morell et al. (2018), používá systémy CASA pro hodnocení motility, a průtokovou cytometrii pro hodnocení integrity membrány, stupně ROS, mitochondriální membrány, poškození akrozómu a přítomnosti obsahu DNA ve spermii. Průtoková cytometrie má široké využití díky přesnosti hodnocení kvality spermií, své citlivosti a schopnosti analyzovat velký počet spermií současně ve velmi krátké době (Svoradová et al. 2019).

Systémy CASA se používají ke stanovení kinematických proměnných (celková motilita spermií, progresivní motilita spermií, průměrná rychlost dráhy atd.). Průtoková cytometrie se používá pro hodnocení poškození plazmatické membrány a akrozomu, zjištění procentuálního zastoupení spermií s vyšším mitochondriálním membránovým potenciálem a procento živých spermií s nižší intracelulární koncentrací vápníku pomocí vícebarevného testu s pěti fluorescenčními barvivy (Ibanescu et al. 2020).

Podle studie, ve které se porovnávalo hodnocení koncentrace spermií pomocí CASA a průtokového cytometru, bylo zjištěno, že koncentrace spermií byla ve dnech, kdy bylo měřeno systémem CASA o 10 až 20 procent nižší, než když se hodnotila průtokovou cytometrií. To bylo ovšem značně ovlivněno různými dny odebrání, jelikož koncentrace spermií otestovaného berana se den ode dne liší. Nicméně rozdíly mezi technikami nebyly statisticky významné. Vždy záleží i na pečlivosti práce, mimo techniky i správný poměr ředění, pečlivost při pipetování, správná kalibrace přístrojů. To vše je velmi důležité pro získání spolehlivých výsledků. Jeden velký problém u systémů CASA je, že hodnotí i nespermatické buňky jako spermie, a spermie „příliš velké“ v důsledku aglutinace nehodnotí. Pro přesnost výsledků v systémech CASA je doporučena imobilizace spermií nebo použití fluorescenčních barviv DNA. Nejčastěji analyzovaným parametrem u CASA zůstává ovšem motilita spermií. Měření koncentrace spermií touto metodou nedoporučují ani Světová zdravotnická organizace (WHO) ani Národní asociace chovatelů zvířat. Přesnější metodou je průtoková cytometrie, která je schopna vyloučit další složky spermatu (např. gel, různé zbytky atd.), jiné buňky než spermie a nečistoty. Oproti systémům CASA má průtokový cytometr nevýhody v nákladnosti zařízení, náročnější obsluze a složitější metodice přípravy vzorků (Baláži et al. 2020).

Pro optimální hodnocení kvality spermatu je třeba použít obě technologie. Systém CASA, který je nezbytný pro analýzu motility spermií, a to jak před, tak po zmrazení, a průtokový cytometr, který umožňuje citlivější a složitější analýzu. Tyto dvě technologie se tak v analýze spermií doplňují (Malama et al. 2017).

Technologie pro hodnocení vlastností spermií se postupně mění zdokonalováním optiky a schopností přístrojů. Vývoj v systémech CASA i průtokového cytometru je rychlý a neustále pokračuje (Boe–Hansen & Satake 2019).

4 Metodika

4.1 Experiment 1

4.1.1 Zvířata zařazená do experimentu

Hodnocení spermií pomocí CASA a průtokové cytometrie bylo provedeno na čtyřech kohoutech plemene Česká zlatá kropenatá. Toto plemeno je původní, bylo chováno na území ČR již po staletí. Nyní je zařazeno do genových zdrojů. Po celou dobu výzkumu byli kohouti chováni v jednotlivých klecích s kontrolovanou teplotou vzduchu kolem 20 °C, a po celou dobu měli přístup k vodě a krmení ad libitum. Kohoutům byla předkládána speciální krmná směs společnosti Sehnoutek a synové s.r.o., která byla vyrobena pro Českou zemědělskou univerzitu v Praze. Průměrný věk kohoutů byl 68 týdnů.

4.1.2 Odběr spermatu

Ejakulát byl odebírán dvakrát týdně vždy v 8 hodin ráno stejným pracovníkem pomocí dorzo–abdominální masáže (Burrows and Quinn 1935). Vzorky byly odebírány po dobu 5 dní, v období 10.1. až 10.2.2022. Po odběru byl ejakulát uchován při 5 °C až do doby zpracování.

4.1.3 Zpracování inseminační dávky a hodnocení pomocí CASA

První měření CASA proběhlo před naředěním, a byla stanovena koncentrace spermií v ejakulátu jednotlivých kohoutů. Poté byly všechny vzorky smíchány dohromady a zvlášť naředěny komerčně dostupnými ředidly Poultry media®, Raptac® a NeXcell®. Po naředění se použilo 10μl každého vzorku pro hodnocení koncentrace a celkové motility (viz obr. 5). K hodnocení těchto parametrů byla použita mCASA (iSperm®, Aidmics Biotechnology Co., Ltd, Taipei, Taiwan) (viz obr. 4), která je prvním celosvětovým mobilním systémem CASA, pomocí něhož lze ejakulát hodnotit i v terénních podmínkách.

Je vybavena následujícími parametry:

- optické zvětšení: 200x
- optické rozlišení: 1-1 μm
- ohřívač: 37 ± 5 °C (důležité pro hodnocení savčího ejakulátu)

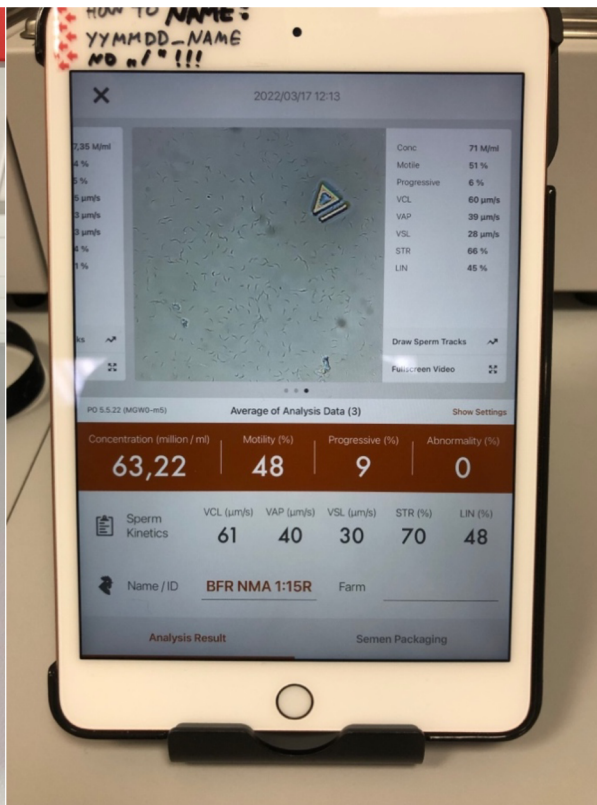
mCASA je vhodná k následujícím analýzám:

- koncentrace: 10-75 mil/ml – optimální 30–60 mil/ml
- celková motilita: 0 % - 100 % pro jakoukoliv koncentraci – optimální 30–60 mil/ml
- progresivní motilita: 0 % - 100 % při koncentraci 10–75 mil/ml – optimální 30–60 mil/ml.

Celková doba analýzy činí pro koncentraci a motilitu <20 sekund a pro progresivní pohyblivost ~ 30 sekund.



Obrázek 4: mCASA (foto: autor)



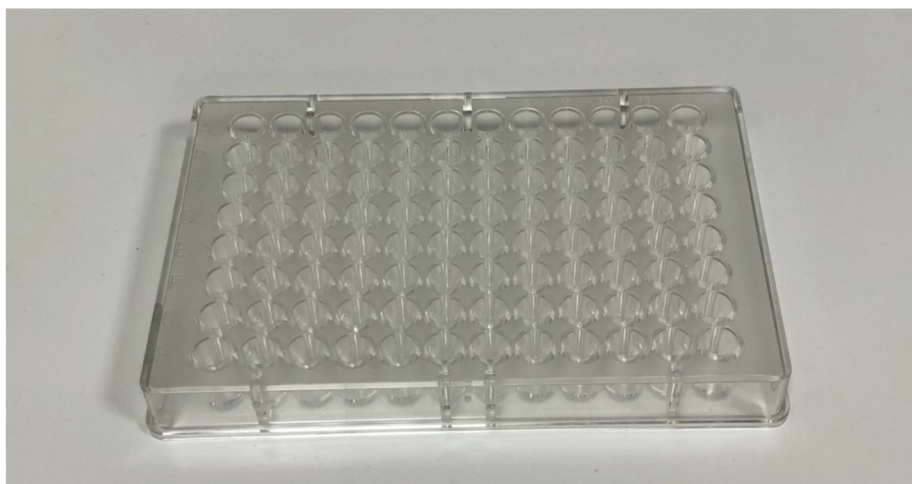
Obrázek 5: Program iSperm (foto: autor)

Po zhodnocení vzorků byly inseminační dávky naplněny do pejet (IMV Technologie, L'Eigle, France) o objemu 0,25 ml. Následně byly pejety uzavřeny těsnícím práškem (IMV Technologie, L'Eigle, France). Takto připravené inseminační dávky byly nejdříve chlazeny v parách tekutého dusíku, poté vhozeny přímo do tekutého dusíku. Takto byly inseminační dávky uchovány až do hodnocení pomocí průtokového cytometru.

