Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín

Ovlivnění funkčních parametrů kančích spermií během modifikované kapacitace in vitro

Diplomová práce

Autor práce Bc. Lenka Malinová

Obor studia Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce prof. Mgr. Ing. Markéta Sedmíková Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Ovlivnění funkčních parametrů kančích spermií během modifikované kapacitace in vitro“ 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 12. 4. 2019 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Mgr. Ing. Markétě Sedmíkové Ph.D. za vedení mé diplomové práce, můj velký dík patří RNDr. Pavle Postlerové Ph.D. za cenné rady, zkušenosti a skvělé vedení v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala všem pracovníkům Katedry veterinárních disciplín za jejich ochotu a cenné rady při experimentálních částech mé diplomové práce, zejména Ing. Jirkovi Šichtářovi Ph.D. a Ing. Ondrovi Šimoníkovi Ph.D. V neposlední řadě patří můj dík mé rodině, která mi byla velkou oporou při tvoření mé diplomové práce.

Ovlivnění funkčních parametrů kančích spermií během modifikované kapacitace in vitro

Souhrn

Schopnost fertilizace spermie je spojená s několika zásadními procesy, kterými musí spermie projít. Jedním z procesů je kapacitace, dálekomplex molekulárních procesů, kde výsledkem jezměna koncentrace vápenatých iontů, proteinu fosforylace, akrozomální matrix a přeskupení membrány. Pro fertilizaci je důležitá motilita spermií, kterou se tato práce zabývá. Cílem diplomové práce bylo za pomoci počítačem řízené analýzy spermií (CASA) vyhodnotit vliv inhibitoru PYR-41 na kinetické parametry motility spermií. Za pomoci inhibice ubikvitin-proteazomového systému PYR-41 byl v této práci zjištěn vliv inhibitoru PYR-41 na motilitu spermií. Spermie byly inkubovány v kapacitačním mediu TL-HEPES-PVA s přidaným inhibitorem PYR-41 ve čtyřech různých koncentracích (10 μM, 25 μM, 50 μM a 100 μM) po dobu 2 hodin, při teplotě 38 °C a v 5 % CO_2. V průběhu inkubace byly měřeny kinetické parametry metodou CASA v čase 0, 1 a 2 hodiny. Měřeny byly kinetické parametry linearita (LIN), přímost napřímené dráhy STR, průměrná rychlost pohybu (VAP), průměrná rychlost na skutečné dráze (VCL), lineární rychlost (VSL) a amplituda oscilace hlavičky (ALH), které byly následně zpracovány statistickou analýzou rozptylu. Tyto kinetické parametry byly srovnávány s kinetickými parametry kontroly (čistě kapacitované spermie bez inhibitoru) a DMSO (prostředí, ve kterém byl rozpuštěn inhibitor PYR-41). Výsledky výzkumu ukázaly, že došlo k inhibici ubikvitin-proteazomového systému, který negativně ovlivnil motilitu spermií během kapacitace in vitro. Statisticky významné snížení VSL, VCL, VAP a také snížení ALH bylo pozorováno u inhibitoru PYR-41 v koncentraci 25 μM a 50 μM pravděpodobně v důsledku inhibice ubikvitin-proteazomového systému. U koncentrace inhibitoru PYR-41 10 μM byl statisticky významný pokles hodnot jen u parametrů VAP, VCL a ALH. Lze konstatovat, že hypotéza říkající, že inhibitor PYR-41 má signifikantní vliv na motilitu spermií v modifikované kapacitaci in vitro, byla potvrzena.

Klíčová slova: spermie, kapacitace, kapacitační medium, inhibitor PYR-41, motilita spermii

Functional parameters of boar sperm influenced by modified in vitro capacitation

Summary

To gain an ability to fertilize, spermatozoa needs to go through several important processes. One of them is the capacitation, which is the complex of molecular processes with the result in a change of a concentration, of calcium ions, of a phosphorylation protein, a change of an acrosomal matrix and a realignment of a membrane. The motility of spermatozoa is an important factor for its fertilizing ability. The aim of this study was to evaluate the influence of a PYR-41 inhibitor on kinematic parameters of motile spermatozoa by using computer-assisted sperm analysis (CASA).

By inhibiting the ubiquitin-proteasome system PYR-41, the influence of PYR-41 inhibitor on motility parameters was found.

Spermatozoa were incubated in TL-HEPES-PVA capacitation medium with PYR-41 inhibitor in four different concentrations (10 μM, 25 μM, 50 μM and 100 μM) for 2 hours in 38 °C and 5 % CO_2. The kinematic parameters were measured in a time 0 and after 1, respectively 2 hours of incubation. Kinematic parameters as linearity (LIN), straightness (STR), mean velocity (VAP), linear velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL) and lateral head displacement (ALH) were measured and evaluated by variance analysis. Samples were compared with a pure control group, where sperms capacitated without an inhibitor, and DMSO group representing an environment, where PYR-41 inhibitor had been diluted.

Results have showed, through lower motility values, that an ubiquitin-proteasome system has been negatively influenced by PYR-41 inhibitor during the capacitation in vitro. The PYR-41 inhibitor in a 25 μM a 50 μM concentration has a statistically significant negative influence on VSL, VCL, VAP and ALH parameters of motility. In a 10 μM concentration there is a statistically significant negative influence on parameters VAP, VCL and ALH.

It may be assumed, that the hypothesis, that PYR-41 inhibitor has an influence on motility parameters of spermatozoa in a modified capacitation in vitro, has been confirmed.

Keywords: sperm, capacity, capacity medium, inhibitor PYR-41, sperm motility

Obsah

1 Úvod ... **1**

2 Cíl práce a hypotéza ... **2**

3 Funkce reprodukční soustavy ... **3**

3.1 Pohlavní ústrojí ... **3**

3.1.1 Varlata ... 3

3.1.2 Vývodné cesty pohlavní ... 3

3.1.3 Přídatné pohlavní žlázy ... 4

3.2 Samčí pohlavní buňky ... **5**

3.2.1 Stavba spermie ... 5

3.2.2 Spermatogeneze ... 6

3.2.3 Spermiogeneze ... 8

3.2.4 Semenná plazma ... 10

3.3 Kapacitace ... **12**

3.3.1 Ubikvitinace ... 15

3.4 Proteomické změny ve spermii ... **19**

3.5 Hyperaktivace ... **20**

3.5.1 Chemotaxe ... 22

3.6 Akrozomální reakce ... **22**

3.7 Oplození ... **23**

4 Metody ... **25**

4.1 Fosforylace proteinů spermie ... **25**

4.2 CASA ... **27**

5 Materiál a metodika ... **30**

5.1 Materiál ... **30**

5.2 Metodika ... **30**

5.2.1 Příprava vzorků ... 30

5.2.2 Kapacitace spermií ... 31

5.2.3 Kapacitační medium ... 31

5.2.4 Indukce akrosomální reakce ... 32

5.2.5 Značení akrozomu pomocí PNA lektinu – vlhká fixace ... 32

5.2.6 Computer assisted sperm analysis (CASA) ... 33

5.2.7 Statistické vyhodnocení ... 34

6 Výsledky ... **35**

6.1 Vliv inhibice proteasomu na integritu akrozomu ... **35**

6.2 Vliv inhibitoru PYR-41 na kinetické parametry motility spermií ... **37**

6.3 Porovnání parametrů motility nativního ejakulátu a inseminační dávky **39**

7 Diskuze 40

8 Závěr 43

9 Literární zdroje 44

1 Úvod

Spermie musí projít několika zásadními procesy, aby byla schopná fertilizace Jedním z procesů je kapacitace. V průběhu kapacitace dochází k mnoha změnám jak uvnitř spermie, tak na povrchu membrány. Kapacitace je komplex molekulárních procesů, jehož výsledkem je změna koncentrace vápenatých iontů, fosforylace proteinů, akrozomální matrix a přeskupení membrány. Dále dochází k redistribuci, modifikaci, odstranění nebo změnám glykoproteinů membrány. Kapacitace umožňuje spermiím dosáhnout a vázat se na zona pellucida, podstoupit akrozomální reakci, proniknout do membrány oocytu a nakonec se spojit s oocytem. Kapacitace spermií je obecně spojována s uvolněním spermií z oviduktálního rezervoáru, rozvojem motility spermií, remodelací povrchu akrozomu a ativací membrán spermií pro fúzi s oolemou. V současné době existují důkazy, že se na těchto událostech účastní i ubikvitin-proteazomový systém. Ubikvitin-proteazomová dráha je nezbytná pro buněčné procesy vyžadující degradaci proteinu, jako je fertilizace. Inhibice proteazomální proteolýzy a ubikvitinace vedla u savčích spermií k zablokování kapacitace, akrozomální reakce a penetrace spermií zonou pellucidou.

