

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

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

Bakalářská práce

**Kateřina Nováková
Chov hospodářských zvířat**

Ing. Filipp Georgijevič Savvulidi, Ph.D.

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 18.4.2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mému konzultantovi Ing. Filippovi Georgijevičovi Savvulidimu, Ph.D. za cenné rady, uvedení do problematiky v praxi a za odbornou pomoc při psaní této práce. Dále bych také ráda poděkovala zaměstnancům Natural spol. s.r.o., kteří mi umožnili návštěvu jejich inseminační stanice býků v Hradištku pod Medníkem a já tak měla možnost zhlédnout danou problematiku v praxi.

Predikce fertilizační schopnosti inseminačních dávek býků pomocí CASA a jiných laboratorních *in vitro* analýz.

Souhrn

Hlavním cílem bakalářské práce bylo zaměřit se na systém CASA a další laboratorní *in vitro* analýzy, zjistit, do jaké míry korelují s predikcí fertilizační schopnosti a vyhodnotit, která z nich má v tomto ohledu největší potenciál.

Nedílnou součástí reprodukce v chovu skotu je užití umělé inseminace. Aby byla umělá inseminace efektivní, je třeba produkce a užívání kvalitních inseminačních dávek, které jsou schopné oplodnění. K vyhodnocení kvality se využívají *in vitro* analýzy, které jsou schopné vyhodnotit vlastnosti spermií v inseminační dávce a na základě toho predikovat fertilizační schopnost.

Za nejvýznamnější analýzu je považován systém CASA, který se zaměřuje převážně na hodnocení parametrů spojených s motilitou, novější systémy jsou však schopné vyhodnotit i morfologii spermií. Vzhledem k tomu, že motilita spolu s morfologií vykazují vysokou korelaci s fertilizační schopností, jsou považovány za nejvýznamnější ukazatele kvality. Z toho důvodu je právě CASA nejrozšířenější analýzou hodnotící kvalitu inseminačních dávek, jelikož dokáže vyhodnotit oba parametry.

Dalším významným parametrem korelujícím s fertilizační schopností je integrita akrozomu. Tu lze vyhodnotit pomocí průtokové cytometrie, která je schopna vyhodnotit i další parametry jako je integrita plazmatické membrány, integrita DNA a mitochondriální aktivita. Díky své schopnosti vyhodnotit více atributů najednou v krátkém časovém úseku se tak průtoková cytometrie dostává do popředí při analýze kvality inseminačních dávek.

Souběžným užitím těchto dvou analýz lze predikovat fertilizační schopnost inseminačních dávek. Další *in vitro* analýzy pak lze užít jako doplňkovou metodu k ověření získaných výsledků nebo v případě selhání fertilizace navzdory příznivým výsledkům získaných systémem CASA a průtokovou cytometrií.

Klíčová slova: inseminace, ID býků, CASA, přežitelnost, fertilizační schopnost

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

Summary

The main aim of the bachelor thesis was to focus on the CASA system and other laboratory *in vitro* assays, to determine to what extent they correlate with the prediction of fertilization capacity and to evaluate which of them has the greatest potential in this respect.

The use of artificial insemination is an integral component in cattle reproduction. To be effective, artificial insemination requires the production and use of quality insemination doses that are capable of fertilisation. *In vitro* analyses are used to evaluate the quality of the sperm in the insemination doses and to predict fertilisation capacity.

The most important analysis is considered to be the CASA system, which focuses mainly on the evaluation of parameters related to motility, but newer systems are also able to evaluate sperm morphology. Since motility and morphology show a high correlation with fertility, they are considered the most important quality indicators. For this reason, CASA is the most widely used analysis to assess the quality of the insemination doses, as it can evaluate both parameters.

Another important parameter correlated with fertilization capacity is the integrity of the acrosome. This can be evaluated by flow cytometry, which is also capable of evaluating other parameters such as plasma membrane integrity, DNA integrity and mitochondrial activity. Due to its ability to evaluate multiple attributes at once in a short period of time, flow cytometry is now at the forefront of insemination doses quality analysis.

By using these two analyses in parallel, the fertilizing ability of insemination doses can be predicted. Other *in vitro* analyses can then be used as a complementary method to verify the results obtained or when fertilization fails despite favourable results obtained by CASA and flow cytometry.

Keywords: insemination, ID of bulls, CASA, survivability, fertilizing ability

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Odběr ejakulátu	10
3.1.1	Makroskopické hodnocení	10
3.1.2	Mikroskopické hodnocení	10
3.2	Inseminační dávky (ID)	12
3.2.1	Výroba ID	12
3.2.2	Uchování ID	13
3.3	Poškození spermií v průběhu kryokonzervace a rozmrazování ID	15
3.4	Posouzení kvality vyrobených a kryokonzervovaných ID pomocí <i>in vitro</i> analýz	16
3.4.1	Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA)	16
3.4.1.1	Systémové komponenty	17
3.4.1.2	Princip funkce systému	18
3.4.1.3	Příprava vzorku	19
3.4.1.4	Měřené parametry	19
3.4.1.5	Mass (Gross) motility	21
3.4.2	Průtoková cytometrie	21
3.4.2.1	Princip funkce systému	22
3.4.2.2	Hodnocené parametry	22
3.4.2.3	Fluorescenční barviva	23
3.4.2.4	Příprava vzorku	23
3.4.3	Zobrazovací průtoková cytometrie	24
3.4.4	Fluorescenční mikroskopie	24
3.4.5	Test funkce spermií	24
3.4.5.1	Hypoosmotický bobtnající test (HOS)	24
3.4.5.2	Vitalita spermií barvením	25
3.4.5.3	Reaktivní formy kyslíku (ROS)	25
3.4.5.4	Test indexu mitochondriální aktivity	26
3.4.5.5	Testy fragmentace DNA	26
3.4.5.6	Akrozomální test	27
3.4.5.7	Morfologie	27
3.4.5.8	Protilátky proti spermiím	28
3.4.6	Spermatická proteomika	28

3.4.7	Spermatická transkriptomika	29
4	Diskuse	30
5	Závěr	32
6	Literatura.....	33
7	Seznam použitých zkratek a symbolů	36

1 Úvod

Umělá inseminace (UI) je v dnešní době nezbytnou součástí reprodukce v chovu skotu. Poprvé byla úspěšně aplikována na počátku 20. století. Hlavním cílem UI bylo zvýšení míry genetického zisku v populacích hospodářských zvířat a na základě toho započal její rozvoj (Moore & Hasler 2017; Goshme et al. 2021). To zahrnovalo objev a vylepšování ředidel spermatu a pokrok v oblasti odběru ejakulátu, jako např. užití fantoma nebo vynález elektroejakulátoru (Moore & Hasler 2017). Nejvýznamnějším objevem se však stala v roce 1949 kryokonzervace spermií glycerolem (Brinsko et al. 2011; Moore & Hasler 2017). První pokus kryokonzervace byl proveden Polgem et al. (1949) na spermatu drůbeže. Drůbeží sperma bylo zmrazeno glycerolem při teplotě $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$, což je teplota pevného oxidu uhličitého, a po rozmrazení se u spermií obnovila normální motilita. Následně Polge & Rowson roku 1952 prokázaly stejný úspěch s býčím spermatem (Moore & Hasler 2017).

V současné době je UI ve velké míře rozšířena po celém světě. A to zásluhou možnosti nepřítomnosti býků na farmách, s tím související zvýšená bezpečnost pracovníků a snížení přenosu onemocnění mezi zvířaty, umožnění mezinárodní distribuce ejakulátu, a především zvýšení potenciálu plemenných býků s přesným genetickým hodnocením (Moore & Hasler 2017; Goshme et al. 2021). K rozšíření distribuce na mezinárodní úrovni došlo hlavně díky pokroku v odběru ejakulátu a uchovávání ID (Moore & Hasler 2017).

V současnosti je cílem UI produkce kvalitních ID s dobrým genetickým materiálem, které budou dosahovat vysoké míry plodnosti (Goshme et al. 2021). Za tímto účelem byly vynalezeny metody vyšetření jak čerstvě odebraného ejakulátu, tak rozmrazených ID, které byly kryokonzervovány (Kasimanickam et al. 2019). Snahou je vyhodnotit životaschopnost spermií a predikovat jejich fertilizační schopnosti. Momentálně existují desítky testů a laboratorních analýz, které jsou způsobilé k vyhodnocení dílčích ukazatelů kvality a pomocí nichž lze odhadnout již zmíněnou fertilizační schopnost (Bissonnette et al. 2009; DeJarnette et al. 2022). Bezkonkurenční výhodou laboratorních *in vitro* analýz je jejich rychlost a nízkonákladovost oproti *in vivo* (polním) testům (DeJarnette et al. 2022; Kasimanickam et al. 2019).

Je nezbytné zaměřit se na užívané *in vitro* analýzy, definovat jejich schopnosti a vyhodnotit potenciál v odhadu fertilizační schopnosti (Amann & Waberski 2014). Toto bude mým cílem v případné navazující diplomové práci.

2 Cíl práce

Cílem této práce je zaměřit se a podat přehled o laboratorních *in vitro* analýzách, používaných při vyhodnocování kvality inseminačních dávek a následně předpovědět, které *in vitro* analýzy nejpravděpodobněji predikují fertilizační schopnost inseminačních dávek býků. Spolu s tím nahlédneme do rozvoje umělé inseminace a zohledníme procesy, které mohou ovlivnit kvalitu spermatu, jako je výroba a kryokonzervace inseminačních dávek.

