

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Možnosti zvýšení fertilizační schopnosti inseminačních
dávek vyrobených pro účel umělé inseminace ovcí**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Lucie Langerová

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: Ing. Filipp Georgijevič Savvulidi, Ph.D.

Konzultant: Ing. Martin Ptáček, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Možnosti zvýšení fertilizační schopnosti inseminačních dávek pro účel umělé inseminace ovcí" 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 vedoucímu mé diplomové práce Ing. Filippu G. Savvulidi, Ph.D. za vstřícný přístup, odborné vedení v rámci mé činnosti v laboratoři při plnění experimentální části a za cenné rady a připomínky během zpracování práce. Také bych chtěla poděkovat konzultantovi Ing. Martinu Ptáčkovi, Ph.D. za pomoc při zpracování dat k této práci. Dále chci poděkovat svým rodičům za obětavou podporu nejen ve studiu, ale i v životě.

Možnosti zvýšení fertilizační schopnosti inseminačních dávek vyrobených pro účel umělé inseminace ovcí

Souhrn

Cílem diplomové práce bylo na základě dostupné literatury definovat specifické látky, které měly pozitivní vliv na motilitu spermatických buněk, byly testovány u jiných druhů hospodářských zvířat nebo člověka a otestovat tyto látky v experimentálním modelu beraního ejakulátu.

V této práci byl testovanou látkou inhibitor fosfodiesterázy ibudilast. Pracovní roztok se připravil rozředěním této látky v DMSO. Vznikla tak koncentrace 100 mM.

Ejakulát se získal od čtyř beranů plemene valašská ovce. Pro výrobu vzorků se vždy použil odběr plemeníka, který splňoval všechny požadavky na minimální kvalitu ejakulátu. Ejakulát byl následně ředěn ředidlem OptiXcell, a poté se sperma rozdělilo do zkumavek. K prvním třem vzorkům byly přidány tři rozdílné objemy ibudilastu, rozředěného v DMSO (0,5, 1, 2 μ l). Finální koncentrace testovaného enhanceru motility byly v těchto objemech 50, 100 a 200 μ M. K dalším třem vzorkům se přidaly tři rozdílné objemy čistého DMSO, které odpovídaly objemům ibudilastu s DMSO (0,5, 1, 2 μ l). Ve vzorcích tak vznikla 0,05, 0,1 a 0,2% koncentrace DMSO. Poslední vzorek byl kontrolní, tedy bez přidaných látek. Po naplnění do pejet probíhala 2 hodiny ekvilibrace, a poté se vzorky zmrazily. Po rozmrazení ve vodní lázni probíhala analýza pomocí systému pro hodnocení motility CASA ve dvou časech, a to ihned po rozmrazení a 3 hodiny od začátku rozmrazování.

Pozitivní vliv na celkovou a progresivní motilitu ($p < 0,05$) měl v obou měřených časech DMSO o koncentraci 0,05 %, ve srovnání s 50 μ M ibudilastem a kontrolou. U koncentrací DMSO 0,1 a 0,2 % se statisticky významný vliv na celkovou a progresivní motilitu projevil pouze v čase 3 hodiny od začátku rozmrazování. Výsledky zde ukazují na účinnou kryoprotektivní i antioxidantní ochranu DMSO, která se projevuje při nízkých koncentracích.

Ibudilast o koncentraci 50 μ M pozitivně ovlivnil celkovou motilitu ($p < 0,05$) v čase měření 3 hodiny od rozmrazení oproti kontrole. Tento jev byl pozorován i u 100 a 200 μ M. Vliv na progresivní motilitu ve srovnání s kontrolou nebyl statisticky prokázán ($p > 0,05$). Výsledky dále ukazují dobré působení ibudilastu na kinematické parametry motility a lineární pohyb. Zde byl prokázán statisticky významný pozitivní vliv ($p < 0,05$) na zvýšení rychlosti těchto parametrů u všech tří konečných koncentrací (50, 100, 200 μ M) v čase ihned po rozmrazení. Měření po 3 hodinách od rozmrazení nepotvrdilo statisticky významný rozdíl mezi těmito třemi variantami ibudilastu a variantami DMSO, i kontrolou ($p > 0,05$). Pro zrychlení pohybu spermií, tedy hyperaktivaci, je důležité zvýšení hladiny cAMP. Inhibitory fosfodiesterázy blokují hydrolýzu cAMP, čímž jeho hladina roste. To potvrzují i výsledky naší práce, kdy ibudilast průkazně zvýšil hodnoty kinematických parametrů, tzn. průměrnou rychlost dráhy, křivočarou rychlost a lineární rychlost (μ m/s) u beraních spermií.

Díky těmto výsledkům máme předpoklady pro zlepšení kvality inseminačních dávek a tím i fertilizační schopnosti. Je však vhodné tyto předpoklady ověřit in vivo, metodou polního testu.

Klíčová slova: beran, motilita, spermie, CASA, enhancer motility

Possibilities of increasing the fertilization capacity of insemination doses produced for the purpose of artificial insemination of sheep

Summary

The aim of the diploma thesis was to define, specific substances that had a positive effect on the motility of sperm cells, were tested in other species of livestock or humans, and to test these substances in an experimental model of ram ejaculate.

The tested substance was the phosphodiesterase inhibitor ibudilast. The working solution was prepared by diluting this substance in DMSO. This resulted in a concentration of 100 mM.

The ejaculate was collected from four rams of the wallachian sheep. We always used the collection of semen, which met all the requirements for the minimum quality of the ejaculate for the production of samples. The ejaculate was diluted by OptiXcell diluent, and then the sperm were separated into tubes. Three different volumes of ibudilast diluted in DMSO (0.5, 1, 2 μ l) were added to the first three samples. The final concentrations of the tested motility enhancer in these volumes were 50, 100 and 200 μ M. Three different volumes of pure DMSO were added to the other three samples, corresponding to the volumes of ibudilast with DMSO (0.5, 1, 2 μ l). This resulted in 0,05, 0.1 and 0,2% DMSO concentrations in the samples. The last sample was a control, i.e. without added substances. Equilibration took place for 2 hours, and then the samples were frozen. Analysis was performed using the CASA motility assessment system at two times, immediately after thawing and 3 hours after the start of thawing.

DMSO at a concentration of 0,05% had a positive effect on motility and progressive motility ($p < 0,05$) at both measured times, compared to 50 μ M ibudilast and the control. DMSO concentrations of 0,1 and 0,2%, was manifested statistically significant effect on total and progressive motility only within 3 hours from the start of thawing. The results here show the effective cryoprotective and antioxidant protection of DMSO, which is manifested at low concentrations

The results further show a good effect of ibudilast on the kinematic parameters of motility and linear movement. Here is a statistically significant positive effect ($p < 0,05$). The high level of cAMP is important for hyperactivation of sperm motility. Phosphodiesterase inhibitors block the hydrolysis of cAMP. This is also confirmed by the results of our work, when ibudilast significantly increased the values of kinematic parameters, i.e. average trajectory velocity, curvilinear velocity and linear velocity (μ m/s) in ram spermatozoa.

Thanks to these results, we have the prerequisites for improving the quality of insemination doses. However, it is advisable to verify these assumptions in vivo, using the field test method.

Keywords: ram, motility, sperm, CASA, motility enhancer

Obsah

1	Úvod	10
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	11
3	Literární rešerše.....	12
3.1	Fyziologie fertilizace	12
3.1.1	Kapacitace.....	13
3.1.2	Fáze fertilizace	13
3.1.2.1	Fáze první – penetrace cumulu oophoru a corona radiata	13
3.1.2.2	Fáze druhá – penetrace zona pellucida	13
3.1.2.2.1	Akrozomální reakce.....	14
3.1.2.3	Fáze třetí – fúze oocytu a spermie	14
3.1.2.3.1	Reakce zony pellucidy	14
3.2	Možnosti inseminace ovcí.....	15
3.2.1	Základní charakteristiky reprodukce ovcí.....	15
3.2.2	Přírozená plemenitba	15
3.2.3	Umělá inseminace.....	15
3.2.4	Ovlivňování a regulace pohlavního cyklu	16
3.2.4.1	Synchronizace říje.....	16
3.3	Výroba a uchovávání inseminačních dávek	17
3.3.1	Odběr spermatu.....	17
3.3.2	Základní hodnocení ejakulátu.....	18
3.3.2.1	Makroskopické hodnocení.....	18
3.3.2.2	Mikroskopické hodnocení.....	18
3.3.2.2.1	Koncentrace	18
3.3.2.2.2	Morfologie	18
3.3.2.2.3	Vířivost pohybu a motilita	19
3.3.2.2.4	Biologické a biochemické zkoušky spermatu.....	19
3.3.3	Posouzení kvality ejakulátu a inseminačních dávek pomocí in vitro analýz.....	19
3.3.3.1	CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).....	20
3.3.3.2	Průtoková cytometrie.....	21
3.3.3.3	Fluorescenční mikroskopie	21
3.3.3.4	Western blot.....	21
3.3.3.5	Testy pro detekci poškození DNA.....	21
3.3.3.6	Vyšetření schopnosti penetrace oocytu.....	22
3.3.3.7	Postkoitální a kontaktní test.....	22
3.3.4	Ověření kvality inseminační dávky in vivo	23
3.3.4.1	Polní test	23
3.3.5	Ředění ejakulátu	23
3.3.5.1	Složení ředidel	23
3.3.5.1.1	Kryoprotektiva	24
3.3.5.1.2	Antioxidační ochrana.....	24
3.3.5.2	Žloutková vs. bezžloutková ředidla	25
3.3.5.3	Látky ovlivňující motilitu spermií (enhancery)	25
3.3.5.3.1	Penicilamin, hypotaurin a epinefrin (PHE).....	26
3.3.5.3.2	Arginin.....	26
3.3.5.3.3	Scutellarin	26

3.3.5.3.4	Kyselina lysosfosfatidová	27
3.3.5.3.5	Vliv růstových faktorů	27
3.3.5.3.6	Zvýšení motility spermií pomocí elektrické stimulace.....	28
3.3.5.3.7	Inhibitory fosfodiesterázy (PDEI)	28
3.3.5.3.8	Charakteristika vybraných druhů PDEI.....	29
3.3.5.3.8.1	Pentoxifylin (PTX)	29
3.3.5.3.8.1.1	Vliv in vitro použití PTX na zlepšení motility.....	30
3.3.5.3.8.1.2	Vliv PTX na morfologii spermií	30
3.3.5.3.8.1.3	Vliv PTX na integraci DNA a kvalitu embrya.....	31
3.3.5.3.8.2	Pentoxifylinové analogy	31
3.3.5.3.8.3	Theofylin a ostatní xantinové deriváty	31
3.3.5.3.8.4	Papaverin	32
3.3.5.3.9	Nejperspektivnější PDEI pro zlepšení motility	33
3.3.6	Konzervace spermatu.....	33
3.3.6.1	Konzervace chlazením.....	33
3.3.6.2	Kryokonzervace	34
3.3.7	Uchovávání inseminačních dávek	34
4	Metodika.....	35
4.1	Plemeníci.....	35
4.2	Odběr ejakulátu	35
4.3	Analýza odebraného ejakulátu	35
4.4	Příprava enhanceru motility ibudilast.....	35
4.5	Příprava inseminačních dávek	36
4.6	Hodnocení inseminačních dávek po rozmrazení	37
4.6.1	Rozmrazení	37
4.6.2	CASA.....	38
4.7	Statistická analýza dat.....	39
5	Výsledky.....	40
5.1	Základní statistické údaje - CASA	40
5.2	Popis modelu	42
5.2.1	Popis modelu pro varianty IB+DMSO (0,5) a DMSO (0,5).....	42
5.2.2	Popis modelu pro varianty IB+DMSO (1) a DMSO (1).....	43
5.2.3	Popis modelu pro varianty IB+DMSO (2) a DMSO (2).....	43
5.3	Vliv odběrového dne na parametry motility	44
5.3.1	Variety IB + DMSO (0,5) a DMSO (0,5).....	44
5.3.2	Variety IB+DMSO (1) a DMSO (1).....	45
5.3.3	Variety IB+DMSO (2) a DMSO (2).....	45
5.4	Vliv látky na parametry motility.....	46
5.4.1	Variety IB+DMSO (0,5) a DMSO (0,5).....	46
5.4.2	Variety IB+DMSO (1) a DMSO (1).....	47
5.4.3	Variety IB+DMSO (2) a DMSO (2).....	48
6	Diskuze.....	50
7	Závěr	53

8	Literatura	54
9	Seznam použitých zkratek a symbolů	69
10	Samostatné přílohy	I
10.1	Vliv odběrového dne na parametry motility v čase T1.....	I
10.2	Vliv odběrového dne na parametry motility v čase T2.....	II

1 Úvod

Dnes je běžnou součástí managementu reprodukce hospodářských zvířat umělá inseminace. Ta má mnoho výhod, mezi které můžeme zařadit maximální využití geneticky kvalitních plemenů. Snižuje se také riziko přenosu mnohých onemocnění a přeprava, která je pro zvířata stresující. Součástí umělé inseminace se stala kryokonzervace pohlavních buněk. Díky kryokonzervaci se dají inseminační dávky dovážet a vyvážet, což umožňuje i přístup k novým plemenům.

Kryokonzervované pohlavní buňky se mohou dlouhodobě skladovat a mají neomezenou dobu životnosti. Toho se využívá i při tvorbě genetických zdrojů, které jsou důležité pro zachování původních plemen, jež jsou cenným zdrojem genů. Z plemen ovcí byla do genetických zdrojů České republiky zařazena šumavská a valašská ovce, která má historický a kulturní význam. Využívá se pro údržbu a obnovu horských pastvin (Milerski 2019).

Proces zmrazování však buňky poškozuje. Narušení spermatických buněk se projevuje sníženou motilitou a vitalitou, což má v konečném důsledku negativní vliv na fertilizační schopnost. Jako účinná ochrana před tvorbou ledových krystalů se v rutinní praxi využívají různé druhy kryoprotektiv.

Jelikož je progresivní motilita velmi důležitým parametrem pro úspěšné oplodnění, testují se různé druhy látek, které mají za úkol tuto vlastnost spermií udržet a podpořit. Ukázalo se, že tyto schopnosti mají i látky, které mohou být součástí ředidel jako antioxidantní ochrana. Jsou to například esenciální oleje rostlin *Rosmarinus officinalis* nebo *Moringa oleifera* (Shokry et al. 2021). Schopnost zvyšovat motilitu má i hormon epifýzy melatonin (Zhu et al. 2019).

Mezi testované zesilovače motility se řadí různé organické sloučeniny a jejich směsi, jako je například penicilamin, či hypotaurin (El-Shahat et al. 2017) nebo rostlinné flavinoidy, jako je scutellarin (Sun et al. 2022). Pozitivní vliv na motilitu mohou mít i růstové faktory (Asimakopoulos et al. 2021). Jako nejúčinnější se zatím jeví látky, které patří do skupiny inhibitorů fosfodiesteráz (Gruber et al. 2022). Použití látek, které zvyšují motilitu může umožnit detekci životaschopných spermií, a tím zvýšit úspěšnost oplodnění.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Předpokládáme, že některé chemické látky mají schopnost ovlivňovat motilitu beraních spermatických buněk, tudíž mohou být přidány jako aditiva k ředidlu za účelem zlepšení fertilizační schopnosti inseminačních dávek. U některých těchto chemických látek bylo již dříve prokázáno, že zrychlují pohyb spermatických buněk různých druhů hospodářských zvířat a člověka. Je-li jedním z nejdůležitějších parametrů kvality spermatických buněk pohyblivost, tak je otázkou, zda jsme tento parametr schopni pozitivně ovlivnit, a tím zlepšit fertilizační schopnost.

Cílem diplomové práce bylo definovat na základě dostupné literatury specifické látky, které již byly použity za účelem zrychlení motility spermatických buněk u jiných druhů hospodářských zvířat nebo člověka a otestovat tyto látky v experimentálním modelu beraního ejakulátu.

3 Literární rešerše

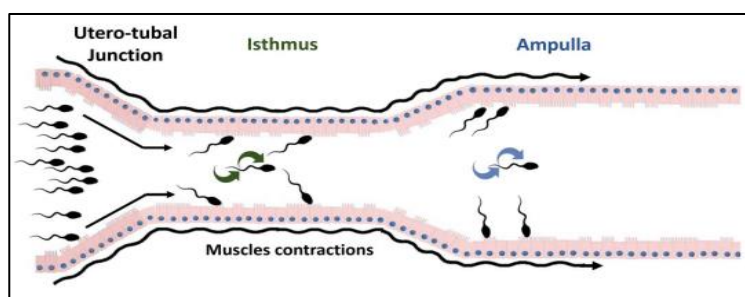
3.1 Fyziologie fertilizace

Migrace spermií v samičí pohlavní soustavě je vysoce selektivní proces, který začíná v době ejakulace (Mahé et al. 2021). Krátce po koitu dochází ke koagulaci ejakulátu, což dočasně omezuje pohyb spermií a jejich postup do další části samičí pohlavní soustavy. Během následujících 20 až 30 minut proteolytický enzym, který je produkován prostatou, sraženinu postupně zkapalní a umožní spermiím migraci do cervikálního hlenu (Brannigan & Lipshultz 2008).

Z miliónů až miliard dorazí na místo oplodnění méně než 100 spermií. V této selekci hraje rozhodující roli děložní krček (Sakkas et al. 2015). Transport spermií z pochvy přes děložní krček ovlivňují vlastnosti cervikálního hlenu, konkrétně množství a viskozita. Jeho složení se v průběhu reprodukčního cyklu mění. Cervikální hlen ve folikulární fázi obsahuje méně bílkovin (Maddison et al. 2016), což usnadňuje transport spermií s progresivním pohybem a normální morfologií (Fair et al. 2019).

V děloze spermie přichází do kontaktu s děložní tekutinou a epiteliálními buňkami endometria. Ty, které jsou mrtvé a abnormálně vyvinuté se z dělohy odstraňují díky děložním kontrakcím (Saint-Dizier et al. 2020). Po migraci dělohou jsou spermie masivně zadržovány v uterotubálním spojení, tj. spojení mezi vejcovodem a dělohou, které lze považovat jako druhou hlavní selektivní bariéru za děložním čípkem. Druart et al. (2009) pozoroval 4 hodiny po inseminaci ovčí rostoucí počet spermií od děložních rohů směrem k uterotubálním spojení. Ve vejcovodech byl však zaznamenán prudký pokles. U hospodářských zvířat jsou selektivní mechanismy uterotubálního spojení stále do značné míry neznámé (Mahé et al. 2021). Obecně platí, že přes toto spojení prochází jen spermie, které mají normální pohyblivost a specifické povrchové molekulární vlastnosti (Saint – Dizier et al. 2020).

Během své cesty vejcovodem se spermie dostávají do kontaktu s jeho epiteliálními buňkami, na které se některé z nich vážou a tvoří tak oviduktální rezervoár. Dále přichází do kontaktu se secernovanými proteiny a extracelulárními vezikuly. To je nejen důležité pro získání schopnosti oplodnění v procesu kapacitace, ale také ke snížení počtu oplodnění schopných spermií (Mahé et al. 2021).



Obrázek 1: Schématické znázornění migrace spermií v samičí reprodukční soustavě – (UTJ) průchod spermií s normální pohyblivostí, (Isthmus) zúžený úsek vejcovodu, kde se tvoří rezervoár spermií, dochází ke kapacitaci, (Ampulla) dochází k oplodnění (Mahé et al. 2021)

3.1.1 Kapacitace

První důležitý objev, týkající se fertilizace savců, přišel pomocí experimentů s umělým oplodněním. Bylo zjištěno, že spermie musí strávit určitou dobu v samičím reprodukčním ústrojí, než je schopna proniknout do vajíčka. Tento jev se nazývá kapacitace. Jedná se o fyziologické změny, které savčí spermie musí pro úspěšnost oplodnění podstoupit (Austin 1952; Chang 1959).

Proces kapacitace může být také napodoben in vitro pomocí specifických médií, která tento proces stimulují. Za prvé dochází k destabilizaci plazmatické membrány změnou uspořádání fosfolipidů (de Vries et al. 2003) a redistribucí cholesterolu do apikální části hlavičky spermie. Cholesterol je poté aktivně transportován pryč z plazmatické membrány a ta se stává fluidnější (tekutější). Tento proces je pro oplodnění nezbytný (Flesch et al. 2001).

Dochází také k hyperaktivaci motility spermií. Hyperaktivace je závislá na zvýšení koncentrace intracelulárního vápníku, který vstupuje přes specifické kanály, které jsou primárně funkční v hlavní části bičíku (Qi et al. 2007). Tento pohyb je zásadní pro napomáhání uvolňování spermií z oviduktálního rezervoáru a pronikání skrz expandovaný kumul a zónu pellucidu oocytu. Po kontaktu se zónou pellucidou dochází k akrozomální reakci (Ickowicz et al. 2012).

3.1.2 Fáze fertilizace

3.1.2.1 Fáze první – penetrace cumulu oophoru a corona radiata

Spermie, které prošly kapacitací, jsou schopné pomocí enzymu hyaluronidázy překonat granulózní buňky, které ve folikulu těsně obklopují vajíčko a před ovulací produkují velké množství kyseliny hyaluronové, díky které vzniká rozsáhlá extracelulární matrix, tzv. expandovaný kumul (Sadler & Langman 2010). Corona radiata je skupina kumulárních buněk, které jsou v těsné blízkosti oocytu a komunikují s ním pomocí mezibuněčných spojů (Randy 2021).

3.1.2.2 Fáze druhá – penetrace zona pellucida

Zona pellucida je obal vajíčka s vláknitou houbovitou strukturou. Základními složkami zóny pellucidy jsou tři glykoproteiny. Jedná se o ZP1, ZP2 a ZP3 (Harris et al. 1994). U člověka, makaků, krys a domácích koček byl dále detekován čtvrtý glykoprotein ZP4 (Bhakta et al. 2019). V průběhu oplodnění se tyto glykoproteiny podílejí na rozpoznávání a vazbě gamet a působí jako ligandy pro specifické receptory spermií (Jaworska – Adamu et al. 2022). Receptory, které nesou spermie, jsou proteinové komplexy, sestavené během kapacitace (Redgrove et al. 2011).

Oligosacharidové postranní řetězce glykoproteinu ZP3 jsou zodpovědné za primární vazbu na spermie. Tento proces spouští akrozomální reakci spermie (Gupta et al. 2021). Kromě ZP3 se na akrozom spermie váže také glykoprotein ZP4 (Prasad et al. 2000). ZP2 umožňuje udržení spermií na zóně pellucidě a glykoprotein ZP1 vzájemně propojuje ZP2 a ZP3 (Hoodbhoy & Dean 2004).

Glykoproteiny také hrají významnou roli v raném vývoji embrya. Zona pellucida obklopuje vyvíjející se embryo až do implantace do dělohy. Obecně se tedy má za to, že se podílí na vývoji blastocysty a brání implantaci embrya do vejcovodu (Wassarman & Litscher 2008).

Fertilní samčí ejakulát obsahuje miliony spermií, z nichž pouze 14 % pohyblivých spermií je schopno vázat se na zonu pellucidu (Liu et al. 2003). Leung et al. (2023) ve své studii dále poukázali na fakt, že spermie, které se navázaly na zonu pellucidu měly výrazně vyšší úroveň normální morfologie, integrity DNA a integrity chromatinu ve srovnání s nenavázanými spermii. Toto pozorování naznačuje, že zona pellucida selektivně interaguje se spermii, které mají vysokou schopnost oplodnění.

3.1.2.2.1 Akrozomální reakce

Savčí akrozom je sekreční váček, připojený k jádru spermie. Jeho biogeneze začíná během meiózy a trvá celý proces spermiogeneze, tj. morfologické a biochemické změny, kterými haploidní spermatidy procházejí od svého vzniku, až po jejich přeměnu ve spermie (Moreno 2022).

Akrozom obsahuje hydrolytické enzymy, které se při akrozomální reakci uvolňují do extracelulárního prostředí. V jeho nitru se dále hromadí vápenaté ionty (Darszon et al. 2011).

K vyvolání akrozomální reakce dochází po navázání spermie na zonu pellucidu oocyty, nebo již mezi kumulárními buňkami, které tvoří buněčnou masu kolem oocyty (Jin et al. 2011). Během reakce dochází k fúzi vnější akrozomální membrány a plazmatické membrány spermie. Po splynutí obou membrán se obsah akrozomu vylévá do extracelulárního prostředí spermie (Avella & Dean 2011). Proteolytické enzymy (jako je např. akrozin) degradují glykoproteinovou vrstvu zóny pellucida a následně dochází ke kontaktu mezi spermii a oolemou (obalem oocyty). Tím dochází k oplodnění (Ickowicz et al. 2012). Bylo prokázáno, že akrozomální reakce je nezbytný proces, vedoucí k oplodnění vajíčka a narušení tohoto procesu vede k samčí neplodnosti (Yanagimachi 2022).

3.1.2.3 Fáze třetí – fúze oocyty a spermie

V této konečné fázi dochází k adhezi obou buněk. Hlavička i bičík spermie pronikají do oocyty, ale plazmatická membrána spermie zůstává vně (Sadler & Langman 2010).