2 Cíl práce a hypotéza

Byla stanovena hypotéza, že inhibice ubikvitin-proteasomového systému PYR-41 ovlivní parametry motility spermií jako markery kapacitace.

Pro ověření hypotézy byly stanoveny následující cíle:

1. Zhodnotit vliv inhibitoru PYR-41 na průběh kapacitace a indukované akrozomální reakce prostřednictvím hodnocení integrity akrozomu.
2. Za pomoci počítačového systému CASA vyhodnotit vliv inhibitoru PYR-41 na kinetické parametry motility spermií

3 Funkce reprodukční soustavy

Hlavními funkcemi reprodukčních orgánů samců jsou: produkce spermií ve varlatech, zrání spermií, skladování a transport spermií reprodukčním traktem a dopravení semene do samičího pohlavního aparátu skrz penis. Součástí reprodukční soustavy jsou pohlavní hormony. Samčí pohlavní hormony zajišťují tři hlavní funkce, spermatogenezi, samčí chování, druhotné pohlavní znaky (Noakes et al. 2001).

3.1 Pohlavní ústrojí

3.1.1 Varlata

Varlata jsou samčí pohlavní žlázy a jsou uložená v šourku, což je kožní vak. Jsou uložena mimo tělo samce, jelikož spermie potřebují o 4 °C nižší teplotu pro svůj vývoj (Reece 2011). Varlata jsou tvořena dvěma druhy tkání, semenotvornými kanálky a intersticiálními buňkami. Semenotvorné kanálky tvoří Sertoliho buňky a zárodečné buňky (Noakes et al. 2009). Sertoliho buňky zajišťují vhodné prostředí pro vývoj spermií. Sertoliho buňky mají dvě odlišné mitotické fáze, které se vyskytují jen u druhů s pozdějším nástupem puberty, jako jsou prasata. U prasat se první fáze proliferace Sertoliho buněk vyskytuje od narození do 1 měsíce, kdy se počet Sertoliho buněk několikanásobně zvyšuje. Druhá fáze probíhá mezi 3. a 4. měsícem (Franca et al. 2005). Intersticiální buňky jsou tvořeny Leydigovými buňkami, které produkují steroidní hormon testosteron (Noakes et al. 2009). U prasat byly pozorovány tři fáze vývoje Leydigových buněk. První fáze souvisí s časným vývojem plodu, zatímco třetí fáze probíhá od počátku puberty až do dospělosti a je zodpovědná za vývoj samčích sekundárních pohlavních znaků a funkční udržování orgánů a struktur, které jsou závislé na androgenu, jakou jsou příslušné sexuální žlázy a spermatogeneze (Franca et al. 2005).

3.1.2 Vývodné cesty pohlavní

V epididymu získávají spermie oplozovací a pohybové schopnosti. Během zrání v epididymu jsou spermie přímo vystaveny epididymální tekutině. Tato tekutina obsahuje ionty, aminokyseliny, malé organické molekuly, proteiny, glykoproteiny a širokou škálu enzymů. Složky tekutiny mají okamžitý účinek na zrání spermií, nebo se mohou vázat na povrch spermií a hrají roli v následných krocích reprodukce. Dochází ke změnám na povrchu spermií, které jsou způsobené jejich interakcí s luminální tekutinou v epididymu. Tento proces se nazývá epididymální zrání a pokrývá změny v distribuci intramembránových proteinů

nebo glykoproteinů původem z varlat, ale některé testikulární proteiny se také mění, maskují nebo nahrazují bílkovinami epididymálního původu. V důsledku těchto modifikací se spermie stávají pohyblivými a funkčně kompetentními buňkami, které jsou schopné podstoupit kapacitaci a vázat se na zona pellucida. Spermie jsou z varlete dopravovány do epididymu pomocí eferentních kanálků, kterých je 13 – 20. Tyto eferentní kanálky se sjednocují z obou varlat do jednoho epididymálního kanálku, který prochází všemi částmi epididymu. Spermie jsou pomocí toho kanálku dopraveny z hlavy epididymu, přes tělo epididymu do ocasu epididymu, kde se nachází rezervoár spermií. V rezervoáru spermií jsou spermie skladovány do ejakulace. Ocas epididymu a penis spojuje chámovod, který slouží k transportu spermií. Histologické důkazy naznačují, že má chámovod absorpční a sekreční funkci, která souvisí s ionty. Mechanismus transportu iontů v chámovodu je zatím však nedefinovaný (Carlin et al. 2006; Maňásková – Postlerová et al. 2010; Noakes et al. 2009).

3.1.3 Přídatné pohlavní žlázy

Samci mohou mít až čtyři přídatné pohlavní žlázy. Jsou to cowperovy (bulbouretrální) žlázy, předstojná žláza (prostata), semenné váčky a ampule chámovodu. U kanců se celkem vyskytují 3 přídatné pohlavní žlázy, bulbouretrální, žlázy, semenné váčky a prostata. Sekret těchto žláz společně se spermiemi vytváří ejakulát. U kanců se vyskytuje 3 fáze frakcionace, předspermiová frakce, která je bohatá na řídký, slizovitý, nažloutlý sekret, výměšek pochází převážně z uretrálních žláz, v této frakci se spermie vyskytují ojediněle. Druhá frakce je spermiová, zde je vyprodukováno 80 % spermií. Poslední frakce je pospermiová a je to mléčný vodnatý sekret, který je produkován z měchýřkovité žlázy a z bulbouretrální žlázy, v této frakci se vyskytuje přibližně 5 % spermií.

Semenné váčky kanců jsou dobře vyvinuté přídatné pohlavní žlázy, které vylučují 15 – 20 % z celkového objemu ejakulace a poskytují 80 – 90 % proteinů semenné plazmě. Tyto proteiny mají významné funkce při reprodukci prasat, neboť poskytují ochranu spermie, zvyšují životaschopnost spermií a fertilizační kapacitu (Badia et al. 2005). Sekrece z těchto žláz jsou hlavními složkami semenné plazmy (Strzezek 2002).

Bulbouretrální žláza (Cowperova žláza) je párový orgán. K celkovému ejakulačnímu objemu přispívá 10 – 25 %. Sekret těchto žláz tvoří želatinovou zátku v děložním krčku prasnice a zabraňuje tak zpětnému toku spermií (Badia et al. 2006).

Prostata u kanců má kompaktní část a rozšiřující část, je to nepárový orgán. Prostata je tubulózní žláza, která produkuje řídký mléčný zásaditý sekret. Sekret z prostatické žlázy společně se sekretem z bulbouretrální žlázy vytváří lubrikant (Aitken 1960).

3.2 Samčí pohlavní buňky

3.2.1 Stavba spermie

Spermie je pohlavní buňka, která se skládá z hlavičky, krčku a bičíku. U různých druhů a zároveň i u různých plemen se liší délka i šířka nejen spermie, ale i jejích částí. U kanců se délka hlavičky pohybuje okolo 8,5 – 10 μm, délka hlavičky je dvojnásobkem šířky hlavičky 5 μm, střední část spermie je dlouhá 10 μm, a bičík spermie, který je dlouhý 30 – 45 μm (Hancock 1955; Kondracki et al. 2012). Hlavička spermie se skládá z jádra, které je obaleno dvěma membránami (Jones 1971). Jaderné membrány mají nedostatečné množství pórů (Bellvé et al. 1975). Spermie jsou haploidní buňky, mají jednu sadu chromozomů. Jádro spermie obsahuje kondenzovaný chromatin. Dále jsou v jádře obsaženy protaminy, které nahrazují histony, histony se na protaminy přeměňují přes přechodné bílkoviny během spermatogeneze (Zini & Agarwal 2014). Jádro je hodně dehydratované a není aktivní pro transkripci (Bellvé et al. 1975). Hlavička spermie je pokrytá akrozomem (Hancock 1955). Akrozom představuje Golgiho komplex a pokrývá dvě třetiny, nebo 70 % hlavičky spermie. V akrozomu je obsaženo několik hydrolitických enzymů, včetně hyaluronidázy a proakrosinu, které jsou nezbytné pro fertilizaci. Během oplodnění vajíčka splynutí vnější akrozomální membrány s plazmatickou membránou vajíčka na více místech uvolňuje akrozomální enzymy při akrozomální reakci (Zini & Agarwal 2014). Akrozom zakrývá jádro v přední části a skládá se z homogenního elektronového materiálu uzavřeného v jediné membráně, která je kontinuální v sagitální sekci, ale protože je oddělena v průřezu, je často označována jako vnitřní a vnější membrána akrozomu (Jones 1971; Zini & Agarwal 2014). Přední polovina hlavičky je pokryta pouze vnitřní akrozomální membránou, zatímco zadní část hlavičky spermie je pokryta jednou membránou nazývanou postakrozomální čapka. Překrytí akrozomu a postakrozomální čapky vede k equatoriálnímu segmentu. Equatoriální segment se neúčastní akrozomální reakce (Zini & Agarwal 2014).