Po rozmrazení pejet byly opět hodnoceny funkční parametry inseminačních dávek pomocí CASA a průtokového cytometru.

4.1.4 Hodnocení průtokovým cytometrem

Příprava vzorků pro analýzu pomocí průtokové cytometrie probíhá na vyhřívané desce (38,5 °C). Pro hodnocení vzorků byl připraven tzv. plate s 96 jamkami (viz obr. 6). Pro každý vzorek byly použity minimálně 3 jamky. Do každé jamky bylo napipetováno 100 µl fyziologického roztoku PBS (fosfátový pufr), poté následoval přídavek 10 µl Master Mixu (kombinace fluorescenčních barviv) a naposledy 10 µl vzorku.



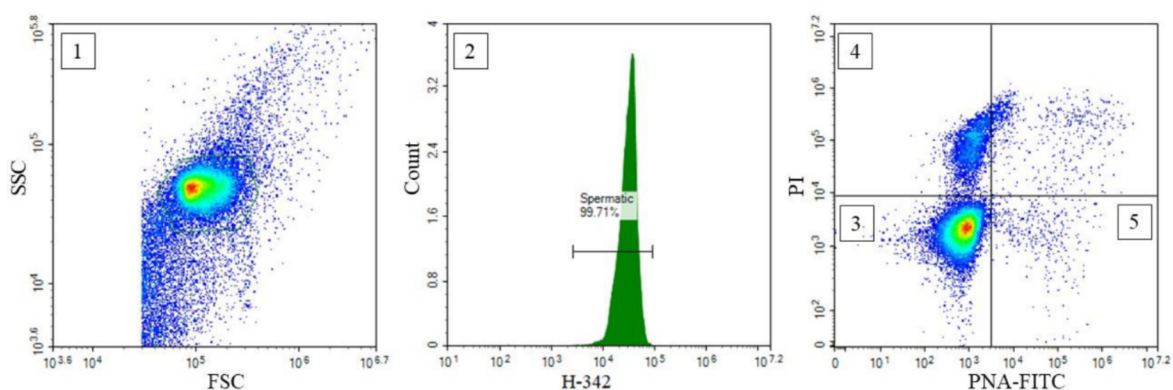
Obrázek 6: Plate s 96 jamkami (foto: autor)

Pro hodnocení pomocí průtokového cytometru byl použit cytometr Novocyte 3000 (Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, California, USA). Cytometr byl vybaven lasery emitující fialové (405 nm), modré (488 nm) a červené (640 nm) záření. Vzorek spermatu o finální koncentraci cca 30 mil. spermii/ml byl obarven fluorescenčními barvivy Hoechst-33342 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o finální koncentraci 16,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PNA-FITC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) o finální koncentraci 0,83 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PI (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o finální koncentraci 13,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a fluorescenčním barvivem MitoTracker Deep Red™ (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o finální koncentraci 80 nM. Vzorky byly po obarvení fluorescenčními barvivy inkubovány po dobu 10 minut ve tmě při teplotě 38 °C.

Při hodnocení vzorku bylo nízkou rychlostí analyzováno minimálně 20 000 částic. Pro analýzu dat a jejich následný sběr byl použit software NovoExpress 1.3.0 (Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, California, USA) (viz obr. 7). Pro oddělení signálu nespermatických částic bylo využito parametrů forward scatter, side scatter a barviva Hoechst-33342.

Varianty složení Master mixu (na 1 jamku):

- 2 μl Hoechst
- 2 μl PI
- 2 μl PNA-FITC
- 4 μl MTR DR



Obrázek 7: Výstup ze softwaru NovoExpress 1.3.0. – strategie gatování 1 - Shluk buněk i nespermatických částic byl zpočátku identifikován pomocí dvourozměrného histogramu s bočním rozptylem (SSC) versus přímým rozptylem (FSC), 2 – Spermie byly identifikovány na základě vtokové sady s barvivem Hoechst-33342 (identifikuje obsah DNA), 3 – procento spermií s intaktní plazmatickou membránou a intaktním akrozomem, 4 – procento spermií s poškozenými plazmatickými membránami, 5 – procento spermií s poškozenými akrozomy (foto: autor).

4.2 Experiment 2

V rámci druhého experimentu bylo postupováno obdobným způsobem jako při Experimentu 1. Byli zde zařazeni stejní jedinci se stejným způsobem ústájení a krmnou dávkou. Vzorek ejakulátu byl získán stejným způsobem odběru. Pro hodnocení jeho kvality byl zvolen systém CASA i průtokový cytometr. Na rozdíl od Experimentu 1 zde byly použity dvě různé varianty složení Master Mixu, přičemž v jednom případě obsahoval barvivo Mitotracker Deep Red™, a ve druhém CellROX Deep Red™. Výsledky jednotlivých měření byly mezi sebou vzájemně porovnávány.

Varianty složení Master mixu:

Pro barvení s MTR DR (na 1 jamku):

- 2μl Hoechst
- 2μl PI
- 2μl PNA-FITC
- 4μl MTR DR

Pro barvení s CellROX DR (na 1 jamku):

- 2μl Hoechst
- 2μl PI
- 2μl PNA-FITC
- 2μl CellROX DR
- 2μl PBS

5 Statistická analýza dat

5.1 Experiment 1

Statistické vyhodnocení proběhlo ve statistickém programu SAS (SAS/STAT 2013). Analýza dat byla hodnocena použitím generalized linear model procedur a jako závislé proměnné byly analyzovány jednotlivé parametry vyplývající z průtokové cytometrie tzn. integrita plazmatické membrány buněk, procento buněk s poškozením akrozomu, procento buněk s poškozenou cytoplazmatickou membránou a procento buněk s poškozením akrozomu i cytoplazmatické membrány.

Statistické modely pro vyhodnocení parametrů průtokové cytometrie po ekvilibraci hodnocené v definovaném časovém intervalu uvedeny níže:

$$1) PMleq_{ijkl} = \mu + DEN_i + EX_j + TEMP_k + EX * TEMP_{jk} + e_{ijkl},$$

$$2) PMDeq_{ijkl} = \mu + DEN_i + EX_j + TEMP_k + EX * TEMP_{jk} + e_{ijkl},$$

$$3) ACRDeq_{ijkl} = \mu + DEN_i + EX_j + TEMP_k + EX * TEMP_{ijk} + e_{ijkl},$$

$$4) PADeq_{ijkl} = \mu + DEN_i + EX_j + TEMP_k + EX * TEMP_{ijk} + e_{ijkl},$$

kde $PMleq_{ijk}$ = integrita plazmatické membrány buněk po ekvilibraci, $PMDeq_{ijk}$ = podíl buněk s poškozenou cytoplasmatickou membránou po ekvilibraci, $ACRDeq_{ijk}$ = podíl buněk s poškozením akrozomu po ekvilibraci, $PADeq_{ijk}$ = podíl buněk s poškozením akrozomu i cytoplazmatické membrány; DEN_i = fixní efekt i-tého odběrového dne ($i = 1$. odběrový den, $n = 9$; $i = 2$. odběrový den, $n = 17$; $i = 3$. odběrový den, $n = 12$; $i = 4$. odběrový den, $n = 18$; $i = 5$. odběrový den, $n = 18$); EX_j = fixní efekt přídatku j-tého ředidla ($j =$ přídatek ředidla Poultry media, $n = 38$; $j =$ přídatek ředidla Raptac, $n = 44$; $j =$ přídatek ředidla NeXcell, $n = 42$); $TEMP_k$ = fixní efekt k-té teploty ekvilibrace po rozmražení ($k =$ varianta ekvilibrace při teplotě 5°C , $n = 58$; $k =$ varianta ekvilibrace při teplotě 40°C , $n = 68$). $EX * TEMP_{ijk}$ = interakce variant přídatku ředidel a teploty ekvilibrace po rozmražení; e_{ijkl} = residuální chyba.

Statistické rozdíly mezi odhadnutými průměry byly detekovány na hladině významnosti $p < 0,05$.

5.2 Experiment 2

V druhém experimentu byl použit tabulkový editor Microsoft Excel 2021 k analýze a vyhodnocení získaných dat. V programu byla vyhodnocena popisná statistika získaných dat a byl proveden dvojitý t-test.

6 Výsledky

6.1 Experiment 1

6.1.1 Výsledky CASA - motilita

V Tabulce 1 jsou znázorněny základní statistické parametry pro motilitu spermií ze všech hodnocených vzorků a během pěti odběrových dní před mrazením i po rozmrazení.