3.1.2.3.1 Reakce zóny pellucidy

V důsledku fúze spermie s oolemou dochází k polyspermickému bloku, který brání proniknutí další spermie a vzniku tzv. polyspermie. K tomuto jevu dochází jak na úrovni zóny pellucida, tak na úrovni oocyty (Bukowska et al. 2014).

Po kontaktu spermie s oolemou dochází ke kortikální reakci. Oocyt začne uvolňovat kortikální granula, která fúzují s oolemou a do perižloutkového prostoru se exocytózou uvolňují enzymy, jako jsou proteázy, glykosidázy, peroxidáza, kyselá fosfatáza, dále pak lektiny a zinek (Fahrenkamp et al. 2020). Tyto enzymy poté modifikují glykoproteiny zóny pellucidy. U ZP3 se vlivem glykosidázy mění struktura oligosacharidových řetězců, ZP2 je štěpen proteinázami, což brání uchycení dalších spermií na zonu pellucidu (Jaworska – Adamu et al. 2022). Po těchto

enzymatických modifikacích zona pellucida ztvrdne a ztrácí své ligandové vlastnosti pro receptory spermií (Wassarman & Litscher 2008).

Dále dochází k obnovení druhého meiotického dělení a vytvoření samičího prvojádra. Hlavička spermie se přibližuje k samičímu prvojádro, vytváří samčí prvojádro a bičík degeneruje (Sadler & Langman 2010).

3.2 Možnosti inseminace ovcí

3.2.1 Základní charakteristiky reprodukce ovcí

Ovce pohlavně dospívají ve věku 5 až 8 měsíců. Jehnice a beránky můžeme poprvé použít k plemenitbě ve věku 10 až 12 měsíců (Liu & Ott 2018).

Většina plemen ovcí je sezónně polyestrická. To znamená, že období rozmnožování je řízeno roční dobou a délkou světelné periody. Říje se tedy dostavuje až po zkrácení světelného dne. Její nástup dále ovlivňuje výživa, plemenná příslušnost, nebo nadmořská výška (Page & Hamer 2017). Délka pohlavního cyklu trvá 21 dní (průměrně 17,5 dne). Říje je dlouhá 20 – 48 hodin a k ovulaci dochází po konci říje. Březost trvá průměrně 147 dní (Dunlap 2018). Anestrus, tedy klidové období, začíná v mírném pásmu v polovině března a končí koncem července nebo začátkem srpna. Vyznačuje se absencí ovulace a sexuálního chování (Hristova 2007).

Berani mají celoroční spermiogenezi. Množství a kvalita semene se však v průběhu roku mění, což by mělo být respektováno i při inseminaci mrazeným spermatem (Liu & Ott 2018).

V chovatelské praxi se u ovcí uplatňují dva způsoby zapouštění, a to přirozená plemenitba a umělá inseminace (Bancheva et al. 2021).

3.2.2 Přirozená plemenitba

V rámci přirozené plemenitby můžeme zapouštění ovcí dělit na volné, skupinové, harémové a individuální. Ovce v říji mohou být zjišťovány pomocí prubíře, tedy mladého pohlavně aktivního berana, kterému je, například pomocí vazektomie, znemožněno oplodnění (Page & Hamer 2017).

Nevýhodou této metody je rychlé vyčerpání plemeníka a nižší počet zapuštěných ovcí (obvykle 30 – 40 ovcí na berana). Dále neznáme přesný termín inseminace a původ potomstva. Také se zkracuje doba využití chovného berana, který se musí jednou za dva roky vyměnit, aby se zabránilo příbuzenskému křížení. Další nevýhodou je mimo jiné snazší šíření pohlavně přenosných chorob (Tyankov et al. 2000).

Jedná se však o levnější a jednodušší metodu na provedení. Není potřeba žádné speciální vybavení, ani vyškolení specialisté. Pro zvířata je tato metoda minimálně stresově náročná a dosahuje se při ní vyšší plodnosti (Baruselli et al. 2018).

3.2.3 Umělá inseminace

Umělá inseminace je velmi důležitým postupem v reprodukci hospodářských zvířat a díky kryokonzervaci inseminačních dávek umožňuje vstup nových cizích plemen (Casali et al.

2017). Jde o základní biotechnologickou metodu, kterou lze dosáhnout rychlého genetického pokroku s využitím omezeného počtu elitních plemenků (Alvares et al. 2015).

Při umělé inseminaci se využívá čerstvé, chlazené, nebo zmrazené sperma (Cueto & Gibbons 2010). Podle místa aplikace inseminační dávky se inseminace dělí na intravaginální, intracervikální a intrauterinní. Při intravaginální, či intracervikální metodě se využívá inseminace čerstvým, nebo chlazeným spermatem. U intrauterinní metody se dá využít inseminace čerstvým, chlazeným, či rozmrazeným spermatem (Liu & Ott 2018). Nevýhodou je dražší, obtížnější aplikace, která vyžaduje speciální vybavení a kvalifikovaného odborníka. Pro zvířata je tato metoda více stresující. Kryokonzervace také snižuje pohyblivost a životaschopnost spermií (Bancheva et al. 2021).

Mezi výhody této metody se řadí maximální využití vysoce produktivních samic a přenos jejich cenných dědičných vlastností na velký počet potomků. Snižuje se riziko přenosu infekčních, parazitárních a pohlavních chorob. Je znám datum inseminace a uplatňuje se zde individuální výběr rodičů. Kryokonzervace také umožňuje dlouhodobé skladování a transport spermií (Amiridis & Cseh, 2012).

3.2.4 Ovlivňování a regulace pohlavního cyklu

Mezi tyto metody můžeme zařadit:

- **„flushing“**, neboli stimulace plodnosti výživou je krátkodobé zvýšení krmné dávky před zapuštěním (krmný šok), zlepší se tak kondice ovcí, což má příznivý vliv na ovulační aktivitu (Page & Hamer 2017),
- **regulaci světelného režimu**, kdy ke stimulaci pohlavní aktivity dojde zvýšeným vylučováním gonadotropinů hypofýzou, která reaguje na snížený přístup světla,
- **beraní efekt**, kdy přítomnost (vazektomovaných) beranů ve stádě urychluje nástup pohlavní aktivity – přes zvukové, sluchové a čichové vjemy se stimuluje ovulace a estrální aktivita (Schoenian 2016).

3.2.4.1 Synchronizace říje

Synchronizace říje znamená vyvolání plodné říje najednou u většího počtu plemenic. Nejvíce se využívá v umělé inseminaci, ale lze jí použít i u přirozené plemenitby (Bancheva et al. 2021). Základem metod regulace reprodukčních funkcí je použití hormonálních prostředků (Skliarov et al. 2021). Nejvhodnější jsou syntetické gestageny (látky funkčně shodné s progesteronem, což je hormon žlutého tělíska), které blokují vylučování hypofyzárních hormonů řídících funkci vaječnicků. Hladina gestagenů v organismu odpovídá stavu sekreční fáze žlutého tělíska. Po jejich vysazení dochází k hromadné říji, která se dostavuje za 4 až 7 dnů (Page & Hamer 2017). Pro aplikaci gestagenů se nejčastěji používají poševní tampóny (Skliarov et al. 2021).

3.3 Výroba a uchovávání inseminačních dávek

3.3.1 Odběr spermatu

Odběr spermatu se nejčastěji provádí pomocí umělé vagíny. Dále se také může využít elektroejakulace zavedením sondy do konečníku, či odběr z nadvarlete (Ehling et al. 2006). Úspěšné odebrání ejakulátu do umělé vagíny záleží na zkušenostech zvířete a jeho schopnosti přizpůsobit se metodě. Proto by se na tuto techniku odběru měla zvířata začít připravovat co nejdříve (Woelders et al. 2012). Elektroejakulace se obvykle využívá u jedinců, kteří nejsou schopni adaptace na odběr pomocí umělé vagíny, nebo mají snížené libido (Dovenski et al. 2022).

Umělá vagina je složená z vnějšího válcovitého pláště, vyrobeného z odolného plastu a vnitřní měkké vložky. Prostor mezi vnějším pláštěm a vložkou je z poloviny vyplněn vodou o teplotě 42 – 45 °C, a poté dofouknut vzduchem. Vložka musí být čistá, suchá a horní část vymazaná vazelinou. Na druhý konec se připojuje sběrač pro ejakulované sperma. Jako atrapa pro odběr ejakulátu se využívá říjná ovce, skopec, či jiný beran. Může se také použít fantom, tedy umělá konstrukce (De Graaf 2010).

Pro získání kvalitního ejakulátu je doporučeno, aby se u beranů prováděly 2 – 3 odběry denně po dobu 4 -5 dnů, po kterých následují 2 dny odpočinku (Cueto & Gibbons 2010).



Obrázek 2: Umělá vagina (Archiv autora)

3.3.2 Základní hodnocení ejakulátu

3.3.2.1 Makroskopické hodnocení

Sperma se ihned po odběru vyšetřuje jak makroskopicky, tak mikroskopicky, aby se určila jeho schopnost oplodnění. Makroskopicky se posuzuje barva, zrnitost, pach, obsah přímísenin a objem přímo ve sběrači (zkumavce) (De Graaf 2010).

Tabulka 1: Parametry ejakulátu berana (Liu & Ott 2018; De Graaf 2010)

Ejakulát berana	
Objem	0,5 – 2,0 ml
Koncentrace	2,5 – 5 mld/ml
Barva	slonová kost
Pach	nevýrazný
Aktivita	min. 70 %
pH	6,2 – 7,6

Sperma se špatnou kvalitou je vodnaté, průsvitné, bez zrnitosti. Ejakulát musí být prostý přímísenin, jako jsou chlupy, vazelína, prach, písek, krev, moč, hnis atd. (Gamčík & Kozumplík 1984).

3.3.2.2 Mikroskopické hodnocení

3.3.2.2.1 Koncentrace

Lze určit odhadem, kdy se na podložní sklo dá kapka spermatu a pod mikroskopem se hodnotí vzdálenost, mezi jednotlivými spermii. Poté se koncentrace obvykle hodnotí na stupnici od 5, kdy je ejakulát hustý a obsahuje více než 5 mld/ml spermií, až do 0, kdy je vzorek čirý, vodnatý a neobsahuje žádné spermie (De Graaf 2010).

Hustota lze dále stanovit hematocytometricky pomocí Bürkerovy komůrky. Spermie se počítají v několika čtverečích podložního skla Bürkerovy komůrky a následně se počty dosazují do vzorce. Jedná se o nejpřesnější metodu pro stanovení koncentrace (Veiga 1995).

Stanovení hustoty ejakulátu spektrofotometricky je na základě stupně zakalení standardního roztoku, ve kterém je rozptýleno odměřené množství spermatu. Přístroj nám ukáže hodnotu absorbanční jednotky, pomocí které následně stanovíme hodnotu koncentrace. Údaje na stupnici se přepočítávají podle tabulky, sestavené pro každý fotometr. Přesnost přístroje závisí na přesnosti vypracované kalibrační křivky (Louda & Hegedušová 2009).

3.3.2.2.2 Morfologie

K hodnocení morfologie spermií je nejprve nutné vytvořit kvalitní roztěr spermatu na sklíčko a následně ho obarvit. K tomuto účelu se používají různé metody barvení (Kos et al. 2019). Spermie jsou hodnoceny na abnormální stav hlavičky, střední části a bičíku (Veiga 1995). Posuzujeme změny primární, které vznikají v době spermatogenního cyklu ve varleti, sekundární, které vznikají při delším pobytu spermií v ocasu nadvarlete, během ejakulace a

zpracování ejakulátu. Také se hodnotí procento nezralých spermií se zadržanou protoplazmatickou kapkou na krčku (Kos et al. 2019).

3.3.2.2.3 Vířivost pohybu a motilita

Vířivost pohybu neboli mass motilita je hodnocení založené na pozorování kapky čerstvého ejakulátu pod mikroskopem. Subjektivně se hodnotí pohyb vln a vířů (David et al. 2015). Vířivý pohyb spermií souvisí s plodností a může sloužit jako predikce fertilizační schopnosti spermií. To bylo prokázáno i pomocí objektivních metod (David et al. 2018).

Motilita se také může hodnotit pod mikroskopem po zředění citrátem sodným nebo fyziologickým roztokem. Hodnotí se především progresivní pohyb (v před za hlavičkou), dále pohyb na místě, zpětný a spermie bez motility (De Graaf 2010).

Alternativou je objektivní hodnocení motility spermií pomocí CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), která je dnes nejrozšířenější metodou. Tato analýza motility poskytuje důležité informace pro hodnocení kvality spermatu a pro studium vlivu změn v mikroprostředí na specifické charakteristiky pohybu spermií in vitro (Amann & Waberski 2014). Bylo prokázáno, že parametry motility změřené pomocí systému CASA souvisí s fertilizační schopností spermií (Van de Hoek et al. 2022).

Del Olmo et al. (2013) ve své studii zjistil, že několik parametrů CASA vykazovalo vysokou pozitivní korelaci s plodností po 2 hodinách inkubace ve zmrazovacím extenderu. Stejně tak Vincente-Fiel et al. (2014) uvedl, že v polním testu ve skupině beranů s vysokou plodností byly všechny parametry motility CASA významně vyšší, ve srovnání se skupinou, u které byla plodnost nízká.

3.3.2.2.4 Biologické a biochemické zkoušky spermatu

Sleduje se odolnost spermií vůči různým vnějším vlivům. Patří sem například tepelný test prožitelnosti, kdy se ejakulát zředí s fyziologickým roztokem o teplotě 39 °C, poté se napipetuje do zkumavky a zahřívá se ve vodní lázni o teplotě 45 °C po dobu 60 min. Hodnotí se aktivita v intervalech 30 min. do úplného vyčerpání. Dále sem můžeme zařadit zkoušku rezistence spermatu vůči 1% roztoku NaCl, nebo dehydrogenační zkoušku, při které se sleduje rychlost fruktolýzy. Ta se projevuje odbarvením roztoku, ve kterém je metylénová modř, společně se spermii (Louda & Hegedušová 2009).

Test hypoosmotické bobtnavosti (HOS test) hodnotí funkční integritu plazmatické membrány spermie. Pozorujeme spermie v hypoosmotickém médiu, ve kterém nabobtnají pouze ty, které mají plazmatickou membránu nepotušenu, tj. živé buňky (Agarwal et al. 2016).

3.3.3 Posouzení kvality ejakulátu a inseminačních dávek pomocí in vitro analýz

Cílem analýzy inseminačních dávek je určit fertilizační potenciál vzorku čerstvého, chlazeného, či kryokonzervovaného spermatu pomocí rychlých a nenákladných postupů (Mocé & Graham 2008). In vitro testy jsou v současné době velmi důležitým nástrojem k hodnocení různých funkcí spermií. Patří k nim například analýza motility, morfologie, nebo schopnosti interakce s oocytem (Bucci et al. 2019).

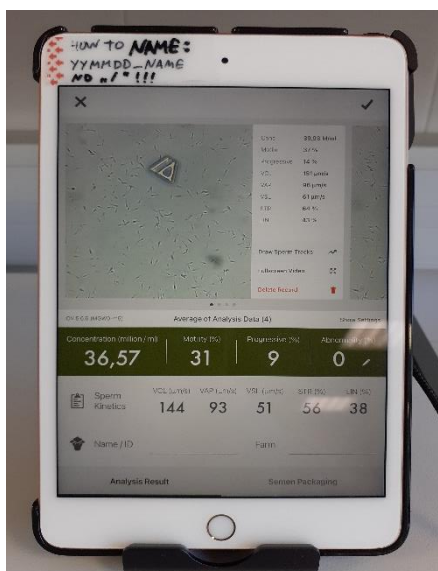
3.3.3.1 CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)

Tento systém slouží pro hodnocení kinetiky a motility spermií. Skládá se z mikroskopu s fázovým kontrastem, kamery, vyhřívané minidesky, digitizéru obrazu a softwaru pro analýzu dat. Hlavním účelem CASA je analyzovat pohyby spermií rekonstrukcí trajektorie hlavičky, vyjádřené v hodnotách za jednotku času (Dovenski et al. 2022).

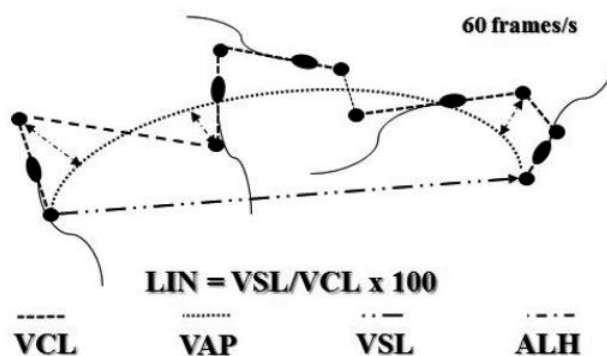
Většina údajů ze systému CASA obsahuje parametry jako je počet pohyblivých (tMOT) a progresivně pohyblivých spermií (pMOT), křivočarý (VLC, μ/s) a lineární pohyb (VSL, μ/s), průměrná rychlost trajektorie spermií (VAP, μ/s), amplituda laterálního posunutí hlavy (ALH, μ), frekvence zkřížených tepů (BCF, Hz), přímota trajektorie (STR, %) - odhadnutá jako VSL/VAP a linearita (LIN, %) - odhadnutá jako VSL/VCL (Nikolovski et al. 2019).

Získané hodnoty jsou závislé na nastavení CASA, což může významně ovlivnit interpretaci výsledků. Výsledky mohou být ovlivněny i hustotou a teplotou média, koncentrací spermií, ale také hloubkou komory. Výsledky by měly být vždy doplněny informacemi o systému CASA, aby mohly být reprodukovány v různých laboratorních podmínkách (Dovenski et al. 2022).

Ačkoliv O' Meara et al. (2008) neuvedl žádný vztah mezi analýzou CASA a plodností berana ověřenou v polním testu, Robayo et al. (2008) zjistil, že některé parametry CASA, kterými je křivočarý pohyb a průměrná rychlost trajektorie spermií, pozitivně korelují se schopností spermií migrovat hlenem z děložního čípku. Souhrnně lze tedy říct, že i když plodnost berana, ověřenou pomocí polního testu, nelze přímo předpovědět, analýza CASA je schopná poskytnout informace, které jsou důležité pro hodnocení kvality spermatu (Van de Hoek et al. 2022).



Obrázek 3: Přístroj pro metodu CASA (Archiv autora)



Obrázek 4: Kinetické parametry CASA (Dovenski et al. 2022)

3.3.3.2 Průtoková cytometrie

Jedná se o technologii, která umožňuje analyzovat velké množství buněk v krátkém časovém intervalu (Dovenski et al. 2022). Průtokové cytometry využívají lasery jako zdroje světla k produkci rozptýlených i fluorescenčních světelných signálů, které jsou čteny detektory, jako jsou fotodiody. Tyto světelné signály jsou následně převedeny na elektronické signály, které jsou analyzovány počítačem a zapisovány do datového souboru (McKinnon 2018).

Tento systém detekuje jak strukturální, tak fyziologické změny spermií, které obvykle nelze detekovat klasickými metodami. Hodnotí integritu akrozomální a cytoplazmatické membrány, strukturu chromatinu, mitochondrie aj. (Dovenski et al. 2022).

Pro tuto analýzu se v průtokové cytometrii používají fluorescenční činidla. Patří mezi ně fluorescenčně konjugované protilátky, barviva vázající nukleové kyseliny atd. (McKinnon 2018), jako je například propidium jodid, který se využívá pro hodnocení plazmatické membrány spermií, nebo akridinová oranž, využívaná pro hodnocení integrity chromatinu (Cunha et al. 2015).

3.3.3.3 Fluorescenční mikroskopie

Pro hodnocení morfologických a funkčních charakteristik spermií můžeme využít i fluorescenční mikroskopii, která využívá fluorescenčních sond. Ve spermatologii se využívá například SYBR green, hodnotící integritu plazmatické membrány, TRITIC (aglutinin z hrachu setého) k hodnocení integrity akrozomu aj. Vyhodnocení se provádí na roztěru vzorku. Hodnotí se alespoň 200 buněk (Bucci et al. 2019).

3.3.3.4 Western blot

Touto metodou se nejčastěji analyzuje exprese proteinů, které mají význam při zkoumání funkcí spermií (Bucci et al. 2019). Asi 150 proteinů souvisí s pohyblivostí beraních spermií. Jedná se například o protein PEBP4, který se vyskytuje v hlavní části bičíku, nebo SPATA18 a CPVL, detekované v mitochondriích (Dovenski et al. 2022). Princip western blottingu spočívá v extrakci buněčných proteinů (z tkání, či buněk), jejich kvantifikaci koncentrace a elektroforetické separace v gelové matici. Poté dochází k přenosu na membránu s vysokou afinitou k proteinům. Povrch membrány je nutné tzv. zablockovat, aby se zabránilo nescifické vazbě. Blokování se provádí umístěním membrány do zředěného roztoku např. sušeného mléka. Dále se detekuje antigen protilátkami specifickými pro sledovaný protein a inkubuje se sekundární protilátkou, která je chemiluminiscenční nebo fluorescenční. Následně se výsledné pásy kvantifikují pomocí denzitometrického softwaru (Bass et al. 2017).

3.3.3.5 Testy pro detekci poškození DNA

Testů pro detekci poškození DNA existuje hned několik. Můžeme se zařadit SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay). Tato metoda měří náchylnost DNA spermií k denaturaci po vystavení vysoké teplotě nebo nízkému pH (Dovenski et al. 2022). Využívá detekce pomocí průtokové cytometrie. Metachromatická barva akridin oranž se váže na poškozenou DNA a výsledkem je červená fluorescence. (Shamsi et al. 2011).

Metoda TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick and Labelling) kvantifikuje začlenění biotinylovaného dUTP (nukleotid používaný pro značení DNA) na dvojité zlomy DNA. Reakce je katalyzovaná templát independentním enzymem - terminální deoxynukleotidovou transferázou (TdT). Hodnotí podíl takto označených buněk s poškozenou DNA, který lze měřit ve světelném a fluorescenčním mikroskopu, nebo pomocí průtokové cytometrie (Evenson et al. 2002).

Test SCD (Sperm Chromatin Disperzion) je založen na schopnosti nepoškozené DNA tvořit rozptýlenou smyčku okolo jádra spermií, tzv. halo efekt (Shamsi et al. 2011). U spermií s poškozenou DNA, po smíchání s roztokem kyseliny a následně s lyzačním pufrem, k tomuto efektu nedochází (Fernandez et al. 2003). Hodnotí se pomocí světelného mikroskopu (Shamsi et al. 2011).

U metody Comet Assay (Single Cell Gell Electrophoresis) jsou buňky vloženy do agarozového gelu, poté pomocí lyzačního roztoku očištěny od proteinových zbytků a umístěny v elektrickém poli. Pohyb fragmentované DNA z poškozeného chromatinu se stává viditelný. Buňky s fragmentovanou DNA jsou značeny specifickými barvivy a jeví se jako komety (Singh et al. 2003). Vyhodnocené parametry (intenzita, délka, pohyb ocasu) jsou analyzovány pomocí specializovaného softwaru (Shamsi et al. 2011).

3.3.3.6 Vyšetření schopnosti penetrace oocytu

Před mezidruhovým křížením je oocyt chráněn zónou pellucidou. K tomuto testu se využívají křeččí vajíčka zbavená zóny pellucidy. Spermie kapacitované v in vitro podmínkách a křeččí oocyty se umístí do média a po inkubaci se oocyty promyjí, barví a zkoumají pod mikroskopem (Dovenski et al. 2022). Je měřeno procento penetrovaných oocytů a počet spermií penetrující každý oocyt. Spermie, které jsou schopné oocyt penetrovat mnohonásobně, mají dobrý fertilizační potenciál (Shaban 2007).

Tento test je však drahý a složitý na přípravu. Jeho výhodou je ale vysoká citlivost při hodnocení normálních funkcí spermií a akrozomové reakce (Dovenski et al. 2022).

3.3.3.7 Postkoitální a kontaktní test

K hodnocení interakce spermií s hlenem děložního hrdla se používá penetrační test cervikálního hlenu. Ten zahrnuje postkoitální test, kontaktní test cervikálního hlenu a penetrační test cervikálního hlenu (Dovenski et al. 2022).

Postkoitální test hodnotí schopnost spermií penetrovat a prostoupit skrz sekret. Provádí se 6 – 12 hodin po pohlavním styku. Odebere se vzorek cervikálního hlenu a vyhodnotí se jeho konzistence, pH, buněčné složení a arborizace. Pokud má hlen normální vlastnosti, kontroluje se počet pohyblivých spermií v něm obsažených. Test je považován za pozitivní, pokud je v každém mikroskopickém poli detekováno alespoň 10 pohyblivých spermií. Tento test lze provádět i v in vitro podmínkách při použití bovinního ovulačního sekretu (Robayo et al. 2008).

Kontaktní test se provádí smícháním kapky cervikálního hlenu a spermií na podložním sklíčku. Hodnotí se počet pohyblivých spermií postupujících v hlenu. Další variantou tohoto testu je kapilární test, při kterém je cervikální hlen umístěn v platové kapiláře (šířka 3 mm, délka 5 cm) a je vertikálně ponořen do vzorku spermatu. Po inkubaci se hodnotí pod mikroskopem vzdálenost pronikání spermií do kapiláry (Dovenski et al. 2022).