Bičík spermie se dělí na čtyři části - krček, spojovací část, hlavní část a koncovou část. Krček je spojovací částí mezi hlavičkou a bičíkem spermie, tvoří je vlákna centriolů (Hancock 1955).

Bičík spermie vzniká ve fázi spermatidy. Během spermatogeneze je centriola diferencována na střední část (spojovací část), hlavní část a koncovku. Střední část navazuje na krček a je obklopena spirální pochvou z mitochondrií. Jednotlivé mitochondrie jsou spirálovitě obklopeny fibrilovými vlákny, čímž vzniká mitochondriální plášť, který obsahuje

enzymy potřebné pro oxidační metabolismus spermií. Axiální jádro je složené ze dvou centrálních fibril, obklopených soustředným kruhem devíti dvojitých vláken, které pokračují až ke koncové části bičíku. Vnější kroužek je složen z devíti hrubých vláken. Hlavní část je tvořena devíti hrubými vnějšími vlákny, u kterých se snižuje tloušťka směrem ke koncové části, dokud nezůstanou pouze vnitřní vlákna axiálního jádra obklopená vláknitým pláštěm (Zini & Agarwal 2014).

3.2.2 Spermatogeneze

Spermatogeneze je cyklický a vysoce koordinovaný proces, který začíná mitotickou proliferací spermatogonií, pokračuje dvěma meiotickými děleními a následuje spermiogeneze, ve které se haploidní spermatidy rozvíjejí ve spermie (Almeida et al. 2006). Délka trvání cyklu je u prasat odhadována na 40 dní (Franca et al. 2005). Spermatogeneze probíhá v semenotvorných kanálcích varlete a začíná v zárodečné vrstvě. Bazální membrána je spermatogenní místo pro spermatogonie a vývoj primárních spermatocytů. Zatímco adluminální oblast slouží pro sekundární vývoj spermatocytů a spermatid. Spermatogenezi lze rozdělit na tři fáze: 1) proliferaci a diferenciaci spermatogonie, 2) meiózu a 3) spermiogenezi, což je komplexní proces, který po meióze transformuje spermatidy na složitou strukturu nazývanou spermie. V semenotvorném kanálku jsou zárodečné buňky uspořádány ve velmi uspořádané sekvenci od bazální membrány k lumenu. Spermatogonie leží přímo na bazální membráně, následované primárními spermatocyty, sekundárními spermatocyty a spermatidami, při postupu směrem k tubulárnímu lumenu. Úzká spojovací bariéra podporuje spermatogonii a časné spermatocyty v bazální membráně a všechny následné zárodečné buňky v adluminální části (Zini & Agarwal 2014). Spermatogonie se vyskytují ve čtyřech typech nediferencované a diferencované A spermatogonie, meziprodukty spermatogonie a spermatogonie B (Frankenhuis et al. 1982). Spermatocytogeneze se skládá z meiotické fáze, ve které primární spermatocyty podléhají meióze I a meióze II za vzniku haploidních spermatid. To se děje v bazální membráně. Primární spermatocyty vstupují do prvního meiotického dělení a tvoří sekundární spermatocyty. Profáze prvního meiotického dělení je velmi dlouhá. Primární spermatocyty mají nejdelší životnost. Sekundární spermatocyty podléhají druhému meiotickému dělení, které produkuje spermatidy.

Mitóza zahrnuje fázi proliferace a udržuje spermatogonie. Jedná se o postup událostí, ve kterém jsou duplikovány chromozomy, dochází k rozpadu jaderného obalu a tvoří se dvě dceřiné buňky v důsledku rovnoměrného rozdělení chromozomů a cytoplazmy. DNA je organizována do smyčkové domény, na které interagují specifické regulační proteiny.

Mitotická fáze zahrnuje spermatogonie (typu A a B) a primární spermatocyty. Primární spermatocyty se produkují vytvořením zárodečných buněk propojených intracelulárními spoji přes řadu mitotických dělení. Jakmile je počáteční počet spermatogonií stanoven po pubertě, pokračuje mitotická část k vytvoření prekurzorových buněk a iniciuje proces diferenciace a zrání (Zini & Agarwal 2014). V mitotické fázi projdou spermatocyty fázemi: preleptotene, leptotene, zygotene, pachytene a diakinezí (Hes & de Franca 2001).

Meiotická fáze zahrnuje primární spermatocyty, dokud se nevytvoří spermatidy, a během tohoto procesu dochází k párování chromozomů, křížení a genetické výměně až do stanovení nového genomu. Meióza se skládá ze dvou po sobě jdoucích dělení, ze kterých se získají čtyři haploidní spermatidy z jednoho diploidního primárního spermatocytu. Po prvním meiotickém dělení obsahuje každá dceřiná buňka jednoho partnera homologního chromozomového páru a jsou nazývány sekundární spermatocyty (2n). Meióza zahrnuje čtyři fáze: profázi, metafázi, anafázi a telofázi. Tento proces začíná, když spermatogonie typu B ztrácí kontakt s bazální membránou a tvoří primární spermatocyty. V telofázi dochází k dělení buněk s tvorbou sekundárních spermatocytů s poloviční počtem chromozomů. Profáze druhého meiotického dělení je velmi krátká a v této fázi je obsah DNA snížen na polovinu. Vzniklé spermatidy jsou tudíž haploidní (Zini & Agarwal 2014). Vývoj spermií ze spermatid se dá rozdělit do 16 kroků (Frankenhuis et al. 1982), spermatidy jsou rozdělené na kulaté spermatidy (1 – 8) a prodloužené spermatidy (9 – 16) (Hess & de Franca 2001).

Spermiogeneze je proces diferenciace spermatidy na spermii s plně zhutněným chromatinem. Během tohoto procesu nastávají morfologické změny po dokončení procesu meiózy (Zini & Agarwal 2014). Spermiohistogeneze zahrnuje čtyři stádia, Golgiho stádium, stádium akrosomální čapky, stádium kaudální manžety a stádium zrání. Golgiho stádium vytváří okolo spermatidy membránu, která obsahuje komplex enzymů, které umožňují spermii penetraci do vajíčka. U savců jsou to enzymy akrosin, arylsulfatása, kyselá a alkalická fosfatáza (Yamada & Aketa 1981). Golgiho stádium zajišťuje diferenciace prvních tří kroků. Tvorbu kruhového spermatidu zahrnuje prominentní Golgiho aparát. Krok 1 spermatida má malou, perinukleární Golgiho oblast bez akrosomálních vezikul nebo granulí. V krocích 2 – 3 proakrosomální vezikuly a granule v Golgiho aparátu vytvářejí jedinou velkou akrosomální granuli ve větším vezikulu, který oddělí jádro (Russel et el. 1990).

Stádium akrosomální čapky zahrnuje kroky 4 – 5 u kulatých spermatid, kde se akrosomální granule dotýká jaderné membrány a vezikuly se začínají vyrovnávat do malé čepičky nad jaderným povrchem. V krocích 6 – 7 se akrosomální váček stane velmi tenkým a granule se zplošťuje. V posledním 8. kroku u kulatých spermatid se akrozom

vyrovnává přibližně na 1/3 jaderného povrchu. V pozdním stadiu kroku 8 se začne měnit tvar jádra. Kroky 9 – 14 zahrnují migraci akrozomálního systému přes ventrální povrch prodlouženého spermatidového jádra. Tato migrace akrozomu je dokončena přibližně v kroku 14 a je obtížné ho identifikovat v typických histologických řezech vzhledem k jeho přítomnosti v různých rovinách úseků a úhlů nebo orientace. Takže rozpoznání specifických stádií spermatogeneze se zpravidla spoléhá na akrozomální systém pozorovaný v kruhových spermatidách spíše než v podlouhlých buňkách. Tyto spermatidové kroky zahrnují kondenzaci chromatinu (Hess & de Franca 2001).