3 Literární rešerše

3.1 Odběr ejakulátu

Původní pokusy odběru spermatu probíhaly za velkých ztrát spermií a s vysokým rizikem přenosu onemocnění mezi zvířaty. Odběr probíhal následovně: býk naskočil na krávu a ejakuloval do pochvy, následně bylo sperma z pochvy odebráno za pomoci houby, sáčku nebo injekční stříkačky (Moore & Hasler 2017). Další alternativou odběru spermatu byla ejakulace býka po transrektální masáži ampulí chámovodu a přídatných pohlavních žláz. Během tohoto odběru však docházelo ke kontaminaci močí a také docházelo k nízké koncentraci spermií (Moore & Hasler 2017). Mezi významný pokrok náleží užití umělé vagíny, která zajišťuje odběr čistých vzorků spermatu bez kontaminace. Poprvé byla umělá vagína použita v roce 1914 společností Amantea při odběru ejakulátu psů, následně v roce 1930 byla Ruskými vědci upravena pro odběr ejakulátu býků (Moore & Hasler 2017). Dále došlo k vynalezení elektroejakulátoru, který se využíval převážně u býků, kteří nebyli vhodní pro odběr spermatu na fantoma a do umělé vagíny. Z důvodu zvýšení poptávky po UI došlo k maximalizaci zaměření na metody odběru ejakulátu. Prokázalo se, že za pomoci pozitivních podnětů či použitím fantoma před ejakulací došlo u býků k vyvolání sexuálního vzrušení a tím došlo ke zvýšení koncentrace a pohyblivosti spermií (Moore & Hasler 2017).

3.1.1 Makroskopické hodnocení

Před hodnocení ejakulátu je třeba zhodnotit aktuální stav samotného býka, a to z hlediska zdraví, kondice a libida (Pipan et al. 2021). Makroskopicky se u ejakulátu hodnotí barva, pH, pach, objem a konzistence. Barva ejakulátu býků je krémově bílá až nažloutlá, pH se pohybuje na neutrální hodnotě 6-7, pach je specifický, objem je cca 7,50 ml a konzistence by měla být hustá (Nagata et al. 2019; Susilowati et al. 2021).

3.1.2 Mikroskopické hodnocení

Jedná se o subjektivní hodnocení ejakulátu pomocí světelného mikroskopu. Po odběru se provádí za účelem poskytnutí informací o vhodnosti ejakulátu pro další zpracování, reprodukční schopnosti býka, udává potenciaální počet dávek a je také nedílnou součástí pro přesné ředění a následné balení (Moore & Hasler 2017). Hodnotí se koncentrace spermií, progresivní motilita, celková motility s požadovaným minimem 65 % a morfologie, u níž se

vyžaduje min. 65 % morfologicky normálních spermií (Zoca et al. 2020; DeJarnette et al. 2022). Koncentraci spermií lze také změřit pomocí fotometru (Pipan et al. 2021).

Mikroskopické hodnocení se provádí i u dávek, které byly kryokonzervovány a následně rozmrazeny. V tomto případě se hodnotí pohyblivost a morfologie. Pohyblivost vzorků rozmrazených ve vodní lázni při teplotě 37 °C se stanovuje buď ihned po rozmrazení nebo 3 h po rozmrazení, po celou dobu jsou však vzorky inkubovány při stále teplotě (DeJarnette et al. 2022). Taktéž samotné vyšetření pod mikroskopem probíhá za stálé teploty 37 °C (Zoca et al. 2020). Pohyblivost se hodnotí v několika zorných polích a následně jsou výsledky z jednotlivých zorných polí zprůměrovány a zaokrouhleny (DeJarnette et al. 2022), u rozmrazených spermií je požadována min. koncentrace 60 % (Zoca et al. 2020). Morfologické hodnocení se provádí po fixaci spermií 0,2 % formalinem a následně lze odhalit defekty hlavičky klasifikovány jako primární defekty, anebo defekty bičíku klasifikovány jako sekundární defekty (Zoca et al. 2020; DeJarnette et al. 2022).

3.2 Inseminační dávky (ID)

Zásluhou vzniku ID mohlo dojít k rozvoji organizované UI (Moore & Hasler 2017). Jejich primárním účelem je zachování životaschopnosti spermií až do samotné inseminace (Nagata et al. 2019). Základním principem zachování životaschopnosti spermií je zpomalit nebo inhibovat jejich metabolickou aktivitu ochlazením na nízké teploty (Brinsko et al. 2011). Bylo zřejmé, že jeden ejakulát obsahuje dostatečné množství spermií pro tisíce inseminací, kdežto s nezředěným spermatem to bylo pouze 10–20 inseminací (Moore & Hasler 2017). Na počátku bylo sperma ředěno médiem, které obsahovalo glukózu, fosfátový pufr a síran sodný. Následně došlo k průlomům při použití vaječného žloutkového fosfátového pufru jako ředidla spermatu (Brinsko et al. 2011). Později se zjistilo, že vařené mléko lze také použít jako médium pro prodloužení životaschopnosti spermií se srovnatelnou plodností (Brinsko et al. 2011; Moore & Hasler 2017). Rozdíly mezi ředidly spermatu a médii byly ve schopnosti prodloužit motilitu a plodnost spermií (Brinsko et al. 2011; Moore & Hasler 2017). Časem došlo k náhradě fosfátového pufru citrátovým pufrem, který má stejné konzervační schopnosti, ale je navíc schopný rozptýlit tukové globule z vaječného žloutku, což zvyšuje jasnost spermatu a zlepšují se tak podmínky pro mikroskopické vyšetření. (Moore & Hasler 2017).

V dnešní době je jak pro producenta i pro nakupujícího zásadní kvalita ID (Amann & DeJarnette 2012). Základními požadavky je, aby vyrobená ID obsahovala dostatečné množství kvalitních životaschopných spermií, díky čemuž se maximalizuje pravděpodobnost následné březosti u samic (DeJarnette et al. 2022). Dále je také požadováno, aby jejich původ byl od geneticky kvalitních jedinců za účelem zlepšení PH potomků (Goshme et al. 2021). Od těchto faktorů se následně odvíjí i odpovídající cena za ID (Amann & DeJarnette 2012).

3.2.1 Výroba ID

Při výrobě ID se provádí ředění ejakulátu pomocí ředidel. Mezi nejběžněji užívané ředidlo se řadí vaječný žloutek spolu s fosfátovým pufrem (Moore & Hasler, 2017; DeJarnette et al. 2022). Ředidla spermatu obsahují ochranné složky, jenž spermiím umožňují přežití mimo reprodukční orgány, a také mají schopnost prodloužit motilitu i plodnost spermií, čímž se odlišují od zmíněných medií. Díky těmto vlastnostem jsou ředidla spermatu dnes hojně užívaným ředidlem (Moore & Hasler 2017; Brinsko et al. 2011).

Pokud se podrobněji zaměříme na ředidla spermatu, tak základní složkou jsou lipoproteiny. Ty, které jsou obsaženy v mléce nebo v již zmíněném vaječném žloutku, mají

schopnost ochránit spermie před teplotním šokem stabilizací buněčných membrán. Nelze opomenout přítomnost metabolizovatelného substrátu, jako je glukóza, která je pro spermie bohatým zdrojem energie (Brinsko et al. 2011). Užíváním vaječného žloutku či mléka je prospěšné z hlediska jeho bohatosti na živiny, je s ním však spojené riziko v podobě výskytu různých mikroorganismů a jejich následného růstu, což má prokazatelně vliv na plodnost. Je tedy nezbytné přidání ATB do ředidel, mezi nejužívanější typy řadíme penicilin a streptomycin (Brinsko et al. 2011; Moore & Hasler 2017). Jejich užitím, spolu se správnými hygienickými postupy a screeningem nemocí, lze přispět k vymýcení chorob, a to zejména pohlavních (Moore & Hasler 2017).

Pokud hodláme ID zmrazit a následně rozmrazit, nesmíme opomenout užití kryoprotektivního činidla, které ochrání spermie před jejich poškozením a před tvorbou vnitřních ledových krystalů, jež ovlivňují strukturu spermií a následně zvyšují osmotický tlak (Moore & Hasler 2017). Jako kryoprotektivum se nejčastěji užívá glycerol, který po rozmrazení dokáže obnovit motilitu spermií na fyziologické hodnoty (Brinsko et al. 2011). Glycerol je vhodným kryoprotektivem hlavně díky své schopnosti vyrovnávat elektrolyty ve spermatu (Brinsko et al. 2011; Moore & Hasler 2017).

Před naředěním ejakulátu je třeba předeheat ředidlo na shodnou teplotu s ejakulátem, což je 37 °C, v ideálním případě by k naředění mělo dojít během 2–5 min po ejakulaci (Brinsko et al. 2011). Ředění provádíme na základě následného užití. Pokud hodláme ID užít okamžitě, ředíme v poměru 1:1. Při delším skladování před inseminací, cca 2–4 h, je nutné ředění s větším poměrem ředidla. Tím maximalizujeme přežití spermií v *in vitro* podmínkách, ideální poměr je 1:4 (tj. 1 díl spermatu na 4 díly ředidla) (Brinsko et al. 2011). Po zředění se provádí odstředění, čímž se z ejakulátu odstraní přebytek semenné plazmy, kterou lze uchovat pro účely dalších analýz. Semenná plazma v ID by měla dosahovat max. 20 % (Brinsko et al. 2011). Naředěné a odstředěné sperma plníme do tzv. pejet, což jsou různě barevná brčka o objemu 0,25 ml (Vigolo et al. 2022) s koncentrací 10 až 20 milionů spermií (Moore & Hasler 2017). Proces automatizovaného plnění probíhá za teploty 4 °C. Každá pejeta je označena kódem plemene, identifikačním číslem býka, datem odběru a kódem inseminační stanice (Vigolo et al. 2022).