3.3.4 Ověření kvality inseminační dávky in vivo

3.3.4.1 Polní test

I přes celou řadu dostupných laboratorních testů neexistuje žádný, který by dokázal přesně předpovědět skutečný fertilizační potenciál inseminačních dávek, i když kombinace různých parametrů mohou zlepšit prediktivní přesnost. K ověření kvality inseminačních dávek in vivo se používá metoda polního testu (Santolaria et al. 2015). K realizaci tohoto testu je zapotřebí mít k dispozici stádo ovcí, které následně inseminujeme (Smith et al. 1998).

Metodou polního testu se nejčastěji ověřují korelace mezi plodností a parametry motility spermií, které jsou měřeny pomocí laboratorních metod a systémů (jako je CASA) (Santolaria et al. 2015). Yániz et al. (2015) ve své studii upozorňuje na fakt, že spermie musí překonat děložní čípek a isthmus, hlavní překážky nejen u ovcí. Epiteliální sliznice zde produkuje viskózní hlen. To naznačuje, že jen spermie s vynikající motilitou dosáhnou místa oplodnění. Určujícím faktorem úspěchu jsou tedy pravděpodobně parametry motility. Santolaria et al. (2015) ve své studii zabývající se prediktivní schopností parametrů kvality spermií na plodnost, dospěl k závěru, že integrita membrány spermií a křivočarý pohyb změřený systémem CASA mají prediktivní schopnost největší. Nejspolehlivější metodou ověření kvality inseminačních dávek však stále zůstává polní test.

3.3.5 Ředění ejakulátu

Ředěním navyšujeme objem ejakulátu, a tím i počet inseminačních dávek z jednoho odběru semene. Dále se vytváří příznivé podmínky pro přežívání spermií mimo organismus (Mutalik et al. 2014). Mělo by být provedeno do 150 min. po odběru. Ředidlo musí být sterilní a přehřáté na stejnou teplotu, jako je teplota ejakulátu (± 1 °C), aby se zabránilo chladovému šoku. Přidává se postupně, za stálého míchání (Ball & Peters 2004).

3.3.5.1 Složení ředidel

Tabulka 2: Základní složky ředidel (Beran et al. 2014)

Složka	Příklad složky	Funkce
Bi-destilovaná voda		Nosič pro ostatní látky
Pufry	Citrát sodný, fosfát, TRIS	Udržují hladinu pH, zabraňují aglutinaci
Jednoduché cukry	Fruktosa, laktosa, kys. citronová	Energie, zvyšují odolnost membrán
Antibiotika	Tylosin, Gentamicin, Spektinomycin ...	Ochrana před bakteriální a virovou infekcí
Aminokyseliny	Cystein, glutamin	Antioxidační vlastnosti, zlepšení motility
Mastné kyseliny	Kys. arachidonová	Zlepšení kvality ejakulátu po rozmrazení
Kryoprotektiva		

3.3.5.1.1 Kryoprotektiva

Kryoprotektiva chrání buňky před prasknutím a roztrháním ledovými krystaly, které vznikají během procesu zmrazování. Také chrání buňky před chladovým šokem. (Ball & Peters 2004). Dají se dělit do dvou skupin:

- **látky penetrující**, které prochází skrz cytoplazmatickou membránu a působí tak intracelulárně i extracelulárně,
- **látky nepenetrující**, působící pouze extracelulárně (Swain & Smith 2010).

Penetrující kryoprotektanty zvyšují fluiditu membrán přeuspořádáním membránových lipidů a bílkovin. Díky tomu mohou mít na spermie toxický vliv (Rosato & Iaffaldano 2013). Patří sem například glycerol, který chrání spermie před mechanickým poškozením během mrazení a snižuje bod mrznutí intracelulární i extracelulární tekutiny na hodnoty pod bodem mrazu vody (Deleeuw et al. 1993).

Dále sem můžeme zařadit vaječný žloutek, který zlepšuje funkce spermií a udržuje jejich oplozovací schopnost, díky fosfolipidům a low-density lipoproteinům (LDL), které se během chlazení dostávají do membrán (Alcay et al. 2016).

Nepenetrující kryoprotektanty díky své neschopnosti překonat plazmatickou membránu vytvářejí osmotický tlak, který snižuje bod mrazu média a tím i tvorbu extracelulárního ledu. Také mají nulovou toxicitu (Aisen et al. 2002). Do této skupiny řadíme zejména bovinní sérový albumin, trehalózu a sacharózu (Deleeuw et al. 1993). Při zmrazení spermií berana se jako kryoprotektivum obvykle používá glycerol (Rekha et al. 2016).

3.3.5.1.2 Antioxidační ochrana

Studie Dovenskiho et al. (2022) ukázala, že ejakuláty beranů s vyšší pohyblivostí spermií obsahovaly nižší hladinu polynenasycených mastných kyselin (PUFA). Vysoké hladiny PUFA způsobují náchylnost spermií k peroxidaci lipidů, což ovlivňuje stabilitu plazmatické membrány, která vede k narušení integrity a k buněčné smrti. ROS také narušují motilitu spermií a integritu chromatinu, což vede ke snížení oplození schopnosti.

Ukázalo se, že funkci spermií mohou ovlivnit například různé esenciální oleje (Benberkane et al. 2019). Ty mohou pozitivně působit na pohyblivost (Yüce et al. 2013), životaschopnost a tlumit negativní následky oxidačního stresu (Ben et al. 2013). Benberkane et al. (2019) ve své studii potvrdil schopnost esenciálního oleje z *Rosmarinus officinalis* chránit sperma berana před oxidačním stresem a poškozením kryokonzervací. Podobný účinek byl prokázán i u extraktu z listů *Moringa oleifera*, jehož koncentrace 300 a 600 mg/ml výrazně zvýšila motilitu, životaschopnost a zmírnila dopady oxidačního stresu u rozmrazených beraních spermií (Shokry et al. 2021).

Existují i antioxidanty cílené na mitochondrie. Jedním z nich je mitochondriálně specifický superoxidový lapač Mito-Tempo. Ten je schopen inhibovat tvorbu ROS během procesu kryokonzervace, a také produkovat další látky k zachování integrity membránové fosfolipidové dvojvrstvy (Yang et al. 2018). Zhang et al. (2019) potvrdil že 10 a 100 μM koncentrace tohoto antioxidantu zmírňuje kryopškození regulací intracelulárního oxidačního

metabolismu ve spermích u asthenozoospermických pacientů. Dále významně zlepšil kvalitu kožního spermatu po rozmrazení (Esmaeilkhani et al. 2021).

Mezi další antioxidanty patří melatonin, hormon epifyzy. Studie ukázaly, že vychytává volné radikály a reaktivní kyslíkové produkty in vivo a in vitro (Galano et al. 2011). Přidání melatoninu do ředidla spermíí významně zlepšilo motilitu, integritu membrány a snížilo intracelulární hladiny ROS u beranů, býků i lidí (Zhu et al. 2019).

3.3.5.2 Žloutková vs. bezžloutková ředidla

Nevýhodou žloutkových ředidel může být nekonzistentní složení žloutku a granula, která ztěžují stanovení aktivity spermíí (Ansari et al. 2010). Vhodnou alternativou pro média na bázi vaječného žloutku může být sójový lecitin, zejména v podmínkách krátkodobé konzervace (Tabarez et al. 2020).

Bezžloutková ředidla na bázi kombinace lecitinu a glycerolu neobsahují žádné živočišné proteiny. Jejich použitím se snižuje riziko patogenů a virů, přičemž oplozovací schopnost je nenarušena (Thun et al. 2002).

3.3.5.3 Látky ovlivňující motilitu spermíí (enhancery)

Technologie kryokonzervace umožňuje spermíím udržet si biologickou funkci po značnou dobu a nyní je široce využívána ve spermobankách a laboratořích asistované reprodukce (Mocé et al. 2016). Jedná se o metodu kontroly a ochrany samčí plodnosti jak u domácích zvířat, tak u člověka. Využívá se pro potřeby asistované reprodukce nebo jako záložní zdroj spermíí (Sharma 2011).

Přestože pohyblivé spermie mají po rozmrazení stále plnou fertilizační schopnost, dochází k jejich poškození procesem zmrazování (Gomez-Torres et al. 2017). Kvůli nesouladu produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) s obsahem antioxidantů je kryokonzervace důvodem vzniku oxidačního stresu. Navíc nedostatek cytoplazmatických ochranných mechanismů činí spermie k tomuto stresu náchylné. To se projevuje oxidací buněčných složek a poškozením buněčné struktury, včetně plazmatické membrány, DNA a akrozomu (O'Connell et al. 2002). Působením dalších faktorů, jako je tepelný šok, osmotický stres a tvorba intracelulárních ledových krystalů dochází k narušení buněk, což se nakonec projeví sníženou celkovou motilitou a vitalitou spermíí (Gomez-Torres et al. 2017).

V chovu hospodářských zvířat je kryokonzervace spermíí jednou z nejdůležitějších technik umělé inseminace, která je výhodná v mnoha ohledech (Althouse & Rossow 2011). Avšak spermie hospodářských zvířat jsou ve srovnání s těmi lidskými citlivější na nízké teploty a po rozmrazení se ztrácí více než 50 % jejich pohyblivosti (Seifi-Jamadi et al. 2017).

Progresivní motilita a vitalita spermíí jsou dva kritické parametry pro schopnost oplodnění. Oba tyto parametry jsou spojené s mírou oplodnění u in vitro fertilizace a intrauterinní inseminace. Proto je hlavním cílem při zpracování spermíí zvýšení progresivní motility a vitality (Asimakopoulos et al. 2021). In vitro použití látek a léčiv, které zvyšují motilitu, umožňují detekci životaschopných spermíí k výběru pro ICSI (Ebner et al. 2014) a zvyšují šanci, že se spermie dostanou do oocytů konvenčním způsobem (IVF, IUI). Dnes se v rutinní praxi pro umělou inseminaci využívají a testují různé zesilovače motility (Asimakopoulos et al. 2021).

3.3.5.3.1 Penicilamin, hypotaurin a epinefrin (PHE)

Směs penicilaminu, hypotaurinu a epinefrinu, zkráceně PHE se používají k posílení a udržení pohyblivosti spermií (Susko-Parrish et al. 1990).

Penicilamin je organická sloučenina, která se skládá z thiolu, aminu a karboxylové kyseliny. Jedná se o lék, který se používá k léčbě revmatických chorob a Wilsonovy nemoci (Munro & Capell 1997). Bylo zjištěno, že penicilamin ve směsi s epinefrinem zvyšuje podíl spermií, u kterých proběhla akrozomální reakce (Meizel 1985). Jako chelátor zinku chrání spermie před oxidací a prodlužuje hyperaktivovanou motilitu (El-Shahat et al. 2017). Epinefrin neboli adrenalin je hormon dřeně nadledvin, patřící do skupiny katecholaminů. Jedná se o hormon stresové reakce. Přípravuje tělo na výkon (Marvan et al. 1992). Hypotaurin je organická kyselina, která se vyskytuje ve žluči. V nízkých koncentracích ho obsahuje většina živočišných tkání (Bouckenoghe et al. 2006). Udržuje pohyblivost a životaschopnost spermií, reguluje vstup do oocytů a rovněž se podílí na kapacitaci (Leibfried & Bavister 1982). Směs epinefrinu a hypotaurinu zvyšuje rychlost penetrace oocytů spermiemi (Ball et al. 1983).

Při určování účinků různých koncentrací PHE a inkubační doby na motilitu, hyperaktivitu a akrozomovou reakci beraních spermií in vitro bylo prokázáno, že vysoké koncentrace PHE (30, 40, 50, 75 a 100 mM/ml) významně motilitu zvýšily. Toto zvýšení bylo pozorováno ihned po zředění vzorků a trvalo první dvě hodiny inkubační doby. Poté došlo k poklesu motility. Podobný nálezn byl pozorován u hyperaktivity. Autoři zde stanovili působení 75 mM/ml PHE po dobu 4 hodin jako ideální koncentraci pro dosažení lepší motility, hyperaktivity a akrozomové reakce v procesu in vitro fertilizace (El-Shahat et al. 2017).

3.3.5.3.2 Arginin

Arginin je aminokyselina, která inhibuje nadměrnou peroxidaci lipidů, zvyšuje motilitu spermií a podporuje kapacitaci (Srivastava et al. 2006).

Sahoo & Gupta (2023) zkoumali, mimo jiné, účinek argininu na indukovanou kapacitaci a zvýšení motility u spermií kozlů. Významná část kozlích spermií si zachovala motilitu a životaschopnost po dobu 2 hodin po přidání argininu i PHE ve srovnání s kontrolní skupinou. Bylo také pozorováno zvýšení motility jak u vzorků s přidaným argininem, tak u vzorků s PHE. Dále došlo ke zvýšení počtu kapacitovaných spermií a akrozomových reakcí.

3.3.5.3.3 Scutellarin

Scutellarin je druh flavinoidu, tj. látka, která patří do skupiny sekundárních metabolitů rostlin. Byl nalezen v turanu (*Erigeron breviscapus*) a využívá se v čínské medicíně. Má protirakovinné, antivirové a antifibrotické účinky (Dong et al. 2019). Studie Long et al. (2015) odhalila jeho ochranné účinky proti poškození varlat u potkanů, které bylo vyvolané diabetem typu II. Svou ochrannou funkci také plnil u myších ovariálních buněk, které byly poškozeny toxinem (Yi et al. 2021).

Sun et al. (2022) se rozhodl hodnotit účinek scutellareinu na funkce lidských spermií in vitro. Ačkoliv působení 1 μ M scutellareinu po dobu 4 hodin motilitu neovlivnilo, koncentrace 10 a 100 μ M významně celkovou a progresivní motilitu zvýšila.

Dále byla také měřena schopnost spermií proniknout 1% roztokem methylcelulózy, který napodobuje prostředí v ženském reprodukčním traktu. Výsledky ukázaly, že penetrační schopnost lidských spermií byla výrazně zvýšena a odpovídajícím způsobem vzrostla také hyperaktivace spermií (Sun et al. 2022).

3.3.5.3.4 Kyselina lysofosfatidová

Kyselina lysofosfatidová (LPA) je glycerofosfolipid, který se vyskytuje v mnoha tělesných tekutinách, jako je krev, folikulární tekutina, slzy, semenná plazma, sliny a volná břišní tekutina u pacientek s rakovinou vaječníků (Tanaka et al. 2004; Ye & Chun 2010). V reprodukčním systému podporuje stimulaci folikulů, zlepšuje oplodnění oocytů a podporuje časný embryonální vývoj a implantaci embrya (Jo et al. 2014).

Studie Li et al. (2022) ukázala, že kyselina lysofosfatidová významně zlepšila motilitu spermií. Zvýšení motility vyvolané kyselinou lysofosfatidovou je závislé na bovinním sérovém albuminu (BSA), ale nezávislé na klasické signální dráze indukované BSA, kdy dochází k aktivaci adenylátcyklázy což vede ke zvýšení cAMP, následné aktivaci PKA a fosforylaci proteinů (Li et al. 2022). BSA se v kultivačním médiu používá k odstranění cholesterolu z plazmatické membrány a následné podpoře tekutosti cytoplazmatické membrány spermií (Cross 1998). Dále bylo pomocí specifických inhibitorů vápníkových kanálů prokázáno, že LPA podporuje motilitu spermií prostřednictvím vápníkových kanálů typu L. Existuje několik typů vápníkových kanálů, z nichž má každý svou specifickou funkci. Tradičně se dělí na typy L, N, P/Q a T (Pollard et al. 2017). Vápníkové kanály řídí mimo jiné pohyby bičíku (Darszon et al. 2011). Kyselina lysofosfatidová by tedy mohla být použita jako nová terapeutická látka ke zlepšení funkce spermií a fertilizace (Li et al. 2022).

3.3.5.3.5 Vliv růstových faktorů

Několik studií, které probíhaly v průběhu posledního desetiletí, ukazují, že některé růstové faktory mají pozitivní vliv na progresivní motilitu a vitalitu spermií. Především dva z nich ukázaly dobré výsledky v experimentálních studiích na zvířatech. Jedná se o IGF-I a NGF β (Asimakopoulos et al. 2021).

Inzulínu podobný růstový faktor 1 (IGF-I), také nazývaný jako somatomedin C, je hormon, který se svou stavbou podobá molekulární struktuře inzulínu. IGF-I je produkován především játry a svým působením napodobuje účinky inzulínu. Podporuje přežití, růst a vývoj buněk. Podílí se na mnoha fyziologických a patologických procesech (Puche & Castilla-Cortázar 2012). Jeho produkce je stimulována růstovým hormonem (somatotropinem) (Decourtye et al. 2017).

Dále bylo zjištěno, že u člověka je IGF-I exprimován také v Sertoliho buňkách, primárních spermatocytech, a také slabě v Leydigových buňkách (Vannelli et al. 1988). Je také přítomen v semenné plazmě (Glander et al. 1996). Koncentrace IGF-I v semenné plazmě významně koreluje s koncentrací a procentem morfologicky normálních spermií (Glander et al. 1996). Henricks et al. (1998) prokázal, že IGF-I zvyšuje motilitu býčích spermií. To se prokázalo i u spermií koní (Champion et al. 2002) a buvolů po rozmrazení (Selvaraju et al. 2009).

Nervový růstový faktor (NGF) patří do skupiny neutrofinů. Jedná se o protein, známý svými účinky na vývoj, přežití a mitotickou aktivitu nervových buněk. Svým působením také ovlivňuje jiné typy buněk (Lin et al. 2015). V roce 1988 byla popsána exprese NGF ve varlatech a nadvarlatech myši a potkanů. Dále byl identifikován v Leydigových buňkách, Sertoliho buňkách, spermatogoniích, nadvarleti a semenných váčcích japonské opice (Jin et al. 2006). U skotu byl detekován v ejakulovaných spermiiích (Li et al. 2010).

Účinky NGF na parametry spermií byly také studovány u několika druhů zvířat a lidí. Studie u křečků ukázala, že inkubace spermií s NGF zlepšuje motilitu (Jin et al. 2010). U spermií skotu se prodloužila jejich životnost (Li et al. 2010). Saeednia et al. (2016) zjistil, že u zmrazených a rozmrazených vzorků spermatu od astenozoospermických pacientů léčba 0,5 ng/ml NGF významně zvýšila motilitu, vitalitu a snížila fragmentaci DNA.

Asimakopoulos et al. (2021) se rozhodl studovat právě in vitro vliv růstových faktorů, které jsou přítomny v samčím reprodukčním systému. Výsledky ukázaly, že jak IGF-I, tak NGFβ zlepšuje in vitro progresivní motilitu a vitalitu lidských spermií. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími studiiemi živočišných druhů a lidí.

3.3.5.3.6 Zvýšení motility spermií pomocí elektrické stimulace

Pohyblivost spermií je rozhodujícím faktorem pro normální oplodnění, které je částečně podporováno mitochondriální aktivitou. ATP, který je produkován v mitochondriích, podporuje fosforylaci proteinů jako je serin a tyrosin (Turner et al. 2006). Fosforylace tyrosinového proteinu v bičíku spermie aktivuje její motilitu (Sakkas et al. 2003). Ke ztrátě energie však částečně dochází v důsledku ztráty mitochondriální funkce (Amaral et al. 2013). Zavedení elektrického proudu v rozsahu nanoampérů slouží jako exogenní zdroj elektronů a slouží jako biofyzikální zdroj pro zvýšení motility spermií (Turner et al. 2006).

Shin et al. (2020) se pokusil zvýšit motilitu spermií pomocí enzymatických biopalivových článků (EBFC). Tyto biopalivové články mají několik výhod. Lze je jednoduše připravit, elektrický proud se dá v nano nebo mikroměřítku snadno ovládat a jsou pro buněčnou elektrickou stimulaci velmi šetrné (Shin et al. 2020).

Výsledky studie ukázaly, že optimální elektrická stimulace zvyšuje motilitu spermií o 30 – 40 % tím, že dojde k obnovení fosforylace tyrosinu ve spermiiích. Elektricky stimulovaná skupina však nevykazovala zvýšení rychlosti nástupu akrozomových reakcí ve srovnání se skupinou kontrolní. V případě asthenozoospermie bylo 40 % motility po elektrické stimulaci obnoveno, ovšem k obnovení pohybu u spermií s 0 % motilitou nedošlo (Shin et al. 2020).

3.3.5.3.7 Inhibitory fosfodiesterázy (PDEI)

Fosfodiesterázy jsou enzymy, které štěpí esterové vazby a hrají důležitou roli v metabolismu celé řady sloučenin. Bylo popsáno celkem jedenáct typů (Bondarev et al. 2022). Hydrolyzují druhé posly, jimiž jsou cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) a cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), na adenosinmonofosfát (AMP) a guanosinmonofosfát (GMP) (Buffone et al. 2014).

Cyklická dráha proteinkinázy A (PKA), závislá na cAMP, hraje hlavní roli v komplexní signální kaskádě, která je základem motility spermií (Freitas et al. 2017). U spermií je hladina

cAMP dynamicky regulována dvěma hlavními enzymy, a to adenylátcyklázami a fosfodiesterázami (PDE). Tyto enzymy katalyzují syntézu a degradaci cAMP (Lefèvre et al. 2002).

Spermie se skládají z mRNA několika podtypů PDE. Například přítomnost PDE1, PDE3, PDE4 a PDE8 je hlášena v lidských spermích i v semenné tekutině (Richter et al. 1999). PDE4 zde hraje klíčovou roli v regulaci motility (Fisch et al. 1998) a PDE10A je klíčová hydroláza, která zvyšuje kapacitu a pohyblivost spermíí. Přispívá k více než 40 % veškeré aktivity cAMP – PDE (Marechal et al. 2017).

Aktivita spermíí je do značné míry závislá na povaze a lokalizaci exprimovaných PDE. PDE4A a PDE4D byly detekovány v akrozomu hlavičky, což podporuje roli PDE4 v regulaci motility bez ovlivnění akrozomové reakce (Fisch et al. 1998).

Pro zvýšení motility a tím zlepšení úspěšnosti umělého oplodnění lze využít inhibitory fosfodiesterázy (PDEI) (Negri et al. 1996). Nicméně pouze některé PDEI byly plně ověřeny z hlediska jejich účinnosti a bezpečnosti. Několik studií uvádí škodlivé účinky, jako je toxicita pro spermie a embryo (Lacham-Kaplan & Trounson 1994), vyvolání předčasné akrozomové reakce (Ford et al. 1994), nebo poškození DNA (Unsal et al. 2016).

Tardif et al. (2014) publikoval rozsáhlý výzkum, který hodnotil účinnost a bezpečnost 43 různých sloučenin PDEI na čerstvém spermatu od normozoospermických dárců a pacientů se subfertilitou. Výzkum byl rozdělen do dvou fází, kde v první fázi provedl screening těchto 43 komerčně dostupných sloučenin s hlášenou PDEI aktivitou k identifikaci hlavních sloučenin, které stimulují motilitu. Na konci této fáze bylo identifikováno 6 sloučenin, které měly silný účinek na celkovou a progresivní motilitu. Tyto sloučeniny byly dále podrobněji vyhodnocovány ve fázi druhé. Jednalo se o dipyridamol, ibudilast, 8-MeO-IBMX, etazolát hydrochlorid, papaverin a tofisopam. Tyto sloučeniny zvýšily penetraci do náhrady cervikálního hlenu, jejich působením nebyla významně indukována akrozomová reakce, stimulace motility byla udržována po dlouhou dobu (180 min.) a účinek byl pozorován i po jejich odstranění.

3.3.5.3.8 Charakteristika vybraných druhů PDEI

3.3.5.3.8.1 Pentoxifylin (PTX)

Pentoxifylin, derivát methylxantinu je vazoaktivní léčivo, které se používá k léčbě cévních onemocnění i mužské neplodnosti (Donate-Correa et al. 2019). Zlepšuje motilitu spermíí in vivo i in vitro (Azgomi et al. 2018), a také zvyšuje penetraci cervikálního hlenu spermiiemi v samičím reprodukčním traktu (Nassar et al. 1999). Jedná se o neselektivní inhibitor PDE5 (Lu et al. 2022). Vazebné studie Satish et al. (2021) založené na kalorimetrii prokázaly, že pentoxifylin vykazuje slabou afinitu k spermaticky specifickým enzymům PDE4A, PDE4D a PDE10A.

Vlivem pentoxifylinu dochází nejen ke zvýšení počtu akrozomových reakcí (Nassar et al. 1998), ale také vykazuje antioxidační vlastnosti vlivem inhibice enzymu xantinoxidázy, což vede ke snížení peroxidace lipidů a intracelulárních reaktivních forem kyslíku (ROS), produkovaných defektními spermiiemi (Mc Kinney et al. 1996). ROS jsou důležité pro funkci spermíí. Ve vysoké míře však nepříznivě ovlivňují cytoplazmatickou membránu spermíí a

integritu genomu. Kromě toho zvýšená peroxidace lipidů snižuje fluiditu membrány, což vede ke snížení motility spermií a narušení základních funkcí spermie (Alahmar 2019).