Kroky 15 – 16 se objevují ve fázích III-VIII a vykazují méně změn jaderného tvaru a akrozomální migraci. Jádro pokračuje v kondenzování a akrozom se sráží do tenké PAS + struktury, která vyčnívá na vrcholu a pokrývá téměř celé jádro, kromě části připojené k ocasu. Nadbytečná cytoplasma je odstraněna ve fázích VII – VIII, což vede k tvorbě prominentních cytoplazmatických kapek, které obsahují nevyužité mitochondrie, ribosomy, lipidy, vezikuly a další cytoplazmatické složky (Franca et al. 1995).

3.2.3 Spermiogeneze

Zralá spermatida se odděluje od Sertoliho buněk a vstupuje do lumenu tubulu a dochází k procesu tvorby spermie. Spermatidy, které pocházejí ze stejné spermatogonie, zůstávají spojeny mosty pro usnadnění transportu cytoplazmatických produktů. Sertoliho buňky se aktivně podílejí na procesu tvorby spermií, napomáhají pohybu spermatid při přesunu do lumenu semenotvorných kanálků (Zini & Agarwald 2014). Zralé spermatidy uzavřou své intracelulární můstky, odpojují se od zárodečného epitelu a stávají se volnými buňkami nazývanými spermie. Části cytoplazmy v Sertoliho buňkách známé jako cytoplazmatická kapka jsou zcela vyloučeny, nebo někdy mohou být během procesu spermií zadrženy v nezralé spermii (Breucker et al. 1985). K procesu zrání spermií dochází v epididimu, doba zrání se liší u jednotlivých druhů zvířat, celkem se pohybuje v rozmezí 2,5 – 5 dnů (Cooper 2012). Spermie dozrávají v epididymální tekutině 1 až 2 týdny. Nejdůležitější změny v této luminální tekutině jsou způsobeny reabsorpcí vody. K resorbci vody dochází v odvodňovacích kanálcích, kde se reabsorbuje téměř 80 – 90 % semenné tekutiny, která dále pokračuje až k první části epididymu. Tyto změny vody prostřednictvím aquaporinových kanálů jsou řízeny transepiteliálním pohybem Na^+, Cl^- a HCO^{3-} a také následkem významné úpravy iontového složení luminální tekutiny v celém epididymální kanálku (Da Silva et al. 2006.).

První důsledek takového pohybu vody je velkolepé zvýšení koncentrace luminálních spermií, zvětšující se z 10^8 spermií/ml v tekutině rete testis na 10^9 v deferentním kanálku

s maximem v první části epididymu. Druhým důsledkem je modifikace koncentrace proteinu od 2 do 4 mg / ml v tekutině rete testis a počátečním segmentu epididymu na maximální hladinu 50 – 60 mg/ml v distální části hlavy. Poté se vrátí na hladinu 20 – 30 mg/ml (Dacheux et al. 2012). Pro všechny studované savce se tyto změny vyskytují v přední části epididymu a jsou vždy spojeny s prvními změnami spermií jako je migrace cytoplazmatické kapky, začátek pohybu bičíku a vazby na zona pellucida (Dacheux & Dacheux 2014). Jednou z nejviditelnějších morfologických změn je migrace cytoplazmatických kapek, zbytek cytoplazmy zárodečných buněk. Mechanismus podílející se na této cytoplazmatické migraci nebyl objasněn, ale stojí za zmínku, že transport těchto kapek nastává ve velmi omezené epididymální oblasti, která odpovídá maximální koncentraci spermií v lumenu, kde jsou sekrety proteinu epitelu nejvíce aktivní. Vztah mezi funkcemi epitelu a molekulárními mechanismy této buněčné modifikace zatím není identifikován. Taková migrace je důležitým znakem zrání spermií, protože jakákoli vada migrace cytoplasmatických kapek souvisí s poklesem fertility spermií, ale nesouvisí s aktivací pohyblivosti spermií v epididymu (Cooper 2005). Další relevantní, ale méně viditelné modifikace spermií zahrnují složení membrány a povrchu spermií. Mnoho studií ukázalo, že se vyskytuje řada sekvenčních změn v lipidové a proteinové kompozici spermatické membrány během epididymálního průchodu. Na základě inhibice vázání / fúze spermií a oocytů s použitím specifických protilátek byly identifikovány různé povrchové proteiny, jako je CRIP1 (protein D/E), akrosin, fertilin, PH20, IZUMO a SPAM1. Některé z těchto povrchových proteinů se zpracovávají během epididymálního průchodu kaskádou proteolytických štěpení, jako jsou dobře zdokumentované proteiny rodiny ADAM (ADAM1/α-fertilin, ADAM2/β-fertilin a ADAM3 / cyteristin). Většina těchto štěpení nastane, jakmile gameta vstoupí do epididymu nebo do první části tohoto orgánu. Rozštěpené peptidy těchto proteinů jsou buď přemístěny v různých plazmatických membránových doménách (např. ADAM) nebo uvolňovány do okolí, jako je případ ACE, který se stává hlavním proteinem v epididymální tekutině pro několik druhů zvířat (Gatti et al. 1999). Během epididymálního přenosu se hladina intracelulárního cAMP spermatu zvyšuje od těla k bičíku současně s metabolickou kapacitou a produkcí ATP. Produkce cAMP je generována atypickou adenylylcyklázou rozpustnou ve spermiích (Wandernoth et al. 2010), která je biochemicky odlišná od transmembránových adenylylcyklázlokalizovaných v celé spermii (Hess et al. 2005) a regulována pomocí hydrogenuhličitanu a vápníku (Xie et al. 2006). Úloha cAMP a adenylátcyklázy v spermiích je nyní geneticky stanovena KO genem Adcy10 (sAc), který indukuje *samcovu* sterilitu spojenou s defektem motility spermií (Esposito et al. 2004). Kontrola intracelulárních hladin cAMP spermií a následná fosforylace proteinu jsou klíčovým

faktorem pro pochopení postupné (potenciální) aktivace motility během epididymálního přenosu. Hydrogenuhličitan a Ca^{2+} koncentrace jsou dvě důležité složky luminální epididymální tekutiny, které se přímo podílejí na intracelulární koncentraci cAMP v nadvarleti a následně aktivují fosforylaci proteinu a motilitu (Dacheux & Dacheux 2014). Role Ca^{2+} u dozrávání spermií v nadvarleti je nejasná. In vitro fyziologický [Ca^{2+}] přímo aktivuje sAC a zvyšuje (cAMP) k produkci zralé spermie (epididymální nebo ejakulované) nezávisle na vazbě CaM na sAC. Kromě toho, byl pozorován aditivní účinek HCO^{3-} a Ca^{2+} na sAC aktivitu a zároveň byla pozorována zralost epididymálních spermií (Jaiswal & Conti 2003). Příliv Ca^{2+} je nutný k aktivaci motility bičíku u epididymálních spermií (Quill et al. 2006). Vápník v kombinaci s HCO^{3-} ionty je schopen urychlit pohyb bičíku zralé spermie in vitro (Carlson et al. 2007).