3.2.2 Uchování ID

Při uchovávání ID je primárním cílem zachovat maximální počet životaschopných spermií až do samotné inseminace (Nagata et al. 2019). Základním principem, jak toho docílit, je zpomalení či úplné potlačení metabolické aktivity ochlazením na nízké teploty. Nejčastějším

typem chlazení je mrazení, a to díky možnosti dlouhodobého uchování ID (Richardson et al. 2017). V původních pokusech mrazení spermatu spolu s ředidlem a kryoprotektivem, viz. výše, se užívalo pevného oxidu uhličitého (CO₂) a alkoholu. Mrazení probíhalo pouze do teplot -79 °C, ale z důvodu jeho těžkopádnosti docházelo k tvorbě krystalů a tím i k poškození spermií (Moore & Hasler 2017). Co se týče prvních pokusů užití tekutého dusíku, jenž se primárně užívá ke kryokonzervaci v dnešní době, tak k jeho vývoji došlo až po náhradě skleněných vakuových nádob za izolované kontejnery (Moore & Hasler 2017). Přínosem tekutého dusíku oproti pevnému CO₂ byla vyšší životaschopnost spermií po rozmrazení a také dlouhodobější nízkotlakové skladování (Moore & Hasler 2017; Vigolo et al. 2022).

Jak již bylo zmíněno v dnešní době se k dlouhodobému uchovávání ID dávek užívá tekutého dusíku (N₂). Již po zředění ejakulátu dochází k postupnému zchlazování a v průběhu plnění teplota dosahuje 4 °C. Po naplnění přemístíme pejetý do programovatelného mrazáku, kde vybereme mrazicí program. Mrazení máme dvojího typu, buďto rychlé nebo pomalé. U obou typů zmrazíme pejetý s inseminační dávkou na -140 °C a následně je ponoříme do tekutého N₂, jehož teplota dosahuje -196 °C (Vigolo et al. 2022).

3.3 Poškození spermií v průběhu kryokonzervace a rozmrazování ID

V průběhu zmrazování a rozmrazování může dojít k poškození funkce a plodnosti až u 50 % spermií (Moore & Hasler 2017; Nagata et al. 2019). Pro kryokonzervované býčí sperma je charakteristické významné snížení motility rozmrazených spermií, to však lze kompenzovat zvýšením počtu spermií v ID (Amann & DeJarnette 2012; Richardson et al. 2017, Goshme et al. 2019), nebo tomu zabránit rozmrazením při teplotě 35 °C po dobu 45 s, což je v dnešní době široce praktikováno (Moore & Hasler 2017). Také bylo prokázáno, že pomalým ochlazováním po dobu několika hodin byla motilita spermií vyšší, a to pravděpodobně díky možnosti přizpůsobit se nízkým teplotám. (Moore & Hasler 2017). Mezi další možné změny způsobené kryokonzervací se řadí poškození či odstranění povrchových proteinů, změny lipidového složení v plazmatické membráně nebo předčasná kapacitace (Richardson et al. 2017). Tyto změny však nelze nijak kompenzovat (Amann & DeJarnette 2012; Richardson et al. 2017). Životaschopnost spermií je ohrožena převážně v době, kdy se teploty okolí pohybují v rozmezí od -15 °C do -60 °C, proto je nutné užívání ředidel, které spermiím poskytnou tepelnou ochranu (Moore & Hasler 2017).

Krátce po rozmrazení kryokonzervovaného spermatu se při teplotě 37 °C provádí posouzení procenta progresivně pohyblivých spermií, případně morfologie (DeJarnette et al. 2022). Pro vyhodnocení životnosti spermií *in vivo* laboratoře užívají „stress test“ neboli zátěžový test (Amann & DeJarnette 2012). Při tomto testu jsou spermie po rozmrazení na dobu 1 až 4 h inkubovány při teplotě 37 °C. Po uplynutí doby je hodnocena motilita, lze vyhodnotit i integritu akrozomů. Takto lze odhalit, zda v průběhu kryokonzervace a rozmrazování nedošlo k poškození či umrtvení spermií (Amann & DeJarnette 2012).

3.4 Posouzení kvality vyrobených a kryokonzervovaných ID pomocí *in vitro* analýz

Zoca et al. (2020) řekli, že kryokonzervace může způsobit nenávratné poškození spermií, které může ovlivnit schopnost spermií oplodnit vajíčko. Primárním cílem posuzování kvality vyrobených a kryokonzervovaných ID je tedy zjistit korelaci mezi kvalitou rozmrazeného spermatu a fertilitou (DeJarnette et al. 2022). Na základě znalosti hodnot těchto dvou proměnných lze následně strategicky využít k identifikaci a vyřazení nevhodných vzorků či plemeníků, u kterých se předpokládá špatná fertilita (Amann & Waberski 2014). V dnešní době již existuje mnoho *in vitro* laboratorních analýz, díky kterým lze následně posoudit a vyhodnotit kvalitu ID. Abychom získali smysluplné hodnocení kvality spermatu, je třeba užití více laboratorních analýz (Zoca et al. 2020). DeJarnette et al. 2022 poukázal mj. na významnou existenci korelace mezi jednotlivými analýzami. Všechny analýzy, ať už subjektivní či objektivní, zahrnují lidskou složku, jelikož užívání automatizovaných zařízení v laboratoři je spolehlivé až po validaci, specifickém nastavení a pravidelně prováděné kalibraci (Amann & DeJarnette 2012). Amann & DeJarnette (2012) také neopomenuli zmínit lidský faktor při manipulaci se vzorky, ředění, přípravě k vyšetření a následném výběru hodnocení. Toto všechno má vliv na následné výsledky a nezávisle tak může dojít k jejich zkreslení. Je třeba vzít na mysl i to, že podmínky, za kterých je sperma vyšetřováno, neodpovídají prostředí, kterému budou spermie vystaveny po UI (Amann & Waberski 2014).

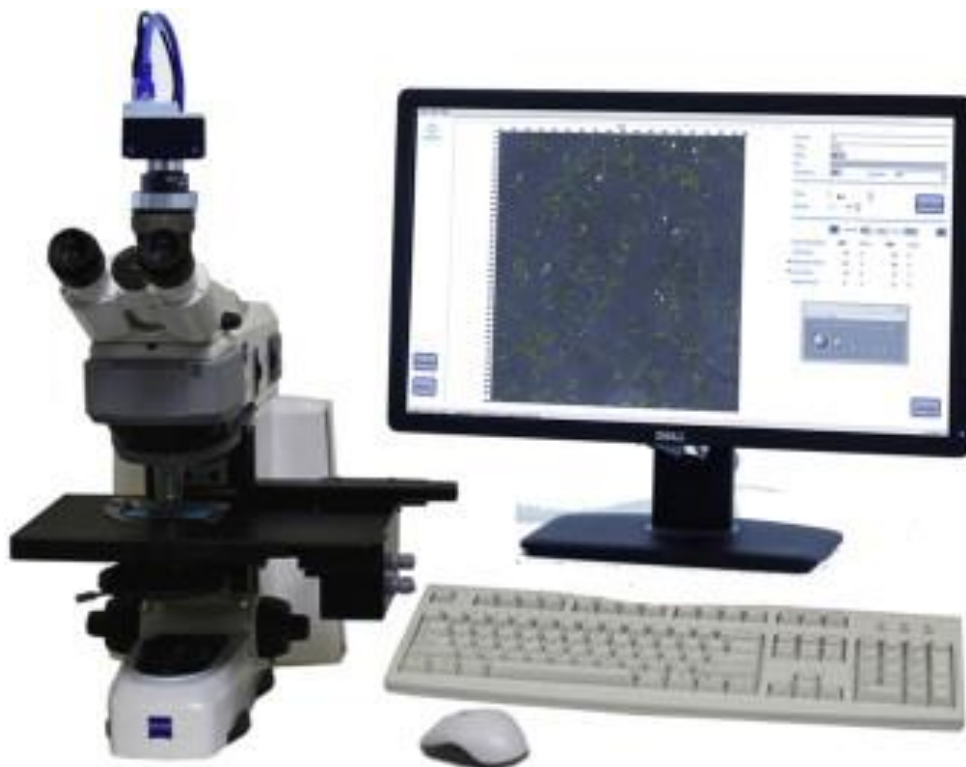
3.4.1 Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA)

V překladu „počítačem podporovaná analýza spermií“ je automatizovaný systém užívaný k vizualizaci a digitalizaci obrazů spermií, je určen ke zpracování a analýze dat a poskytuje přesné informace o kinematice jednotlivých spermatických buněk (Sethi et al. 2021). Mezi lety 1974 až 1975 byl zahájen vývoj prvního primitivního systému a plně automatizované systémy CASA se začaly užívat od roku 1992 (Amann & Waberski 2014). K pokroku přispěl hlavně rozvoj zařízení pro zachycení obrazu z mikroskopu, nárůst výpočetního výkonu současně se zmenšením velikosti počítačů s novými počítačovými jazyky a rozšířením softwarových algoritmů. Základní pojmy pro identifikaci spermií a jejich pohybové vzorce jsou však téměř neměnné (Amann & Waberski 2014). Moderní systémy CASA mohou automaticky zobrazit více polí v mělké komoře vzorku pro zachycení a analýzu více než 500 spermií (Amann & Waberski 2014; Prete et al. 2022). Za 1 s lze pořídit a uchovat informace až 60

snímků a poskytnout tak rychlou analýzu nejen pro každou spermii, ale i pro celou populaci (Amann & Waberski 2014; Sethi et al. 2021). Několik systémů dokáže zároveň s pohybem vyhodnotit i morfologii a detekovat případné abnormality (DeJarnette et al. 2022).