3.3.5.3.8.1.1 Vliv in vitro použití PTX na zlepšení motility

Několik studií se zaměřilo na testování optimálních dávek pentoxifylinu a času jeho působení. Příkladem takové studie je účinek 5 mmol/l PTX na spermie po dobu jedné hodiny, kdy došlo u normozoospermického vzorku ke zvýšení aktivity (Banihani & Abu-Alhayjaa 2016). Banihani et al. (2018) inkuboval ve tmě 1 hodinu při 25 °C vzorky spermatu, ke kterým bylo přidáno 5 mmol/l a 10 mmol/l PTX. Přidáním 5 mmol/l se výrazně zvýšila progresivní motilita, avšak přidání 10 mmol/l PTX mělo negativní účinky, kvůli nadměrné produkci oxidu dusnatého, který nepříznivě ovlivňuje funkci spermií.

Salian et al. (2019) hodnotil účinek 1 mmol/l PTX. Vzorky normozoospermiků a astenozoospermiků inkuboval 60 min. při teplotě 37 °C. Motilita byla vyhodnocována v intervalech 1, 4, 24, 48 a 72 hodin. Celková motilita u normozoospermiků se hodinu po inkubaci výrazně zvýšila, ale dále se s delší inkubační dobou postupně snižovala. U astenozoospermických vzorků se po hodině inkubace celkové procento pohyblivých spermií výrazně nezvýšilo, avšak procento progresivní motility bylo významně vyšší.

Lu et al. (2022) sestavil systematický přehled na základě dostupných studií o účinnosti a bezpečnosti PTX. Všechny hodnocené studie uvedly prospěšnou roli PTX při zlepšování progresivní motility spermií. Také bylo prokázáno, že aplikace PTX zvyšuje motilitu spermií po rozmražení (Mahaldashtian et al. 2021).

3.3.5.3.8.1.2 Vliv PTX na morfologii spermií

Motilita spermií je ovlivněna jejich morfologií. Morfologické defekty spermií se nazývají teratozoospermie. Dle referenční hodnoty Světové zdravotnické organizace se vyznačují méně než 4 % normálního tvaru spermií v ejakulátu (Touré et al. 2020). Morfologie hlavičky je zásadní pro interakci spermie s oocytem. Normální morfologie bičíku se zdá být nejdůležitějším faktorem pro zajištění pohyblivosti spermií (Lehti & Sironen 2017).

Nabi et al. (2017) aplikoval 3,6 mmol/l PTX na 30 min. a potvrdil, že PTX dokázal zvrátit škodlivé účinky mrazení na motilitu spermií, ale neindukoval specifické ultrastrukturální změny. Na druhou stranu (Nasimi et al. 2018) ve své studii uvádí, že perorální podávání PTX může zlepšit normální morfologický poměr spermií u idiopatické mužské neplodnosti.

Byly také hodnoceny účinky pentoxifylinu na chlazené a kryokonzervované sperma kozy šrouborohé. Autoři zde mimo jiné vyhodnocovali životaschopnost a integritu cytoplazmatické membrány a akrozomů. Chlazené spermie vykazovaly významné zlepšení. Kryokonzervované spermie byly hodnoceny pomocí počítačové analýzy a výsledky rovněž naznačují, že přidání 3 a 6 mmol/l PTX snižuje škody, způsobené procesem chlazení a kryokonzervace (Rahimizadeh et al. 2021).

3.3.5.3.8.1.3 Vliv PTX na integraci DNA a kvalitu embrya

Morfologie i motilita koreluje s poškozením DNA spermií (Meseguer et al. 2012). I když aplikace PTX v koncentraci 1,5 mmol/l neuspěla a negativně integritu DNA ovlivnila (Dutra et al. 2018), nevýznamný rozdíl byl pozorován po přidání 1 mmol/l PTX (Salian et al. 2019).

Předběžné studie ukázaly, že PTX vyvolává předčasnou akrozomovou reakci (Yovich 1993) a má toxické účinky na funkci oocytů a časný vývoj embrya (Tournaye et al. 1994), což vede k obstrukci embryonálního vývoje nebo teratogenním účinkům novorozenců (Tournaye et al. 1995). Tournaye et al. (1993) publikoval, že dávka 3, 6 a 7,2 mmol/l PTX po dobu 30 min. v kultivačním médiu myších embryí způsobila pokles počtu buněk blastocyst. V klinickém prostředí je však PTX přítomen pouze v připraveném vzorku spermatu a oocyty/embrya mu nejsou vystaveny (Hattori et al. 2011). Obecně je výzkum o vlivu PTX na kvalitu a klasifikaci lidských embryí velmi vzácný (Mahaldashtian et al. 2021). Navas et al. (2017) sledoval novorozence po ICSI, u kterého byla použita spermie vystavená PTX. Dle klasifikace novorozeneckých malformací nebyla frekvence významně vyšší než frekvence zjištěná u potomků po IVF. Tato studie však potřebuje dlouhodobé sledování.

Existuje rozdíl v odpovědi spermií na PTX v normoozoospermických a abnormálních vzorcích. Většina výzkumníků používala koncentraci 3-5 mmol/l PTX a dobu inkubace 10 až 30 minut. PTX vyžaduje prahovou koncentraci, aby působil jako zesilovač motility spermií, ale vysoká koncentrace a dlouhá doba expozice mohou mít negativní vliv na parametry spermií a integritu cytoplazmatické membrány (Mahaldashtian et al. 2021).

3.3.5.3.8.2 Pentoxifylinové analogy

S cílem snížit nežádoucí účinky a zvýšit motilitu spermií Satish et al. (2021) studoval analogy PTX, pomocí strukturně řízeného přístupu *in silico*, tedy počítačovou simulací. Hodnocení *in silico* ukázalo, že analogy PTX se vážou pevněji na PDE a tvoří stabilní komplexy. Zejména *ex vivo* hodnocení spermií ošetřených jedním z analogů PTX (PTXm-1) ukázalo příznivý účinek při mnohem nižší koncentraci. Prokázal se pomalejší nástup akrozomové reakce, prodloužená životaschopnost spermií a vynikající kvalita embrya.

Modifikované sloučeniny mPTX1 až mPTX6 byly syntetizovány reakcí PTX s různými arylaldehydy (nenasycený aldehyd) za přítomnosti alkoholického roztoku KOH. I v této studii tato sloučenina prokázala vynikající zvýšení motility a prodloužené přežití spermií *in vitro*. Optimální aktivita mPTX1 byla pozorována při koncentraci, která byla čtyřikrát nižší než výchozí látka. Modifikace také vedla ke snížení genotoxických účinků (Nazari et al. 2022).

3.3.5.3.8.3 Theofylin a ostatní xantinové deriváty

Jedná se o přírodní derivát methylovaného xantinu, který se v malém množství přirozeně vyskytuje v čaji a kakaových bobech. Působí relaxačním účinkem na hladké svalstvo a stimuluje srdeční a centrální nervový systém. Od roku 1922 se díky svým bronchodilatačním účinkům využívá ke klinické léčbě astmatu a dalších respiračních onemocnění (Jilani et al. 2021).

Působí jako neselektivní inhibitor fosfodiesterázy (Hendeles et al. 1985) a je antagonistou adenosinového receptoru. (Jilani et al. 2021). Jeho nevýhodou je úzký rozsah terapeutických dávek a množství komplikací spojených s léčbou (Journey & Bentley 2021).

Theofylin také zvyšuje motilitu spermií a penetraci do vajíčka (Loughlin & Agarwal 1992). Dle Frot et al. (1998) však vykazoval fetální toxicitu a teratogenní účinky.

Ibis et al. (2021) ve své studii provedl experiment, který porovnával schopnosti papaverinu, pentoxifylinu a theofylinu zvýšit motilitu. Bylo zjištěno, že theofylin je ve zvýšení celkové motility lepší než ostatní dvě uvedené látky.

Také další xantinové deriváty, jako jsou acefyllin, dyfylin a proxyphyllin zvýšily motilitu ejakulovaných lidských spermií a myších testikulárních spermií (Satish et al. 2021). Acefyllin se používá k léčbě astmatu a bronchitidy (Masood et al. 2018). Dyfylin má menší nežádoucí účinky na žaludeční, kardiovaskulární a centrální nervový systém než theofylin (Hudson et al. 1973). Proxyphyllin se také používá k léčbě respiračních onemocnění, jako je obstrukční plicní onemocnění a astma (Selvig 1981). Satish et al. (2021) uvádí, že nejsilněji na pohyblivost a dlouhověkost spermií působí acefylin.

3.3.5.3.8.4 Papaverin

Papaverin je benzylisochinolinový opioidní alkaloid, izolovaný z latexu *Papaver somniferum* (máku setého). Jedná se o inhibitor PDE2-4 (Valentová et al. 2004) a PDE10A. Blokuje hydrolýzu cAMP i cGMP (Mooradian et al. 1989) a má vasodilatační a spasmolytické účinky (Valentová et al. 2004). Klinicky se používá při léčbě erektilní dysfunkce prostřednictvím intrakavernózní injekce (Mooradian et al. 1989).

Ibis et al. (2021) se rozhodl účinek papaverinu jako inhibitoru PDE10A ověřit na modelu snížené motility u kryokonzervovaných spermií po rozmrazení.

Pomocí předběžného experimentu byla optimální dávka papaverinu s nejvyšší rychlostí motility stanovena na 100 $\mu\text{M/l}$. Dále byly hodnoceny dva expoziční časy, a to 30 a 60 minut. Podrobné parametry motility byly detekovány pomocí metody CASA. Stav akrozomu, životaschopnost, apoptóza a fragmentace DNA byly hodnoceny průtokovou cytometrií.

Kryokonzervace výrazně zhoršila parametry motility spermií, ale nedošlo k žádným výrazným změnám v akrozomálním stavu a apoptóze. Papaverin významně zlepšil parametry motility ve všech intervalech expozice. Životnost však byla nižší u působení 60 min. ve srovnání s 30 min. Dále bylo poukázáno na to, že papaverin neměl žádný vliv na akrozomální změny, poškození DNA a ztrátu životaschopnosti (Ibis et al. 2021). Při testu bezpečnosti na myších embryích bylo zjištěno, že papaverin nezpůsobuje žádnou embryotoxicitu (Terriou et al. 2015). Nicméně k ověření, zda je použití papaverinu opravdu bezpečné jsou zapotřebí další klinické studie, včetně studie vlivu na lidská embrya (Ibis et al. 2021).

3.3.5.3.9 Nejperspektivnější PDEI pro zlepšení motility

Mezi nejperspektivnější inhibitory fosfodiesterázy, které pozitivně ovlivňují motilitu, se řadí tofisopam a ibudilast (Tardif et al. 2014). Tofisopam je anxiolytikum, tedy lék předepisovaný k léčbě příznaků stavu úzkosti. Chemicky se jedná o 2,3-benzodiazepin. Dále působí jako inhibitor PDE4 (Bernard et al. 2008).

Ibudilast je léčivo, které bylo uvedeno na trh v Japonsku k léčbě astmatu. Jedná se o inhibitor PDE (Rolan et al. 2009). V největší míře inhibuje PDE4 (Huang et al. 2006). Vykazuje protizánětlivou aktivitu jak v periferním imunitním systému, tak v CNS prostřednictvím útlumu gliových buněk. Tato protizánětlivá aktivita zaměřená na CNS se využívá při léčbě roztroušené sklerózy, neuropatické bolesti a při zlepšování účinnosti a bezpečnosti opioidů (Rolan et al. 2009).

Při testování vlivu této sloučeniny na motilitu kančích spermií bylo potvrzeno, že přidání ibudilastu do vzorků, které byly předem zahřáté na teplotu 37° C a následně inkubovány po dobu 10 minut, došlo ke zvýšení procenta progresivní motility spermií (Madamidola 2015).

K identifikaci různých typů sloučenin (například pro mužskou antikoncepci) se používá systém HTS (Gruber et al. 2020). Gruber et al. (2022) jej použil k hodnocení motility lidských spermií s cílem identifikovat sloučeniny, zvyšující jejich motilitu. Pomocí výkonného mikroskopu dochází k záznamu časosběrných snímků ze dvou pozic v každé jamce, kde se nachází vzorek. Jednou z hlavních cílových skupin screeningu byly PDE. Všechny anotované inhibitory PDE10A použité v této studii, mezi kterými byl ibudilast a papaverin, měly zesilující účinek na motilitu.

Ví se tedy, že spermie exprimují několik fosfodiesteráz, lokalizovaných v různých oblastech buňky. Použitím specifických typů PDEI lze dosáhnout zlepšení motility spermií bez nepříznivého ovlivnění dalších funkcí. Především ibudilast, tofisopam a papaverin, u kterých byla pozorována výraznější stimulace motility spermií i u vzorků s nižší výchozí motilitou, byly označeny za velmi slibné kandidáty pro další testování bezpečnosti a klinické účinnosti (Tardif et al. 2014). Na základě tohoto doporučení jsme se rozhodli testovat jednu z látek, a to konkrétně ibudilast, na modelu beraního ejakulátu.

3.3.6 Konzervace spermatu

Konzervaci beraního spermatu lze provádět dvěma způsoby, a to chlazením, nebo mrazením (Dovenski et al. 2022).

3.3.6.1 Konzervace chlazením

Jedná se o krátkodobou konzervaci. Jako ředidlo lze využít např. citrát sodný, vaječný žloutek, mléko, Tris a další (Louda et al. 2001). Během skladování spermatu v chlazené tekutině se metabolismus spermií snižuje a tím se prodlužuje jejich životaschopnost na 6-8 hodin (Dovenski et al. 2022). Naředitelé sperma lze ihned použít k inseminaci. Lze uchovávat při teplotě 15 °C po dobu 5 – 6 hodin, nebo při 3 – 5 °C po dobu 12 - 24 hodin (Louda et al. 2001). Ke skladování a přepravě se obvykle používají termo nebo polystyrenové nádoby doplněné chlazenými ampulemi s ledovou kyselinou octovou. Inseminační dávky přepravované při 5 °C

je baleno v nádobách z polystyrenu, které jsou vybaveny láhvemi s mraženou vodou, gelem, nebo drceným ledem (Dovenski et al. 2022).

3.3.6.2 Kryokonzervace

Vystavení spermií berana nižším teplotám významně snižuje jejich životaschopnost. Tyto škodlivé účinky lze zmírnit používáním ředidla spermatu obsahujícího kryoprotektivní složky a postupným snižováním teplot (Dovenski et al. 2022).

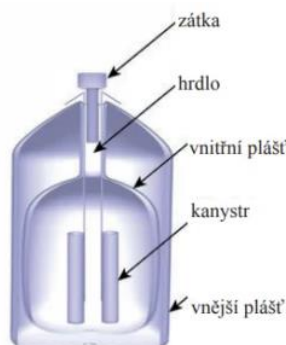
Rychlost zmrazování by měla být dostatečně pozvolná, aby se stihla z buněk dostat voda a minimalizovala se tak tvorba intracelulárních ledových krystalů. Zároveň se však musí zabránit vážné dehydrataci buněk. Uvádí se, že většina destrukcí spermií nastává v teplotní zóně mezi -15 a -30 °C. Během zmrazování inseminačních dávek je tedy sperma naředěno vhodným ředidlem a postupně schlazeno na cca 5 °C, tedy ekvilibrováno (Saha et al. 2022). U beranů byly použity různé doby ekvibrace (od 1 do 5 hodin). Ranjan et al. (2015) a Sharma & Sood (2020) zjistili, že 4 hodinová ekvilibrační perioda zlepšuje kvalitu spermatu po rozmrazení. Na druhou stranu Baruah et al. (2003) nezjistil žádné významné odchylky v pohyblivosti ve vzorcích spermatu, které byly ekvilibrovány po dobu 0,5, 1 nebo 1,5 hodiny. Standardně se tedy využívá doba ekvibrace 1,5 – 2 hodiny (Saha et al. 2022).

Dále se teplota snižuje z 5 °C na cca -125 °C, tím, že se pejetý s inseminačními dávkami umístí 4 - 6 cm nad hladinu tekutého dusíku (do páry) na dobu 8 – 10 minut (Saha et al. 2022). Před ponořením do tekutého dusíku (-196 °C) by měla být konečná teplota snížena alespoň na -130 °C, aby se zastavily všechny metabolické procesy, včetně tepelně řízených chemických změn (Medeiros et al. 2002).

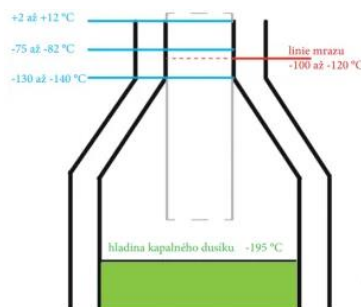
3.3.7 Uchovávání inseminačních dávek

Inseminační dávky, které jsou uloženy v kontejneru (Dewarově nádobě) s kapalným dusíkem tzn. při teplotě -196 °C mají životnost neomezenou dobu.

V horní polovině hrdla kontejneru se nachází oblast s teplotou, kterou by měly inseminační dávky překročit pouze těsně před vlastním rozmrazením, jinak hrozí tvorba ledových krystalů, které buňky nenávratně poškozují. Tato oblast je označována jako tzv. „linie mrazu“. Teplota se zde pohybuje kolem -100 až -130 °C. Při manipulaci by dávky měly být z kapalného dusíku vyjmuty pouze na krátkou dobu a to 5 – 10 sekund. V nádobě je nutné udržovat dostatečnou hladinu tekutého dusíku pravidelným doléváním (Povolná 2017).



Obrázek 5: Popis Dewarovy nádoby (Povolná 2017)



Obrázek 6: Linie mrazu (Povolná 2017)

4 Metodika

4.1 Plemeníci

Pro účely této diplomové práce byl použit odebraný ejakulát celkem od 4 beranů plemene valašské ovce. Ejakulát byl pokaždé odebrán od všech 4 plemeníků. Pro výrobu vzorků se vždy použil odběr plemeníka, který splňoval všechny požadavky na minimální kvalitu ejakulátu. Pouze ve třech případech byly odběry smíchány z důvodu nízkého objemu.

Všichni plemeníci byli ustájeni v Demonstrační a pokusné stáji České zemědělské univerzity v Praze. Jednalo se o skupinové ustájení. K dispozici byl skupinový kotec s volným přístupem do venkovního pastevního výběhu. Ustájovací prostory, venkovní plochy a technologické vybavení splňovaly platnou legislativu dle zákona č. 208/2004 Sb. Krmnou dávku během celého roku tvořil pastevní porost doplněný lučním senem ad libitum. Doplnkovou krmnou dávku tvořily granule (1580 OVCE UNI, De Heus a.s., Bučovice, ČR) v množství 300 - 500 g/ks/den z ohledem na kondiční stav zvířat. Voda byla poskytnuta ad libitum. Zvířata měla dále volný přístup k minerálním lizům. Plemeníci byli celou dobu pod veterinárním dohledem a po čas experimentu nevykazovali příznaky žádných onemocnění.

4.2 Odběr ejakulátu

Odběr ejakulátu byl proveden pomocí umělé vagíny pro malé přežvýkavce (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Německo). Před odběrem byla umělá vagina nahřátá teplou vodou na 38 – 39 °C, dofouknuta na požadovaný tlak a její vstupní část nalubrikována vazelínou. Ejakulát byl odebrán do nespermicidního latexového sběrače, a poté ihned přenesen automatickou pipetou do uzavíratelné zkumavky o objemu 10 ml. Během transportu do laboratoře a následného zpracování se udržoval při teplotě 25 °C až do ekvilibrace.

4.3 Analýza odebraného ejakulátu

Hodnocení odebraného ejakulátu probíhalo v laboratoři při teplotě 25 °C. Nejprve se na kapce nativního ejakulátu hodnotila vířivost pohybu (mass motility) pomocí mikroskopu s vyhřevnou deskou nahřátou na 38°C. Hodnota mass motility se u všech ejakulátů využitých v této diplomové práci pohybovala v rozmezí 4,5 – 5 bodů (na stupnici od 1 – 5; 5 bodů = velmi rychlý vířivý pohyb).

Dále byla stanovena koncentrace spermií pomocí kalibrovaného spektrofotometru (Genesys 10S Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Výchozí koncentrace se u všech využitých ejakulátů pohybovala v rozmezí 1 – 3,5 mld/ml buněk. Poté se stanovil objem ejakulátu dle stupnice na zkumavce.

4.4 Příprava enhanceru motility ibudilast

Ibudilast (I057 – 10MG, Merck, Germany) byl navážen a rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO) (2,5 mg/100 µl DMSO). Výchozí koncentrace pracovního roztoku byla 100 mM. Poté byl rozdělen do zkumavek a uchováván ve zmrazeném stavu při – 20 °C. Zkumavky se jednotlivě rozmrazovaly na vyhřevné desce (38 °C) vždy před samotným použitím.

4.5 Příprava inseminačních dávek

Po zhodnocení byl ejakulát naředěn komerčním ředidlem OptiXcell (IMV Technologies, L'Aigle, France) o teplotě 38 °C na konečný objem 7,5 ml. Koncentrace spermií byla v tomto objemu průměrně 200 mil/ml.

Následně se naředěné sperma automatickou pipetou rozdělilo po 1 ml do 7 zkumavek. K prvním třem vzorkům spermatu byly přidány tři rozdílné koncentrace ibudilastu – viz tabulka 3. K dalším třem vzorkům se přidaly tři rozdílné objemy čistého DMSO, které odpovídaly objemům ibudilastu s DMSO – viz tabulka 4. Poslední vzorek spermatu byl kontrolní, tzn. bez přidání látek.

Tabulka 3: *Koncentrace ibudilastu*

	Vzorek	Pipetovaný objem	Finální koncentrace ibudilastu
1	IB + DMSO (0,5)	0,5 µl	50 µM
2	IB + DMSO (1)	1 µl	100 µM
3	IB + DMSO (2)	2 µl	200 µM

Tabulka 4: *Objem DMSO*

	Číslo vzorku	Pipetovaný objem
4	DMSO (0,5)	0,5 µl
5	DMSO (1)	1 µl
6	DMSO (2)	2 µl
7	---KONTROLA--	

Takto připravené sperma bylo plněno do pejet o objemu 0,25 ml (IMV Technologies, L'Aigle, France). Od každé varianty byly naplněny tři pejety, označeny příslušným značením (viz obrázek 5) a uzavřeny pomocí polyvinylalkoholu (IMV Technologies, L'Aigle, France). Připravené pejety byly následně umístěny do chladicího boxu, kde probíhala ekvilibrace při teplotě 5 °C po dobu 2 hodin.

K mrazení inseminačních dávek byl použit polystyrenový mobilní mrazicí box. Pejety byly nejprve umístěny 5 cm nad hladinou tekutého dusíku po dobu 10 minut, poté se vložily přímo pod hladinu tekutého dusíku. Takto kryokonzervované pejety byly uchovávány několik dnů v kontejneru s tekutým dusíkem.

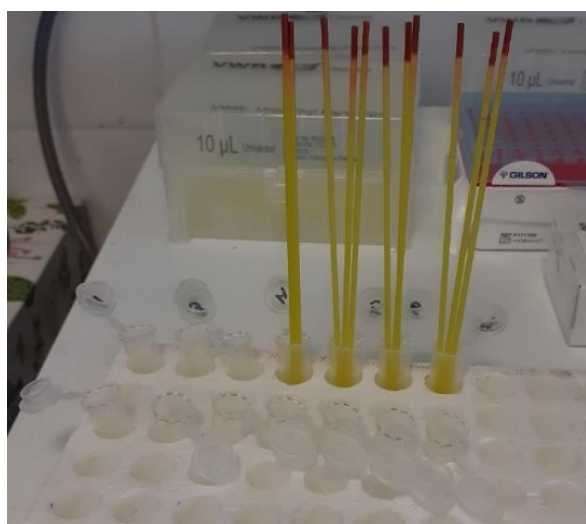


Obrázek 7: *Značky na filtru pejety (Archiv autora)*

4.6 Hodnocení inseminačních dávek po rozmrazení

4.6.1 Rozmrazení

Rozmrazení pejet probíhalo ve vodní lázni, která byla předehřátá na 39 °C. Pejety se vkládaly do lázně na dobu 30 sekund. Pro následnou analýzu motility se rozmrazily všechny tři pejety od každé varianty a smíchaly se dohromady. Veškerá práce se vzorky probíhala při teplotě 38° C.



Obrázek 8: *Rozmrazené pejety rozříděné dle varianty (Archiv autora)*

4.6.2 CASA

Analýza motility vzorků byla provedena pomocí mobilní počítačově asistované analýzy spermií (mCASA) (model iSperm, Aidmics Biotechnology Co., LTD, Taipei City, Taiwan). Pro přípravu jednotlivých vzorků, které se měřily postupně, bylo použito od 50 – 150 μ l PBS (dle výchozí koncentrace každého ejakulátu; přístroj mCASA je schopný měřit vzorky které mají koncentraci v rozmezí 30 – 60 mil/ml buněk) a 10 μ l spermatu. Po důkladném promíchání se 10 μ l tohoto vzorku automatickou pipetou aplikovalo na podložní část jednorázové analyzační komůrky. Poté se nasadila krycí část této komůrky a takto připravený vzorek byl vložen do předehřáté čočky (38 °C), která je součástí přístroje mCASA. Software následně vyhodnotil motilitu spermií. U každého vzorku se měřila 4 zorná pole.