3.2.4 Semenná plazma

Semenná plazma (SP) je směs sekrečních produktů samčích reprodukčních orgánů – epididymis, semenných váčků, prostaty a bulburetrálních žláz (Yanagimachi 1994). Bioinformatická analýza GO ukázala, že 20 identifikovaných SP-proteinů bylo specificky zapleteno do reprodukčních procesů, ačkoli jiné SP-proteiny by mohly být nepřímo zapojeny do funkčních znaků a fertilní schopnosti kančí spermie. Komparativní analýza SP-proteomu odhalila 34 proteinů (16 identifikovaných v taxonomii Sus scrofa) diferenciálně vyjádřených mezi ejakulátovými částmi, 16 nadměrně exprimovaných a 18 nedostatečně exprimovaných v P1 – P2 vzhledem k P3. Závěrem lze říci, že toto hlavní proteomové mapování kanců SP poskytuje komplexní inventář proteinů s potenciálními úlohami, jako jsou biomarkery spermiové funkce a plodnosti. U různých savčích druhů bylo prokázáno, že některé SP-proteiny stabilizují membránu spermií, regulují pohyblivost spermií a kapacitaci a dále usnadňují kolonizaci spermií v samičím reprodukčním traktu (Wagner et al. 2002). U semenné plazmy se rozlišují tři hlavní frakce během ejakulace, první frakce se nazývá pre-spermiová, která připravuje prostředí pro příchozí spermie v reprodukčním traktu samice, druhá frakce se jmenuje spermiová (frakce bohatá na spermie), která obsahuje většinu spermií a třetí se jmenuje post-spermiová, má velký objem, ale obsahuje jen velmi málo spermií (Roca et al. 2015). Mnoho identifikovaných SP-proteinů, zahrnutých nebo nezahrnutých do GO analýzy, je nepřímo zapojeno do reprodukčních procesů, jako například těch, které regulují imunitní odpovědi samičí pohlavní soustavy. Některé SP-proteiny, jako je například kompletní faktor H, inhibitor plazmatické proteázy C1, katepsin H, dipeptidyl peptidáza 4 a transformující růstový faktor – β2, regulují imunitní odpovědi v samičím genitálním traktu (Sakaue et al. 2010)

a usnadňují přenos a fertilizaci spermií. Mnoho z identifikovaných SP – proteinů vykazuje katalytickou aktivitu, konkrétně aktivitu hydrolázy, a některé z nich také nepřímo souvisí s reprodukčními funkcemi, což se děje u Acrosinu. Je známo, že akrosin je zapojen do systému proakrosinakrosinu, který je nezbytný pro kapacitaci kančích spermií (Puigmulé et al. 2011). Katepsiny (Pro-athepsin H, katepsin L1, katepsin H, katepsin Z a katepsin D) jsou také SP – proteiny s aktivitou hydrolázy, konkrétně proteázovou aktivitou, některé sekretované v epididymu (Moura et al. 2006). Tento původ naznačuje, že mohou řídit remodelování spermií během epididymálního přenosu spermií. Kromě toho by SP-katepsiny mohly také interagovat s proteiny membrány spermií, které ovlivňují oplození schopnost spermií. Velké množství SP – proteinů kanců identifikovaných ve studii (Perez-Patino et al. 2016) ukázalo vazebnou aktivitu, která má významné reprodukční funkce, protože je schopna vázat plazmatické membrány spermií, které ovlivňují funkčnost spermií (Jelínková et al. 2003). Nejčastěji se jedná o spermadhesiny, včetně AWN – 1, AWN – 3, AQN, PSP – I a PSP – II, které se projevují v oplození schopnosti spermií kanců (Caballero et al. 2008). Protein tepelného šoku 70 kDa a lysozomální typ alfa – D-mannosidáza jsou další dva SP-proteiny kódované v GO analýze, které mají vazebnou aktivitu a prokazatelné dopady na funkčnost spermií (Spinaci et al. 2005). Semenná plazma kanců obsahuje velké množství glykoproteinů, které zahrnují výše uvedené spermadhesiny. Jejich schopnost glykosylace jim dává důležitou roli ve funkci spermií (Calvete et al. 1994), zejména při regulaci pohyblivosti spermií, kapacitaci, akrozomální reakci a vazby spermií a oocyty (Pang et al. 2011). Některé identifikované SP-proteiny vykazují iontové vazebné vlastnosti, zvláště důležité pro výkon spermií, které se vážou na zinek a vápník. Proteiny vázající zinek hrají důležitou roli při zachování stability chromatinu spermií a při regulaci pohyblivosti spermií. Navíc mají antibakteriální a antioxidační funkce a podílejí se na regulační imunitní odpovědi v samičím reprodukčním traktu (Vivacqua et al. 2004). Některé proteiny vázající vápník byly identifikovány v kančí SP. Vápník, zejména extracelulární, je nezbytný pro procesy exocytózy spermií, jako je akrozomální reakce (Gadella et al. 2000). Proto by přítomnost proteinů vázajících vápník v kančí SP mohla omezit dostupnost volného vápníku, což by zabránilo předčasné kapacitaci spermií. Jen několik málo krevních SP proteinů je kódováno v GO analýze jako antioxidanty. Avšak identifikované 1 SP – proteiny mají prokázanou antioxidační aktivitu. Například albumin, běžný SP protein kódovaný jako protein s vazebnou aktivitou, který prokázal schopnost chránit spermie před oxidačním stresem způsobeným lipidovou peroxidací (Gonzalez-Cadavid et al. 2014). Podobně některé identifikované SP proteiny kódované GO analýzou jako metabolickou funkci vykazují aktivitu oxidoreduktázy, například epididymálně sekreční glutathionperoxidázu

a superoxid dismutasu. Kančí spermie jsou obzvláště zranitelné vůči oxidativnímu stresu, protože jejich plazmatická membrána je obzvláště bohatá na polynenasycené mastné kyseliny, výše uvedené SP enzymy se ukázaly jako účinně chránící kančí spermie před oxidačním stresem (Bathgate 2011). Pokud jde o umístění v buňkách, je také patrné, že velký podíl SP – proteinů má intracelulární lokalizaci. Jedním z možných vysvětlení by bylo, že pocházejí z SP exosomů, jejichž obsah je bohatý na bílkoviny. Padesát tři proteinů identifikovaných v kančí SP bylo kódováno v GO analýze jako proteiny pocházející z exosomů. Převládající data ukazují, že proteiny v epididymální tekutině spojené s dozráváním spermií jsou přeneseny do spermatu exosomy a následkem toho bylo prokázáno, že obsah proteinů v těchto extracelulárních vezikulech se podílí na dozrávání spermií po testikulárním vyšetření, včetně akumulace motility spermií a snížení oxidativního stresu a akrozomální reakce (Siciliano et al. 2008).

3.3 Kapacitace

Ejakulovaná spermie není schopná oplození. Samčí spermie musí projít určitými procesy v samičím reprodukčním traktu, než dojde k samotné fertilizaci. Těmto procesům se říká kapacitace, která probíhá ještě před penetrací spermie do vajíčka. Kapacitace je komplex molekulárních procesů, kde je výsledkem změna koncentrace vápenatých iontů, proteinu fosforylace, akrozomální matrix a přeskupení membrány. Dále dochází k redistribuci, modifikaci, odstranění nebo změnám glykoproteinů, povrchových cukrů a proteinů vázajících cukr jako jiné různé antigeny, které se vyskytují během kapacitace. Takové modifikace mohou být hodnoceny použitím specifických protilátek, lektinů, cukrů konjugovaných s albuminem (Cohen-Dayag & Eisenbach 1994; Ded et al. 2010).

Kapacitace umožňuje spermiím dosáhnout a vázat se na zona pellucida, podstoupit akrozomální reakci, proniknout do membrány oocytu a nakonec se spojit s oocytem (de Lamirande et al. 1997). Už Chang (1951) a Austin (1951) zjistili, že spermie nejsou schopny oplodnit vajíčko, pokud se na určitou dobu nenacházejí v samičím reprodukčním traktu a neprojdou kapacitací, souborem transformací, které tyto buňky musí projít, aby byly fertilní. Od té doby je fyziologický proces kapacitace považován za krok zrání, aktivaci nebo-li zapnutí, v reprodukčním traktu samice, oddělení ochranného pláště z plazmatické membrány spermie a výběr kompetentních populací spermií.

Spermie jsou v semenné plazmě, která má dekapacitační účinky, proto je nutné, aby spermie pobyly nějaký čas v samičím reprodukčním traktu, aby došlo k rekapacitaci

(Bedford & Chang 1962; Bailey 2010).

Mechanismy regulující spermie a epiteliální buněčné interakce, při kterých tubulární sekrece působí na spermie, nejsou dobře známy. U křečků byl popsán sialovaný oligosacharid podobný tomu, který byl nalezen na fetuinu. Je přítomen na epitelu oviduktu a zdá se, že má být rozpoznán spermií a zprostředkovávat vazbu spermií na oviduktální tkáň. Ztráta specifických lektinů rozpoznávající fetuin a kyselinu sialovou z membrán spermií křečka byla dočasně spojená s akvizicí hyperaktivované motility a uvolnění spermií z oviduktálního epitelu (Demott et al. 1995).