3.4.1.1 Systémové komponenty

Systém CASA je složen z několika komponent. Základními komponentami jsou mikroskop, videokamera a počítač se softwarem (Sethi et al. 2021) viz obr. 1. Videokamera snímá obraz z objektivu mikroskopu, který je označován jako meziobraz (Amann & Waberski 2014; Sethi et al. 2021). Počet rozeznávaných bodů v objektu se zvyšuje se zvětšením a vyšší číselnou clonou objektivu videokamery, zároveň ale dochází k poklesu hloubce ostrosti, na kterou má dále vliv i vlnová délka osvětlení a index lomu média obsahující spermie (Amann & Waberski 2014). Tato nastavení se provádí prostřednictvím softwaru a není tedy třeba provádět mechanické úpravy, jež by mohly ovlivnit snímávaný obrazec (Sethi et al. 2021). Následně je obraz poslán do počítače a ten jej převede na digitální obraz a softwarem je pak analyzována pohyblivost a vyhodnocena morfologie (Sethi et al. 2021). V dnešní době existují komerční, ale i volně dostupné softwary, které lze využít jako takřka stejně spolehlivou levnější alternativu (Prete et al. 2022).

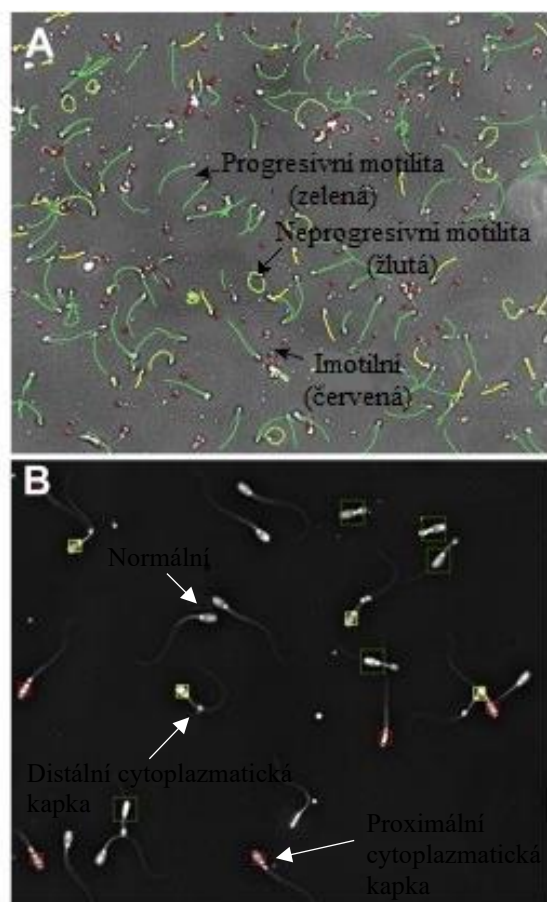


Obr. 1 Systém CASA Amann & Waberski (2014)

3.4.1.2 Princip funkce systému

Funkce většiny systémů CASA je založena na principu stanovení centriodu u každé spermie a jejich propojení v po sobě jdoucích snímcích s následným vyhodnocením trajektorie pohybu (Amann & Waberski 2014; Sethi et al. 2021), viz obr. 3. Další systémy CASA jsou schopny generovat vlastnosti pixelů v obraze, jež zobrazují spermie s časovými fluktuacemi signálu v po sobě jdoucích snímcích (Amann & Waberski 2014). Oba tyto typy se zaměřují na pohyb jednotlivých spermií. Amann & Waberski (2014) ve své studii však zmínili i existenci systémů, jež se zaměřují na hromadný pohyb spermií. Všechny systémy jsou schopny na základě nasbíraných dat rozdělit celkovou populaci spermií na subpopulace dle pohybových charakteristik, a to na obvykle rychlé, středně rychlé, pomalé a nehybné (Prete et al. 2022). Reálný vyhodnocený obraz s trajektoriemi spermií lze vidět na obr. 2A.

Při morfologické analýze se obvykle provádí vyhodnocení na základě jednoho či více snímků, ale některé systémy vyhodnocují morfologické statistiky ze všech pořízených snímků (Amann & Waberski 2014). Obrazec s vyhodnocenou morfologií spermií lze vidět na obr. 2B.



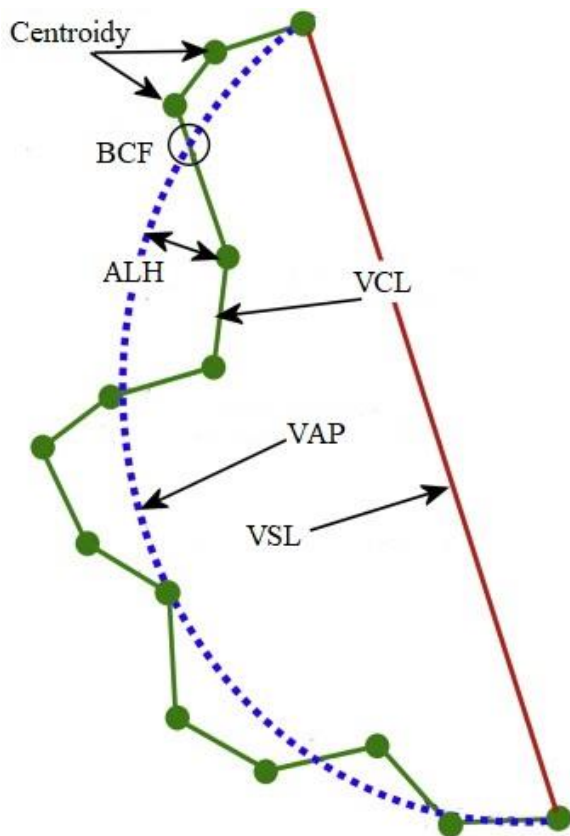
Obr. 2 Vyhodnocení A: pohybu spermií, B: morfologie spermií pomocí CASA upraveno dle Amann & Waberski (2014)

3.4.1.3 Příprava vzorku

Pro analýzu se užívají vzorky z 2 či 3 pejet od každého býka se stejným datem odběr. Pejety jsou rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu nejméně 60 s a následně je jejich obsah vyprázdněn do 2ml Eppendorfovy zkumavky (Zoca et al. 2020; DeJarnette et al. 2022). Vyšetřování je obvykle prováděno po standardním zředění spermatu v komplexním roztoku nebo v roztoku jednoduchých solí (Amann & Waberski 2014). Naředěný vzorek je následně po dobu 2 s homogenizován (Zoca et al. 2020). Pro analýzu pohybu lze užít podložní sklíčko či jednorázovou komoru, na níž se vzorek nanáší pomocí pipety. Užití jednorázových komor je častější díky kontrolované hloubce, čímž nedochází k pohybu spermií nahoru a dolů mimo hloubku ostrosti mikroskopu, je však třeba správné nastavení systému. (Amann & Waberski 2014). Pro analýzu morfologie u některých systémů CASA je třeba provést obarvení vzorku na podložním sklíčku a následné sušení (Amann & Waberski 2014).

3.4.1.4 Měřené parametry

Mezi parametry pohybu, které je CASA schopna vyhodnotit, řadíme celkovou motilitu (TM, %), progresivní motilitu (PM, %), linearitu (LIN, %) a přímost (STR, %), tyto hodnoty jsou vypočítány skrze parametry zjištěné na trajektorii spermie. Mezi parametry vyhodnocené dle trajektorie se řadí křivočará rychlost (VCL, mm/s), průměrná rychlost dráhy (VAP, mm/s), přímočará rychlost (VSL, mm/s), průměrný boční posun hlavy (ALH, mm) a frekvence křížení tepu (BCF, Hz) (Prete et al. 2022; Vigolo et al. 2022). Za zásadní parametry při hodnocení kvality spermií se považuje VAP, VSL a VCL (Prete et al. 2022) Jednotlivé parametry na trajektorii spermie jsou znázorněny na obr. 3.



Obr. 3 Trajektorie spermie vyhodnocena systémem CASA upraveno podle Amann & Waberski (2014)

Celková motilita je vyhodnocena jako procento spermii, které vykazují průměrnou rychlost dráhy $>25 \mu\text{m/s}$ a přímou rychlost $>20 \mu\text{m/s}$, progresivní motilita je vyhodnocena jako procento spermii, které vykazují průměrnou rychlost dráhy $>25 \mu\text{m/s}$ a přímost je $>75 \%$. Přímost je počítána jako $VSL/VAP \cdot 100$ a linearita je počítána jako $VSL/VCL \cdot 100$ (Vigolo et al. 2022).

Prete et al. (2022) během své studie zjistil, že s životaschopností spermii nejvíce koreluje TM ($r = 0,848$) a PM ($r = 0,84$), nejméně pak BCF ($r = 0,335$), STR ($r = 0,24$) a LIN ($r = 0,099$), zbývající parametry dosahovaly středních hodnot korelačních koeficientů. Dále při jeho studii byla zjištěna korelace mezi mitochondriálním membránovým potenciálem a VCL, kdy $r = 0,848$. Následně konstatoval, že parametry pohybu spermii spolu s morfologií a integritou akrozomů mají vysokou prediktivní hodnotu ve fertilizační schopnosti ID býků.

Při morfologické analýze je CASA schopna vyhodnotit morfologii hlavičky, akrozomální stav, ohnutí či svinutí střední části nebo bičíku, po vystavení fluorochromům lze odhalit intaktnost plazmatické membrány a novější systémy jsou schopny odhalit i přítomnost cytoplazmatické kapky. (Amann & Waberski 2014).