Tabulka 1: Základní statistické parametry hodnocené systémem CASA, kdy BFRM je motilita před mrazením a THWM je motilita po rozmrazení

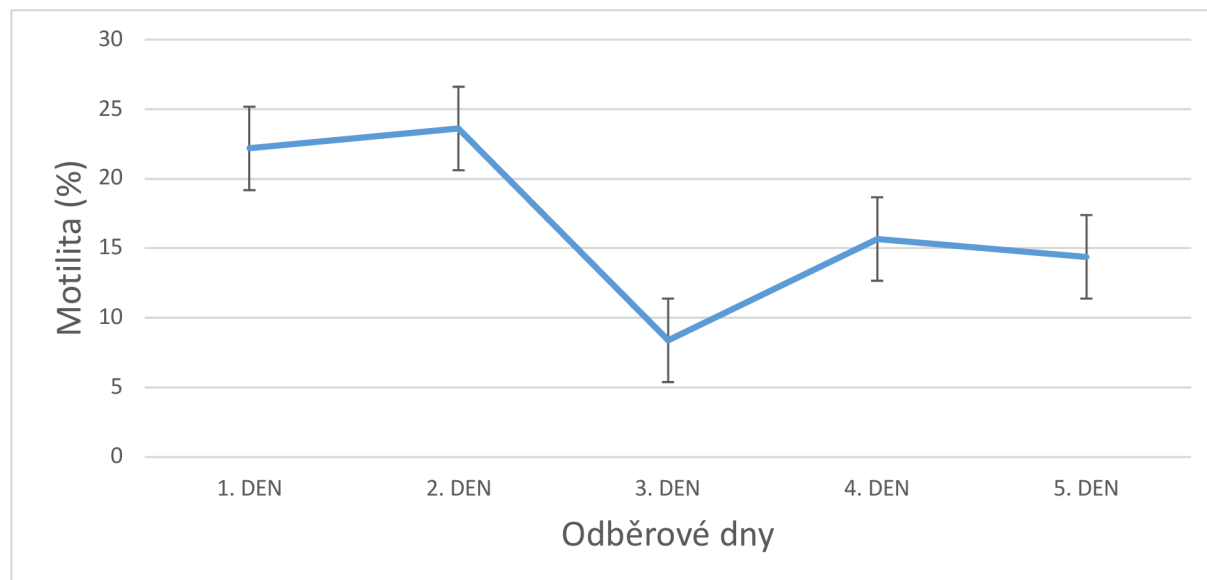
	Četnost	Průměr (%) ± SEM	Min (%)	Max (%)
BFRM	81	52,93 ± 10,16	32,7	59,1
THWM	81	16,85 ± 5,53	8,4	23,6

V Tabulce 2 je uvedena celková motilita po rozmrazení na základě vlivu tří různých ředidel (Poultry media, Raptac a NeXcell). Poultry media a Raptac se od sebe statisticky nelišily, oproti tomu se NeXcell lišil od obou ředidel hodnotou 3,83 % ± 2,41.

Tabulka 2: Vliv ředidla na celkovou motilitu po rozmrazení, kdy THWM je motilita po rozmrazení, LSM je metoda nejmenších čtverců, SEM je směrodatná odchylka. Písmena ve sloupcích ukazují na statistické rozdíly ($p < 0,05$).

Typ ředidla	THWM LSM (%) ± SEM
Poultry media	23,58 ± 2,41 ^a
Raptac	23,12 ± 2,41 ^a
NeXcell	3,83 ± 2,41 ^b

Graf 1: Vliv odběrového dne na motilitu po rozmrazení (THWM-motilita po rozmrazení). Lze vyčíst, že procentuálně byl nejúspěšnější druhý den s $23,61 \% \pm 2,89$, ale nebyly statisticky prokazatelné změny proti 1. a 4-5. Odběrovému dni. Nejhorší byl třetí odběrový den s $8,39 \% \pm 2,89$, statisticky se tento den lišil ovšem pouze od druhého dne.



6.1.2 Výsledky průtokové cytometrie

6.1.2.1 Základní charakteristika výsledků průtokové cytometrie

V tabulce 3 jsou uvedeny základní statistické parametry po rozmrazení, měřeny v pěti odběrových dnech průtokovou cytometrií. Celkově bylo hodnoceno 81 vzorků. Procentuálně byly vyhodnoceny následující parametry: integrita plazmatické membrány, poškození plazmatické membrány a poškození akrozomu. Průměrné procentuální zastoupení životaschopných spermií bylo $36,74 \% \pm 4,53$, spermií s poškozenou plazmatickou membránou bylo $57,55 \% \pm 6,49$, celkově spermií s poškozeným akrozomem bylo $2,94 \% \pm 3,72$ a procentuální zastoupení spermií s poškozenou plazmatickou membránou i poškozeným akrozomem bylo $2,76 \% \pm 3,40$.

Tabulka 3: Základní statistické parametry vyhodnocené průtokovým cytometrem, kdy PMI je integrita plazmatické membrány po rozmrazení, PMD je poškození plazmatické membrány po rozmrazení, ACRD je poškození akrozomu po rozmrazení a PAD je poškození plazmatické membrány i akrozomu po rozmrazení.

	Četnost	Průměr (%) ± SEM	Min (%)	Max (%)
PMI	81	36,74 ± 4,53	28,98	42,79
PMD	81	57,55 ± 6,49	44,98	63,33
ACRD	81	2,94 ± 3,72	0,25	10,19
PAD	81	2,76 ± 3,40	0,62	9,52

6.1.2.2 Procentuální zastoupení životaschopných spermií po rozmrazení

6.1.2.2.1 Popis modelu

Proměnlivost ukazatele byla prokázána z 97,44 % ($p < 0,0001$). V modelové rovnici byl statisticky průkazný vliv dvou sledovaných faktorů, a to vliv odběrového dne ($p < 0,0001$) a vliv použitého ředidla. V následujících podkapitolách jsou znázorněny vlivy odběrových dnů a ředidel.

6.1.2.2.2 Vliv použitého ředidla na životaschopnost spermií

Tabulka 4 udává vliv použití různých ředidel na integritu plazmatické membrány spermií po rozmrazení. Nejlepší hodnoty byly naměřeny u vzorků s ředidlem Raptac s 52,04 % ± 0,72. Vzorky obsahující ředidlo Poultry media se statisticky výrazně nelišily. Nejhorší výsledek byl naměřen u vzorků s ředidlem NeXcell 7,07 % ± 0,72, který se statisticky lišil od obou předchozích ředidel.

Tabulka 4: Vliv použitého ředidla na integritu plazmatické membrány (PMI – integrita plazmatické membrány po rozmrazení, SEM – směrodatná odchylka, LSM – metoda nejmenších čtverců, písmena ve sloupcích ukazují na statistické rozdíly ($p < 0,05$)).

Typ Ředidla	PMI LSM (%) ± SEM
Poultry media	51,11 ± 0,72 ^a
Raptac	52,04 ± 0,72 ^a
NeXcell	7,07 ± 0,72 ^b

6.1.2.2.3 Vliv odběrového dne na životaschopnost spermií

V průběhu odběrových dní byly zjištěny markantní rozdíly v integritě plazmatické membrány. Nejvyšší hodnota integrity plazmatické membrány byla zjištěna 1. den výzkumu s hodnotami $42,79 \% \pm 1,29$. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl u 2. a 5. odběrového dne. Nejnižší hodnoty integrity plazmatické membrány byly naměřeny 4. den s $28,98 \% \pm 0,86$, kde byl zjištěn statistický rozdíl od všech dní (viz Tabulka 5).

Tabulka 5: Vliv odběrového dne na integritu plazmatické membrány, kdy PMI je integrita plazmatické membrány spermií po rozmrazení, SEM je směrodatná odchylka, LSM je metoda nejmenších čtverců a statistické rozdíly jsou znázorněny $p < 0,05$.

Odběrový den	PMI LSM (%) \pm SEM	p < 0,05
1.	$42,79 \pm 1,29$	1:3,4
2.	$38,85 \pm 0,86$	2:4
3.	$35,80 \pm 0,86$	3:1,4
4.	$28,98 \pm 0,86$	4:1-3,5
5.	$37,30 \pm 0,86$	5:4

6.1.2.3 Procentuální zastoupení spermií s poškozenou plazmatickou membránou, poškozeným akrozomem, a poškozením akrozomu i cytoplazmatické membrány

6.1.2.3.1 Popis modelu

Proměnlivost ukazatele pro poškození plazmatické membrány byla prokázána z 96,75 % ($p < 0,0001$). V modelové rovnici byl statisticky průkazný vliv dvou sledovaných faktorů, a to vliv odběrového dne ($p < 0,0001$), a vliv použitého ředidla. Pro poškození akrozomu byla proměnlivost ukazatele prokázána z 95,40 % ($p < 0,0001$). V modelové rovnici byl taktéž statisticky průkazný vliv stejných sledovaných faktorů (vliv odběrového dne ($p < 0,0001$) a vliv použitého ředidla). Dále model znázornil proměnlivost ukazatele poškození plazmatické membrány i akrozomu, která byla prokázána z 91,70 % ($p < 0,0001$). Vliv odběrového dne ($p < 0,0001$) a použitého ředidla byl statisticky průkazný v modelové rovnici.

6.1.2.3.2 Vliv odběrového dne a zvoleného ředidla na poškození cytoplazmatické membrány

V Tabulce 6 je znázorněn vliv odběrového dne na poškození plazmatické membrány. Statisticky nejhorší s hodnotami $63,33 \% \pm 0,98$ byl 3. odběrový den, který ovšem nebyl prokazatelně horší než 5. odběrový den. Statisticky nejlepší byl 1. odběrový den, který se lišil od všech ostatních odběrových dnů.

Tabulka 6: Vliv odběrového dne na poškození cytoplazmatické membrány po rozmrazení (PMD), kdy SEM je směrodatná odchylka, LSM je metoda nejmenších čtverců a statistické rozdíly jsou znázorněny $p < 0,05$.