Je možné, že regulace kapacitace spočívá méně ve stimulaci tohoto procesu a více v oblasti neomezování inhibičních modulátorů kapacitace odstraněním dekapacitačních faktorů (Hunter & Nornes 1969; Yanagimachi 1994; Bailey 2010). Přestože jsou odlišná kapacitační média pro spermie u různých druhů, zdá se, že určité součásti média, jako je sérový albumin, Ca^{2+} a HCO^{3-}, hrají důležitou regulační roli při podpoře kapacitace u všech dosud studovaných druhů. Bylo objasněno, jakým způsobem jsou tyto sloučeniny spojeny s membránou, transmembránou a intracelulární signalizační událostí regulující kapacitaci. Role mediálních složek v kapacitaci in-vitro. Sérový albumin, který je přítomný v kapacitním médiu (obvykle bovinní sérový albumin BSA), má za úkol odstraňování cholesterolu z plazmatické membrány spermie (Go & Wolf 1985; Langlais & Roberts 1985; Cross 1998). Odstranění cholesterolu by mohlo ovlivnit fluiditu membrány (Wolf et al. 1986). Nebylo zjištěno, zda je odstranění cholesterolu jedinou funkcí BSA. Experimenty ukazují, že jiné bílkoviny vázající cholesterol, jako jsou lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL), mohou nahradit albumin v in vitro fertilizaci (Thérien & Manjunath 1996) a naznačují, že by primární účinek BSA mohl zprostředkovávat pohyb cholesterolu (Cross 1998). Ukázalo se, že cholesterol přítomný v membránách spermií omezuje iontovou propustnost, vkládání bílkovin a pohyblivost ve fosfolipidových dvojvrstvách a také ztužuje a stabilizuje membrány (Parks & Ehrenwald 1990; Leahy & Gadella 2015), čímž zabraňuje některým jevům spojených s kapacitací spermií (Langlais et al. 1981). Dále bylo také navrženo, že cholesterol sulfát ve spojení s vápníkem může destabilizovat membránu při přípravě membránové fúze během akrozomální reakce (Holt 1995). Eflux cholesterolu nebo redistribuce umožnuje destabilizaci spermií a indukuje kapacitaci. Inkubace promytých spermií s albuminem nebo s folikulárními nebo oviduktálními tekutinami (které obsahují bílkoviny pro přenos lipidů) podporuje cholesterolový eflux a kapacitaci spermií (Davis 1982; Leahy & Gadella 2015).

Kapacitace spermií byla spojena se zvýšenou rychlostí difúze lipidů v membráně akrozomu, střední a bičíkové části spermie, avšak nikoliv u post-akrozomální oblasti spermií.

Kromě toho difúzní lipidová frakce akrozomální membrány poklesla během kapacitace spermií (Wolf et al. 1986). Tyto fyzikální změny jsou v souladu s funkčními změnami, získáním hyperaktivní pohyblivosti a schopností oplodnit vajíčko, které se vyskytují v kapacitovaných spermiích. Fluidita membrány by také mohla být ovlivněna zvýšením teploty, ke které dochází v období ovulace (Hunter & Nichol 1986).

Vazba tří proteinů je závislá na vápníku, tyto proteiny mohou stabilizovat buněčné membrány silnou vazbou na spermie v isthymu, kde je koncentrace vápníku vyšší (2,5 mM) a tím podporují kapacitaci tak, že se pomalu odstraňují proteiny ze spermií v ampuli, kde je koncentrace vápníku nižší (1,8 mM) (Lapointe & Sirard 1996). Byly objeveny proteiny syntetizované vejcovodem, které se vážou na spermie a stabilizují je (Lippes & Wagh 1989). Na druhé straně oviduktální tekutina také obsahuje bílkoviny, které by mohly destabilizovat membránu spermií za podpory choleterolového efluxu (Davis 1982; Ehrenwald et al. 1990; Ravnik et al. 1990; Leahy & Gadella 2015). Dále jsou v oviduktální tekutině přítomny malé molekuly, jako jsou progesteron a lipidy, které mohou ovlivňovat spermie. Progesteron může stimulovat kapacitaci spermií, případně iniciovat příliv vápníku (Zhu et al. 1994; Revelli et al. 1994; Yeste et al. 2015). Na regulaci koncentrace spermií při kapacitaci se společně s Ca^{2+} a HCO^{3-} podílí také cAMP. Mezi transmebránové signalizační procesy patří uvolňování cholesterolu z buněčné membrány spermie za pomocí BSA (Hyne & Garbers 1979; Leahy & Gadella 2015). Hyperpolarizace membrány způsobuje zvýšenou permeabilitu K^+ iontů, dochází tak ke snížení K^+ v membráně spermie. Dále hyperpolarizace navozuje Ca^{2+} kanály z inaktivního stavu do uzavřeného, avšak aktivního stavu, ze kterého by mohli být depolarizací vyvolanou antagonisty otevřeny (Arnoult et al. 1996).

Dalšími faktory, které ovlivňují kapacitaci spermií jsou koncentrace kyslíku (Maas et al. 1976) a teplota (Hunter & Nichol 1986). Spermie inkubované za aerobních podmínek vytváří reaktivní druhy kyslíku (ROS), jako je superoxidový anion (O_2), který spontánně dismutuje na peroxid vodíku (H_2O_2). Zatímco se ukázalo, že vysoké koncentrace ROS a hlavně peroxidu vodíku mají škodlivé účinky na spermie (Aitken & Clarkson 1987) řízené koncentrace ROS se podílejí na získávání schopnosti fertilizace spermií (de Lamirande & Gagnon 1995 b). Superoxidový anion podílející se na kapacitaci pochází ze samotných spermií. Kromě toho, skutečnost, že superoxid dismutáza (buněčný nepropustný protein) předchází kapacitaci spermií, naznačuje, že superoxidový anion byl generován na úrovni plazmatické membrány a působil na vnějším povrchu buňky (de Lamirande & Gagnon 1995 a).

Influx HCO^{3-} se jeví jako hlavní determinant ve vývoji hyperaktivní motility. Většina studií prokázala, že větší koncentrace HCO^{3-} byla potřebná pro hyperaktivace,

než pro kapacitaci, kde nebyla potřeba tak velká koncentrace HCO^{3-} (Boatman & Robin 1991).

Influx Ca^{2+} iontů při kapacitaci je důležitý pro následnou hyperaktivaci a akrosomální reakci (Suarez & Dai 1995). Ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů dochází ve dvou fázích při kapacitaci a v akrosomu při akrosomální reakci (Florman et al. 1992). Mechanismus působení vápníku během kapacitace zůstává vymezen, ale jako u HCO^{3-} může stimulovat aktivitu adenylylcyklázy (Gross et al. 1987). Jiné enzymy přítomné ve spermiích, jako je fosfolipáza A_2 a protein kináza C, jsou rovněž závislé na přítomnosti vápníku, i přestože byla zjištěna jejich role v akrosomální reakci spermií (Yanagimachi 1994). Aktivita Ca^{2+} může být také přímou interakcí s fosfolipidy, modifikující jejich fyzikální stav, chování fázové separace a může tak ovlivnit fluiditu membrány (Holt 1995). Vliv vápníku a tvorba ROS se objevují jako nejprvotnější události při kapacitaci spermie, protože jsou iniciovány na začátku inkubace, kde jsou podmínky jako při kapacitaci (Baldi et al. 1991). Tyto dva postupy mohou být zodpovědné za fyziologickou aktivaci adenylylcyklázy, která by mohla hrát roli ve vývoji spermií. Ve skutečnosti látky, které přispívají ke zvýšení intracelulární koncentrace cAMP, jako je forskolin (aktivátor adenylylcyklázy), dibutyryl cAMP (analog buněčného permeátu cAMP), stejně jako kofein a isobutylmethylxantin (inhibitory fosfodiesterázy), stimulovaly kapacitaci spermií a protein tyrosinovou fosforylaci dvou proteinů, p105 a p81 (Leclerc et al. 1997). Dále bylo prokázáno, že progesteron stimuluje příliv vápníku ve spermiích a následně způsobuje zvýšení intracelulární koncentrace cAMP, fosforylaci proteinu tyrosinu a rychlost kapacitace (Emiliozzi et al. 1996). Zvýšení aktivity adenylylcyklázy vede k nárůstu cAMP, který je zapojen do zahájení a udržování motility spermií (Tash 1990; Kerns et al. 2016) a kapacitace (Yanagimachi 1994). Většina účinků cAMP je zprostředkována prostřednictvím aktivace protein kináz A (PKA), jejichž přítomnost byla popsána u spermií (Garbers et al. 1973; Kerns et al 2016).