3.4.1.5 Mass (Gross) motility

S analýzou spermatu pomocí systému CASA úzce souvisí i vyšetření mass motility, jinak také gross motility (Nagata et al. 2019). Jedná se o subjektivní hodnocení prováděné techniky za pomoci světelného mikroskopu s vyhřívaným stolkem, kdy se hodnotí množství vířivého, nebo také vlnového pohybu, v neřaděném vzorku (Nagata et al. 2019; Goshme et al. 2021). Udává tzv. hmotnostní skóre pohyblivosti (MMS) vyjádřené jako procento pohyblivých buněk, které se odhaduje vizuálním měřením. Při měření se považuje 100 spermií ve všech zorných polích (Nagata et al. 2019). Pohyblivost lze klasifikovat 2 způsoby. Při výzkumu Nagata et al. (2019) hodnotil pohyblivost do 3 skupin značenými „+“, „+++“ je energický pohyb vypadající jako vír, lze vidět největší pohyb vpřed. „++“ je aktivní pohyb vpřed a „+“ je slabý pohyb. Goshme et al. (2021) užil 5 bodovou stupnici s procenty založenými na intenzitě motility. Stupnice vypadá následovně:

1. Velmi špatná: málo aktivní se slabým pohybem (cca 10 % aktivních spermií)
2. Špatná: málo aktivní (20–40 % aktivních spermií)
3. Slušná: pomalý pohyb (40–70 % aktivních spermií)
4. Dobrá: spermie vykazují hustý energetický pohyb (75–90 % aktivních spermií)
5. Velmi dobrá: hustý, zakalený a rychlý pohyb (>90 % aktivních spermií)

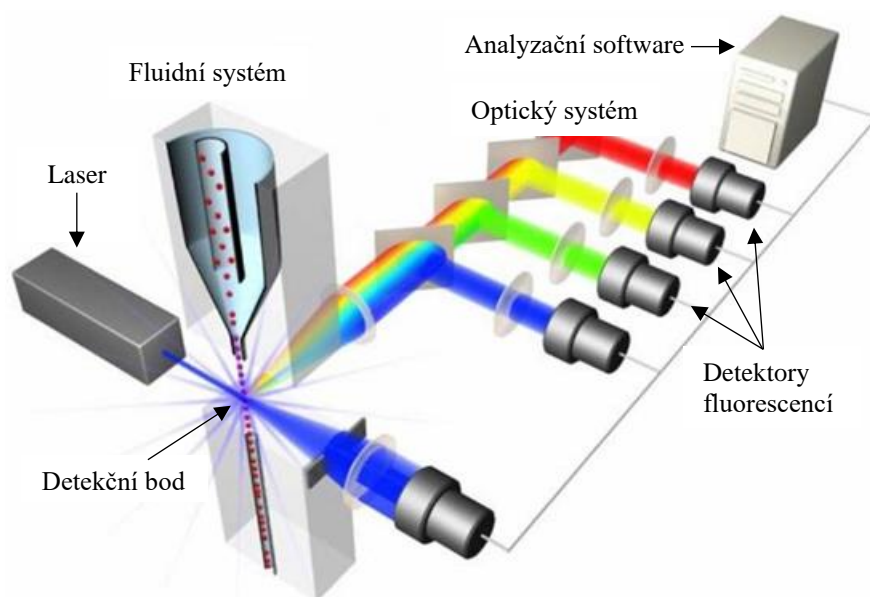
Goshme et al. (2021) při svém výzkumu zjistil, že mass motility může být ovlivněna rozmrazovacími metodami, kdy u každého rozmrazovací postupu byla odlišná průměrná procentuální mass motilita. Goshme et al. (2021) tak na základě své studie doporučil užití rozmrazování dávek při teplotě 37 °C po dobu 30 s. Načež Nagata et al. (2019) svou studií zjistil, že spermie, které před kryokonzervací vykazovaly vysoký stupeň mass motility, měly příznivé výsledky v polních testech, tedy v počtu oplodnění. Z těchto dvou studií vyplývá, že selekci spermií dle mass motility a užitím správného rozmrazovacího procesu lze dosáhnout dobrých výsledků oplodnění.

3.4.2 Průtoková cytometrie

V komerčním prostředí poskytuje rychlou a objektivní analýzu kvality spermatu s reprodukovatelným hodnocením (DeJarnette et al. 2022; Rosa et al. 2023). Během několika minut dokáže průtokový cytometr získat data o všech spermatických buňkách ve vzorku a zároveň je schopen v každé buňce otestovat více atributů současně (Rosa et al. 2023).

3.4.2.1 Princip funkce systému

Existuje několik druhů průtokových cytometrů, většinou se odlišují výrobcem, užívaným systémem či lasery. Zde ovšem vzniká otázka, že některé lasery nejsou schopny kooperace s určitými fluorescenčními barvivy. (Zoca et al. 2020). Princip funkčnosti je však stejný. Skládá se ze 4 základních komponent, a to laseru, fluidního systému, optického systému a analyzačního software viz. obr. č. 4. Fluidním systémem dochází k nasávání suspenze buněk, které jsou dále poháněny k laseru, kde jsou ozářeny laserovým paprskem a světlem vycházejícím z optického systému, to nazýváme jako detekční bod. Spermie jsou poháněny tak, aby detekčním bodem procházela vždy jen jedna spermatická buňka. V detekčním bodě dochází k rozptylu světla a detekci fluorescence. Následně je intenzita fluorescence zaznamenána a vyhodnocena analyzačním softwarem (Rosa et al. 2023).



Obr. 4 Princip průtokové cytometrie upraveno dle Rowley (2012)

3.4.2.2 Hodnocené parametry

Průtokový cytometr je schopen vyhodnotit integritu a stabilitu plazmatické membrány spermíí, stav akrozomů, mitochondriální aktivitu a integritu DNA (Rosa et al. 2023). Při studii Zoca et al. (2020) byl zjištěn široký rozsah korelace mezi integritou plazmatické membrány a fertilitou s korelačním koeficientem 0,05 – 0,56. DeJarnette et al. (2022) zjistil vysokou korelaci mezi integritou DNA a životaschopností spermíí, ale korelace s predikcí fertilizační

schopností byla o poznání nižší. Mocé & Graham (2008) uvedli, že životaschopnost spermií stanovena pomocí průtokového cytometru vysoce koreluje s fertilizační schopností býků.

3.4.2.3 Fluorescenční barviva

Existují desítky až stovky fluorescenčních barviv, kdy každé barvivo se užívá k vyhodnocení jiného parametru a má své excitační a emisní optimum, při kterém je schopné fluorescence. Mezi ty nejznámější a nejvyužívanější se řadí barviva Hoechst 33342, propidium jodid (PI), PNA-lectin (peanut agglutinin), MTR DR (MitoTracker Deep Red) a akridinová oranž (AO) (Zoca et al. 2020). Hoechst 33342 s excitačním optímem 405 nm a emisním optímem 450/50 nm se přednostně váže v oblasti dvojité šroubovice a lze tak detekovat přítomnost spermatických buněk na úrovni DNA, obsažené buněčné zbytky neobsahují DNA, a tím pádem nejsou obarveny (Zoca et al. 2020; Rosa et al. 2023). PI s excitačním optímem 488 nm a emisním optímem 695/40 nm detekuje poškození plazmatické membrány (Zoca et al. 2020; DeJarnette et al. 2022; Rosa et al. 2023). PNA-lectin s excitačním optímem 635 nm a emisním optímem v rozmezí 655-730 nm je schopen odhalit poškození akrozomu (Zoca et al. 2020). MTR DR s excitačním optímem 641 nm a emisním optímem 662 nm vyhodnocuje mitochondriální aktivitu (Zoca et al. 2020; Rosa et al. 2023). Akridinová oranž hodnotí integritu DNA spermie (DeJarnette et al. 2022) a je schopna červené a zelené fluorescence (Zoca et al. 2020). Excitační optimum AO je 488 nm, emisní optimum pro červenou fluorescenci je 630/50 nm a pro zelenou fluorescenci 513/30 nm (Zoca et al. 2020). Nelze opomenout skutečnost citlivosti barviv na světlo, je tedy třeba uchovávat je v prostředí bez přístupu světla (Rosa et al. 2023).

3.4.2.4 Příprava vzorku

Pro průtokovou cytometrii se vzorek připravuje obdobně jako při vyšetření systémem CASA, jelikož tato dvě vyšetření většinou probíhají současně. Vzorek se získává z 2 či 3 pejet od jednoho býka s odběrem provedeným ve stejný den. Pejety jsou rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu min. 60 s. Následně se odstříhne konec pejety a obsah se vylije do 2ml Eppendorfovy zkumavky (Zoca et al. 2020, DeJarnette et al. 2022). Při cytometrickém vyšetření se následně provádí ředění fluorescenčními barviv. Poměr ředění je dán užívaným typem cytometru. U každého cytometru je základem naředění vzorku tak, aby byl software schopen vyhodnotit každou buňku samostatně. Ředění se provádí ve speciálních 96jamkových destičkách s kulatým dnem (Zoca et al. 2020; Rosa et al. 2023). Po naředění je vzorek

inkubován za nepřítomnosti světla při teplotě 37 °C (Rosa et al. 2023) nebo 35 °C (DeJarnette et al. 2022) po dobu 15 min (DeJarnette et al. 2022; Rosa et al. 2023).

3.4.3 Zobrazovací průtoková cytometrie

Jedná se o propojení výhod fluorescenční mikroskopie s průtokovou cytometrií. Oproti průtokové cytometrii je zobrazovací průtoková cytometrie schopna vyhodnotit spermatické buňky více dopodrobna (Rosa et al. 2023). Systém kombinuje elektronické sledování buněk s multispektrálním zobrazovacím systémem s vysokým rozlišením, který umožňuje získat několik snímků každé buňky v různých zobrazovacích režimech (Thongkham et al. 2021). Lze tak identifikovat buňky nejen na základě fluorescence, ale také dle velikosti, tvaru, textury a nesoucích chromozómů (Thongkham et al. 2021).