Odběrový den	PMD LSM (%)	p < 0,05
1 (n=9)	44,98 ± 1,47	1:2-5
2 (n=17)	58,80 ± 0,98	2:1,3
3 (n=12)	63,33 ± 0,98	3:1,2,4
4 (n=18)	59,23 ± 0,98	4:1,3
5 (n=18)	61,42 ± 0,98	5:1

Vliv zvoleného ředidla na poškození cytoplazmatické membrány je znázorněn v Tabulce 7, kde byl statisticky významný rozdíl mezi ředidlem NeXcell, který s hodnotou 87,03 % ± 0,82 měl nejhorší výsledek, a ředidly Poultry media a Raptac, která mezi sebou neměla statisticky významný rozdíl.

Tabulka 7: Vliv zvoleného ředidla na poškození cytoplazmatické membrány po rozmrazení (PMD), kdy SEM je směrodatná odchylka, LSM je metoda nejmenších čtverců a písmena ve sloupcích ukazují na statistické rozdíly ($p < 0,05$).

Typ Ředidla	PMD LSM (%) ± SEM
Poultry media	43,1 ± 0,82 ^a
Raptac	42,57 ± 0,82 ^a
NeXcell	87,03 ± 0,82 ^b

6.1.2.3.3 Vliv odběrového dne a zvoleného ředidla na poškození akrozomu

Vliv odběrového dne na poškození akrozomu je viditelný v Tabulce č. 8. Nejvyšší procentuální zastoupení buněk s poškozeným akrozomem byl 4. odběrový den s 10,19 % ± 0,21 a nejnižší procentuální zastoupení poškozených buněk byl 3. odběrový den, který nebyl statisticky prokazatelně lepší než 2. a 5. odběrový den.

Tabulka 8: Vliv odběrového dne na poškození akrozomu po rozmrazení (ACRD), kdy SEM je směrodatná odchylka, LSM je metoda nejmenších čtverců a statistické rozdíly jsou znázorněny $p < 0,05$.

Odběrový den	ACRD LSM (%)	p < 0,05
1 (n=9)	2,73 ± 0,32	1:2-5
2 (n=17)	1,00 ± 0,21	2:1,4
3 (n=12)	0,25 ± 0,21	3:1,4
4 (n=18)	10,19 ± 0,21	4:1-3,5
5 (n=18)	0,56 ± 0,21	5:1,4

Vliv používaného ředidla na poškození akrozomu je uveden v Tabulce 9. Raptac není statisticky odlišný od obou ostatních ředidel, ale mezi Poultry media, které mělo procentuální nejvyšší zastoupení poškozených buněk s 3,36 % ± 0,18, a NeXcell, které mělo nejnižší procento poškozených buněk, je statistický významný rozdíl.

Tabulka 9: Vliv zvoleného ředidla na poškození akrozomu po rozmrazení (ACRD), kdy SEM je směrodatná odchylka, LSM je metoda nejmenších čtverců a písmena ve sloupcích ukazují na statistické rozdíly ($p < 0,05$).

Typ ředidla	ACRD LSM (%) ± SEM
Poultry media	3,36 ± 0,18 ^a
Raptac	2,87 ± 0,18 ^a
NeXcell	2,60 ± 0,18 ^a

6.1.2.3.4 Vliv odběrového dne a zvoleného ředidla na poškození akrozomu i cytoplazmatické membrány

Znázornění vlivu odběrového dne na poškození akrozomu i cytoplazmatické membrány je uvedeno v tabulce 10. Den s nejnižším procentuálním zastoupením poškozených buněk je 3. den s 0,62 % ± 0,20. 2. a 5. den nebyly statisticky významně rozdílné. Nejvyšší procentuální zastoupení buněk bylo 1. den s 9,52 % ± 0,30 (viz Tabulka 10).

Tabulka 10: Vliv odběrového dne na poškození akrozomu i cytoplazmatické membrány po rozmrazení (PAD), kdy SEM je směrodatná odchylka, LSM je metoda nejmenších čtverců a statistické rozdíly jsou znázorněny $p < 0,05$.

Odběrový den	PAD LSM (%)	p < 0,05
1 (n=9)	9,52 ± 0,30	1:2-5
2 (n=17)	1,33 ± 0,21	2:1
3 (n=12)	0,62 ± 0,20	3:1,4
4 (n=18)	1,60 ± 0,20	4:1,3,5
5 (n=18)	0,73 ± 0,20	5:1,4

Při porovnání vlivu zvoleného ředidla na poškození akrozomu i cytoplazmatické membrány, je ředidlo s nejmenším procentem poškozených buněk Poultry media s 2,47 % ± 0,17, Raptac se oproti těmito hodnotám statisticky významně neliší. NeXcell má nejvyšší procentuální zastoupení poškozených buněk s 3,28 % ± 0,17 (viz Tabulka 11).

Tabulka 11: Vliv zvoleného ředidla na poškození akrozomu i cytoplazmatické membrány po rozmrazení (PAD), kdy SEM je směrodatná odchylka, LSM je metoda nejmenších čtverců a malá písmenka ve sloupcích ukazují na statistické rozdíly ($p < 0,05$).

Typ Ředidla	PAD LSM (%) ± SEM
Poultry media	2,47 ± 0,17 ^a
Raptac	2,53 ± 0,17 ^a
NeXcell	3,28 ± 0,17 ^a

6.1.2.3.5 Vliv teploty ekvilibrace na parametry měřené průtokovou cytometrií

V následující tabulce (Tabulka 12) je znázorněn vliv teploty ekvilibrace spermií po rozmrazení na parametry hodnocené průtokovou cytometrií. Jsou uvedeny procentuální zastoupení u všech parametrů při dvou různých teplotách (5 °C a 40 °C). Hodnoty se statisticky od sebe nelišily, a to u žádného z hodnocených parametrů.

Tabulka 12: Vliv teploty ekvibrace na parametry měřené průtokovou cytometrií po rozmrazení (PMI – integrita plazmatické membrány, PMD – poškození plazmatické membrány, ACRD – poškození akrozomu, PAD – poškození akrozomu i cytoplazmatické membrány, SEM - směrodatná odchylka, LSM - metoda nejmenších čtverců, a malá písmenka ve sloupcích ukazují na statistické rozdíly ($p < 0,05$).

Teplota	PMI LSM (%) ± SEM	PMD LSM (%) ± SEM	ACRD LSM (%) ± SEM	PAD LSM (%) ± SEM
5 °C	36,87 ± 0,55 ^a	57,62 ± 0,62 ^a	2,85 ± 0,14 ^a	2,65 ± 0,13 ^a
40 °C	36,61 ± 0,67 ^a	57,46 ± 0,76 ^a	3,04 ± 0,17 ^a	2,87 ± 0,16 ^a

6.2 Experiment 2

6.2.1 Zjištění mitochondriální aktivity spermií pomocí průtokového cytometru

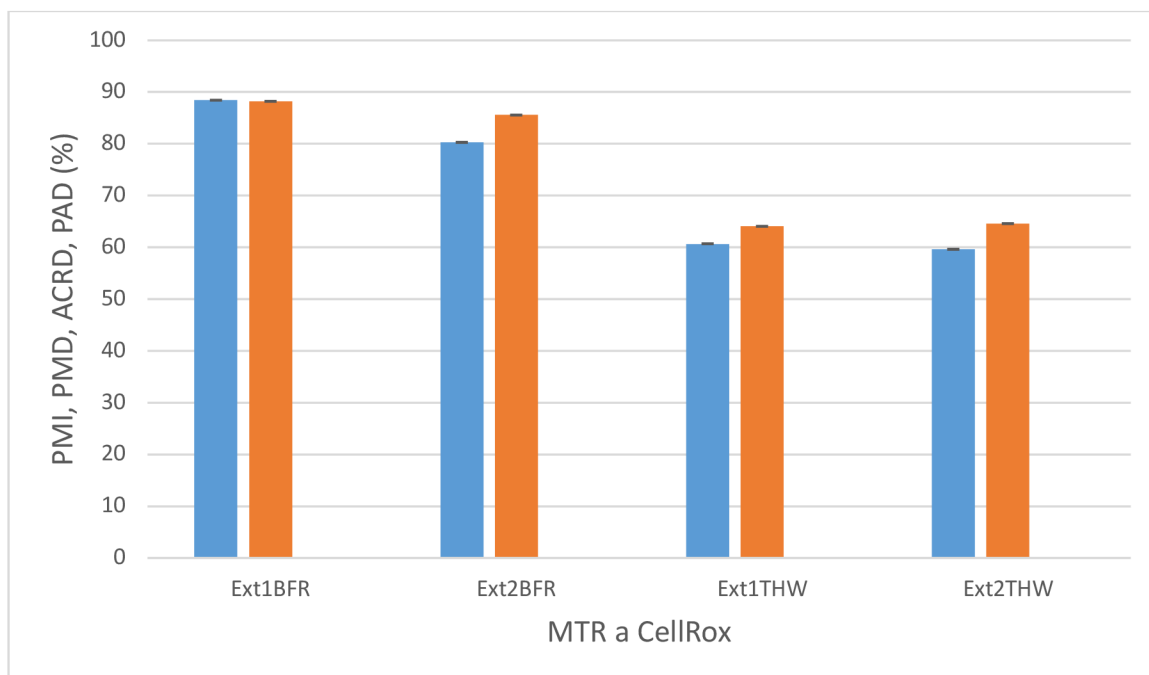
6.2.1.1 Porovnání barviv MitoTracker Deep Red™ & CellRox Deep Red™

V tabulce 13 je znázorněno porovnání hodnocených parametrů (PMI, PMD, ACRD, PAD) pomocí průtokové cytometrie před i po rozmrazení v závislosti na používání dvou různých barviv MitoTracker Deep Red™ (MTR) a CellRox Deep Red™, a dvou různých ředidel Poultry media (Ext1) a Raptac (Ext2). Nejvyšší procentuální zastoupení buněk s nepoškozenou plazmatickou membránou (PMI) před mrazením bylo zjištěno u ředidla Poultry media (PM) s hodnotou 82,71 % ± 0,04. Při použití ředidla Raptac byla PMI 75,43 % ± 0,12. Hodnoty PMI po rozmrazení byly následující; PM - 61,94 % ± 0,06 a Raptac - 62,61 % ± 0,10).