Při kapacitaci jsou velmi nízké požadavky na koncentraci Na^+. Influx Na^+ je regulován membránou stejně jako je to mu u K^+ iontů (Fraser et al. 1993).

3.3.1 Ubikvitinace

Ubikvitinace je posttranslační modifikace, která obecně řídí proteiny pro degradaci proteazomem nebo lysosomy. Ubivitinace se však podílí na mnoha jiných buněčných procesech, včetně regulace transkripce, opravy DNA, regulace interakcí protein-protein a vazby s ubikvitinem (Stringer & Piper 2011). Ubikvitinace je katalyzována sekvenčním působením enzymu aktivujícího ubikvitin (E1), enzymu konjugujícího ubikvitin (E2) a ligázy ubikvitinového proteinu (E3). U lidí existuje jeden základní E1 a více než 30 odlišných E2, E3,

z nichž se odhaduje, že jsou z velké části zodpovědné za udělení specifičnosti ubikvitinace (Ciechanover & Schwartz 2004; Fang & Weissman 2004). Ubikvitinace je nezbytná pro četné buněčné a vývojové procesy, včetně kontroly kvality proteinu, růstu, apoptózy, prezentace antigenu, opravy DNA a přenosu signálu. Proteiny mohou být modifikovány buď řetězci molekul ubikvitinu (polyubikvitinace nebo multiubikvitinace) nebo jednou nebo více jedinými ubikvitinovými částmi (monoubikvitinace). Nejvíce charakterizovaná úloha ubikvitinu spočívá v cílení proteinů na degradaci 26S proteazomem po modifikaci řetězců čtyř nebo více ubikvitinů spojených prostřednictvím Lys-48 (K48) ubikvitinu. K63-vázané polyubikvitinové řetězce hrají zásadní roli v aktivaci jaderného faktoru-KB (NF-κB) indukovaného cytokiny a zapojení receptorů podobných Toll (Chen 2005). Ubikvitinace K63 a monoubikvitinace jsou také zahrnuty do vezikulárního přenosu proteinů, nukleocytoplazmatického transportu a opravy DNA (Sigismund et al. 2004; Hicke 2001). Existují také důkazy, že jiné ubikvitinové vazby hrají kritické role, včetně aktivace ubikvitinových ligáz samotných (Ben-Saadon et al. 2006). Změny ubikvitinace jsou pozorovány ve většině, ne-li ve všech, rakovinových buňkách. To se projevuje destabilizací nádorových supresorů, jako je p53, a nadměrné exprese protoonkogenů, včetně c-myC a c-Jun (Ciechanover & Schwartz 2004). Ubikvitinace je dynamický proces (Stringer & Piper 2011). Ubikvitin-proteasomová dráha je nezbytná pro buněčné události vyžadující degradaci proteinu specifickou pro substrát, jako je např. progrese buněčného cyklu, endocytóza membránového receptoru, prezentace antigenu v imunitním systému a fertilizace (Sutovsky et al. 2004). Systém ubikvitin-proteazom je zodpovědný za regulovanou proteolýzu specifickou pro substrát – 75 % všech eukaryotických proteinů (Sutovsky 2011). Ubikvitin je malý, vysoce konzervovaný chaperonový protein (8,5 kDa), který se kovalentně váže na substrátové proteiny prostřednictvím vícestupňové enzymatické dráhy katalyzované enzymatickými aktivitami enzymu aktivujícího ubikvitin E1 (UBA1), enzym konjugující ubikvitin E2 (enzymy UBC) a ubikvitin specifický pro substrát ligázy E3 (UBE-enzymy). První molekula ubikvitinu se váže na vnitřní lysinový zbytek substrátového proteinu; multi-ubikvitinový isopeptidový řetězec je následně tvořen tandemovou ligací dalších molekul ubikvitinu (Glickman & Ciechanover 2002). Ubikvitin se přidává k proteinům E3 ubikvitinovými ligázami jako kovalentní modifikace jednoho nebo více lysinových zbytků, stejně jako ne-lysinových aminokyselin. Ubikvitin samotný obsahuje sedm lysinů, z nichž každý může být také ubikvitinovaný, což vede k polyubikvitinovaným řetězcům (Stringer & Piper 2011). UBA1 je prvním enzymem v enzymatické kaskádě vedoucí k ubikvitinaci proteinů. Evolučně konzervovaný enzym u savců UBA1 aktivuje ubikvitin prostřednictvím dvoukrokové

intramolekulární ATP-dependentní reakce za vzniku vysoce energetického E1-thiolesterového meziproduktu; aktivovaná ubikvitinová skupina je pak přenesena na enzym E2 konjugovaný s ubikvitinem, který slouží jako nosič aktivovaného ubikvitinu (Glickman & Ciechanover 2002). UBA1 má dvě aktivní místa, z nichž každé obsahuje jednu molekulu ubikvitinu. Dvě izoformy UBA1, Ela (117 kDa) a Elb (110 kDa) byly lokalizovány v jádře a cytoplazmě savců (Stephen et al. 1997). Úloha UBA1 byla popsána v progresi buněk. Kromě ubikvitinovaného, exprimovaného genu Ubel x byla popsána exprese specifická pro varlata pro chromozom Y nesený genem Ube1 y a považovaná za nezbytnou pro spermatogenezi u myší (Odorisio et al. 1996). Krysí homolog myšího genu Ube1 y byl vysoce exprimován ve spermatogonii, ve srovnání se spermatocyty, spermatidy a Sertoliho buňkami v krysích varlatech (Du et al. 2008). Baska et al. (2008) detekovali enzymaticky aktivní enzym UBA1 v bovinní epididymální tekutině pomocí testu Western blotting (WB) a thiolester, což naznačuje zapojení extracelulární ubikvitinace do kontroly obratu luminálního epididymálního proteinu a dozrávání epididymálních spermií. Kromě spermatogeneze a dozrávání spermií byl UBA1 detekován v proteomu plně diferencovaných spermií krysy, kde dochází k fosforylaci během kondenzace spermií (Baker et al. 2010). Všechna tato fakta naznačují, že UBA1 je přenesen do zralých spermií a mohl by hrát důležitou roli během oplození. Studie Sutovsky et al. (2004) prokázala, že ubiquitin-proteasomová dráha se účastní interakce spermatu s oocytem během fertilizace savců. Proteazomální inhibitory a další činidla, která interferují s funkcí proteasomu spermií (protilátky, peptidy a mutantní ubikvitin), účinně a někdy zcela inhibují fertilizaci savců (Zimmerman & Sutovsky 2009). Díky jedinečným strukturním a funkčním vlastnostem akrozomu savčích spermií jsou proteazomy akrozomů spermií lokalizovány extracelulárně, tj. navázány na povrchu akrosomů u lidí, hlodavců a kopytníků (Sutovsky 2011). Proteasomy jsou pravděpodobně spojeny s vnitřními a vnějšími akrosomálními membránami spermií během akrozomální biogeneze ve stadiu spermatid (Rivkin et al. 2009). V důsledku toho se zdá, že proteazomy jsou vystaveny na povrchu akrozomu savčích spermií a jsou schopny přímo reagovat se ZP během oplození (Sutovsky et al. 2004). Evoluční zachování fertilizačního mechanismu závislého na ubikvitinu může přesahovat rámec živočišné říše na rostliny, kde se zdá, že adheze a vedení pylu závisí na ubikvitinu (Kim et al. 2006). Inhibitory by v zásadě měly blokovat všechny funkce ubikvitinace. Inhibitor ubiquitinu E1 by měl blokovat jak proteazomální, tak neproteasomální funkce ubikvitinace. V souladu s tím PYR-41 (4[4-(5-itro-furan-2-ylmethylen)-3 ethylester kyseliny 5-dioxopyrazolidin-1-yl] benzoové) blokoval jak ubikvitinaci, tak proteasomální degradaci testovaného substrátu, GFP ^{u}, který byl použit pro hodnocení funkce systému