3.4.4 Fluorescenční mikroskopie

Několik funkčních testů je založeno na barvení spermií pomocí fluorochromů a následné analýze buněk fluorescenční mikroskopií. Při této analýze se užívá světelný mikroskop, jenž je schopen vnímat fluorescenční barviva. Před mikroskopováním je třeba sledovaný vzorek obarvit. Na základě užitých barviv lze odhalit určitá poškození spermií. Ve skutečnosti se však tímto vyšetřením hodnotí pouze malá část spermií, čímž pak může dojít ke zkresleným výsledkům. Mezi další nevýhody lze zařadit i časovou náročnost a subjektivitu. Oproti předešlým analýzám, které jsou schopny vyhodnotit více parametrů najednou, fluorescenční mikroskopií obvykle vyhodnotíme pouze jednu spermatickou charakteristiku (Rosa et al. 2023).

3.4.5 Test funkce spermií

Jedná se o komplex testů, jež se většinou provádí až v případech s hraničními parametry nebo s anamnézou selhání oplodnění v minulosti. Formy testů jsou navrhovány a schvalovány výzkumníky a jsou schopné detekovat funkce určitých částí spermií a poskytují tak přehled o událostech při oplodnění (Talwar & Hayatnagarkar 2015).

3.4.5.1 Hypoosmotický bobtnající test (HOS)

Pomocí tohoto testu se hodnotí vitalita spermií. Je založen na schopnosti živých spermií odolávat mírnému hypoosmotickému stresu, při němž membrány bobtnají a dosahují ustáleného stavu, kdy tekutina prochází do buněk a je čerpána neporušenou funkční membránou. Pokud jsou přítomny mrtvé spermie, jejich membrána je porušena a tím pádem se

v hypotonickém médiu nezvětšují (Stanger et al. 2010). Reagující spermie vykazující otok hlavy a stočený bičík jsou označeny jako HOS pozitivní (Pipan et al. 2021). Dále lze spermie subjektivně vyhodnotit a klasifikovat stupnicí A až G na základě množství otoků a stupně zvlnění bičíku. Existuje korelace mezi reakcí spermií na hypoosmotický tlak a fragmentací DNA, kdy spermie hodnocené stupni D, E a F vykazují nižší fragmentaci DNA oproti spermím na stupnici A, B a C (Stanger et al. 2010).

3.4.5.2 Vitalita spermií barvením

Jedná se o test hodnotící životaschopnost spermií. Hodnocení se provádí pomocí mikroskopu, princip testu je založen na obarvení spermií a odráží se na podílu živých spermií, jejichž plazmatické membrány jsou schopné vyloučit extracelulární látky, jako jsou užívaná barviva (Goshme et al. 2021). Lze si tak zkontrolovat i přesnost hodnocení pohyblivosti, jelikož procento živých spermií by mělo mírně překračovat celkové procento pohyblivých spermií (Björndahl et al. 2003). Živé spermie jsou ty, které zůstaly neobarvené a mrtvé ty, které vykazují jakýkoliv stupeň růžové či červené barvy (Goshme et al. 2021). K barvení lze také použít eosin-nigrosin, který mrtvé spermie obarví na růžovou a nigrosin zbarví pozadí do tmavé barvy, což následně usnadňuje vyhodnocení preparátu (Björndahl et al. 2003; Goshme 2021).

3.4.5.3 Reaktivní formy kyslíku (ROS)

Spermie pro svůj metabolismus neustále vyžadují kyslík. Reaktivní formy kyslíku jsou produkované škodlivé metabolity, které potencionálně mohou mít patologické účinky. ROS modifikují funkci buněk nebo je poškodí až do ohrožení jejich přežití (Henkel et al. 2005). V nízkých dávkách spermím umožňují kapacitaci, hyperaktivaci a akrozomální reakci, ale nadměrné množství vede ke ztrátě motility, narušení integrity membrány a zvýšenému poškození DNA (Vigolo et al. 2022). Semenná plazma obsahuje proteiny, inhibitory ROS a antioxidanty, jež spermie před těmito škodlivými metabolity chrání. Oxidační stres tedy vzniká až v případě, kdy neexistuje rovnováha mezi ROS a antioxidanty (Henkel et al. 2005; Vigolo et al. 2022). Hladinu ROS v ejakulátu lze odhadnout různými chemickými metodami nebo testy s použitím oxidačních indikátorů (Vigolo et al. 2022). Henkel et al. (2005) zjistil negativní vliv ROS produkovaných leukocyty obsažených v ejakulátu na koncentraci spermií, počet motilních spermií a poškození DNA, zatímco ROS produkované spermii negativně korelují se samotnou motilitou a také s počtem motilních spermií. Původ ROS má tak vliv na místo poškození a tím je následně ovlivněna fertilizační schopnost spermií (Henkel et al. 2005).

3.4.5.4 Test indexu mitochondriální aktivity

Mitochondriální aktivita je nezbytná pro mnoho funkcí spermií. Mitochondrie koncentrované ve středu spermií oxidativní fosforylací produkují ATP, z něhož spermie získávají energii pro svou bičíkovou aktivitu, která je potřebná pro průchod samičím pohlavním aparátem (Bulkeley et al. 2021). Mitochondriální oxido-redukční enzymový aparát se testuje indikátory nitrotetrazoliové modři, která produkuje modrý nerozpustný pigment ve střední části a kolem ní. Obarvení středové části se hodnotí jako dobrá mitochondriální aktivita a při neobarvení jako špatná mitochondriální aktivita. Jedná se o jednoduchý a spolehlivý test, proto jej lze doplnit do běžné analýzy spermatu (Mukhopadhyay et al. 2008).

Na základě studií provedených Krzyosiakem et al. (1999) bylo předpokládáno, že mitochondriální oxidační fosforylace není nezbytná pro motilitu spermií. Uvedli, že motilita býčích spermií, s poskytnutím glykolytického substrátu, může být poháněna výhradně anaerobním metabolismem, tedy glykolýzou. Tuto skutečnost vyvrací Mukhopadhyay et al. (2008), který zjistil významnou korelaci mezi mitochondriální aktivitou a motilitou spermií, kdy dle predikční rovnice byla zjištěna korelace 88,74 %. K tomuto faktu se přiklání i Magdanz et al. (2019), který ve své studii uvedl, že spermie se zvýšenou mitochondriální aktivitou mají vyšší motilitu. Na základě těchto studií provedl Bulkeley et al. (2021) výzkum, při němž zjistil určitou korelaci mezi mitochondriální aktivitou a celkovou a progresivní motilitou spermií, ne však takovou, jakou očekával na základě studie Magdanz et al. (2019). Bulkeley et al. (2021) řekl, že nesrovnalosti lze připsat četným experimentálním faktorům, včetně rozdílů ve složení média a zpracování spermatu. Je tedy nezbytné provedení dalších budoucích studií.

3.4.5.5 Testy fragmentace DNA

Integrita samčího genomu hraje zásadní roli při zahájení životaschopného embryonálního vývoje. K poškození DNA může dojít z několika důvodů, např. již zmíněnou zvýšenou hladinou ROS (Palermo et al. 2014). Správně sbalená DNA je studována dekondukcí *in vitro*, indukovanou kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA), glutathionem, který je mj. přítomen v oocytu, nebo dithiotreitem (Tomlinson et al. 2001). Spermie s poškozenou nebo špatně sbalenou DNA pak nevykazují plnou dekondukcí. Je třeba vzít v potaz, že ne všechny zjištěné vady DNA mají vliv na vývoj embrya (Palermo et al. 2014). Pokud je v ejakulátu podíl spermií vykazujících poškození zanedbatelný, může být dávka i tak

dostatečně vhodná pro oplodnění a normální vývoj březosti, protože nikdy nevyjde 100% negativní prediktivní hodnota (Tomlinson et al. 2001; Palermo et al. 2014).

3.4.5.6 Akrozomální test

Jedná se o *in vitro* vazebný test, kdy se zjišťuje schopnost receptorů na akrozomální membráně vázat se na kyselinu hyaluronovou (Bastiaan et al. 2003). Provádí se vazbou na kyselinu hyaluronovou imobilizovanou na plastovém nebo skleněném povrchu (Huszar et al. 2003). Přítomnost a funkčnost těchto receptorů je důležitá pro navození specifického kapacitního vzorce motility a také pro vazbu zón (Bastiaan et al. 2003). Dalším typem testu je želatinový test, který vyhodnocuje proteolytickou aktivitu akrozomálních enzymů (Huszar et al. 2003), které pomáhají spermii proniknout do zony pellucidy (Bastian et al. 2003). Princip testu je založen na želatinovém filmu pokrývajícím podložní sklíčko, kdy po kontaktu s proteolytickými enzymy z akrozomu způsobí jeho rozklad, to umožní průchod světla a v okolí hlavičky spermie vznikne „svatozář“, kterou lze zkoumat pomocí mikroskopu (Huszar et al. 2003). Spermie s nepřítomnou „svatozáří“ jsou vyhodnoceny jako negativní z hlediska akrozomálního stavu a funkce (Huszar et al. 2003). Mocé & Graham (2008) poukázali na silnou korelaci mezi procentem pohyblivých spermií a procentem spermií s neporušeným akrozomem.

3.4.5.7 Morfologie

Jedná se o klasifikační systém, který hodnotí morfologii spermií na základě určených standardů, kdy spermie nesplňující daná kritéria jsou pak považovány za abnormální (Bastiaan et al. 2003). Hodnocení se provádí mikroskopováním obarveného a vysušeného nátěru na podložním sklíčku (Zoca et al. 2020). Poté se provede vyhodnocení počtu abnormálních a normálních spermií a stanoví se jejich procentuální zastoupení (Bastiaan et al. 2003). U býků je požadováno min. 65 % morfologicky normálních spermií (Zoca et al. 2020; DeJarnette 2021).