Tabulka 13: Porovnání přídavku barviv MitoTracker Deep Red™ & CellRox Deep Red™ (MTR – MitoTracker Deep Red™, Ext1BFR – Poultry media před mrazením, Ext2BFR – Raptac před mrazením, Ext1THW – Poultry media po rozmrazení, Ext2THW – Raptac po rozmrazení)

Ukazatel	MTR	CellRox
Ext1BFR Průměr (%) ± SEM	88,45 ± 0,01	88,24 ± 0,01
Ext2BFR Průměr (%) ± SEM	80,30 ± 0,06	85,58 ± 0,05
Ext1THW Průměr (%) ± SEM	60,70 ± 0,07	64,09 ± 0,10
Ext2THW Průměr (%) ± SEM	59,63 ± 0,09	64,61 ± 0,15

Graf 2: Porovnání přidavku barviv MTR a CellRox na průměrné hodnoty parametrů s chybovými úsečkami, jako celková integrita plazmatické membrány, poškození plazmatické membrány, poškození akrozomu a poškození akrozomu i plazmatické membrány spermii, a s různými ředidly (MTR - MitoTracker Deep Red™, Ext1BFR – Poultry media před mražením + kryoprotektant NMA, Ext2BFR – Raptac před mražením + kryoprotektant NMA, Ext1THW – Poultry media po rozmrazení, Ext2THW – Raptac po rozmrazení).



Podle dvojběžrového t-testu nebyl prokázán statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi průměry hodnocených parametrů (PMI, ACRD, PAD, PMD) v závislosti na používání dvou různých barviv MitoTracker Deep Red™ a CellRox Deep Red™, a dvou různých ředidel Poultry media a Raptac.

Z Grafu č. 3 lze soudit, že u kohoutího spermatu jsou zastoupeny obě cesty mitochondriálního metabolismu, protože naměřené procentuální zastoupení barviv MitoTracker Deep Red™ a CellRox Deep Red™ se nelišilo. Na hodnoty neměl vliv ani přídavek různého ředidla. Naše předběžné výsledky naznačují, že barvivo CellRox Deep Red™ značí mitochondriální aktivitu stejně jako Mitotracker Deep Red™, a nemusí tudíž indikovat pouze oxidační stres. Pro potvrzení našich výsledků je třeba provést více pozorování.

7 Diskuze

Hodnocení funkčních parametrů spermií pomocí průtokového cytometru bylo provedeno na kohoutích spermiích. V této studii bylo použito české národní plemeno Česká zlatá kropenatá, které bylo v roce 1992 zařazeno do genových zdrojů ČR. V roce 2020 bylo evidováno na území ČR pouze 186 kusů. Tendence narůstajícího počtu v následujících letech je ale příznivá.

Pro zachování takových genetických zdrojů je nepostradatelné správné ředění ejakulátu a kryokonzervace, která se stále vylepšuje využíváním nových kryoprotektantů, aby spermie zůstala po rozmrazení co nejvíce životaschopná a co nejméně poškozená. Počet oplodněné drůbeže, která se inseminovala mrazeným spermatem, je oproti čerstvému spermatu dramaticky nižší. Zřejmě dodnes neexistují standardizované protokoly pro kryokonzervaci kohoutích spermií.

Kohoutí, všeobecně ptačí, spermie se od savčích spermií značně odlišují, a jsou tak náchylnější k poškození během procesu kryokonzervace. Proto je celý proces obtížnější a citlivější na případné chyby v mrazících postupech. Hlavička spermie u drůbeže je úzká a obsahuje malé množství cytoplazmy, bičík je delší a užší oproti jiným druhům, a to velmi ztěžuje pohyblivost spermií v kryoprotektivních tekutinách, a vede zejména k poškození mitochondrií ve střední části (Saleh Mohammad et al. 2021).

V experimentu 1 byla porovnávána tři ředidla v kombinaci s přídatkem 9 % NMA, a jejich vliv na funkční parametry spermií. Nejen ředidla a kryoprotektant NMA hrály roli ve vyhodnocování parametrů, ale i odběrový den. Byly pozorovány značné odchylky v porovnání jednotlivých odběrových dnů a hodnocených parametrech.

Pro kryokonzervaci semene drůbeže se v současnosti používá mnoho ředidel, jako je např. Lake and Ravie (LR), BHSV, Beltsville a EK. Většina ředidel se skládá z fosforečnanu draselného, glutamátu sodného, fruktózy a octanu sodného kromě jiných pufrů a solí. Existují také některá komerčně dostupná ředidla, včetně Poultry media[®] bez antibiotik, Raptac[®] a NeXcell[®] (Zong et al. 2023). Výhoda komerčně dostupných ředidel Poultry media[®], Raptac[®] a NeXcell[®] se projevuje při manipulaci v laboratoři a zároveň v jejich dobré cenové dostupnosti. V experimentu 1 byl porovnáván vliv ředidel Poultry media[®], Raptac[®] a NeXcell[®] na parametry spermií po rozmrazení. Předpokládalo se, že ředidlo NeXcell[®] dospěje k nejlepším výsledkům, protože obsahuje zároveň i antioxidanty. Navzdory očekávání měl v experimentu nejhorší výsledky, a tak se s hodnotami $3,83 \pm 2,41$ statisticky významně lišil od ředidel Poultry media[®] a Raptac[®]. Ředidla Poultry media[®] a Raptac[®] mezi sebou neměla statisticky významné rozdíly.

Dle Zong et al. (2023) bývá kohoutí ejakulát ředěn v poměru 1:1 až 1:4, a studie mezi sebou neprokazují statisticky významné rozdíly. V tomto výzkumu byl ejakulát ředěn v poměru 1:15, neboť neproběhla žádná studie s tímto poměrem ředění.

Nejvhodnější kryoprotektiva u kohoutích spermií jsou glycerol, dimethylacetamid (DMA) a NMA. Výsledky různých studií poukazovaly na to, že použití NMA vykazovalo vyšší míru plodnosti oproti využití DMA. Ve studii Pérez-Marín et al. (2019) přesto bylo prokázáno,

že přidáním 9 % NMA do ředidla se celková integrita plazmatické membrány a motilita spermií zhoršila. Zaniboni et al. (2022) ve své studii porovnávali DMA a NMA mezi sebou, a došli k závěru, že DMA bylo nejefektivnější při koncentraci 6 %, zato NMA vykazovalo lepší výsledky při koncentraci 2 %. NMA i DMA ovšem vykazovaly podobný pozitivní účinek na kvalitu kryokonzervovaného spermatu. Dle Mosca et al. (2019) lze kryoprotektanty použít v různých koncentracích. V porovnání 6 % a 9 % se při 6 % zlepšila kvalita pohybu spermií, ale zároveň byla negativně ovlivněna životaschopnost spermií. Ve studii Miranda et al. (2017) bylo zjištěno, že přidáním 9 % NMA do ejakulátu a následným rozmrazením při 5 °C se zlepšuje motilita po rozmrazení. Zároveň bylo prokázáno, že teplota 5 °C je příznivější pro rozmrazení spermií než 37 °C. Ve studii Pranay Kumar et al. (2018) byly porovnávány tři různé koncentrace (6 %, 9 %, 12 %) NMA a zjistilo se, že při 9 % koncentraci bylo 38 % spermií viabilních, zatímco při 12 % koncentraci bylo pouze 17 % spermií viabilních. Dle ostatních studií (Ehling et al. 2012) lze také pozorovat změnu plodnosti při použití NMA u různých plemen kuřat. Výzkum Sasaki et al. (2010) byl velmi podobný našemu výzkumu. K naředěnému spermatu, po ekvilibraci při 5 °C, bylo přidáno v poměru 1:1 NMA, a konečná koncentrace měla 9 %. Líhivost z tohoto experimentu byla přes 90 %.

Ve studii Hanzawa et al. (2010) byly porovnávány NMA (N-methylacetamid), DMF (dimethylformamid), DMA (dimethylacetamid) a DMSO (dimethylsulfoxide), a rozmrazení probíhalo při 5 °C. Výsledkem celého experimentu bylo, že plodnost spermatu byla mnohem vyšší u spermií s kryoprotektantem NMA než u ostatních.

Na základě takových výsledků různých studií byl ve výzkumu použit kryoprotektant NMA s koncentrací 9 %.