Měření probíhala ve dvou intervalech. První měření se provedlo ihned po rozmrazení (T1), druhé po 3 hodinách od začátku rozmrazování (T2). Mezi prvním a druhým měřením byly vzorky uchovávány v termostatu při teplotě 38°C.



Obrázek 9 a 10: Přístroj mCASA s vyhřívanou čočkou pomocí USB kabelu (Archiv autora)

4.7 Statistická analýza dat

Naměřené hodnoty z analýzy motility CASA byly exportovány do Microsoft Office Excel, ve kterém se vytvořila tabulka pro následné vyhodnocení softwarem SAS (SAS/STAT® verze 9.3., 2011). Jako závislé proměnné byly vyhodnocovány parametry motility měřené pomocí systému CASA (celková motilita, progresivní motilita, průměrná rychlost trajektorie spermií, křivočará rychlost, lineární rychlost, linearita a přímota trajektorie).

Modelová rovnice pro jednotlivé ukazatele:

$$Y_{ijk} = \mu + \text{DEN}_i + \text{VAR}_j + e_{ijk}$$

- Y_{ijk} = závisle proměnná (MOT, PROGR, VAP, VCL, VSL, LIN, STR)
- μ = průměrná hodnota závisle proměnné
- DEN_i = i -tá varianta odběrového dne (i = odběrový den 1, $n = 12$; i = odběrový den 2, $n = 12$; i = odběrový den 3, $n = 12$; i = odběrový den 4, $n = 12$; i = odběrový den 5, $n = 12$; i = odběrový den 6, $n = 24$; i = odběrový den 7, $n = 12$; i = odběrový den 8, $n = 12$)
- VAR_j = j -tá varianta objemu látek ($j = \text{IB} + \text{DMSO} (0,5)$, $n = 36$; $j = \text{IB} + \text{DMSO} (1)$, $n = 36$; $j = \text{IB} + \text{DMSO} (2)$, $n = 36$; $j = \text{DMSO} (0,5)$, $n = 36$; $j = \text{DMSO} (1)$, $n = 36$; $j = \text{DMSO} (2)$, $n = 36$; $j = \text{kontrola } 7$, $n = 36$)
- e_{ijk} = reziduální chyba

Statisticky významné rozdíly byly definovány Tukey – Kramerova testu na hladině významnosti $p < 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Základní statistické údaje - CASA

Základní statistické údaje pro varianty IB+DMSO (0,5) a DMSO (0,5) jsou uvedeny v tabulce 5. Jedná se o hodnoty měřené ve dvou časech, a to ihned po rozmrazení a 3 hodiny od začátku rozmrazování. Tabulka uvádí pro jednotlivé parametry motility aritmetický průměr, směrodatnou odchylku, minimum a maximum. Hodnocené parametry motility jsou celková motilita, progresivní motilita, průměrná rychlost trajektorie spermií, křivočará rychlost, lineární rychlost, linearita a přímota trajektorie.

U jednotlivých parametrů můžeme vidět pokles hodnoty průměru mezi časem měření ihned po rozmrazení a 3 hodiny od začátku rozmrazení. Pokles je nejvíce patrný u celkové a progresivní motility.

Podobný pokles byl zaznamenán i u variant IB+DMSO (1) a DMSO (1), a také u IB+DMSO (2) a DMSO (2). Detailní popis statistických údajů pro tyto varianty je uveden v Tabulce 6 a 7.

Tabulka 5: Základní statistické údaje CASA pro varianty IB+DMSO (0,5) a DMSO (0,5)

Čas	Parametry	Četnost (N)	Průměr (%)	Směrodatná odchylka (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
Ihned po rozmrazení (T1)	MOT	108	30,60	18,01	3,90	72,95
	PROGR	108	14,97	11,63	1,30	43,80
	VAP	108	96,40	17,65	55,82	151,76
	VCL	108	138,33	21,34	82,93	201,52
	VSL	108	66,33	15,79	34,36	99,07
	LIN	108	66,35	8,08	36,79	83,39
	STR	108	48,50	8,08	26,00	68,92
3 hodiny od začátku rozmrazování (T2)	MOT	108	18,74	9,31	2,63	43,33
	PROGR	108	7,45	4,80	0,00	23,38
	VAP	108	88,94	15,95	55,14	135,27
	VCL	108	138,36	23,26	69,90	225,12
	VSL	108	57,13	13,99	28,00	106,33
	LIN	108	63,49	10,51	35,59	91,49
	STR	108	43,29	9,19	21,81	71,84

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP ($\mu\text{m/s}$) – průměrná rychlost trajektorie, VCL ($\mu\text{m/s}$) – křivočará rychlost, VSL ($\mu\text{m/s}$) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímota

Tabulka 6: Základní statistické údaje CASA pro varianty IB+DMSO (1) a DMSO (1)

Čas	Parametry	Četnost (N)	Průměr (%)	Směrodatná odchylka (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
Ihned po rozmrazení (T1)	MOT	108	27,87	14,64	7,23	69,17
	PROGR	108	13,11	8,96	0,00	39,17
	VAP	108	93,69	18,06	52,83	142,04
	VCL	108	132,90	22,40	71,25	190,76
	VSL	108	65,00	16,70	19,42	115,08
	LIN	108	66,70	8,10	31,39	88,04
	STR	108	49,73	9,26	18,60	76,18
3 hodiny od začátku rozmrazování (T2)	MOT	108	22,00	13,57	1,67	78,46
	PROGR	108	8,66	6,13	0,00	32,31
	VAP	108	90,29	14,83	56,00	128,78
	VCL	108	141,01	23,26	69,90	244,91
	VSL	108	57,30	11,55	28,00	89,51
	LIN	108	62,95	8,99	35,49	87,28
	STR	108	43,06	7,91	21,30	71,84

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP ($\mu\text{m/s}$) – průměrná rychlost trajektorie, VCL ($\mu\text{m/s}$) – křivočará rychlost, VSL ($\mu\text{m/s}$) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímost

Tabulka 7: Základní statistické údaje CASA pro varianty IB+DMSO (2) a DMSO (2)

Čas	Parametry	Četnost (N)	Průměr (%)	Směrodatná odchylka (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
Ihned po rozmrazení (T1)	MOT	108	26,98	16,18	3,66	65,14
	PROGR	108	13,14	9,74	0,00	43,96
	VAP	108	95,84	17,53	58,00	141,91
	VCL	108	135,11	23,48	76,71	202,95
	VSL	108	66,48	16,07	34,36	115,31
	LIN	108	68,24	9,34	47,47	94,16
	STR	108	50,99	11,12	28,47	87,82
3 hodiny od začátku rozmrazování (T2)	MOT	108	17,62	10,97	0,00	48,00
	PROGR	108	7,02	6,27	0,00	30,23
	VAP	108	87,26	18,08	0,00	140,62
	VCL	108	134,14	25,27	0,00	204,49
	VSL	108	55,29	14,99	0,00	112,57
	LIN	108	61,87	12,29	0,00	91,73
	STR	108	43,01	10,46	0,00	74,09

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP ($\mu\text{m/s}$) – průměrná rychlost trajektorie, VCL ($\mu\text{m/s}$) – křivočará rychlost, VSL ($\mu\text{m/s}$) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímost

5.2 Popis modelu

5.2.1 Popis modelu pro varianty IB+DMSO (0,5) a DMSO (0,5)

Tabulka 8 uvádí použitý model pro varianty IB+DMSO (0,5) a DMSO (0,5), který ukazuje proměnlivost následujících ukazatelů ihned po rozmrazení: MOT ze 76 %, PROGR ze 78 %, VAP z 60 %, VCL z 43 %, VSL z 58 %, LIN z 31 %, STR z 32 %. U všech ukazatelů byla prokázána statistická významnost u obou sledovaných faktorů ($P < 0,05$).

Proměnlivost ukazatelů v čase 3 hodiny od začátku rozmrazování byla: MOT z 52 %, PROGR z 50 %, VAP z 23 %, VCL z 19 %, VSL z 25 %, LIN z 34 %, STR z 36 %. Většina ukazatelů byla rovněž statisticky průkazná u obou sledovaných faktorů ($P < 0,05$). Nebyl statisticky prokázán vliv látky na kinematické parametry motility VAP, VCL, VSL, LIN, STR ($P > 0,05$).

Tabulka 8: Popis modelu CASA pro varianty IB+DMSO (0,5) a DMSO (0,5)

	Parametry	R2	P - parametr	Odběrový den	Látka
Ihned po rozmrazení (T1)	MOT	0,76	<,0001	<,0001	0,0003
	PROGR	0,78	<,0001	<,0001	0,0063
	VAP	0,60	<,0001	<,0001	<,0001
	VCL	0,43	<,0001	<,0001	0,0123
	VSL	0,58	<,0001	<,0001	<,0001
	LIN	0,31	<,0001	<,0001	0,0201
	STR	0,32	<,0001	0,0002	0,0014
3 hodiny od začátku rozmrazování (T2)	MOT	0,52	<,0001	<,0001	0,0034
	PROGR	0,50	<,0001	<,0001	0,0243
	VAP	0,23	0,0018	0,0008	0,4375
	VCL	0,19	0,0118	0,0049	0,6789
	VSL	0,25	0,0006	0,0002	0,5246
	LIN	0,34	<,0001	<,0001	0,9052
	STR	0,36	<,0001	<,0001	0,9728

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP ($\mu\text{m/s}$) – průměrná rychlost trajektorie, VCL ($\mu\text{m/s}$) – křivočará rychlost, VSL ($\mu\text{m/s}$) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímota

Míra významnosti: ($P < 0,05$) – existuje statistická významnost; ($P > 0,05$) – neexistuje statistická významnost

5.2.2 Popis modelu pro varianty IB+DMSO (1) a DMSO (1)

Detailní popis tohoto modelu je uveden v Tabulce 9. Použitý model ukazoval proměnlivost následujících ukazatelů v čase T1: MOT ze 68 %, PROGR ze 65 %, VAP ze 41 %, VCL z 38 %, VSL ze 40 %, LIN ze 34 %, STR ze 40 %. U většiny ukazatelů byla prokázána statistická významnost obou sledovaných faktorů ($P < 0,05$). Nebyl však prokázán statisticky významný vliv látky na celkovou, progresivní motilitu a VCL ($P > 0,05$).

Proměnlivost ukazatelů v čase T2 byla: MOT ze 60 %, PROGR z 50 %, VAP ze 34 %, VCL z 20 %, VSL z 22 %, LIN z 20 %, STR z 20 %. U většiny parametrů byla prokázána statistická významnost obou sledovaných faktorů ($P < 0,05$). Statisticky významný vliv látky na parametry motility (VAP, VCL, VSL, LIN, STR) nebyl prokázán ($P > 0,05$).

Tabulka 9: Popis modelu CASA pro varianty IB+DMSO (1) a DMSO (1)

Čas	Parametry	R2	P - parametr	Odběrový den	Koncentrace látky
Ihned po rozmrazení (T1)	MOT	0,68	<,0001	<,0001	0,5362
	PROGR	0,65	<,0001	<,0001	0,0816
	VAP	0,41	<,0001	<,0001	0,0264
	VCL	0,38	<,0001	<,0001	0,7879
	VSL	0,40	<,0001	<,0001	<,0001
	LIN	0,34	<,0001	0,0204	<,0001
	STR	0,40	<,0001	0,0313	<,0001
3 hodiny od začátku rozmrazování (T2)	MOT	0,60	<,0001	<,0001	<,0001
	PROGR	0,50	<,0001	<,0001	0,0004
	VAP	0,34	<,0001	<,0001	0,0965
	VCL	0,20	0,0064	0,0078	0,1245
	VSL	0,22	0,0035	0,0017	0,4314
	LIN	0,20	0,0060	0,0018	0,9992
	STR	0,20	0,0071	0,0022	0,9611

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP ($\mu\text{m/s}$) – průměrná rychlost trajektorie, VCL ($\mu\text{m/s}$) – křivočará rychlost, VSL ($\mu\text{m/s}$) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímota

Míra významnosti: ($P < 0,05$) – existuje statistická významnost; ($P > 0,05$) – neexistuje statistická významnost

5.2.3 Popis modelu pro varianty IB+DMSO (2) a DMSO (2)

Detailní popis tohoto modelu je uveden v Tabulce 10. Použitý model ukazoval proměnlivost následujících ukazatelů v čase T1: MOT ze 76 %, PROGR ze 73 %, VAP z 51 %, VCL ze 42 %, VSL ze 46 %, LIN z 31 %, STR z 37 %. U většiny parametrů byla prokázána statistická významnost obou sledovaných faktorů ($P < 0,05$). Statisticky významný vliv látky na celkovou, progresivní motilitu a VCL nebyl prokázán ($P > 0,05$).

Proměnlivost ukazatelů v čase T2 byla: MOT z 63 %, PROGR ze 69 %, VAP z 38 %, VCL z 23 %, VSL z 33 %, LIN z 36 %, STR ze 40 %. Nebyl statisticky prokázán vliv látky na kinematické parametry motility VAP, VCL, VSL, LIN, STR ($P > 0,05$).

Tabulka 10: Popis modelu CASA pro varianty IB+DMSO (2) a DMSO (2)

Čas	Parametry	R2	P - parametr	Odběrový den	Koncentrace látky
Ihned po rozmrazení (T1)	MOT	0,76	<,0001	<,0001	0,0626
	PROGR	0,73	<,0001	<,0001	0,3136
	VAP	0,51	<,0001	<,0001	0,0025
	VCL	0,42	<,0001	<,0001	0,7473
	VSL	0,46	<,0001	<,0001	<,0001
	LIN	0,31	<,0001	0,0403	<,0001
	STR	0,37	<,0001	0,0055	<,0001
3 hodiny od začátku rozmrazování (T2)	MOT	0,67	<,0001	<,0001	0,02
	PROGR	0,69	<,0001	<,0001	0,03
	VAP	0,38	<,0001	<,0001	0,98
	VCL	0,23	0,00	0,00	0,77
	VSL	0,33	<,0001	<,0001	0,93
	LIN	0,36	<,0001	<,0001	0,35
	STR	0,40	<,0001	<,0001	0,20

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP ($\mu\text{m/s}$) – průměrná rychlost trajektorie, VCL ($\mu\text{m/s}$) – křivočará rychlost, VSL ($\mu\text{m/s}$) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímota

Míra významnosti: ($P < 0,05$) – existuje statistická významnost; ($P > 0,05$) – neexistuje statistická významnost

5.3 Vliv odběrového dne na parametry motility

5.3.1 Varianty IB + DMSO (0,5) a DMSO (0,5)

V čase T1 byly shledány významné statistické rozdíly mezi parametry v jednotlivých odběrových dnech. Vliv odběrových dnů na parametry motility u těchto variant popisuje Tabulka 17 v příloze č. 10.1. Ejakulát odebraný 5. odběrový den vykazoval nejlepší hodnoty všech parametrů motility ve srovnání s ostatními odběrovými dny. U celkové ($63,83 \pm 2,66$ %) a progresivní ($37,85 \pm 1,64$ %) motility byl 5. odběrový den prokázán statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) oproti všem ostatním odběrovým dnům.

Nejnižších hodnot (v rozmezí $16,12 \pm 2,66$ až $21,15 \pm 2,66$ %) u celkové a progresivní (v rozmezí $6,87 \pm 1,16$ až $8,20 \pm 1,64$) motility dosahoval ejakulát z 1., 2., 3. a 6. odběrového dne, mezi kterými nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl ($P > 0,05$). Ostatní parametry motility u těchto odběrových dnů byly statisticky srovnatelné s dalšími dny.

V čase T2 vykazoval nejlepší hodnoty u celkové a progresivní motility ejakulát z 5. a 8. odběrového dne. U obou dnů byl shledán statisticky významný rozdíl oproti ostatním odběrovým dnům. Ostatní parametry motility byly srovnatelné s dalšími odběrovými dny. Nejnižších hodnot celkové a progresivní motility dosahoval ejakulát z 2. odběrového dne. Ostatní parametry motility byly srovnatelné s dalšími dny. Tabulka 20 pro detailní popis vlivu odběrového dne v čase T2 je uvedena v příloze č. 10.2.

5.3.2 Varianty IB+DMSO (1) a DMSO (1)

V čase T1 byly opět shledány významné statistické rozdíly mezi parametry v jednotlivých odběrových dnech. Vliv odběrových dnů na parametry motility u těchto variant popisuje Tabulka 18 v příloze 10.1. Ejakulát odebraný 5. odběrový den vykazoval nejlepší hodnoty u celkové a progresivní motility ve srovnání s ostatními odběrovými dny. U celkové motility ($49,29 \pm 2,50$ %) byl 5. den statisticky srovnatelný se 7. dnem. Progresivní motilita ($27,00 \pm 1,60$ %) byla 5. odběrový den srovnatelná se dnem 4. Ve srovnání s ostatními dny byl shledán statisticky významný rozdíl u obou parametrů motility ($P < 0,05$). Ostatní parametry motility u těchto odběrových dnů byly srovnatelné s dalšími odběrovými dny.

Nejnižších hodnot u celkové motility (v rozmezí $11,54 \pm 2,50$ až $20,18 \pm 1,77$ %) dosahoval ejakulát z 1., 2., a 6. odběrového dne, mezi kterými nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl ($P > 0,05$). U progresivní motility dosahoval nejnižších hodnot (v rozmezí $4,88 \pm 1,60$ až $10,10 \pm 1,60$ %) ejakulát z 1., 2., 3. a 6. odběrového dne, mezi kterými nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl. Ostatní parametry motility u těchto odběrových dnů byly statisticky srovnatelné s dalšími dny.

V čase T2 vykazoval nejlepší hodnoty u celkové a progresivní motility ejakulát z 5. a 7. odběrového dne. U obou dnů byl shledán statisticky významný rozdíl oproti ostatním odběrovým dnům. Ostatní parametry motility byly srovnatelné s dalšími odběrovými dny. Nejnižších hodnot celkové a progresivní motility dosahoval ejakulát z 2. odběrového dne. Ostatní parametry motility byly srovnatelné s dalšími dny. Tabulka 21 pro detailní popis vlivu odběrového dne v čase T2 je uvedena v příloze č. 10.2.

5.3.3 Varianty IB+DMSO (2) a DMSO (2)

V čase T1 byly shledány významné statistické rozdíly mezi parametry v jednotlivých odběrových dnech. Vliv odběrových dnů na parametry motility u těchto variant popisuje Tabulka 19 v příloze č. 10.1. Ejakulát odebraný 5. odběrový den vykazoval nejlepší hodnoty u celkové a progresivní motility ve srovnání s ostatními odběrovými dny. U celkové motility ($53,93 \pm 2,38$ %) byl 5. den statisticky srovnatelný se 7. dnem. Progresivní motilita ($30,29 \pm 1,52$ %) byla 5. odběrový den srovnatelná se dnem 4. Ve srovnání s ostatními dny byl shledán statisticky významný rozdíl u obou parametrů motility ($P < 0,05$). Ostatní parametry motility u těchto odběrových dnů byly srovnatelné s dalšími odběrovými dny.

Nejnižších hodnot u celkové motility (v rozmezí $14,44 \pm 1,68$ % až $18,41 \pm 2,38$ %) dosahoval ejakulát z 1., 2., 3., a 6. odběrového dne, mezi kterými nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl ($P > 0,05$). U progresivní motility dosahoval nejnižších hodnot (v rozmezí $5,20 \pm 1,07$ % až $9,95 \pm 1,52$ %) ejakulát z 1., 2., 3. a 6. odběrového dne, mezi kterými nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl. Ostatní parametry motility u těchto odběrových dnů byly statisticky srovnatelné s dalšími dny.

V čase T2 vykazoval nejlepší hodnoty u celkové a progresivní motility ejakulát z 5. odběrového dne. Byl zde shledán statisticky významný rozdíl oproti ostatním odběrovým dnům ($P < 0,05$). Ostatní parametry motility byly srovnatelné s dalšími odběrovými dny. Nejnižších hodnot celkové a progresivní motility dosahoval ejakulát z 1., 2. a 6. odběrového dne mezi kterými nebyl shledán statisticky významný rozdíl ($P > 0,05$). Ostatní parametry motility byly

srovnatelné s dalšími dny. Tabulka 22 pro detailní popis vlivu odběrového dne v čase T2 je uvedena v příloze č. 10.2.

5.4 Vliv látky na parametry motility

5.4.1 Varianty IB+DMSO (0,5) a DMSO (0,5)

Vliv látky na parametry motility v čase T1 u těchto variant popisuje Tabulka 11. V čase T1 měla největší vliv na celkovou a progresivní motilitu varianta DMSO (0,5) (MOT $37,12 \pm 1,55$ %, PROGR $18,08 \pm 0,95$ %). Tento vliv byl statisticky významný ($P < 0,05$) oproti variantě IB + DMSO (0,5) a kontrole. Ostatní parametry motility (VAP, VCL, VSL) však nejvíce pozitivně ovlivnila varianta IB + DMSO (0,5). Ve všech třech případech byl potvrzen statisticky významný rozdíl oproti variantě DMSO (0,5) a kontrole. U parametrů LIN a STR nebyl žádný statisticky významný rozdíl mezi variantami IB + DMSO (0,5) a DMSO (0,5). Byl však prokázán rozdíl mezi variantou IB + DMSO (0,5) a kontrolou u obou parametrů.

V čase T2 byl pozorován největší vliv na celkovou motilitu u varianty IB + DMSO (0,5) a DMSO (0,5). U obou variant byla prokázána statistická významnost oproti kontrole. Na progresivní motilitu měla statisticky významný vliv pouze varianta DMSO (0,5). Nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl ($P > 0,05$) mezi vlivem obou variant na ostatní parametry motility (VAP, VCL, VSL, LIN, STR). Vliv odběrových dnů na parametry motility v čase T2 u těchto variant popisuje Tabulka 12.

Tabulka 11: Vliv látky na parametry motility u variant IB+DMSO (0,5) a DMSO (0,5) v čase T1

Varianta	MOT (%)	PROGR (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)
IB+DMSO (0,5) (n = 36)	$28,26 \pm 1,55$ a	$16,15 \pm 0,95$ ab	$103,57 \pm 1,95$ a	$144,28 \pm 2,84$ a	$74,85 \pm 1,80$ a	$69,32 \pm 1,18$ a	$52,21 \pm 1,17$ a
DMSO (0,5) (n = 36)	$37,12 \pm 1,55$ b	$18,08 \pm 0,95$ a	$93,77 \pm 1,95$ b	$134,64 \pm 2,84$ b	$64,75 \pm 1,80$ b	$66,97 \pm 1,18$ ab	$48,61 \pm 1,17$ ab
Kontrola (n = 36)	$30,43 \pm 1,55$ a	$13,72 \pm 0,95$ b	$89,97 \pm 1,95$ b	$133,19 \pm 2,84$ b	$60,24 \pm 1,80$ b	$64,61 \pm 1,18$ b	$46,08 \pm 1,17$ b

Varianta: IB+DMSO (0,5) = $50 \mu\text{M}$ koncentrace ibudilastu v DMSO o objemu $0,5 \mu\text{l}$; DMSO (0,5) = DMSO o objemu $0,5 \mu\text{l}$ (koncentrace $0,05 \mu\text{M}$)

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP ($\mu\text{m/s}$) – průměrná rychlost trajektorie, VCL ($\mu\text{m/s}$) – křivočará rychlost, VSL ($\mu\text{m/s}$) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímota

a,b = rozdílná písmena ve sloupcích popisují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$)

Tabulka 12: Vliv látky na parametry motility u variant IB+DMSO (0,5) a DMSO (0,5) v čase T2

Varianta	MOT (%)	PROGR (%)	VAP (μm/s)	VCL (μm/s)	VSL (μm/s)	LIN (%)	STR (%)
IB+DMSO (0,5) (n = 36)	20,50 ± 1,14 a	7,70 ± 0,60 a	87,62 ± 2,46 a	138,38 ± 3,68 a	55,58 ± 2,13 a	63,60 ± 1,51 a	42,82 ± 1,29 a
DMSO (0,5) (n = 36)	21,53 ± 1,14 a	8,86 ± 0,60 b	90,31 ± 2,46 a	139,27 ± 3,68 a	58,26 ± 2,13 a	63,42 ± 1,51 a	43,24 ± 1,29 a
Kontrola (n = 36)	16,30 ± 1,14 b	6,53 ± 0,60 a	85,89 ± 2,46 a	134,96 ± 3,68 a	55,10 ± 2,13 a	62,71 ± 1,51 a	42,98 ± 1,29 a

Varianta: IB+DMSO (0,5) = 50 μM koncentrace ibudilastu v DMSO o objemu 0,5 μl; DMSO (0,5) = DMSO o objemu objemu 0,5 μl (koncentrace 0,05 μM)

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP (μm/s) – průměrná rychlost trajektorie, VCL (μm/s) – křivočará rychlost, VSL (μm/s) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímota

a,b = rozdílná písmena ve sloupcích popisují statisticky významné rozdíly (P<0,05)

5.4.2 Varianty IB+DMSO (1) a DMSO (1)

V čase T1 nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl (P > 0,05) mezi vlivem variant na celkovou a progresivní motilitu. Na ostatní parametry motility (VAP, VSL, LIN a STR) měla statisticky průkazný vliv varianta IB+DMSO (1). Vliv látky na parametry motility v čase T1 u těchto variant popisuje Tabulka 13.