Při hodnocení morfologie spermií lze užít tzv. index tetrazoospermie (TZI), jež je dobrým prediktorem oplodnění (Menkveld et al. 2001). Menkveld et al. (2001) to popsal jako index vícenásobných anomálií, kdy se počítá celkový počet spermií a následně se vede záznam o počtu normálních a abnormálních spermií. Dále se pozorování zaměřuje pouze na abnormální spermie a jsou sledovány pro max. 4 nejčastější abnormality. Zjištěné samostatné abnormality jsou následně vyděleny počtem všech nalezených abnormálních spermií a tím se získá TZI (Menkveld et al. 2001). Studie prokazují, že vyšší procento abnormálních spermií vykazuje sníženou plodnost ID (Mocé & Graham 2008).

3.4.5.8 Protilátky proti spermiiám

Jedná se o pozorování protilátek obsažených v hlenu, jenž se nachází v pohlavním aparátu samice. Protilátky lze detekovat různými testy, mezi ty nejpoužívanější řadíme imunoperličkovou zkoušku, smíšenou antiglobulinovou reakce nebo ELISA test. Pomocí těchto testů však nelze určit, do jaké míry je protilátkami ovlivněna fertilizační schopnost spermiiám (Lu & Zha 2000). Testy pro detekci protilátek proti spermiiám jsou užívány převážně u lidské populace, to však neznamená, že tyto testy nelze praktikovat i v chovu skotu.

3.4.6 Spermatická proteomika

Zabývá se studiem proteomu spermiiám a semenné plazmy. Býčí spermatický proteom je složen ze stovek proteinů, a i přes to, že funkce většiny proteinů je stále neznámá, nelze vyloučit jejich zapojení do fertilizační schopnosti (Kasimanickam et al. 2019). Viana et al. (2018) řekl, že proteiny semenné plazmy hrají zásadní roli v ochraně spermiiám, kapacitaci, akrozomální reakci, vazbě spermie na vajíčko, oplodnění a počátečním embryonálním vývoji. Jakákoliv změna v četnosti specifických proteinů může způsobit změnu funkce spermiiám a snížit tak schopnost oplodnění (Kasimanickam et al. 2019).

Princip je založen na extrakci proteinů spermiiám a následném stanovení celkové koncentrace proteinů pomocí Bradfordovy metody, která je založena na principu vazby protein-barvivo (Kasimanickam et al. 2019). Ihned po odběru se provede centrifugace pro získání proteinů ze semenné plazmy a následně se stanoví koncentrace rozpustného proteinu (Viana et al. 2018; Kasimanickam et al. 2019). Ze získaných proteinů spermiiám a semenné plazmy se vyrobí gely, které jsou 3x po dobu 20 min promyty v roztoku obsahujícím kyselinu fosforečnou a ethanol, následně se provede barvení gelů vložením do roztoku s kyselinou fosforečnou, ethanol a síranem amonným s přidáním 2 ml barviva na dobu 72 h (Kasimanickam et al. 2019). Gely jsou následně skenovány a vyhodnoceny softwarem, jenž porovnává skvrny ve vzorcích s vygenerovaným hlavním gelem, který představuje nejlepší vzor skvrn (Moura et al. 2006; Kasimanickam et al. 2019). Množství proteinů je měřeno jako části na milion celkové optické hustoty skvrn (Moura et al. 2013). Viana et al. (2018) a Kasimanickama et al. (2019) zjistili, že býci s vyšší relativní hladinou proteinů obsažených ve spermiiám a semenné plazmě vykazovali vyšší plodnost. Lze tedy konstatovat korelaci mezi hladinou proteinů a fertilizační schopností. Viana et al. (2018) při svém výzkumu definovali 6 proteinů vykazujících nejvyšší korelaci s plodností a pomocí normalizovaných četností všech 6 proteinů tak vypočítal korelaci s hodnotou 0,83.

3.4.7 Spermatická transkriptomika

Zabývá se studiem transkriptomu spermií, což je soubor molekul RNA vzniklých transkripcí DNA. Spermatogeneze zahrnuje transkripci tisíců genů a díky nedávnému pokroku v transkriptomice byl odhalen fakt, že zralé spermie do oocyty dodávají mimo otcovského haploidního genomu také různé typy RNA jako např. mRNA, tRNA, rRNA, piRNA a miRNA (Donnellan et al. 2022). Bissonnette et al. (2009) mj. ve své studii prokázal také přítomnost některých transkriptů, jež jsou spojeny s motilitou spermií. Dále existují důkazy naznačující podíl mRNA na kapacitaci, oplodnění a časně embryogenezi (Donnellan et al. 2022).

Princip je založen na extrakci transkriptů RNA ze spermatických buněk (Bissonnette et al. 2009; Sellem et al. 2020; Donnellan et al. 2022). K tomu lze užít různé extrakční protokoly prováděné na základě doporučení výrobců, každý protokol však může mít odlišný výtěžek RNA (Bissonnette et al. 2009). Je tedy nezbytné dbát na správný výběr extrakčního protokolu. Po extrakci se posoudí kvalita RNA metodou RT-PCR, která se mj. užívá k ověření nepřítomnosti kontaminantů v preparátu (Bissonnette et al. 2009; Donnellan et al. 2022). Extrahovaná RNA je skenována a vyhodnocena systémem na základě předchozích analýz standardního ejakulátu s dobrou spolehlivostí (Sellem et al. 2020). Studie Bissonnette et al. (2009) se zabývala transkriptomem RNA jako potencionálním multiparametrickým nástrojem pro predikci plodnosti, pomocí něhož identifikovat specifické markery pro různé parametry spermatu, jako např. motilita. V nedávné studii Donnellan et al. (2022) odhalil, že ne všechny transkripty mají vliv na fertilizační schopnost býků. Princip jejich studie byl založen na porovnávání transkriptomů býků s vysokou a nízkou fertilizační schopností *in vivo*.

4 Diskuse

Jak již bylo řečeno, tak umělá inseminace je v dnešní době nezbytnou součástí reprodukce v chovu skotu. S tím úzce souvisí kvalita inseminačních dávek, kterou lze vyhodnotit pomocí laboratorních *in vitro* analýz, na které jsem se zaměřila v této práci. Cílem pak bylo stanovit, která laboratorní *in vitro* analýza nejvíce koreluje s predikcí fertilizační schopnosti. Na základě toho bylo prostudováno několik analýz a testů, které se užívají v běžném provozu, ale také jsem se zaměřila na ty, které nejsou až tolik užívané či je jejich vývoj teprve v prvopočátku.

Z mých poznatků, které jsem nabrala během studie o této problematice, mohu konstatovat, že jako nejúčinnější analýza, která je schopna predikovat fertilizační schopnost, se jeví systém CASA. A to hlavně díky své schopnosti vyhodnotit více ukazatelů, které souvisí s fertilizační schopností, jako je motilita a morfologie. Jako nejvýznamnější hodnocený parametr nejvíce korelující s fertilizační schopností se jeví celková a progresivní motilita, kdy Prete et al. (2022) konstatoval $r = 0,848$ pro celkovou motilitu a $r = 0,84$ pro progresivní motilitu. I dle mého názoru je motilita skutečně jedním z nejdůležitějších parametrů, díky nimž odhadnout schopnost oplodnění, jelikož poškozené spermie jsou často imotilní. K tomuto závěru jsem dospěla po prostudování testů a analýz, které vyhodnocovaly různá poškození spermii většinou s následkem poškození motility.

S vyšetřením CASA také úzce souvisí vyšetření mass motility, kdy se hodnotí množství vířivého pohybu před ředěním pomocí světelného mikroskopem. Jak poukázaly studie zmíněné v této kapitole, jedná se o velmi dobrý ukazatel kvality spermatu. Sperma vykazující vysokou hodnotu mass motility následně dosahovalo dobrých výsledků při vyšetření CASA a také příznivých výsledků v počtu oplodnění, jak prokázal Nagata et al. (2019) ve své studii.

Jako další významnou analýzu považuji průtokovou cytometrii, která se, obdobně jako CASA, vyznačuje schopností hodnotit více parametrů najednou. U průtokové cytometrie je třeba vyzdvihnout způsobilost k testování několika atributů v jedné buňce za poměrně krátkou dobu. Nelze však konstatovat, který parametr nejvíce koreluje s fertilizační schopností. Pokud se na hodnocené parametry zaměříme jako na celek, jsou rozhodně významným prediktorem ve fertilizační schopnosti.

Zbývající sledované analýzy a testy bych v praxi doporučila pouze jako doplňkové, pokud výsledky získané systémem CASA a průtokovou cytometrií nekorelují se skutečnou fertilizační schopností, tedy v případě selhání oplodnění i přes příznivé výsledky těchto dvou

analýz. Nebo také jako ověření věrohodnosti získaných výsledků. A to z důvodu jejich náročnosti ať už časové či finanční.

Nelze opomenout fakt, že všechna vyšetření probíhají v definovaných standardizovaných podmínkách, které jsou odlišné od těch, kterým jsou spermie vystaveny po umělé inseminaci. Odlišnost podmínek může mít vliv na funkčnost spermií v pohlavním aparátu samice. Zde tedy vzniká otázka. Můžeme získané výsledky opravdu považovat za věrohodné v predikci fertilizační schopnosti? Tato otázka je spíše polemizující, jelikož oplodnění jako takové je složitý fyziologický proces, který může být ovlivněn i ze strany samice. Žádná analýza zatím není schopna 100% predikce skutečné plodnosti býka, a to právě z důvodu odlišnosti podmínek *in vitro* a *in vivo*. Ovšem kombinací nejvýznamnějších analýz, tedy systému CASA a průtokové cytometrie, lze opravdu vyhodnotit, že ID je schopna oplodnění a užít ji tak v průmyslu umělé inseminace. Zároveň díky tomu můžeme vyřadit ID a plemeníky vykazující nedostatečnou kvalitu a zlepšit tak efektivitu a ekonomiku provozu UI.