V našem výzkumu byl také porovnáván vliv dvou různých teplot (5 °C a 40 °C) na funkční parametry spermií po rozmrazení. Teplota 40 °C je spermiím fyziologicky bližší, protože připomíná teplotu uvnitř slepice, do kterého bezprostředně po inseminaci vstupují. Teplota 5 °C byla nastavena jako kontrolní. Po rozmrazení se spermie ekvilibrovaly v obou teplotách po dobu 30 minut. Výsledkem pokusu bylo, že na rozdíl od výše zmíněného výzkumu Miranda et al. (2017) neexistuje statisticky významný rozdíl mezi teplotami. Velmi důležitý aspekt je samozřejmě i lidská kompetence a důslednost v provádění experimentů. Nejpřesněji se mohou různé experimenty a odběrové dny jednotlivých experimentů porovnávat, pokud je zpracovává vždy jeden vědec nebo vědecký tým, který na všech experimentech pracuje se stejnou precizností.

V Experimentu 2 byla porovnávána dvě barviva pro průtokovou cytometrii mezi sebou. Jednalo se o MitoTracker Deep Red™ a CellRox Deep Red™, která obě působí v mitochondriích. MitoTracker znázorňuje mitochondriální membránový potenciál a CellRox indikuje reaktivní formy kyslíku. Experiment Plaza Davila et al. (2015) naznačuje, že fluorescenční barvivo CellRox identifikuje především superoxid, a že produkce superoxidu může odrážet spíše intenzivní mitochondriální aktivitu než oxidační stres. Podobných výsledků bylo dosaženo i v této práci, kdy byly u obou použitých barev naměřeny hodnoty, které se od sebe vzájemně statisticky nelišily. Je tedy pravděpodobné, že CellRox barví spíše viabilní buňky s aktivními mitochondriemi, než buňky s oxidativním poškozením.

8 Závěr

Cílem této práce bylo posouzení kvality spermatických buněk hodnocením jejich funkčních parametrů pomocí průtokové cytometrie, vytvoření ucelené rešerše o výhodách průtokové cytometrie v praxi, a porovnání cytometrie s metodou CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). V rámci diplomové práce byl získán ejakulát kohoutů, který byl analyzován jak přístrojem CASA, tak průtokovým cytometrem. Pro experiment bylo zvoleno původní české plemeno Česká slepice zlatá kropenatá, které je řazeno mezi genetické zdroje.

V rámci prvního experimentu byly porovnávány funkční parametry spermií při použití tří různých komerčně dostupných ředidel (Poultry media[®], Raptac[®] a NeXcell[®]). V rámci pokusu byla hodnocena celková motilita před mrazením i po rozmrazení, integrita plazmatické membrány, poškození plazmatické membrány, poškození akrozomu a poškození cytoplazmatické membrány i akrozomu. Z našich výsledků vyplývá, že nejlepších hodnot bylo dosaženo při použití ředidel Poultry media[®] a Raptac[®]. Oproti nim nejhorších výsledků bylo dosaženo při použití ředidla NeXcell[®].

Druhý experiment byl zaměřen na barviva, která se běžně používají pro hodnocení kvality spermií v průtokové cytometrii - MitoTracker Deep Red[™] a CellRox Deep Red[™]. MitoTracker poukazuje na mitochondriální membránový potenciál a CellRox detekuje reaktivní formy kyslíku. V našem výzkumu bylo dosaženo numericky podobných výsledků (včetně statisticky neprůkazného rozdílu), což značí, že obě testovaná barviva jsou potenciálně schopna detekovat mitochondriální aktivitu.

Na závěr je možno říci, že ideální a v praxi plně využitelný protokol pro kryokonzervaci kohoutích spermií doposud nebyl sestaven. Pro zajištění rychlejšího a ekonomicky výhodnějšího zlepšování genetického zisku díky kryokonzervaci a umělé inseminaci drůbeže je proto důležité i nadále pokračovat ve výzkumu a sestavování mrazících protokolů, přinášet nové inovace zajišťující lepší přežitelnost a oplozeníschopnost spermií po rozmrazení.

Cílem této práce bylo prokázat hypotézu, že lze detekovat průkazné rozdíly ve funkčních parametrech spermií v inseminačních dávkách hospodářských zvířat po rozmrazení pomocí průtokové cytometrie ve vztahu k typu zvoleného ředidla a kryoprotektivního agens. Tuto hypotézu lze na základě našich výsledků potvrdit, jelikož se parametry při používání různých ředidel mezi sebou lišily, a je to zjistitelné právě na základě průtokové cytometrie. Z našeho výzkumu vyplývá, že nejlepší hodnoty měla ředidla Raptac[®] a Poultry media[®] v porovnání k ředidlu NeXcell[®], které se od obou ředidel statisticky významně lišilo, a že průtoková cytometrie je spolehlivý nástroj na hodnocení parametrů u spermatických buněk.

9 Literatura

- Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. 2017. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnology* **37(2)**: 163–176.
- Aires VA, Hinsch KD, Müller-Schlösser F, Bogner K, Müller-Schlösser S, Hinsch E. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* **60**:269-279.
- Aitken RJ, Baker MA. 2006. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology* **250**:66-69.
- Allai L, Benmoula A, Da Silva Maia M, Nasser B, El Amiri B. 2018. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science* **192**:6-17.
- Amann RP, Waberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* **81(1)**:5-17.
- Asadzadeh N, Abdollahi Z, Esmaeilkhanian S, Masoudi R. 2021. Fertility and flow cytometry evaluations of ram frozen semen in plant-based extender supplemented with Mito-TEMPO. *Animal Reproduction Science* **233**:106836.
- Baláží A, Vašíček J, Svoradová A, Macháč M, Jurčík R, Huba J, Pavlík I, Chrenek P. 2020. Comparison of three different methods for the analysis of ram sperm concentration. *Slovak J. Anim. Sci.* **53(2)**:53-58.
- Bansal AK, Bilaspuri GS. 2010. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International* **2011**:686137.
- Barbagallo F, La Vignera S, Cannarella R, Aversa A, Calogero AE, Condorelli RA. 2020. Evaluation of Sperm Mitochondrial Function: A Key Organelle for Sperm Motility. *J. Clin. Med.* **9**:363.
- Bergeron A, Manjunath P. 2006. New Insights Towards Understanding the Mechanisms of Sperm Protection by Egg Yolk and Milk. *Molecular Reproduction and Development* **73**:1338-1344.
- Bianchi E, Wright GJ. 2020. Find and fuse: Unsolved mysteries in sperm-egg recognition. *Plos Biology* **18(11)**:e3000953.
- Bianchi Rodrigues Alves M, Cesar de Andrade AF, Paes de Arruda R, Batissaco L, Florez-Rodriguez SA, Lançon R, Marcele Martins de Oliveira B, Andrade Torres M, Mouri Ravagnani G, Guibu de Almeida T, Vellone VS, Carvalho Celeghini EC. 2015. An Efficient Technique to Detect Sperm Reactive Oxygen Species: The CellRox Deep Red[®] Fluorescent Probe. *Biochemistry & Physiology* **4**:2.

- Boe-Hansen GB, Satake N. 2019. An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA. *Theriogenology* **137**:93-103.
- Bollwein H, Bittner L. 2018. Impacts of oxidative stress on bovine sperm function and subsequent in vitro embryo development. *Anim Reprod.* **15**:703-710.
- Brito LFC, Althouse GC, Aurich C, Chenoweth PJ, Eilts BE, Love CC, Luvoni GC, Mitchell JR, Peter AT, Pugh DG, Waberski D. 2016. Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology* **85**:1507-1527.
- Broekhuijse MLWJ, Šoštarić E, Feitsma H, Gadella BM. 2011. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenology* **76**:1473-1486.
- Bucher K, Malama E, Siuda M, Janett F, Bollwein H. 2019. Multicolor flow cytometric analysis of cryopreserved bovine sperm: A tool for the evaluation of bull fertility. *J. Dairy Sci.* **102**:11652-11669.
- Bulkeley E, Santistevan AC, Varner D, Meyers S. 2022. Imaging flow cytometry to characterize the relationship between abnormal sperm morphologies and reactive oxygen species in stallion sperm. *Reproduction in Domestic Animals* **58**:10-19.
- Bustani GS, Baiee FH. 2021. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanism of semen and semen extenders. *Veterinary World* **14(5)**:1220-1233.
- Christensen P, Stenvang PJ, Godfrey LW. 2013. A Flow Cytometric Method for Rapid Determination of Sperm Concentration and Viability in Mammalian and Avian Semen. *Journal of Andrology* **25(2)**:255-264.
- Crespilho AM, Sá Filho MF, Dell'Aqua Jr JA, Nichi M, Monteiro GA, Avanzi BR, Martins A, Papa FO. 2012. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livestock Science* **140**:1-6.
- Da Costa R, Redmann K, Schlatt S. 2021. Simultaneous detection of sperm membrane integrity and DNA fragmentation by flow cytometry: A novel and rapid tool for sperm analysis. *Andrology* **9**:1254-1263.
- Davila MP, Munoz PM, Tapia JA, Ferrusola CO, S Silva CCB, Pena FJ. 2015. Inhibition of mitochondrial complex I leads to decreased motility and membrane integrity related to increased hydrogen peroxide and reduced ATP production, while the inhibition of glycolysis has less impact on sperm motility. *PLoS One* **10(9)**.
- DeJarnette JM, Harstine BR, McDonald K, Marshall. 2021. Commercial application of flow cytometry for evaluating bull sperm. *Animal Reproduction Science* **246**:106838.
- Dolník M, Mudroňová D, Pošivák J, Lazar G, Mudroň P. 2019. Flow cytometry in assessment of sperm integrity and functionality – a review. *ACTA VET. BRNO* **88**:169-175.
- 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.