Čas T2 ukazuje statisticky významný rozdíl mezi variantami (IB+DMSO (1) a DMSO (1)) a kontrolou u celkové a progresivní motility. U ostatních parametrů motility (VAP, VCL, VSL, LIN STR) nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl mezi oběma variantami a kontrolou. Vliv látky na parametry motility v čase T2 u těchto variant popisuje Tabulka 14.

Tabulka 13: Vliv látky na parametry motility u variant IB+DMSO (1) a DMSO (1) v čase T1

Varianta	MOT (%)	PROGR (%)	VAP (μm/s)	VCL (μm/s)	VSL (μm/s)	LIN (%)	STR (%)
IB+DMSO (1) (n = 36)	28,64 ± 1,46 a	15,41 ± 0,93 a	98,50 ± 2,44 a	133,08 ± 3,10 a	73,18 ± 2,28 a	72,38 ± 1,15 a	56,84 ± 1,26 a
DMSO (1) (n = 36)	27,79 ± 1,46 a	12,54 ± 0,93 a	90,77 ± 2,44 ab	130,99 ± 3,10 a	61,76 ± 2,28 b	64,24 ± 1,15 b	46,64 ± 1,26 b
Kontrola (n = 36)	30,06 ± 1,46 a	13,37 ± 0,93 a	90,00 ± 2,44 b	133,90 ± 3,10 a	59,90 ± 2,28 b	64,25 ± 1,15 b	45,58 ± 1,26 b

Varianta: IB+DMSO (1) = 100 μM koncentrace ibudilastu v DMSO o objemu 1 μl; DMSO (1) = DMSO o objemu objemu 1 μl (koncentrace 0,1 μM)

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP (μm/s) – průměrná rychlost trajektorie, VCL (μm/s) – křivočará rychlost, VSL (μm/s) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímota

a,b = rozdílná písmena ve sloupcích popisují statisticky významné rozdíly (P<0,05)

Tabulka 14: Vliv látky na parametry motility u variant IB+DMSO (1) a DMSO (1) v čase T2

Varianta	MOT (%)	PROGR (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)
IB+DMSO (1) (n = 36)	27,24 \pm 1,50 a	10,92 \pm 0,76 a	91,95 \pm 2,12 a	144,85 \pm 3,65 a	58,26 \pm 1,80 a	62,87 \pm 1,41 a	42,62 \pm 1,24 a
DMSO (1) (n = 36)	24,94 \pm 1,50 a	9,34 \pm 0,76 a	89,16 \pm 2,12 a	139,42 \pm 3,65 a	56,01 \pm 1,80 a	62,95 \pm 1,41 a	42,98 \pm 1,24 a
Kontrola (n = 36)	16,50 \pm 1,50 b	6,55 \pm 0,76 b	85,47 \pm 2,12 a	134,30 \pm 3,65 a	55,06 \pm 1,80 a	62,92 \pm 1,41 a	43,10 \pm 1,24 a

Varianta: IB+DMSO (1) = 100 μM koncentrace ibudilastu v DMSO o objemu 1 μl ; DMSO (1) = DMSO o objemu objemu 1 μl (koncentrace 0,1 μM)

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP ($\mu\text{m/s}$) – průměrná rychlost trajektorie, VCL ($\mu\text{m/s}$) – křivočará rychlost, VSL ($\mu\text{m/s}$) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímota

a,b = rozdílná písmena ve sloupcích popisují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$)

5.4.3 Varianty IB+DMSO (2) a DMSO (2)

V čase T1 nebyl pozorován žádný statisticky významný ($P > 0,05$) rozdíl mezi variantami IB+DMSO (2), DMSO (2) a kontrolou u celkové a progresivní motility. Na ostatní parametry motility (VAP, VSL, LIN, STR) měla statisticky významný vliv varianta IB+DMSO-2. Vliv látky na parametry motility v čase T1 u těchto variant popisuje Tabulka 15.

U parametrů celkové a progresivní motility v čase T2 nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi variantou IB+DMSO (2) a DMSO (2), byla však prokázána statistická významnost mezi DMSO (2) a kontrolou. U ostatních parametrů motility (VAP, VCL, VSL, LIN a STR) nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl mezi oběma variantami a kontrolou. Vliv látky na parametry motility v čase T2 u těchto variant popisuje Tabulka 16.

Tabulka 15: Vliv látky na parametry motility u variant IB+DMSO (2) a DMSO (2) v čase T1

Varianta	MOT (%)	PROGR (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)
IB+DMSO (2) (n = 36)	26,07 \pm 1,39 a	15,22 \pm 0,88 a	101,15 \pm 2,16 a	133,38 \pm 3,14 a	74,96 \pm 2,07 a	74,33 \pm 1,37 a	58,66 \pm 1,55 a
DMSO (2) (n = 36)	28,90 \pm 1,39 a	13,47 \pm 0,88 a	95,34 \pm 2,16 ab	136,30 \pm 3,14 a	65,65 \pm 2,07 b	67,44 \pm 1,37 b	49,62 \pm 1,55 b
Kontrola (n = 36)	30,67 \pm 1,39 a	13,70 \pm 0,88 a	90,39 \pm 2,16 b	133,39 \pm 3,14 a	60,50 \pm 2,07 b	64,52 \pm 1,37 b	46,08 \pm 1,55 b

Varianta: IB+DMSO (2) = 200 μM koncentrace ibudilastu v DMSO o objemu 2 μl ; DMSO (2) = DMSO o objemu objemu 2 μl (koncentrace 0,2 μM)

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP ($\mu\text{m/s}$) – průměrná rychlost trajektorie, VCL ($\mu\text{m/s}$) – křivočará rychlost, VSL ($\mu\text{m/s}$) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímota

a,b = rozdílná písmena ve sloupcích popisují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$)

Tabulka 16: *Vliv látky na parametry motility u variant IB+DMSO (2) a DMSO (2) v čase T2*

Varianta	MOT (%)	PROGR (%)	VAP (μm/s)	VCL (μm/s)	VSL (μm/s)	LIN (%)	STR (%)
IB+DMSO (2) (n = 36)	18,32 ± 1,11 ab	6,85 ± 0,61 ab	85,38 ± 2,50 a	130,30 ± 3,90 a	53,67 ± 2,16 a	62,80 ± 1,72 a	44,44 ± 1,43 a
DMSO (2) (n = 36)	20,96 ± 1,11 a	8,80 ± 0,61 a	85,73 ± 2,50 a	133,07 ± 3,90 a	53,91 ± 2,16 a	59,80 ± 1,72 a	40,85 ± 1,43 a
Kontrola (n = 36)	16,62 ± 1,11 b	6,72 ± 0,61 b	85,01 ± 2,50 a	134,15 ± 3,90 a	54,73 ± 2,16 a	62,92 ± 1,72 a	43,02 ± 1,43 a

Varianta: IB+DMSO (2) = 200 μM koncentrace ibudilastu v DMSO o objemu 2 μl; DMSO (2) = DMSO o objemu objemu 2 μl (koncentrace 0,2 μM)

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP (μm/s) – průměrná rychlost trajektorie, VCL (μm/s) – křivočará rychlost, VSL (μm/s) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímota

a,b = rozdílná písmena ve sloupcích popisují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$)

6 Diskuze

Nenarušená motilita spermií je nezbytná jak pro oplodnění přirozenou cestou, tak u umělé inseminace. Jedná se o jeden z nejdůležitějších parametrů používaných pro hodnocení kvality ejakulátu (Van de Hoek et al. 2022). Již dříve byla špatná pohyblivost spermií spojena s nízkou mírou úspěšnosti oplodnění u člověka (Guzick et al. 2001), ovce (Wierzbowski & Kareta 1993) a dalších druhů zvířat. Villani et al. (2022) ve své studii potvrdil, že se úspěšnost umělé inseminace zvyšuje společně se zlepšením motility spermií.

Cílem mé diplomové práce bylo otestovat jednu z vybraných specifických látek, které již dříve byly použity za účelem zlepšení parametrů motility spermatických buněk. Vybranou látkou byl inhibitor fosfodiesterázy ibudilast, ředěný v DMSO. Jeho účinek jsme testovali na experimentálním modelu beraního ejakulátu. Vliv ibudilastu byl porovnán s vlivem DMSO, který se přidal do vzorků ve třech stejných objemech.

Zjistili jsme, že v čase T1, tedy ihned po rozmrazení, měl DMSO (0,5) statisticky průkazný pozitivní vliv na celkovou a progresivní motilitu (MOT $37,12 \pm 1,55$ %, PROGR $18,08 \pm 0,95$ %) ve srovnání s kontrolou (MOT $30,43 \pm 1,55$ %, PROGR $13,72 \pm 0,95$ %) i s variantou IB+DMSO (0,5), která se rovnala 50 μ M koncentraci ibudilastu (MOT $28,26 \pm 1,55$ %, PROGR $16,15 \pm 0,95$ %). Koncentrace DMSO u této varianty odpovídala 0,05 %. Statisticky významný vliv si tato varianta udržela i po 3 hodinách od začátku rozmrazování. U variant DMSO (1) a DMSO (2), které odpovídaly koncentracím 0,1 a 0,2 %, se statisticky významný vliv na celkovou a progresivní motilitu projevil pouze v čase 3 hodiny od začátku rozmrazování.

DMSO je organické rozpouštědlo, které se používá jako penetrační kryoprotektant a nosič látek, například antioxidantů. Je běžnou součástí procesu chlazení a kryokonzervace spermií (Becerra et al. 2017). Dokáže udržet pohyblivost spermií při teplotě 4 °C až 10 dní (Yoshimoto et al. 2017).

Společně se svým kryoprotektivním účinkem může DMSO působit jako účinný antioxidant při nízkých koncentracích (Bisconti et al. 2022). Hodnoty těchto koncentrací jsou v různých studiích rozdílné. Becerra et al. (2017) potvrdil pozitivní vliv 0,1; 0,5 a 5% DMSO na parametry motility, jako je progresivní motilita a linearita, při inkubaci v 5 °C v různých časových frekvencích. Farshad et al. (2009) ve své studii hodnotil vliv DMSO v koncentracích 1; 1,25 a 1,75 % na parametry motility spermií koz po rozmrazení. Potvrdil zde dobrý vliv 1,75% DMSO na celkovou a progresivní motilitu. Naše výsledky rovněž ukázaly pozitivní zvýšení celkové a progresivní motility, a to v nejnižší použité koncentraci 0,05 %. U ostatních koncentrací (0,1 a 0,2 %) nebyl již zaznamenán výrazný vliv na tyto parametry oproti kontrole. Měření v čase 3 hodiny po začátku rozmrazování však u koncentrací 0,1 a 0,2 % ukázalo významný statistický vliv na zlepšení hodnot celkové a progresivní motility. Vše tedy ukazuje na pozitivní působení kryoprotektivních a antioxidačních vlastností DMSO. Koncentrace od 0,3; 1,5; 2 % může vést až k 5% poklesu hodnot parametrů spermií, tedy i celkové a progresivní motility, vitality, nebo integrity akrozomu. Bisconti et al. (2022) tedy doporučuje používat koncentrace, které jsou nižší než tyto hodnoty.

Mnoho studií poukazuje na negativní dopad DMSO při vyšších koncentracích. Najafi et al. (2017) testoval vliv DMSO v koncentraci 3, 5 a 7 % na kryokonzervované beraní spermie

po rozmrazení. U všech uvedených hodnot byl statisticky potvrzený vliv na vysoké procento mrtvých spermií, ve srovnání se 7% glycerolem a 3, 5, 7% ethylenglykolem.

Lze tedy říct, že DMSO dokáže působit jako účinný antioxidant při nízkých koncentracích, a tím pozitivně ovlivňovat motilitu. Při vysokých koncentracích však působí cytotoxicky.

Účinek ibudilastu na celkovou a progresivní motilitu se v několika studiích lišil. Tardif et al. (2014) v první fázi svého výzkumu testoval na čerstvém spermatu člověka ibudilast v koncentracích 1, 10 a 100 μM . Následně byly vzorky inkubovány při 38 °C cca 20 min. Výsledek ukázal výrazné zvýšení především progresivní motility oproti negativní kontrole (1% DMSO). Vliv na celkovou motilitu ale nebyl statisticky prokázán. Ve druhé fázi se však vzorky se sloučeninami inkubovaly po delší čas (20 až 180 min). Zde byl již prokázán vliv ibudilastu na zvýšení celkové motility v čase inkubace 20, 60 a 90 minut oproti kontrole. Madamidola (2015) uvádí statisticky průkazný pozitivní vliv 100 μM koncentrace ibudilastu pouze na progresivní motilitu při 37 °C ihned po přidání sloučeniny vůči 1% DMSO u čerstvého spermatu kance.

V naší práci jsme se však zabývali vlivem ibudilastu na kryokonzervované beraní spermie. Koncentrace 50 μM pozitivně ovlivnila motilitu v čase měření 3 hodiny od rozmrazení (MOT $20,50 \pm 1,14 \%$) oproti kontrole (MOT $16,30 \pm 1,14 \%$). Tento jev byl pozorován i u 100 a 200 μM . Vliv na progresivní motilitu ve srovnání s kontrolou nebyl statisticky prokázán.

Výsledky dále ukazují dobré působení ibudilastu na kinematické parametry motility a lineární pohyb. Byl zde prokázán statisticky významný pozitivní vliv na zvýšení rychlosti těchto parametrů u všech tří konečných koncentrací (50, 100, 200 μM) v čase T1, tedy ihned po rozmrazení. Měření po 3 hodinách od rozmrazení nepotvrdilo statisticky významný rozdíl mezi těmito třemi variantami ibudilastu a variantami DMSO, i kontrolou.

Pro motilitu spermií je velmi důležitá cyklická dráha proteinkinázy A, která je regulována pomocí cyklického adenosinmonofosfátu-cAMP (Freitas et al. 2017). cAMP aktivuje pohyb a je nezbytný pro hyperaktivaci motility během kapacitace. Jednou ze skupin enzymů, které regulují hladinu cAMP u spermií jsou právě fosfodiesterázy (Buffone et al. 2014). Ibudilast v největší míře inhibuje fosfodiesterázu PDE 4 (Huang et al. 2006), která je jednou z nejdůležitějších pro regulaci motility (Fisch et al. 1998).

Pro zrychlení pohybu spermií, tedy hyperaktivaci, je důležité, aby se hladina cAMP zvýšila. Inhibitory fosfodiesterázy blokuji hydrolýzu cAMP, čímž jeho hladina roste a ovlivňuje rychlost motility spermie. To potvrzují i výsledky naší práce, kdy inhibitor fosfodiesterázy ibudilast průkazně zvýšil hodnoty kinematických parametrů, tzn. průměrnou rychlost dráhy, křivočarou rychlost a lineární rychlost ($\mu\text{m/s}$) u beraních spermií.

U všech tří případů koncentrací (50, 100 a 200 μM) byl v měření ihned po rozmrazení také statisticky prokázán pozitivní vliv na přímou a linearitu dráhy (LIN a STR %) oproti kontrole. Hyperaktivované spermie lze charakterizovat zvýšením parametrů VSL, VAP a VCL, ale procentuálním poklesem přímosti a linearitu dráhy (LIN a STR), protože hyperaktivovaný pohyb je asymetrický. Je nezbytný pro uvolnění spermií z ovidukálního rezervoáru a dosažení oocyty (Shivaji et al. 1995). Z jakého důvodu ibudilast v tomto případě zvýšil procento přímosti a linearitu přesně nevíme, proto je nutné pokračovat v další studii této sloučeniny.

Víme, že spermie musí v samičím reprodukčním ústrojí překonat několik úseků, které hrají důležitou roli v jejich selekci. K tomu je zapotřebí nenarušená motilita. Dále je důležité,

aby spermie neměla porušený akrozom, který je nezbytný pro reakci s oocytem. Některé inhibitory fosfodiesteráz měly negativní vliv na akrozom a v neposlední řadě mohou mít toxický vliv na vyvíjející se embryo (Navas et al. 2017). K ověření korelace mezi plodností a parametry motility lze využít metodu polního testu, při níž je zapotřebí mít k dispozici stádo, které se bude následně inseminovat (Santolaria et al. 2015).

Výsledky naší práce ukázaly velmi dobrý účinek ibudilastu, jako jedné z mnoha sloučenin, které se řadí mezi inhibitory fosfodiesteráz, na parametry motility beraních spermií po kryokonzervaci. Nevíme však, zda mohou mít takto ošetřené inseminační dávky zvýšený fertilizační potenciál. Z tohoto důvodu by bylo vhodné dál testovat vliv této sloučeniny nejen v podmínkách in vitro, ale i in vivo, pomocí polního testu, který zůstává nejspolehlivější metodou pro ověření kvality inseminačních dávek.

7 Závěr

Cílem práce bylo otestovat jednu z vybraných sloučenin za účelem zjištění, zda má pozitivní vliv na parametry motility spermatických buněk. Touto látkou byl ibudilast, inhibitor fosfodiesterázy, který se rozředil v DMSO. Jeho účinek jsme testovali na experimentálním modelu beraního ejakulátu.

Hodnocení parametrů motility probíhalo pomocí systému mCASA ve dvou časech. První měření bylo provedeno ihned po rozmrazení a druhé 3 hodiny od začátku rozmrazování. Účinky koncentrací ibudilastu (50, 100 a 200 μM) byly porovnávány s koncentracemi DMSO (0,05, 0,1 a 0,2 %) a kontrolou (bez přidaných látek).

Pozitivní vliv na celkovou a progresivní motilitu byl zaznamenán u DMSO v koncentraci 0,05 % v obou časech měření. Tento statisticky významný vliv se opakoval i u koncentrací 0,1 a 0,2 % v měření 3 hodiny od začátku rozmrazování. Pozitivní vliv DMSO na motilitu ukazuje účinnou kryoprotektivní a antioxidační ochranu, která se projevuje při nízkých koncentracích.

Kladný účinek na celkovou motilitu byl statisticky průkazný u prvních dvou koncentrací ibudilastu (50 a 100 μM) v čase měření 3 hodiny od začátku rozmrazování.

U všech tří koncentrací (50, 100 a 200 μM) se statisticky prokázal pozitivní vliv na kinematické parametry motility v čase měření ihned po rozmrazení.

Ibudilast měl pozitivní účinek, a to především na kinematické parametry motility, jimiž jsou průměrná rychlost trajektorie, křivočará rychlost a lineární rychlost. Pro zrychlení pohybu spermií je důležité, aby stoupla hladina cAMP. Inhibitory fosfodiesterázy blokuji hydrolýzu cAMP, čímž jeho hladina roste. To potvrzují i výsledky naší práce.

Díky těmto výsledkům máme jisté předpoklady pro zlepšení kvality inseminačních dávek a tím i fertilizační schopnosti, pomocí inhibitoru fosfodiesterázy ibudilast. V budoucnu by bylo však vhodné ověřit tyto předpoklady in vivo, prostřednictvím inseminace a dále testovat tuto látku v in vitro podmínkách.

8 Literatura

Agarwal A, Gupta S, Sharma R. 2016. Hypoosmotic Swelling Test (HOS). Pages 93-96 in Agarwal A, Gupta S, Sharma R, editors. *Andrological Evaluation of Male Infertility*. Springer International Publishing, Cham.

Alahmar AT. 2019. Role of oxidative stress in male infertility: An updated review. *Journal of Human Reproductive Sciences* **12**:4–18.

Alcay S, Gokce E, Toker MB, Onder NT, Ustuner B, Uzabac E, Gul Z, Cavus S. 2016. Freeze-dried egg yolk based extenders containing various antioxidants improve post-thawing quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology* **72**:269-273.

Althouse GC, Rossow K. 2011. The potential risk of infectious disease dissemination via artificial insemination in swine. *Reproduction in Domestic Animals* **46**:64-67.

Alvares CTG, Cruz JF, Ferreira ML. 2015. Técnicas de inseminação artificial e implicações fisiopatológicas em ovinos Maringá. *Pubvet* **9**:220-231.

Amann RP, Waberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* **81**:5–17.

Amaral A, Lourenco B, Marques M, Ramalho-Santos J. 2013. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction* **146**:R163–R174.

Amiridis SG, Cseh S. 2012. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science* **130**:152-161.

Ansari MS, Rakha BA, Andrabi SMH, Akhter S. 2010. Usefulness of powdered and fresh egg yolk for cryopreservation of Zebu bull spermatozoa. *Reproductive Biology* **10**:235-240.

Asimakopoulos B, Tiptiri-Kourpeti A, Metallinou C. 2021. IGF-I and NGF β enhance in vitro progressive motility and vitality of human spermatozoa. *Reproductive Medicine and Biology* **20**:361-367.

Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Australian Journal of Biological Sciences* **4**:581–596.

Avella MA, Dean J. 2011. Fertilization with acrosome-reacted mouse sperm: implications for the site of exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**:19843-19844.

Azgomi ND, et al. 2018. Comparative evaluation of the effects of *Withania somnifera* with pentoxifylline on the sperm parameters in idiopathic male infertility: A triple-blind randomised clinical trial. *Andrologia* (e13041) DOI: 10.1111/a.13041.

Ball GD, Leibfried ML, Lenz RW, Ax RL, Bavister BD, First NL. 1983. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biology of Reproduction* **28**:717-725.

Ball PJH, Peters AR. 2004. *Reproduction in cattle*. Blackwell Publishing, New Jersey.

Bancheva T, Stoycheva S, Dimitrova T, Markov N. 2021. Natural and Artificial Insemination in Sheep – A Review. *Scientific Papers. Series D. Animal Science* **64**:231-240.

- Banihani SA, Abu-Alhayjaa RF, Amarin ZO, Alzoubi KH. 2018. Pentoxifylline increases the level of nitric oxide produced by human spermatozoa. *Andrologia* (e12859) DOI: 10.1111/and.12859.
- Banihani SA, Abu-Alhayjaa RF. 2016. The activity of seminal creatine kinase is increased in the presence of pentoxifylline. *Andrologia* **48**:603–604.
- Baruah CK, Biswas RK, Deka BC, Borgohain BN. 2003. Effect of glycerol equilibration periods on quality of frozen semen in Beetal x Assam local crossbred goats. *Indian Veterinary Journal of Animal Reproduction* **24**:69-70.
- Baruselli PS, Ferreira RM, Sá Filho MF, Bó GA. 2018. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. *Animal* **12**:s45-s52.
- Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, Atherton PJ. 2017. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* **27**:4-25.
- Becerra VAB, Neves BP, Brito MF, Auler PA, de Almeida J, Henry M. 2017. Effect of dimethyl sulfoxide on buffalo sperm motility refrigerated at 5 C. *Review Brasileiro Reprodução Animal* **41**:351.
- Ben SA, Ali MB, Barkallah M, Traore AI, Boudawara T, Allouche N, Gdoura R. 2013. Antioxidant properties of *Pelargonium graveolens* L'Her essential oil on the reproductive damage induced by deltamethrin in mice as compared to alpha-tocopherol. *Lipids in health and disease* **12**:1-9.
- Benberkane A, Khellouf A, Benhenia K, Fatmi S, Iguer-Ouada M. 2019. *Rosmarinus officinalis* essential oil preloaded in β -cyclodextrin: Effect on ram spermatozoa motility, membrane integrity and oxidative status during 4 C storage. *CryoLetters* **40**:219-225.
- Beran J, Stádník L, Doležalová M, Toušová R. 2014. Zlepšení kvality inseminačních dávek býků výběrem vhodného ředidla ejakulátu. *Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha*.
- Bernard P, et al. 2008. Application of drug repositioning strategy to TOFISOPAM. *Current medicinal chemistry* **15**:3196-3203.
- Bhakta HH, Refai FH, Avella MA. 2019. The molecular mechanisms mediating mammalian fertilization. *Development* **146**:1-13.
- Bisconti M, Grosjean P, Arcolia V, Simon JF, Hennebert E. 2022. Influence of two widely used solvents, ethanol and dimethyl sulfoxide, on human sperm parameters. *International Journal of Molecular Sciences* (505) DOI: 10.3390/ijms24010505.
- Bondarev AD, Attwood MM, Jonsson J, Chubarev VN, Tarasov VV, Liu W, Schioth HB. 2022. Recent developments of phosphodiesterase inhibitors: Clinical trials, emerging indications and novel molecules. *Frontiers in pharmacology* **13**:1057083.
- Bouckenooghe T, Remacle C, Reusens B. 2006. Is taurine a functional nutrient?. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* **9**:728-733.