5 Závěr

Bylo zjištěno, že každá *in vitro* analýza do určité míry koreluje s predikcí fertilizační schopnosti. Jako nejvýznamnější, s nejvyšším koeficientem korelace a nízkou náročností, byly vyhodnoceny systém CASA a průtoková cytometrie. Byla zjištěna i pozitivní korelace mezi těmito dvěma analýzami. Také bylo zjištěno, že ID dávka je ovlivněna mnoha faktory, jako např. způsobem ředění, kryokonzervací, užitým rozmrazovacím procesem ad., což může mít za následek odlišné výsledky ve skutečné plodnosti.

Do budoucna bych určitě doporučila rozšířit analýzu spermatu o proteomiku, jelikož proteiny hrají zásadní roli v několika funkcích spermií a z velké části se podílí na samotném procesu oplodnění. Zkoumání býčího proteomu si do budoucna určitě zaslouží větší pozornost, jelikož funkce většiny proteinů zůstává stále neznámá. Podrobným zkoumáním a objevením funkcí proteinů tak budeme moci odhalit jejich vliv na spermie a fertilizační schopnost.

6 Literatura

- Amann RP, DeJarnette JM. 2012. Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: A paradigm shift. *Theriogenology* **77**(5): 795-817.
- Amann RP, Waberski D. 2014. Computer-Assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* **81**: 5–17.
- Bastiaan HS, Windt ML, Menkveld R, Kruger TF, Oehninger S, Franken DR. 2003. Relationship between zona pellucida-induced acrosome reaction, sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* **79**(1): 49-55.
- Bissonnette N, Lévesque-Sergerie JP, Thibaultová C, Boissonneault G. 2009. Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: a potential tool to evaluate semen quality. *Reproduction* **138**(1): 65-80.
- Björndahl L., Söderlund I., Kvist U. 2003. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human reproduction* **18**(4): 813-816.
- Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CHC, Hinrichs K, Hartman DL, 2011. Semen Preservation. Pages 207–227 in Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CHC, Hinrichs K, Hartman DL editors. *Manual of Equine Reproduction (Third Edition)*. Mosby, Saint Louis.
- Bulkeley EA, Foutouhi A, Wigney K, Santistevan AC, Collins Ch, McNabb B, Meyers S. 2021. Effects from disruption of mitochondrial electron transport chain function on bull sperm motility. *Theriogenology* **176**: 63-72.
- DeJarnette JM, Harstine BR, McDonald K, Marshall CE. 2022. Commercial application of flow cytometry for evaluating bull sperm. *Animal Reproduction Science* (e106838) DOI: 10.1016/j.anireprosci.2021.106838.
- Donnellan EM, Perrier JP, Keogh K et al. 2022. Identification of differentially expressed mRNAs and miRNAs in spermatozoa of bulls of varying fertility. *Frontiers in Veterinary Science* **9** (e993561) DOI: 10.3389/fvets.2022.993561.
- Goshme S, Asfaw T, Demiss Ch, Besufekad S. 2021. Evaluation of motility and morphology of frozen bull semen under different thawing methods used for artificial insemination in North Shewa zone, Ethiopia. *Heliyon* **7**(10) (e08183) DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e08183.
- Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg HR, Schill WB, Kruger TF. 2005. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertility and sterility* **83**(3): 635-642.
- Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. 2003. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* **79**(3): 1616-1624.

- Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Arangasamy A, Kastelic JP. 2019. Sperm and seminal plasma proteomics of high- versus low-fertility Holstein bulls. *Theriogenology* **126**: 41-48.
- Lu NQ, Zha SW. 2000. Inhibitory effects of human seminal plasma on an ELISA used to detect anti-sperm antibodies: Implications for the determination of sperm quality. *Journal of reproductive immunology* **47**: 33-40.
- Magdanz V, Boryshpolets S, Ridzewski C, Eckel B, Reinhardt K. 2019. The motility-based swim-up technique separates bull sperm based on differences in metabolic rates and tail length. *PLOS ONE* **14**(10) (e0223576) DOI: 10.1371/journal.pone.0223576.
- Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. 2001. Semen parameters, including WHO and strcit criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod* **16**(6): 1165-1171.
- Mocé E, Graham JK. 2008. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science* **105**: 104-118.
- Moore SG, Hasler JF. 2017. A 100 - year review: reproductive technologies in dairy science. *Journal of dairy science* **100**(12): (e10314–10331) DOI: 10.3168/jds.2017-13138.
- Moura AA, Chapman DA, Koc H, Killian GJ. 2006. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. *J Androl* **27**(4): 534-541.
- Mukhopadhyay CS, Verma A, Joshi BK, Chakravarty AK. 2008. Association od sperm mitochondrial aktivty index with gross seminal parameters and fertility in crossbred bulls. *Indian journal of animal research* **42**: 282-284.
- Nagata MB, Egashira J, Katafuchi N et al. 2019. Bovine sperm selection procedure prior to cryopreservation for improvement of post-thawed semen quality and fertility. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **10**: 91.
- Palermo GD, Neri QV, Cozzubbo T, Rosenwaks Z. 2014. Perspectives on the assessment of human sperm chromatin integrity. *Fertil steril* **102**(6): 1508-1517.
- Pipan MZ, Zrimšek P, Strajn BJ, Vrtač KP, Knific T, Mrkun J. 2021. Macro- and microelements in serum and seminal plasma as biomarkers for bull sperm cryotolerance. *Acta Vet Scand* **63**: 25.
- Prete CD, Prieto OB, Mislei B, Iacono E, Mari G, Cocchia N, Gasparrini B, Merlo B, Bucci D. 2022. Assessment of an open-access CASA software for bovine and buffalo sperm motility analysis. *Animal Reproduction Science* **247** (e107089) DOI: 10.1016/j.anireprosci.2022.107089.
- Richardson BN, Larimore EL, Walker JA, Utt MD, DeJarnette JM, Perry GA. 2017. Comparison of fertility of liquid or frozen semen when varying the interval from CIDR removal to insemination. *Animal Reproduction Science* **178**: 61-66.

- Rosa JL, Freitas Dell'Aqua CP, Ferreira de Souza F, Missassi G, Kempinas WG. 2023. Multiple flow cytometry analysis for assessing human sperm functional characteristics. *Reproductive toxicology* **117** (e108353) DOI: 10.1016/j.reprotox.2023.108353.
- Rowley T. 2012. Flow Cytometry – A Survey and the basics. *Mater methods* **2**: 125 DOI: 10.13070/mm.en.2.125.
- Sellem E, Marthey S, Rau A et al. 2020. A comprehensive overview of bull sperm-borne small non-coding RNAs and their diversity across breeds. *Epigenetics & Chromatin* **13**: 19
- Sethi M, Shah N, Kumar P, Gupta V, Rohilla A, Bhatia N, Kumar N, Bhakat M, Mohanty TK. 2021. CASA (Computer Assisted Semen Analysis): As a tool for analysis of bull fertility. *Indian Farmer* **8**(4): 293-299.
- Stanger JD, Vo L, Yovich JL, Almahbobi G. 2010. Hypo-osmotic swelling test identifies individual spermatozoa with minimal DNA fragmentation. *Reproductive Biomedicine Online* **21**(4): 474-484.
- Susilowati S, Sardjito T, Mustofa I, Widodo OS, Kurnijasanti R. 2021. Effect of green tea extract in extender of Simmental bull semen on pregnancy rate of recipients. *Anim biosci* **34**(2): 198-204.
- Talwar P, Hayatnagarkar S. 2015. Sperm function test. *Journal of human reproductive sciences* **8**(2): 61-69.
- Thongkham M, Thaworn W, Pattanawong W, Teepatimakorn S, Mekchay S, Sringarm K. 2021. Spermatological parameters of immunologically sexed bull semen assessed by imaging flow cytometry, and dairy farm trial. *Reproductive biology* **21**(2) (e100486) DOI: 10.1016/j.repbio.2021.100486.
- Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. 2001. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: Implications for assisted conception. *Hum Reprod* **16**(10): 2160-2165.
- Viana AGA, Martins AMA, Pontes AH et al. 2018. Proteomic landscape of seminal plasma associated with dairy bull fertility. *Scientific Reports* **8** (e16323) DOI: 10.1038/s41598-018-34152-w.
- Vigolo V, Giaretta E, Da Dalt L, Damiani J, Gabai G, Bertuzzo F, Falomo ME. 2022. Relationships between Biomarkers of Oxidative Stress i Seminal Plasma and Sperm Motility in Bulls before and after Cryopreservation. *Animals (Basel)*. Sep 22; **12**(19) (e2534) DOI: 10.3390/ani12192534.
- Zoca SM, Shafii B, Price W, Utt M, Harstine B, McDonald K, Cruppe L, DeJarnette M, Peters L, Vascelos JLM, Dalton J. 2020. Angus sire field fertility and *in vitro* sperm characteristics following use of different sperm insemination doses in Brazilian beef cattle. *Theriogenology* **147**: 146-153.

7 Seznam použitých zkratek a symbolů

ad. – a další

ATB – antibiotika

ATP – adenosintrifosfát

cca – přibližně

h – hodina

ID – inseminační dávka

max. – maximálně

min – minuta

mj. – mimo jiné

MK – mastné kyseliny

ml – milimetr

např. – například

obr. – obrázek

PH – plemenná hodnota

r – korelační koeficient

ROS – reaktivní forma kyslíku

s – sekunda

tj. – to je

tzv. – tak zvaných

UI – umělá inseminace