- Dutta S, Henkel R, Sengupta P, Agarwal A. 2020. Physiological role of ROS in sperm function. *Male infertility: Contemporary clinical approaches, Andrology, ART and antioxidants* 337-345.
- Ehling C, Taylor U, Baulain U, Weigend S, Henning M, Rath D. 2012. Cryopreservation of semen from genetic resource chicken lines. *Agriculture and Forestry Research* **3**:151-158.
- Elsayed M, El-Sherry TM, Abdelgawad. 2015. Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using Image-J. *Theriogenology* **84**:1367-1377.
- Evenson DP. 2016. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA[®]) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science* **169**:56-75.
- Fattah A, Sharafi M, Masoudi R, Shahverdi A, Esmaili V, Najafi A. 2017. Effects of Hoechst33342 staining on the viability and flow cytometric sex-sorting of frozen-thawed ram sperm. *Cryobiology* **74**:148-153.
- Gacem S, Bompard D, Valverde A, Catalán J, Miró J, Soler C. 2020. Optimal frame rate when there were stallion sperm motility evaluations and determinations for kinematic variables using CASA-Mot analysis in different counting chambers. *Animal Reproduction Science* **223**:106643.
- Garner DL. 2009. Hoechst 33342: The dye that enabled differentiation of living X-and Y-chromosome bearing mammalian sperm. *Theriogenology* **71**:11-21.
- Getachew T. 2016. A Review Article of Artificial Insemination in Poultry. *World's Veterinary Journal* **6(1)**:25-33.
- Gibb Z, Aitken RJ. 2015. The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. *BioMed Research International* **2016**:9380609.
- Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* **63**:445-457.
- Gonzalez-Castro R. A, Peña F J, Herickhoff LA. 2022. Validation of a new multiparametric protocol to assess viability, acrosome integrity and mitochondrial activity in cooled and frozen thawed boar spermatozoa. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* **102(5)**:400-408.
- Hallap T, Nagy S, Jaakma Ü, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 2005. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. *Theriogenology* **63**:2311-2322.
- Hanzawa S, Niinomi T, Miyata T, Tsutsui M, Tajima A. 2010. Cryopreservation of chicken semen using N-methylacetamide as cryoprotective agent. *Japanese Journal of Poultry Science* **47**:27-32.

- Henning H, Nguyen QT, Wallner U, Luther AM, Waberski D. 2022. Liquid preservation of boar semen: Insights into the sperm's energy budget. *Animal Reproduction Science* **247**:107102.
- Herickhoff LA, Gonzalez-Castro RA. 2019. Comparison of Hoechst 33342 and SYBR 14 for the identification of boar spermatozoa during flow cytometric assessment of membrane and acrosome integrity. *Theriogenology* **137**:127-137.
- Hernández-Avilés C, Ramírez-Agámez L, Love CC, Friedrich M, Pearson M, Kelley DE, Beckham AMN, Teague SR, LaCaze KA, Brinsko SP, Varner DD. 2021. The effects of metabolic substrates glucose, pyruvate, and lactate added to a skim milk-based semen extender for cooled storage of stallion sperm. *Theriogenology* **161**:83-97.
- Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, Shahverdi A. 2018. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive Healthcare Ltd.* **37**:327-339.
- Hossain S, 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 J Androl* **13(3)**:406-419.
- Chankitisakul V, Boonkum W, Kaewkanha T, Pimprasert M, Ratchamak R, Authaida S, Thananurak P. 2022. Fertilizing ability and survivability of rooster sperm diluter with a novel semen extender supplemented with serine practical use on smallholder farms. *Poultry Science* **101**:102188.
- Ibanescu I, Siuda M, Bollwein H. 2020. Motile sperm subpopulations in bull semen using different clustering approaches – Associations with flow cytometric sperm characteristics and fertility. *Animal Reproduction Science* **215**:106329.
- Jäkel H, Henning H, Luther AM, Rohn K, Waberski D. 2021. Assessment of chilling injury in hypothermic stored boar spermatozoa by multicolor flow cytometry. *Cytometry Part A* **99(10)**:1033-1041.
- Kamphuis C, Duenk P, Veerkamp RF, Visser, Singh G, Nigsch A, De Mol RM, Broekhuijse MLWJ. 2020. Machine learning to further improve the decision which boar ejaculates to process into artificial insemination doses. *Theriogenology* **144**:112-121.
- Kanno C, Kang SS, Kitade Y, Yanagawa Y, Takahashi Y, Nagano M. 2016. Simultaneous evaluation of plasma membrane integrity, acrosomal integrity, and mitochondrial membrane potential in bovine spermatozoa by flow cytometry. *Zygote* **24(4)**: 529-536.
- Kowalczyk A. 2021. The Role of the Natural Antioxidant Mechanism in Sperm Cells. *Reproductive Sciences* available from: <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00795-w>.
- Lemma A. 2011. Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. *Artificial insemination in farm animals* **12**:191-216.

- Llavanera M, Ribas-Maynou J, Delgado-Bermúdez A, Recuero S, Muiño R, Hidalgo CO, Tamargo C, Bonet S, Mateo-Otero Y, Yeste M. 2021. Sperm chromatin condensation as an in vivo fertility biomarker in bulls: a flow cytometry approach. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **12**(1):1-12.
- Llavanera M, Ribas-Maynou J, Delgado-Bermúdez A, Recuero S, Muiño R, Hidalgo CO, Tamargo C, Bonet S, Mateo-Otero Y, Yeste M. 2021. Sperm chromatin condensation as an in vivo fertility biomarker in bulls: a flow cytometry approach. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **12**:115.
- Love CC, Thompson JA, Brinsko SP, Rigby SL, Blanchard TL, Lowry VK, Varner DD. 2003. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology* **60**:1127-1138.
- Madhuri, D. Gupta, V. Nema, S. Patidar, A. Shivhare, M. Singh, N. and Shakya, V. 2012. Modern semen evaluation techniques in domestic animals: A review. *International Journal of Biomedical and Life Sciences* **3**:10-22.
- Malama E, Zeron Y, Janett F, Siuda M, Roth Z, Bollwein H. 2017. Use of computer – assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. *Theriogenology* **87**:79-90.
- Manjunath P. 2012. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim. Reprod.* **9**:809-815.
- Martínez-Pastor F. 2021. What is the importance of sperm subpopulations? *Animal Reproduction Science* **233**:106844.
- Matsuzaki M, Sasanami T. 2022. Sperm motility regulation in male and female bird genital tracts. *The Journal of Poultry Science* **59**:1-7.
- McKinnon KM. 2019. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* **120**:5.1.1-5.1.11.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* **57**:327-344.
- Miranda M, Kulíková B, Vašíček J, Olexiková L, Iaffaldano N, Chrenek P. 2017. Effect of cryoprotectants and thawing temperature on chicken sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals* **53**:93-100.
- Mocé E, Fajardo AJ, Graham JK. 2016. Human sperm cryopreservation. *EMJ* **1**:86-91.
- Moradpour F. 2019. A Review on Animals Semen Characteristics: Fertility, Reproduction and Development. *Asian J. Adv in Agric Res* **1**: 1-9.
- Morrell JM, Valeanu AS, Lundeheim N, Johannisson A. 2018. Sperm quality in frozen beef and dairy bull semen. *Acta Veterinaria Scandinavica* (2018) **60**:41.

- Mosca F, Zaniboni L, Abdel AS, Madeddu M, Iaffaldano N, Cerolini S. 2019. Effect of dimethylacetamide and N-methylacetamide on the quality and fertility of frozen/thawed chicken semen. *Poultry Science* **98**:6071-6077.
- Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM. 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology of reproduction* **68(5)**:1828-1835.
- Neila-Montero M, Riesco MF, Alvarez M, Montes-Garrido R, Boixo JC, de Paz P, Anel-Lopez L, Anel L. 2021. Centrifugal force assessment in ram sperm: identifying species-specific impact. *Acta Veterinaria Scandinavica* (2021) **63**:42.
- Nesci S, Spinaci M, Galeati G, Nerozzi C, Pagliarani A, Algieri C, Tamanini C, Bucci D. 2020. Sperm function and mitochondrial activity: An insight on boar sperm metabolism. *Theriogenology* **144**:82-88.
- Partyka A, Nizański W, Łukaszewicz E. 2010. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology* **74**:1019-1027.
- Partyka A, Nizański W. 2022. Advances in storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science* **246**:106921.
- Peña FJ, Ball BA, Squires EL. 2018. A New Method for Evaluating Stallion Sperm Viability and Mitochondrial Membrane Potential in Fixed Semen Samples. *Cytometry Part B* **94B**:302-311.
- Peña FJ, Ferrusola CO, Muñoz PM. 2016. New flow cytometry approaches in equine andrology. *Theriogenology* **86**:366-372.
- Pérez-Marín CC, Arando A, Mora C, Cabello A. 2019. Fertility after insemination with frozen-thawed sperm using N-methylacetamide extender on the Combatiente Español avian breed. *Animal Reproduction Science* **208**:106111
- Petričáková K, Janošíková M, Ptáček M, Zita L, Savvulidi FG, Partyka A. 2022. Comparison of Commercial Poultry Semen Extenders Modified for Cryopreservation Procedure in the Genetic Resource Program of Czech Golden Spotted Hen. *Animals* **12**:2886.
- Pintus E, Ros-Santaella JL. 2021. Impact of Oxidative Stress on Male Reproduction in Domestic and Wild Animals. *Antioxidants* 2021 **10(7)**:1154.
- Pranay Kumar K, Swathi B, Shanmugam M. 2018. Cryopreservation of rooster semen using N-methylacetamide as cryoprotective agent. *International Journal of Agriculture Sciences* **10**:5123-5126.
- Purdy PH, Graham JK, Azevedo HC. 2021. Evaluation of boar and bull sperm capacitation and the acrosome reaction using flow cytometry. *Animal Reproduction Science* **233**:106846.
- Quan GB, Ma Y, Li J, Wu GQ, Li DJ, Ni YN, LV CR, Zhu L, Hong QH. 2015. Effects of Hoechst33342 staining on the viability and flow cytometric sex-sorting of frozen-thawed ram sperm. *Cryobiology* **70(1)**:23-31.