- Brannigan R, Lipshultz L. 2008. Sperm transport and capacitation. *The Global Library of Women's Medicine* (10316) DOI: 10.3843/GLOWM.10316.
- Bucci D, Spinaci M, Galeati G, Tamanini C. 2019. Different approaches for assessing sperm function. *Animal Reproduction* **16**:72-80.
- Buffone MG, Wertheimer EV, Visconti PE, Krapf D. 2014. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochimica et Biophysica Acta* **1842**:2610–2620.
- Bukowska D, Kempisty B, Zaorska K, Antosik P, Pawłowska J, Nowicki M. 2014. Molecular aspects of sperm-oocyte activation during mammalian fertilization. *Medycyna Weterynaryjna* **70**:269-273.
- Casali R, Pinczak A, Cuadro F, Guillen-Muñoz JM, Mezzalana A, Menchaca A. 2017. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. *Theriogenology* **103**:30-35.
- Cross NL. 1998. Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. *Biology of Reproduction* **59**:7-11.
- Cueto M, Gibbons A. 2010. Conservación seminal e inseminación artificial en ovinos. Pages 61-77 in Mueller JP, Cueto MI, editors. *Actualización en Producción Ovina*. Impreso en Imprenta Feher, Río Negro, Argentina.
- Cunha ATM, Carvalho JO, Dode MAN. 2015. Techniques for sperm evaluation using fluorescent probes. *Semina: Ciênc Agrár* **36**:4365-4376.
- Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Trevino CL. 2011. Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiological Reviews* **91**:1305–1355.
- David I, Kohnke P, Fehrenbach J, Simoes AL, Debreuve E, Descombes X, Plouraboue F, Degond P, Druart, X. 2018. New objective measurements of semen wave motion are associated with fertility in sheep. *Reproduction, Fertility and Development* **30**:889-896.
- David I, Kohnke P, Lagriffoul G, Praud O, Plouraboue F, Degond P, Druart X. 2015. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Animal Reproduction Science* **161**:75–81.
- De Graaf SP. 2010. Reproduction. Pages 189-222 in Cottle DJ, editor. *International Sheep and Wool Handbook*. Nottingham University Press, Nottingham.
- de Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM. 2003. Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biology of Reproduction* **68**:2122-2134.
- Decourtye L, et al. 2017. IGF-1 induces GHRH neuronal axon elongation during early postnatal life in mice. *PLoS One* (e0170083) DOI: 10.1371/journal.pone.0170083.
- Del Olmo E, et al. 2013. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Animal Reproduction Science* **138**:102–109.
- Deleeuw FE, Deleeuw AM, Dendaas JHG, Colenbrander B, Verkleij AJ. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* **30**:32-44.

- Donate-Correa J, et al. 2019. Pentoxifylline for renal protection in diabetic kidney disease. A model of old drugs for New Horizons. *Journal of Clinical Medicine* **8**:287.
- Dong YX, et al. 2019. Hybrid molecules of scutellarein and tetramethylpyrazine's active metabolites for ischemic stroke. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (126608) DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.08.012.
- Dovenski T, Trojancanec P, Atanasov B, Nikolovski M, Petkov V, Popovska-Percinic F, Grizelj J, Vince, S. 2022. Novelties in Ovine Assisted Reproductive Technologies—A Review. *Macedonian Veterinary Review* **45**:109-125.
- Druart X, Cognié J, Baril G, Clément F, Dacheux J-L, Gatti J-L. 2009. In vivo imaging of in situ motility of fresh and liquid stored ram spermatozoa in the ewe genital tract. *Reproduction* **138**:45–53.
- Dunlap KA. 2018. Sheep. *Encyclopedia of Reproduction* (Second Edition). Elsevier, Amsterdam.
- Dutra TCE, da Silva DS, Lazzari VM, Stein A, Filho DC. 2018. Activation of the mobility of human spermatozoa with the use of pentoxifylline: Effects on spermal DNA. *Human Reproduction Archives* **32**:1–7.
- Ebner T, Shebl O, Mayer RB, Moser M, Costamoling W, Oppelt P. 2014. Healthy live birth using theophylline in a case of retrograde ejaculation and absolute asthenozoospermia. *Fertility and Sterility* **101**:340–343.
- Ehling C, Rath D, Struckmann C, Frenzel A, Schindler L, Niemann H. 2006. Utilization of frozen-thawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in Scrapie susceptible sheep breeds. *Theriogenology* **66**:2160-2164.
- El-Shahat KH, Taysser MI, Badr MR, Zaki KA. 2017. Effects of penicillamine, hypotaurine, and epinephrine on motility, hyperactivity, acrosome reaction of fresh ram sperm. *Asian Pacific Journal of Reproduction* **6**:283-288.
- Esmailkhanian S, Asadzadeh N, Masoudi R. 2021. Flow cytometry study of post-thawed bulk spermatozoa: Mito-TEMPO improves cryopreservation performance by controlling apoptosis rate, DNA fragmentation and ROS production. *Cryobiology* **103**:147-149.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. 2002. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology* **23**:25-43.
- Fahrenkamp E, Algarra B, Jovine L. 2020. Mammalian egg coat modifications and the block to polyspermy. *Molecular Reproduction and Development* **87**:326-340.
- Fair S, Meade KG, Reynaud K, Druart X, de Graaf SP. 2019. The biological mechanisms regulating sperm selection by the ovine cervix. *Reproduction* **158**:R1–R13.
- Farshad A, Khalili B, Fazeli P. 2009. The Effect of Different Concentrations of Glycerol and DMSO on Viability of Markhoz Goat Spermatozoa during Different Freezing Temperatures Steps. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **12**:239–245.

Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. 2003. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of Andrology* **24**:59-66.

Fisch JD, Behr B, Conti M. 1998. Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: Differential activation by typespecific phosphodiesterase inhibitors. *Human Reproduction* **13**:1248–1254.

Flesch FM, Brouwers JFHM, Nievelstein PFEM, Verkleij AJ, van Golde LMG, Colenbrander B, Gadella BM. 2001. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *Journal of Cell Sciences* **114**:3543-3555.

Ford WC, Rees JM, McLaughlin EA, Ling L, Hull MG. 1994. Pentoxifylline acts synergistically with A23187 to increase the penetration of zona-free hamster oocytes by cryopreserved human spermatozoa. *International Journal of Andrology* **17**:199–204.

Freitas MJ, Vijayaraghavan S, Fardilha M. 2017 Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biology of Reproduction* **96**:2–12.

Galano A, Tan DX, Reiter RJ. 2011. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination, *Journal of Pineal Research* **51**:1–16.

Gamčík P, Kozumplík J. 1984. Umelá inseminácia a andrológia hospodárskych zvierat. *Príroda*, Bratislava.

Glander HJ, Kratzsch J, Weisbrich C, Birkenmeier G. 1996. Insulin-like growth factor-I and α 2-macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. *Human Reproduction* **11**:2454-2460.

Gomez-Torres MJ, Medrano L, Romero A, Fernandez-Colom PJ, Aizpurúa J. 2017. Effectiveness of human spermatozoa biomarkers as indicators of structural damage during cryopreservation. *Cryobiology* **78**:90–94.

Gruber FS, Johnston Z C, Norcross NR, Georgiou I, Wilson C, Read KD, Gilbert IH, Swedlow JR, da Silva SM, Barratt CL. 2022. Compounds enhancing human sperm motility identified using a high-throughput phenotypic screening platform. *Human Reproduction* **37**:466-475.

Gruber FS, Johnston ZC, Barratt CLR, Andrews PD. 2020 A phenotypic screening platform utilising human spermatozoa identifies compounds with contraceptive activity (e5173) DOI: 10.7554/eLife.51739.

Gupta SK, Bhandari B, Shrestha A, Biswal BK, Palaniappan C, Malhotra SS, Gupta N. 2021. Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell Tissue Research* **349**:665-678.

Guzick DS, et al. 2001. Sperm Morphology, Motility, and Concentration in Fertile and Infertile Men. *New England Journal of Medicine* **345**:1388–1393.

- Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC, Sacco AG. 1994. Cloning and characterization of zona pellucida genes cDNA from variety of mammals species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Sequence* **4**:361-393.
- Hattori H, Nakajo Y, Ito C, Toyama Y, Toshimori K, Kyono K. 2011. Birth of a healthy infant after intracytoplasmic sperm injection using pentoxifylline-activated sperm from a patient with Kartagener's syndrome. *Fertility and Sterility* (2431.e9–e11) DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.03.074.
- Hendeles L, Massanari M, Weinberger M. 1985. Update on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of theophylline. *Chest* **88**:103S–111S.
- Henricks DM, Kouba AJ, Lackey BR, Boone WR, Gray SL. 1998. Identification of insulin-like growth factor i in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. *Biology of Reproduction* **59**:330-337.
- Hoodbhoy T, Dean J. 2004. Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction* **127**:417-22.
- Hristova T. 2007. Opportunities for controlling the cyclic activity in sheep [Ph.D. Thesis]. Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan, Bulgaria.
- Huang Z, et al. 2006. Preferential inhibition of human phosphodiesterase 4 by ibudilast. *Life sciences* **78**:2663-2668.
- Hudson LD, Tyler ML, Petty TL. 1973. Oral aminophylline and dikydroxypropyl theophylline in reversible obstructive airway disease: A single-dose, double-blind, crossover comparison. *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental* **15**:367–372.
- Champion ZJ, Vickers MH, Gravance CG, Breier BH, Casey PJ. 2002 Growth hormone or insulin-like growth factor-I extends longevity of equine spermatozoa in vitro. *Theriogenology* **57**:1793-1800.
- Chang MC. 1959. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature* **184**:466–467.
- Ibis E, Hayme S, Baysal E, Gul N, Ozkavukcu S. 2021. Efficacy and safety of papaverine as an in vitro motility enhancer on human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **38**:1523-1537.
- Ickowicz D, Finkelstein M, Breitbart H. 2012. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian Journal of Andrology* **14**:816-821.
- Jaworska – Adamu J, Krawczyk A, Rycerz K. 2022. Osłonka przejrzysta w procesie zapłodnienia i rozwoju zarodkowym ssaka. *Med. Weter* **78**:121-125.
- Jilani TN, Preuss CV, Sharma S. 2021. Theophylline. StatPearls Publishing. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519024/> (accessed Jnuary 2024).
- Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohash N. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**:4892-4896.

- Jin W, Arai KY, Shimizu K, Itoh M, Watanabe G, Taya K. 2006. Cellular localization of NGF and its receptors trkA and p75LNGFR in male reproductive organs of the Japanese monkey, *macaca fuscata fuscata*. *Endocrine* **29**:155-160.
- Jin W, Tanaka A, Watanabe G, Matsuda H, Taya K. 2010. Effect of NGF on the motility and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa in vitro. *Journal of Reproduction and Development* **56**:437-443.
- Jo JW, Jee BC, Suh CS, Kim SH. 2014. Addition of Lysophosphatidic Acid to Mouse Oocyte Maturation Media Can Enhance Fertilization and Developmental Competence. *Human Reproduction* **29**:234–241.
- Journey JD, Bentley TP. 2021. Theophylline toxicity. StatPearls Publishing. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532962/> (accessed January 2024).
- Kos V, Andrlíková M, Ledabylová A, Marková B, Koudelová A, Novotný R, Vránová L, Čech S. 2019. Příručka pro praktická cvičení z andrologie. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno.
- Lacham-Kaplan O, Trounson AO. 1994. Embryo development capacity of oocytes fertilized by immature sperm and sperm treated with motility stimulants. *Reproduction, Fertility, and Development* **6**:113–116.
- Lefèvre L, Jha KN, de Lamirande E, Visconti PE, Gagnon C. 2002. Activation of protein kinase a during human sperm capacitation and acrosome reaction. *Journal of Andrology* **23**:709–716.
- Lehti MS, Sironen A. 2017. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biology of Reproduction* **97**:522–536.
- Leibfried ML, Bavister BD. 1982. Effects of epinephrine and hypotaurine on in-vitro fertilization in the golden hamster. *Reproduction* **66**:87-93.
- Leung ETY, Lee BKM, Lee ChL, Tian X, Lam KKW, Li RHW, Ng EHY, Yeung WSB, Ou JP, Chiu PCN. 2023. The role of spermatozoa-zona pellucida interaction in selecting fertilization-competent spermatozoa in humans. *Frontiers in Endocrinology* **14**:728.
- Li C, Sun Y, Yi K, Ma Y, Sun Y, Zhang W, Zhou X. 2010. Detection of nerve growth factor (NGF) and its specific receptor (TrkA) in ejaculated bovine sperm, and the effects of NGF on sperm function. *Theriogenology* **74**:1615-1622.
- Li Y, Jin L, Li Y, Qian J, Wang Z, Zheng X, Huang H, Zhou, Y. 2022. Lysophosphatidic acid improves human sperm motility by enhancing glycolysis and activating L-type calcium channels. *Frontiers in Endocrinology* (896558) DOI: 10.3389/fendo.2022.896558.
- Lin K, et al. 2015. Nerve growth factor promotes human sperm motility in vitro by increasing the movement distance and the number of a grade spermatozoa. *Andrologia* **47**:1041-1046.
- Liu DY, Garrett C, Baker HW. 2003. Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Human Reproduction* **18**:2382–2389.
- Liu W, Ott T. 2018. Sheep overview. *Encyclopedia of Reproduction*. Elsevier, Amsterdam.
- Long L, Wang J, Lu X, Xu Y, Zheng S, Luo C, Li Y. 2015. Protective effects of scutellarin on type II diabetes mellitus-induced testicular damages related to reactive oxygen species/Bcl-

2/Bax and reactive oxygen species/microcirculation/staving pathway in diabetic rat. *Journal Diabetes Research* (252530) DOI: 10.1155/2015/252530.

Louda F, Čeřovský J, Jeřková A, Stádník L. 2001. Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.

Loughlin KR, Agarwal A. 1992. Use of theophylline to enhance sperm function. *Archives of Andrology* **28**:99–103.

Lu Y, Su H, Zhang J, Wang Y, Li H. 2022. Treatment of poor sperm quality and erectile dysfunction with oral pentoxifylline: A systematic review. *Frontiers in Pharmacology* (789787) DOI: 10.3389/fphar.2021.789787.

Madamidola OA. 2015. Role of second generation phosphodiesterase inhibitors on mammalian sperm motility [PhD. Thesis]. School of Science, Engineering and Technology University of Abertay, Dundee.

Maddison JW, Rickard JP, Mooney E, Bernecic NC, Soleilhavoup C, Tsikis G, Druart X, Leahy T, de Graaf SP. 2016. Oestrus synchronisation and superovulation alter the production and biochemical constituents of ovine cervicovaginal mucus. *Animal Reproduction Science* **172**:114–122.

Mahaldashtian M, Khalili MA, Nottola SA, Woodward B, Macchiarelli G, Miglietta S. 2021. Does in vitro application of pentoxifylline have beneficial effects in assisted male reproduction?. *Andrologia* (e13722) DOI: 10.1111/and.13722.

Mahé C, Zlotkowska AM, Reynaud K, Tsikis G, Mermillod P, Druart X, Schoen J, Saint-Dizier M. 2021. Sperm migration, selection, survival, and fertilizing ability in the mammalian oviduct. *Biology of Reproduction* **105**:317-331.

Marechal L, Guillemette C, Goupil S, Blondin P, Leclerc P, Richard FJ. 2017. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in human spermatozoa and seminal fluid: Presence of an active PDE10A in human spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta. General Subjects* **1861**:147–156.

Marvan F, Hampl A, Hložánková E, Kresan J, Massanyi L, Vernerová E. 1992. Morfologie hospodářských zvířat. Brázda, s.r.o., Praha.

Masood S, Rehman W, Khan Z, Arshad H, Begum S, Perveen A. 2018. Structure breaking/making property of acefylline piperazine in aqueous, aqueous methanol, and aqueous ethylene glycol systems. *Journal of Structural Chemistry* **59**:1148–1157.

McKinnon KM. 2018. Flow cytometry: an overview. *Current protocols in immunology* **120**:5-1. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology* **57**:327–344.

Meizel S. 1985. Molecules that initiate or help stimulates the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *American Journal of Anatomy* **174**:285-302.

Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. 2012. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: A retrospective cohort study. *Fertility and Sterility* **98**:1481-1489.

- Milerski M. 2019. Metodika uchovávání genetického zdroje zvířat. Ministerstvo zemědělství, Praha. Available from <https://genetickezdroje.cz/wp-content/uploads/2019/11/Metodika-uchovani-GZ-OV.pdf> (accessed April 2024).
- Mocé E, Fajardo AJ, Graham JK. 2016. Human sperm cryopreservation. *European Medicinal Journal* **1**:86-91.
- Mocé E, Graham JK. 2008. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal reproduction science* **105**:104-118.
- Mooradian AD, Morley JE, Kaiser FE, Davis SS, Viosca SP, Korenman SC. 1989. Biweekly intracavernous administration of papaverine for erectile dysfunction. *Western Journal of Medicine* **151**:515–517.
- Moreno RD. 2022. Human globozoospermia-related genes and their role in acrosome biogenesis. *WIREs Mechanisms of Disease* (e1589) DOI: 10.1002/wsbm.1589.
- Munro R, Capell HA. 1997. Penicillamine. *British journal of rheumatology* **36**:104-109.
- Mutalik S, Salian SR, Avadhani K, Menon J, Joshi H, Hegde AR, Kumar P, Kalthur G, Adiga SK. 2014. Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **60**:183-188.
- Nabi A, Khalili MA, Talebi AR, Mangoli E, Yari N, Nottola SA, Miglietta S, Taheri F. 2017. In-vitro application of Pentoxifylline preserved ultrastructure of spermatozoa after vitrification in Asthenozoospermic patients. *Urology Journal* **14**:4038–4043.
- Najafi A, Daghigh-Kia H, Dodaran HV, Mehdipour M, Alvarez-Rodriguez M. 2017. Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithin-based extenders in ram sperm cryopreservation. *Animal Reproduction Science* **177**:35–41.
- Nasimi DAR, Nazemiyeh H, Sadeghi Bazargani H, Fazljou SMB, Nejatbakhsh F, Moini Jazani A, Ahmadi AsrBadr Y, Zomorodi A. 2018. Comparative Evaluation of the Effects of Withania Somnifera with Pentoxifylline on the Sperm Parameters in Idiopathic Male Infertility: A Triple-Blind Randomised Clinical Trial. *Andrologia* (e13041) DOI: 10.1111/and.13041.
- Nassar A, Mahony M, Blackmore P, Morshedi M, Ozgur K, Oehninger S. 1998. Increase of intracellular calcium is not a cause of pentoxifylline-induced hyperactivated motility or acrosome reaction in human sperm. *Fertility and Sterility* **69**:748–754.
- Nassar A, Morshedi M, Mahony M, Srisombut C, Lin MH, Oehninger S. 1999. Pentoxifylline stimulates various sperm motion parameters and cervical mucus penetrability in patients with asthenozoospermia. *Andrologia* **31**:9–15.
- Navas P, et al. 2017. Obstetric and neo-natal outcomes of ICSI cycles using pentoxifylline to identify viable spermatozoa in patients with immotile spermatozoa. *Reproductive BioMedicine* **34**:414–421.
- Nazari P, Farshad A, Hosseini Y. 2022. Protective effects of trehalose and pentoxifylline on goat sperm exposed to chilling-freezing process. *Biopreservation and Biobanking* **20**:540-550.

- Negri P, Grechi E, Tomasi A, Fabbri E, Capuzzo A. 1996. Effectiveness of pentoxifylline in semen preparation for intrauterine insemination. *Human Reproduction* **11**:1236–1239.
- Nikolovski M, Dovenska M, Ilievska K, Adamov N, Atanasov, Radeski M, Kirovski D, Petkov V, Dovenski T. 2019. Homologous seminal plasma and glutathione promote precapacitation motility and structural stability of cryopreserved ram spermatozoa. *Macedonian Veterinari Review* **42**:169-179.
- O'connell M, McClure N, Lewis S. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction* **17**:704–709.
- Page P, Hamer K. 2017. *Sheep Keeping*. 5m Publishing, Sheffield.
- Pollard T, Earnshaw W, Lippincot-Schwartz J. 2017. *Cell Biology*. Elsevier, Amsterdam.
- Povolná L. 2017. Být jen „cool“ nestačí, aneb jak správně zacházet s inseminačními dávkami. Agropress.cz, Praha. Available from <https://www.agropress.cz/byt-jen-cool-nestaci-aneb-jak-spravne-zachazet-s-inseminacnimi-davkami/> (accessed February 2024).
- Prasad SV, Skinner SM, Carino C, Wang N, Cartwright J, Dunbar BS. 2000. Structure and function of the proteins of the mammalian zona pellucida. *Cells Tissues Organs* **166**:148-164.
- Puche JE, Castilla-Cortázar I. 2012. Human conditions of insulinlike growth factor-I (IGF-I) deficiency. *Journal of Translational Medicine* **10**:1-29.
- Qi H, Moran MM, Navarro B, Chong JA, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Kirichok Y, Ramsey IS, Quill TA, David E. 2007. Clapham All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**:1219-1223.
- Rahimizadeh P, Rezaei Topraggaleh T, Bucak MN, Ziarati N, Hasirbaf A, Taher-Mofrad SMJ, Maroufizadeh S, Shahverdi, A. 2021. Effect of Bovine Serum Albumin Supplementation in Tris-Soybean Lecithin-Based Extender on Quality of Chilled Ram Epididymal Spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking* **19**:33-40.
- Randy A. 2021. Rozdíl mezi Zona pellucida a Corona radiata. *Strephonsays*. Available from <https://cs.strephonsays.com/zona-pellucida-and-corona-radiata-12878> (accessed April 2023).
- Ranjan R, Goel AK, Ramachandran N, Kharche SD, Jindal SK. 2015. Effect of egg yolk levels and equilibration periods on freezability of Jamunapari buck semen. *Indian Journal of Small Ruminants* **21**:32–36.
- Redgrove KA, Anderson AL, Dun MD, McLaughlin EA, O'Bryan MK, Aitken RJ, Nixon B. 2011. Involvement of multimeric protein complexes in mediating the capacitationdependent binding of human spermatozoa to homologous zonae pellucidae. *Developmental Biology* **356**:460–474.
- Rekha A, Zohara BF, Bari FY, Alam MGS. 2016. Comparisons of commercial triladyl and locally manufactured extenders for the chilling of semen and their effects on pregnancy rates after transcervical AI in Bangladeshi Indigenus (*Ovis aries*) sheep. *Animal Reproduction* **13**:735–742.

- Richter W, Dettmer D, Glander H. 1999. Detection of mRNA transcripts of cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes in ejaculated human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* **5**:732–736.
- Robayo I, Montenegro V, Valdés C, Cox J. 2008. CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reproduction in Domestic Animals* **43**:393-399.
- Rolan P, Hutchinson MR, Johnson KW. 2009. Ibudilast: a review of its pharmacology, efficacy and safety in respiratory and neurological disease. *Expert opinion on pharmacotherapy* **10**:2897-2904.
- Rosato MP, Iaffaldano N. 2013. Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology* **79**:508-516.
- Sadler TW, Langman J. 2010. *Langman's medical embryology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Saeednia S, Shabani Nashtaei M, Bahadoran H, Aleyasin A, Amidi F. 2016. Effect of nerve growth factor on sperm quality in asthenozoospermic men during cryopreservation. *Reproductive Biology and Endocrinology* **14**:1-8.
- Saha A, Asaduzzaman M, Bari FY. 2022. Cryopreservation techniques for ram sperm. *Veterinary Medicine International (7378379)* DOI 10.1155/2022/7378379.
- Sahoo B, Gupta MK. 2023. Effect of arginine-induced motility and capacitation on RNA population in goat spermatozoa. *Veterinary Research Communications* **1**:1-18.
- Saint-Dizier M, Mahÿe C, Reynaud K, Tsikis G, Mermillod P, Druar X. 2020. Sperm interactions with the female reproductive tract: A key for successful fertilization in mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology (110956)* DOI: 10.1016/j.mce.2020.110956.
- Sakkas D, Leppens-Luisier G, Lucas H, Chardonens D, Campana A, Franken DR, Urner F. 2003. Localization of tyrosine phosphorylated proteins in human sperm and relation to capacitation and zona pellucida binding. *Biology of Reproduction* **68**:1463–1469.
- Sakkas D, Ramalingam M, Garrido N, Barratt CL. 2015. Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes?. *Human Reproduction Update* **21**:711–726.
- Salian SR, et al. 2019. Supplementation of biotin to sperm preparation medium enhances fertilizing ability of spermatozoa and improves preimplantation embryo development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **36**:255–266.
- Santolaria P, Vicente-Fiel S, Palacín I, Fantova E, Blasco ME, Silvestre MA, Yániz JL. 2015. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Animal reproduction science* **163**:82-88.