- Quan GB, Ma Y, Li J, Wu GQ, Li DJ, Ni YN, Lv CR, Zhu L, Hong QH. 2015. Effects of Hoechst33342 staining on the viability and flow cytometric sex-sorting of frozen-thawed ram sperm. *Cryobiology* **70**:23-31.
- Quirino M, Jakop U, Mellagi APG, Bortolozzo FP, Jung M, Schulze M. 2022. A 5-color flow cytometry panel to assess plasma membrane integrity, acrosomal status, membrane lipid organization and mitochondrial activity of boar and stallion spermatozoa following liquid semen storage. *Animal Reproduction Science* **247**:107076.
- Raei H, Torshizi MAK, Sharafi M, Ahmadi H. 2022. Sperm flow cytometric parameters, antioxidant status, and testicular histomorphology in roosters fed diets supplemented with camphor. *Poultry Science* **101**:102014.
- Raheja N, Choudhary S, Grewal S, Sharma N, Kumar N. 2018. A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies* **6(3)**:239-245.
- Saleh Mohammad M, Mardenli O, Al-Tawash ASA. 2021. Evaluation of The Cryopreservation Technology of Poultry Sperm: A Review Study. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* **735**:012016.
- Sasaki K, Tatsumi T, Tsutsui M, Niinomi T, Imai T, Naito M, Tajima A, Nishi Y. 2010. A Method for Cryopreserving Semen from Yakido Roosters Using N-Methylacetamide as a Cryoprotective Agent. *The Journal of Poultry Science* **47**:297-301.
- Setiawan R, Priyadarshana C, Miyazaki H, Tajima A, Asano A. 2021. Functional difference of ATP-generating pathways in rooster sperm (*Gallus gallus domesticus*). *Animal Reproduction Science* **233**:106843.
- Shahverdi A, Sharafi M, Gourabi H, Amiri Yetka A, Esmaeili V, Sharbatoghli, Janzamin E, Hajnasrollahi, Mostafayi F. 2015. Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology* **83**:78-85.
- Sharma R, Iovine C, Agarwal A, Henkel R. 2021. TUNEL assay—Standardized method for testing sperm DNA fragmentation. *Andrologia* **53**:e13738.
- Singh AK, Kumar A, Bisla A. 2021. Computer-assisted sperm analysis (CASA) in veterinary science: A review. *Indian Journal of Animal Sciences* **91(6)**: 419–429.
- Słowińska M, Liszewska E, Judycka S, Konopka M, Ciereszko A. 2018. Mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in liquid stored and cryopreserved turkey (*Meleagris gallopavo*) spermatozoa. *Poultry Science* **97**:3709-3717.
- Storey BT. 2008. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int. J. Dev. Biol.* **52**:427-437.

- Sundararaman, M. Kalatharan, J. Thilak, P. and Jawahar, K. (2012). Computer assisted semen analysis for quantification of motion characteristics of bull sperm during cryopreservation cycle. *Vet. World* **12**: 723-726.
- Sutovsky P. 2015. New Approaches to Boar Semen Evaluation, Processing and Improvement. *Reproduction in Domestic Animals* **50**:11-19.
- Svorádová A, Baláži A, Vašíček J, Hrnčár C, Chrenek P. 2019. Quality evaluation of fresh gander semen of slovak white goose by CASA and flow cytometry: short communication. *Slovak J. Anim. Sci.* **52(2)**:90-94.
- Teves ME, Roldan ERS. 2022. Sperm Bauplan and Function and underlying Processes of Sperm Formation and Selection. *Physiological Reviews* **102**:7-60.
- Torres MA, Diaz R, Boguen R, Martins SMMK, Ravagnani GM, Leal DF, De Andrade AFC. (2016). Novel flow cytometry analyses of boar sperm viability: can the addition of whole sperm-rich fraction seminal plasma to frozen-thawed boar sperm affect it?. *PLoS One* **11(8)**: e0160988.
- Valverde A, Castro-Morales O, Madrigal-Valverde M, Soler C. 2019. Sperm kinematics and morphometric subpopulations analysis with CASA systems: A review. *Revista de Biología Tropical* **67(6)**:1473-1487.
- Vincent P, Underwood S, Dolbec C, Bouchard N, Kroetsch T, Blondin P, 2012. Bovine semen quality control in artificial insemination centers. *Anim. Reprod.* **9**:153-165.
- Wilkerson MJ. 2012. Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* **42(1)**:53-71.
- Windsor DP. 1997. Mitochondrial function and ram sperm fertility. *Reproduction, Fertility and Development* **9(3)**:279-284.
- Wolff C, Fuks B, Chatelain P. 2003. Comparative Study of Membrane Potential-Sensitive Fluorescent Probes and their Use in Ion Channel Screening Assays. *Sage Journals* **8**:5.
- Yamada A, Gaja N, Ohya S, Muraki K, Narita H, Ohwada T, Imaizumi Y. 2001. Usefulness and Limitation of DiBAC4 (3), a Voltage-Sensitive Fluorescent Dye, for the Measurement of Membrane Potentials Regulated by Recombinant Large Conductance Ca⁺ - Activated K⁺ Channels in HEK293 Cells. *Jpn. J. Pharmacol.* **86**:342-350.
- Yáñez-Ortiz I, Catalán J, Rodríguez-Gil JE, Miró J, Yeste M. 2022. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science* **246**:106904.
- Zaniboni L, Madeddu M, Mosca F, Sayed AA, Marelli SP, Di Iorio MD, Iaffaldano N, Cerolini S. 2022. Concentration dependent effect of dimethylacetamide and N-methylacetamide on the quality and fertility of cryopreserved chicken semen. *Cryobiology* **106**:66-72.

- Zong Y, Li Y, Sun Y, Mehaisen GMK, Ma T, Chen J, 2023. Chicken Sperm Cryopreservation: Review of Techniques, Freezing Damage, and Freezability Mechanisms. *Agriculture* **13**:445.
- Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, Babenko VA, Zorov SD, Balakireva AV, Juhaszova M, Sollott SJ, Zorov DB. 2018. Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry* **552**:50-59.

10 Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázek 1: CASA (dostupné z www.imv-technologies.com)	11
Obrázek 2: Cytometr Novocyt 3000, Acea Biosciences, Aglient, Santa Clara, California, USA (foto: autor).....	12
Obrázek 3: Princip průtokové cytometrie (dostupné z www.infekce.lf1.cuni.cz).....	13
Obrázek 4: mCASA (foto: autor).....	27
Obrázek 5: Program iSperm (foto:autor).....	27
Obrázek 6: Plate s 96 jamkami (foto: autor).....	28
Obrázek 7: Výstup ze softwaru NovoExpress 1.3.0. (foto: autor).....	29
Tabulka 3: Základní charakteristická statistika hodnocena systémem CASA.....	31
Tabulka 2: Vliv ředidla na celkovou motilitu po rozmrazení.....	31
Tabulka 3: Základní charakteristiky parametrů vyhodnocených průtokovým cytometrem.....	33
Tabulka 4: Vliv použitého ředidla na integritu plazmatické membrány.....	33
Tabulka 5: Vliv odběrového dne na integritu plazmatické membrány.....	34
Tabulka 6: Vliv odběrového dne na poškození cytoplazmatické membrány po rozmrazení.....	35
Tabulka 7: Vliv zvoleného ředidla na poškození cytoplazmatické membrány po rozmrazení....	35
Tabulka 8: Vliv odběrového dne na poškození akrozomu po rozmrazení.....	36
Tabulka 9: Vliv zvoleného ředidla na poškození akrozomu po rozmrazení.....	36
Tabulka 10: Vliv odběrového dne na poškození akrozomu i cytoplazmatické membrány po rozmrazení.....	37
Tabulka 11: Vliv zvoleného ředidla na poškození akrozomu i cytoplazmatické membrány po rozmrazení.....	37
Tabulka 12: Vliv teploty ekvilibrace na parametry měřené průtokovou cytometrií po rozmrazení.....	38
Tabulka 13: Porovnání přídatku barviv MitoTracker Deep Red™ & CellRox Deep Red™	38
Graf 1: Vliv odběrového dne na motilitu po rozmrazení.....	32
Graf 2: Porovnání přídatku barviv MTR a CellRox na průměrných hodnot parametrů s chybovými úsečky, jako celková integrita plazmatické membrány, poškození plazmatické membrány, poškození akrozomu a poškození akrozomu i plazmatické membrány spermíí, s různými ředidly.....	39