- Satish M, et al. 2021. Structure-based redesigning of pentoxifylline analogs against selective phosphodiesterases to modulate sperm functional competence for assisted reproductive technologies. *Scientific Reports* (12293) DOI: 10.1038/s41598-021-91636-y.
- Seifi-Jamadi A, Ahmad E, Ansari M, Kohram H. 2017. Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen. *Cryobiology* **75**:15-20.
- Selvaraju S, Reddy IJ, Nandi S, Rao SBN, Ravindra JP. 2009. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake in vitro. *Animal Reproduction Science* **113**:60-70.
- Selvig K. 1981. Pharmacokinetics of proxiphylline in adults after intravenous and oral administration. *European Journal of Clinical Pharmacology* **19**:149–155.
- Shaban SF. 2007. Male infertility overview: assessment, diagnosis and treatment. IVF. com, Atlanta.
- Shamsi MB, Imam SN, Dada R. 2011. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **28**:1073-1085.
- Sharma A, Sood P. 2020. Caprine semen cryopreservation and the factors affecting it: an overview. *Veterinary Sciences: Research and Reviews* **6**:46–57.
- Sharma V. 2011. Sperm storage for cancer patients in the UK: A review of current practice. *Human Reproduction* **26**:2935–2943.
- Shin TE, et al. 2020. Motility enhancement of human spermatozoa using electrical stimulation in the nano-Ampere range with enzymatic biofuel cells. *Plos one* (e0228097) DOI: 10.1371/journal.pone.0228097.
- Shivaji S, Peedicayil J, Girija Devi L. 1995. Analysis of the motility parameters of in vitro hyperactivated hamster spermatozoa. *Molecular reproduction and development* **42**:233-247.
- Shokry DM, Abd Eldaim MA, Badr MR, Khalifa HK, Orabi SH, Hassan AM, Dohreig R. 2021. Enhancement impact of *Moringa oleifera* leaves extract–base extender on cryopreservation and fertilization of Barki ram sperms: comparative study with vitamin E and selenium combination. *Italian Journal of Animal Science* **20**:1175-1186.
- Schoenian S. 2016. A beginner's guide to raising sheep. *Sheep* 201. Available from <https://www.sheep101.info/201/> (accessed February 2024).
- Singh NP, Muller CH, Berger RE. 2003. Effects of age on DN A double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and sterility* **80**:1420-30.
- Skliarov P, Pérez C, Petrusa V, Fedorenko S, Bilyi D. 2021. Induction and synchronization of oestrus in sheep and goats. *Journal of Central European Agriculture* **22**:39-53.
- Smith JF, Parr J, Murray GR, Clarke AG, McDonald RM, Duganzich DM. 1998. Relationship between laboratory measures of ram sperm competence and field fertility. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* **58**:181-185.

Srivastava S, Desai P, Coutinho E, Govil G. 2006. Mechanism of action of L-arginine on the vitality of spermatozoa is primarily through increased biosynthesis of nitric oxide. *Biology of Reproduction* **74**:954–958.

Sun Z, Xu W, Yuan Y, Song D, Chen H, Luo T, Chen Y. 2022. Scutellarein stimulates human sperm function by increasing the levels of intracellular calcium and tyrosine phosphorylation. *Andrologia* (e14625) DOI: 10.1111/and.14625.

Susko-Parrish JL, Wheeler MB, Ax RL, First NL, Parrish JJ. 1990. The effect of penicillamine, hypotaurine, epinephrine, and sodium metabisulfite on bovine in vitro fertilization. *Theriogenology* **33**:333-335.

Swain JE, Smith GD. 2010. Cryoprotectants. Pages 24-38 in Chian RC, Quinn P, editors. *Fertility cryopreservation*. Cambridge University Press, New York.

Tabarez A, García W, Palomo MJ. 2020. Soy lecithin as a potential alternative to powdered egg yolk for buck sperm cryopreservation does not protect them from mitochondrial damage. *Animal reproduction science* **217**:106473.

Tanaka M, Kishi Y, Takanezawa Y, Kakehi Y, Aoki J, Arai H. 2004. Prostatic Acid Phosphatase Degrades Lysophosphatidic Acid in Seminal Plasma. *FEBS Letters* **571**:197–204.

Tardif S, Madamidola OA, Brown SG, Frame L, Lefievre L, Wyatt PG, Barratt ChLR, Martins Da Silva SJ. 2014. Clinically relevant enhancement of human sperm motility using compounds with reported phosphodiesterase inhibitor activity. *Human Reproduction* **29**:2123-2135.

Terriou P, et al. 2015. Papaverine as a replacement for pentoxifylline to select thawed testicular or epididymal spermatozoa before ICSI. *Gynecologie Obstetrique Fertilité* **43**:786–90.

Thun R, Hurtado M, Janett F. 2002. Comparison of Biociphos-Plus (R) and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* **57**:1087-1094.

Touré A, Martinez G, Kherraf ZE, Cazin C, Beurois J, Arnoult C, Ray PF, Coutton C. 2020. The genetic architecture of morphological abnormalities of the sperm tail. *Human Genetics* **140**:1–20.

Tournaye H, Devroey P, Camus M, Van der Linden M, Janssens R, Van Steirteghem A. 1995. Use of pentoxifylline in assisted reproductive technology. *Human Reproduction* **10**:72–79.

Tournaye H, Janssens R, Verheyen G, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A. 1994. Andrology: An indiscriminate use of pentoxifylline does not improve in-vitro fertilization in poor fertilizers. *Human Reproduction* **9**:1289-1292.

Tournaye H, Van der Linden M, Van den Abbeel E, Devroey P, Van Steirteghem A. 1993. Effects of pentoxifylline on in-vitro development of preimplantation mouse embryos. *Human Reproduction* **8**:1475–1480.

Turner RM. 2006. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction Fertility and Development* **18**:25–38.

Tyankov S, Dimitrov I, Stankov I, Slavov R, Panayotov D. 2000. *Sheep and Goat Breeding*. Abagar Publishing House, Veliko Tarnovo.

- Unsal E, et al. 2016. Effects of pentoxifylline and platelet activating factor on sperm DNA damage. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* **197**:125–129.
- Valentová K, Entnerová P, Urbaníková J, Šimánek V. 2004. Chemie mužské sexuality. *Chemické listy* **98**:1119-1129.
- Van de Hoek M, Rickard JP, de Graaf SP. 2022. Motility assessment of ram spermatozoa. *Biology* (1715) DOI: 10.3390/biology11121715.
- Vannelli BG, Barni T, Orlando C, Natali A, Serio M, Balboni GC. 1988. Insulin-like growth factor-1 (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study supported by the university of florence. *Fertil Steril* **49**:666-669.
- Veiga A. 1995. Fertilization capacity. Pages 311-315 in Bringer J, Hedon B, editors. *Fertility and Sterility: A Current Overview*. CRC Press, London.
- Villani MT, Morini D, Spaggiari G, Falbo AI, Melli B, La Sala GB, Romeo M, Simoni M, Aguzzoli L, Santi D. 2022. Are sperm parameters able to predict the success of assisted reproductive technology? A retrospective analysis of over 22,000 assisted reproductive technology cycles. *Andrology* **10**: 310–21.
- Wassarman PM, Litscher ES. 2008. Mammalian fertilization the egg's multipotential zona pellucida. *International Journal of Developmental Biology* **52**:665-676.
- Wierzbowski S, Karetka W. 1993. An assessment of sperm motility estimation for evaluation in rams. *Theriogenology* **40**:205–209.
- Woelders H, Windig J, Hiemstra S. 2012. How developments in cryobiology, reproductive technologies and conservation genomics could shape gene banking strategies for (farm) animals. *Reproduction in Domestic Animals* **47**:264-273.
- Yanagimachi R. 2022. Mysteries and unsolved problems of mammalian fertilization and related topics. *Biology of Reproduction* **106**:644–675.
- Yang SG, et al. 2018. Mito-TEMPO improves development competence by reducing superoxide in preimplantation porcine embryos, *Scientific Reports* **8**:1–10.
- Yániz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Sánchez-Nadal JA, Santolaria P. 2015. Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Animal Reproduction Science* **156**:128-134.
- Ye X, Chun J. 2010. Lysophosphatidic Acid (Lpa) Signaling in Vertebrate Reproduction. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **21**:17–22.
- Yi Y, Wan S, Wang S, Khan A, Guo J, Zheng X, Li H, Sun N. 2021. Scutellarin protects mouse ovarian granulosa cells from injury induced by the toxin zearalenone. *Food & Function* **12**:1252–1261.
- Yoshimoto H, Takeo T, Nakagata N. 2017. Dimethyl sulfoxide and quercetin prolong the survival, motility, and fertility of cold-stored mouse sperm for 10 days. *Biology of reproduction* **97**:883-891.

Yovich JL. 1993. Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. *Human Reproduction* **8**:1786–1791.

Yüce A, Türk G, Çeribas S, Sönmez M, Çiftçi M, Güvenç M. 2013. Effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark oil on testicular antioxidant values, apoptotic germ cell and sperm quality. *Andrologia* **45**:248-255.

Zhang X, Lu X, Li J, Xia Q, Gao J, Wu B. 2019. Mito-Tempo alleviates cryodamage by regulating intracellular oxidative metabolism in spermatozoa from asthenozoospermic patients. *Cryobiology* **91**:18-22.

Zhu Z, Li R, Lv Y, Zeng W. 2019. Melatonin protects rabbit spermatozoa from cryo-damage via decreasing oxidative stress. *Cryobiology* **88**:1-8.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

- °C – stupeň Celsia
- Aj. – a jiné
- AMP – adenosin monofosfát
- Atd. – a tak dále
- ATP – adenosin trifosfát
- BSA – bovinní sérový albumin
- cAMP – cyklický adenosin monofosfát
- CASA – Computer Assisted Sperm Analysis (počítačem asistovaná analýza motility spermií)
- Cca – cirka (přibližně)
- cm – centimetr
- DMSO – dimethylsulfoxid
- DNA – deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
- GMP – guanozin monofosfát
- Hod. – hodina
- ICSI – intracytoplazmatická injekce spermií
- IGF-I – inzulínu podobný růstový faktor 1 - litr
- In vitro
- In vivo
- IUI – intrauterinní inseminace
- IVF – in vitro fertilizace
- l – litr
- mg – miligram
- Min. – minut
- ml – mililitr
- mld – miliard/a
- mM - milimolární
- mRNA – messenger ribonucleic acid (messenger ribonukleová kyselina)
- NaCl – chlorid sodný
- Např. – například
- NGF – nervový růstový faktor
- PBS – fosfátem pufovaný fyziologický roztok
- PDE – fosfodiesterázy
- PDEI – inhibitory fosfodiesterázy
- UTJ – uterotubal junction (uterotubální spojení)
- μ l – mikrolitr
- μ M – mikromolární
- PHE – směs
- PKA – proteinkináza A
- PTX – pentoxifylin
- ROS – reactive oxygen species (reaktivní forma kyslíku)
- T1 – začátek měření ihned po rozmrazení
- T2 – měření po 3 hodinách od začátku rozmrazování
- Tj. – to je
- Tzn. – to znamená
- Tzv. – tak zvaný/ně
- USB – universal serial bus

10 Samostatné přílohy

10.1 Vliv odběrového dne na parametry motility v čase T1

Tabulka 17: Vliv odběrového dne na parametry motility u variant IB+DMSO (0,5) a DMSO (0,5) v čase T1

Odběrový den	MOT (%)	PROGR (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)
1 (n = 12)	16,32 \pm 2,66 a	6,90 \pm 1,64 a	75,27 \pm 3,35 a	120,45 \pm 4,87 abc	51,47 \pm 3,09 a	67,58 \pm 2,02 ac	47,06 \pm 2,01 abc
2 (n = 12)	16,12 \pm 2,66 a	8,08 \pm 1,64 a	97,96 \pm 3,35 b	139,34 \pm 4,87 bd	69,95 \pm 3,09 bcd	68,23 \pm 2,02 ac	50,31 \pm 2,01 abc
3 (n = 12)	21,15 \pm 2,66 a	8,20 \pm 1,64 a	73,25 \pm 3,35 a	110,23 \pm 4,87 c	49,07 \pm 3,09 a	61,85 \pm 2,02 cd	45,12 \pm 2,01 a
4 (n = 12)	40,65 \pm 2,66 b	23,99 \pm 1,64 b	107,19 \pm 3,35 b	152,12 \pm 4,87 d	78,80 \pm 3,09 cd	71,99 \pm 2,02 a	51,98 \pm 2,01 abc
5 (n = 12)	63,83 \pm 2,66 c	37,85 \pm 1,64 c	109,66 \pm 3,35 b	146,07 \pm 4,87 de	80,88 \pm 3,09 bc	72,03 \pm 2,02 ad	54,67 \pm 2,01 b
6 (n = 24)	19,93 \pm 1,88 a	6,87 \pm 1,16 a	101,42 \pm 2,37 b	146,00 \pm 3,44 d	64,03 \pm 2,18 d	61,39 \pm 1,43 cd	44,78 \pm 1,42 c
7 (n = 12)	39,47 \pm 2,66 b	16,87 \pm 1,64 b	97,81 \pm 3,35 b	144,55 \pm 4,87 d	65,65 \pm 3,09 d	64,05 \pm 2,02 ac	44,88 \pm 2,01 ac
8 (n = 12)	38,09 \pm 2,66 b	19,09 \pm 1,64 b	103,63 \pm 3,35 b	140,18 \pm 4,87 abd	73,05 \pm 3,09 bcd	68,64 \pm 2,02 ac	52,97 \pm 2,01 ab

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP ($\mu\text{m/s}$) – průměrná rychlost trajektorie, VCL ($\mu\text{m/s}$) – křivočará rychlost, VSL ($\mu\text{m/s}$) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímost
a-d = rozdílná písmena ve sloupcích popisují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$)

Tabulka 18: Vliv odběrového dne na parametry motility u variant IB+DMSO (1) a DMSO (1) v čase T1

Odběrový den	MOT (%)	PROGR (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)
1 (n = 12)	16,77 \pm 2,50 ac	6,56 \pm 1,60 a	75,98 \pm 4,19 a	121,72 \pm 5,33 ac	49,19 \pm 3,91 ac	63,56 \pm 1,99 a	43,76 \pm 2,16 a
2 (n = 12)	11,54 \pm 2,50 a	4,88 \pm 1,60 a	81,67 \pm 4,19 ac	116,23 \pm 5,33 ac	57,24 \pm 3,91 ad	64,62 \pm 1,99 ab	49,76 \pm 2,16 a
3 (n = 12)	22,69 \pm 2,50 ce	10,10 \pm 1,60 ad	79,27 \pm 4,19 a	109,59 \pm 5,33 a	58,17 \pm 3,91 a	69,00 \pm 1,99 ab	52,98 \pm 2,16 a
4 (n = 12)	36,38 \pm 2,50 b	20,21 \pm 1,60 b	106,83 \pm 4,19 bd	154,79 \pm 5,33 b	79,24 \pm 3,91 be	72,35 \pm 1,99 b	51,11 \pm 2,16 a
5 (n = 12)	49,29 \pm 2,50 d	27,00 \pm 1,60 b	101,96 \pm 4,19 bd	139,10 \pm 5,33 bc	72,59 \pm 3,91 cde	68,76 \pm 1,99 ab	51,83 \pm 2,16 a
6 (n = 24)	20,18 \pm 1,77 ac	7,80 \pm 1,13 a	98,51 \pm 2,96 bd	134,81 \pm 3,77 bc	65,39 \pm 2,76 bd	64,65 \pm 1,40 a	50,06 \pm 2,16 a
7 (n = 12)	42,31 \pm 2,50 bd	18,45 \pm 1,60 c	97,86 \pm 4,19 cde	145,99 \pm 5,33 b	64,77 \pm 3,91 ae	64,85 \pm 1,99 ab	45,71 \pm 2,16 a
8 (n = 12)	31,50 \pm 2,50 be	15,22 \pm 1,60 cd	102,65 \pm 4,19 be	139,06 \pm 5,33 bc	72,98 \pm 3,91 bd	67,87 \pm 1,99 ab	52,32 \pm 2,16 a

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP ($\mu\text{m/s}$) – průměrná rychlost trajektorie, VCL ($\mu\text{m/s}$) – křivočará rychlost, VSL ($\mu\text{m/s}$) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímost
a-d = rozdílná písmena ve sloupcích popisují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$)

Tabulka 19: Vliv odběrového dne na parametry motility u variant IB+DMSO (2) a DMSO (2) v čase T1

Odběrový den	MOT (%)	PROGR (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)
1 (n = 12)	15,49 ± 2,38 a	6,69 ± 1,52 a	79,78 ± 3,70 ac	125,63 ± 5,39 ac	55,06 ± 3,56 ac	67,45 ± 2,35 a	46,43 ± 2,67 a
2 (n = 12)	18,41 ± 2,38 ac	9,95 ± 1,52 ad	91,88 ± 3,70 ad	124,68 ± 5,39 ac	69,13 ± 3,56 ab	72,82 ± 2,35 a	57,20 ± 2,67 a
3 (n = 12)	17,02 ± 2,38 a	6,25 ± 1,52 a	74,61 ± 3,70 c	100,25 ± 5,39 b	52,96 ± 3,56 c	69,83 ± 2,35 a	55,47 ± 2,67 a
4 (n = 12)	35,75 ± 2,38 bc	20,20 ± 1,52 bc	106,83 ± 3,70 bd	154,51 ± 5,39 bc	77,16 ± 3,56 bd	71,45 ± 2,35 a	50,54 ± 2,67 a
5 (n = 12)	53,93 ± 2,38 b	30,29 ± 1,52 b	110,69 ± 3,70 b	145,44 ± 5,39 c	79,82 ± 3,56 bd	70,54 ± 2,35 a	54,43 ± 2,67 a
6 (n = 24)	14,44 ± 1,68 a	5,20 ± 1,07 a	97,49 ± 2,62 de	141,13 ± 3,80 c	62,03 ± 2,52 ac	64,05 ± 1,66 a	47,29 ± 1,88 a
7 (n = 12)	44,92 ± 2,38 b	19,71 ± 1,52 c	95,57 ± 3,70 ade	140,11 ± 5,39 c	64,48 ± 3,56 acd	65,12 ± 2,35 a	46,05 ± 2,67 a
8 (n = 12)	28,41 ± 2,38 c	14,75 ± 1,52 cd	108,17 ± 3,70 be	143,13 ± 5,39 c	75,67 ± 3,56 bd	68,85 ± 2,35 a	54,21 ± 2,67 a

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP ($\mu\text{m/s}$) – průměrná rychlost trajektorie, VCL ($\mu\text{m/s}$) – křivočará rychlost, VSL ($\mu\text{m/s}$) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímota
a-d = rozdílná písmena ve sloupcích popisují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$)

10.2 Vliv odběrového dne na parametry motility v čase T2

Tabulka 20: Vliv odběrového dne na parametry motility u variant IB+DMSO (0,5) a DMSO (0,5) v čase T2

Odběrový den	MOT (%)	PROGR (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)
1 (n = 12)	17,27 ± 1,95 ac	9,44 ± 1,03 a	78,66 ± 4,22 a	118,52 ± 6,32 a	59,84 ± 3,66 abc	75,54 ± 2,59 ac	54,57 ± 2,21 a
2 (n = 12)	9,35 ± 1,95 a	1,89 ± 1,03 b	83,20 ± 4,22 ab	146,26 ± 6,32 b	44,87 ± 3,66 a	54,75 ± 2,59 bc	34,48 ± 2,21 b
3 (n = 12)	16,16 ± 1,95 ac	5,67 ± 1,03 ab	84,49 ± 4,22 ab	134,80 ± 6,32 ab	51,59 ± 3,66 abc	60,36 ± 2,59 bcd	40,15 ± 2,21 bc
4 (n = 12)	19,65 ± 1,95 cde	7,47 ± 1,03 ad	83,95 ± 4,22 ab	137,26 ± 6,32 ab	54,94 ± 3,66 abc	64,67 ± 2,59 cd	41,26 ± 2,21 bc
5 (n = 12)	26,91 ± 1,95 bd	13,96 ± 1,03 c	93,94 ± 4,22 ab	139,51 ± 6,32 ab	65,39 ± 3,66 bc	69,05 ± 2,59 ad	48,05 ± 2,21 ac
6 (n = 24)	13,16 ± 1,38 ae	5,48 ± 0,73 bd	96,98 ± 2,99 b	144,97 ± 4,47 b	63,66 ± 2,59 c	65,40 ± 1,82 d	45,54 ± 1,56 c
7 (n = 12)	24,72 ± 1,95 d	7,88 ± 1,03 ad	82,70 ± 4,22 ab	126,88 ± 6,32 ab	49,53 ± 3,66 abc	57,72 ± 2,59 bd	39,91 ± 2,21 bc
8 (n = 12)	28,32 ± 1,95 b	9,79 ± 1,03 ac	99,59 ± 4,22 ab	152,10 ± 6,32 b	60,69 ± 3,66 abc	58,49 ± 2,59 bd	40,16 ± 2,21 bc

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP ($\mu\text{m/s}$) – průměrná rychlost trajektorie, VCL ($\mu\text{m/s}$) – křivočará rychlost, VSL ($\mu\text{m/s}$) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímota
a-d = rozdílná písmena ve sloupcích popisují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$)

Tabulka 21: Vliv odběrového dne na parametry motility u variant IB+DMSO (1) a DMSO (1) v čase T2

Odběrový den	MOT (%)	PROGR (%)	VAP (μm/s)	VCL (μm/s)	VSL (μm/s)	LIN (%)	STR (%)
1 (n = 12)	14,75 ± 2,58 ac	7,35 ± 1,31 ac	86,14 ± 3,63 ac	135,90 ± 6,27 ab	61,99 ± 3,09 ab	71,57 ± 2,42 a	50,73 ± 2,13 a
2 (n = 12)	11,59 ± 2,58 ab	4,08 ± 1,31 ac	87,23 ± 3,63 ac	147,84 ± 6,27 ab	50,97 ± 3,09 a	59,87 ± 2,42 b	38,63 ± 2,13 bcd
3 (n = 12)	18,61 ± 2,58 abc	5,86 ± 1,31 a	81,60 ± 3,63 a	134,69 ± 6,27 ab	49,67 ± 3,09 a	59,91 ± 2,42 b	39,55 ± 2,13 c
4 (n = 12)	24,47 ± 2,58 bc	9,76 ± 1,31 cd	81,46 ± 3,63 a	132,17 ± 6,27 ab	53,95 ± 3,09 ab	64,55 ± 2,42 a	42,09 ± 2,13 ad
5 (n = 12)	34,06 ± 2,58 bde	15,97 ± 1,31 b	83,50 ± 3,63 a	127,62 ± 6,27 a	56,70 ± 3,09 ab	66,79 ± 2,42 a	45,80 ± 2,13 a
6 (n = 24)	14,85 ± 1,82 ac	6,50 ± 0,92 ac	101,71 ± 2,57 b	152,94 ± 4,43 b	64,16 ± 2,18 b	63,24 ± 1,71 a	44,36 ± 1,51 a
7 (n = 12)	41,18 ± 2,58 d	15,03 ± 1,31 bd	88,46 ± 3,63 ab	133,90 ± 6,27 a	54,42 ± 3,09 ab	58,62 ± 2,42 c	40,60 ± 2,13 b
8 (n = 12)	23,65 ± 2,58 ce	6,95 ± 1,31 ac	100,79 ± 3,63 bc	151,13 ± 6,27 a	59,68 ± 3,09 ab	58,76 ± 2,42 c	41,44 ± 2,13 a

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP (μm/s) – průměrná rychlost trajektorie, VCL (μm/s) – křivočará rychlost, VSL (μm/s) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímota
a-d = rozdílná písmena ve sloupcích popisují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$)

Tabulka 22: Vliv odběrového dne na parametry motility u variant IB+DMSO (2) a DMSO (2) v čase T2

Odběrový den	MOT (%)	PROGR (%)	VAP (μm/s)	VCL (μm/s)	VSL (μm/s)	LIN (%)	STR (%)
1 (n = 12)	7,91 ± 1,90 a	4,42 ± 1,05 a	68,81 ± 4,29 ae	109,21 ± 6,69 a	51,47 ± 3,70 ab	72,89 ± 2,97 ac	53,43 ± 2,45 a
2 (n = 12)	9,64 ± 1,90 a	1,86 ± 1,05 a	79,31 ± 4,29 ab	138,04 ± 6,69 a	38,39 ± 3,70 a	47,22 ± 2,97 b	30,53 ± 2,45 b
3 (n = 12)	18,48 ± 1,90 b	6,01 ± 1,05 ac	82,60 ± 4,29 ab	133,53 ± 6,69 a	50,49 ± 3,70 a	60,38 ± 2,97 acd	39,71 ± 2,45 bd
4 (n = 12)	21,58 ± 1,90 b	8,55 ± 1,05 c	75,41 ± 4,29 ae	121,71 ± 6,69 a	50,67 ± 3,70 a	65,39 ± 2,97 ce	42,29 ± 2,45 c
5 (n = 12)	35,66 ± 1,90 c	20,10 ± 1,05 b	92,85 ± 4,29 bd	131,36 ± 6,69 a	66,24 ± 3,70 b	70,83 ± 2,97 ac	51,26 ± 2,45 ac
6 (n = 24)	9,56 ± 1,35 a	3,52 ± 0,75 ad	102,31 ± 3,04 cde	147,25 ± 4,73 b	64,77 ± 2,62 b	62,15 ± 2,10 ace	44,91 ± 1,73 adc
7 (n = 12)	22,76 ± 1,90 b	7,13 ± 1,05 cd	86,83 ± 4,29 be	133,04 ± 6,69 a	52,85 ± 3,70 a	57,05 ± 2,97 bde	39,60 ± 2,45 bd
8 (n = 12)	23,45 ± 1,90 b	8,08 ± 1,05 c	94,89 ± 4,29 be	145,91 ± 6,69 b	57,98 ± 3,70 b	58,82 ± 2,97 bcd	40,44 ± 2,45 bd

Zkratky: MOT (%) – celková motilita, PROG (%) – progresivní motilita, VAP (μm/s) – průměrná rychlost trajektorie, VCL (μm/s) – křivočará rychlost, VSL (μm/s) – lineární rychlost, LIN (%) – linearita, STR (%) – přímota
a-e = rozdílná písmena ve sloupcích popisují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$)