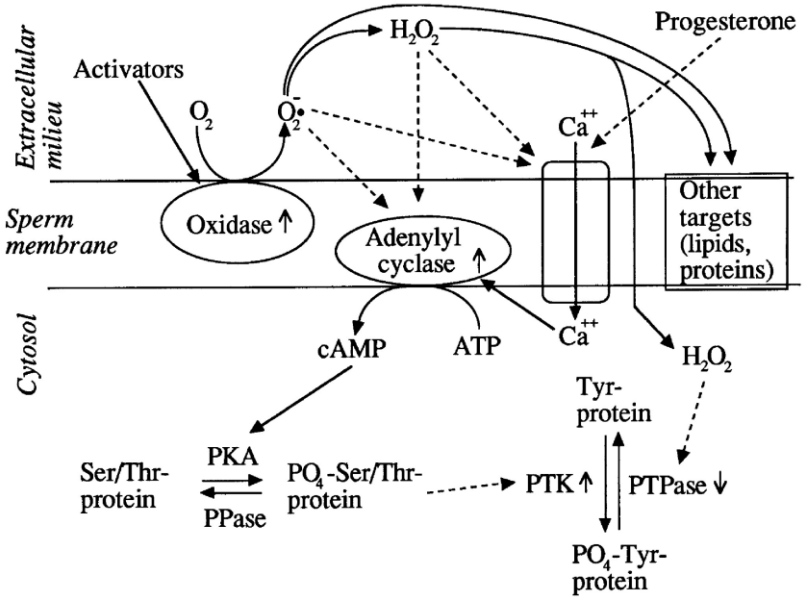
ubikvitin-proteazom (Bence et al. 2005), a také vede ke zvýšení hladiny cyklinu D3. Mezi nonproteasomální role ubikvitinace patří down-regulace signalizace EGFR, která podléhá ligandem indukované fosforylaci tyrosinu. Tato stimulovaná fosforylace vede k ubikvitinaci EGFR a případnému přenosu aktivovaných receptorů do lysosomů a jejich destrukci. Tento proces je závislý na monoubikvitinaci a na ubikvitinaci EGFR zprostředkované K63, jakož i na monoubikvitinaci mnoha dalších proteinů podílejících se na přenosu membrán (Dikic 2003). Pro další charakterizaci inhibice El pomocí PYR-41 byla stanovena degradace cyklinu E s použitím cytosolu (S100), který obsahuje všechny složky systému ubikvitin-proteazom nezbytný pro degradaci tohoto proteinu (Dai & Li 2001). PYR-41 účinně blokoval degradaci cyklinu E, který byl obrácen přidáním exogenního E1 v konečné koncentraci 50 nmol/1 po období 30 min. Naopak inhibice degradace cyklinu E inhibitorem proteazomu (MG132) nebyla překonána přidáním El. PYR-41 také blokuje in vitro ubikvitinem zprostředkovanou degradaci p53 v lyzátech králičích retikulocytů při stimulaci lidským papiloma virem E6 (Scheffner etal. 1993). PYR-41 tedy inhibuje El, aby se zabránilo proteazomální degradaci zprostředkované ubikvitinem. Ve studii Yi et al. (2012) zjistili, že specifický inhibitor UBA1, PYR-41, změnil remodelaci vnější acrosomální membrány během kapacitace spermií. Ačkoli byly spermie životaschopné a pohyblivé i po kapacitaci v přítomnosti PYR-41, vykazovaly signifikantně sníženou míru oplození během oplození in vitro. Podobně byla rychlost oplození snížena přidáním PYR-41 přímo do fertilizačního média během IVF. Ve Western Blotu (WB) byly vysoké Mr vazby, což svědčí o ubikvitinaci proteinů detekováných v nesenzitizovaných spermiích protilátkami proti ubikvitinu, WB s antifosfotyrosinovými protilátkami a protilátkami proti akrosomálním proteinům SPINK2 (inhibitor acrosinu) a AQN1 (spermadhesin) ukázaly, že PYR-41 změnil kapacitně indukovanou modifikaci těchto proteinů. Stručně řečeno, zdá se, že ubikvitinace bílkovin de novo zahrnující UBA1 přispívá ke kapacitaci spermií a funkci akrosomů během oplození. V této studii byla testována hypotéza, zda enzym aktivující ubikvitin typu E1 (UBA1) je zodpovědný za aktivaci ubikvitinu, což je počáteční krok ligace ubikvitin-protein, která je vyžadována během kapacitace kančího spermatu in vitro. Čerstvě odebrané spermie kanců byly kapacitovány po dobu 4 hodin v TL-HEPES-PVA doplněném 2 % BSA s inhibitorem UBA1 (10 ul nebo 100 ml) a DMSO (prostředí pro inhibitor UBA1). Měření kapacitně indukované expozice průtokovou cytometrií (FITC-PNA lektinový vazebný test) ukázala, že UBA1 statisticky významně inhiboval remodelaci akrosomu během kondenzace.

3.4 Proteomické změny ve spermii

Vazba a lokalizace dalších faktorů pocházejících ze semenné plazmy nebo epididymální tekutiny jsou také modifikovány během kapacitace spermií. Bylo zjištěno, že bovinní protein ze semenné plazmy nazývaný BSP váže fosfatidylcholinové molekuly spermie a usnadňuje heparinem indukovanou kapacitaci (Thérien et al. 1995). Navíc tyto bovinní proteiny sdílely antigenní determinanty s proteiny vázajícími fosfatidylcholin nacházející se v semenné plazmě různých druhů, včetně člověka (Leblond et al. 1993).

Imunofluorescenční pozorování na spermiích fixovaných methanolem ukázalo progresivní změnu v lokalizaci protein tyrosinové fosforylace z bičíku do akrosomální oblasti během kapacitace (Naz et al. 1991). Jiní vědci pozorovali časově závislé zvýšení protein tyrosinové fosforylace během kapacitace spermií, ale nepokusili se lokalizovat tyto proteiny (Luconi et al. 1995).

Obrázek 1: Hypotetické signalizační cesty během kapacitace spermií (de Lamirande et al. 1997).



Během kapacitace spermií dochází k různým dějům, které jsou znázorněny na obrázku 1. Generace ROS a příliv vápníku se objevují jako první při kapacitaci. Na počátku kapacitace je dosud neidentifikovaný biologický efektor, který aktivuje oxidázu na úrovni plazmatické membrány spermií, což vede k okamžité a trvalé produkci superoxiázového anionu (O^{2-}). Tento ROS nebo jeho produkt dismutace, peroxid vodíku (H_2O_2), aktivuje adenylylcyklázu, jak je pozorováno v jiných buněčných systémech, a zároveň podporuje příliv vápníku prostřednictvím inaktivace vápenatých ATPáz nebo vápenatých kanálů (přerušované čáry naznačují hypotetický jev). Je také možné, že ROS transformují lipidy a podporují

tak jejich extrakci z plazmatické membrány. Navíc ROS může oxidovat proteiny a modifikovat jejich strukturu a funkce. Vliv vápníku, který by mohl být indukován působením progesteronu na specifický receptor nebo inaktivaci vápenatých ATPáz, se také objevuje na začátku kapacitace a funguje maximálně 2 hodiny. Vápník by mohl aktivovat adenylylcyklázu stejně jako mnoho dalších enzymů, jako je protein kinasa C a fosfolipázy, pro které zatím neexistují žádné důkazy o jejich zapojení do kapacitace spermií. Stimulace aktivity adenylylcyklázy by vedla ke zvýšení tvorby cAMP. V důsledku produkce tohoto druhého posla by se aktivovala proteinová kináza A (PKA) a způsobila by zvýšení fosforylace serinu/threoninu a dále modulaci jejich funkcí, aby vyvolala celkovou buněčnou odpověď. Zvýšení fosforylace Ser/Thr může být způsobeno inhibicí aktivity proteinové fosfatázy. Protein tyrosin kinázy (PTK) je potenciálním cílem pro PKA nebo jejich fosforylované substráty; následné zvýšení PTK aktivity by mělo za následek fosforylaci různých proteinů, umístění (fibrózní plášť, membrána, bičík, hlava) by se lišila se stupněm dosažené kapacitace. Navíc zvýšení obsahu proteinu fosfotyrosinu může být způsobeno inhibicí protein-tyrosinové-fosfatázy (PTPázy), protože tyto enzymy jsou velmi citlivé na oxidaci (de Lamirande et al. 1997).

3.5 Hyperaktivace

Hyperaktivace spermie nastává po kapacitaci ještě před oplozením vajíčka. Hyperaktivace je typ motility, při kterém nedochází k progresivnímu pohybu spermie, je to energetický, zběsilý pohyb bičíku spermie, který má za úkol najít a dopravit spermii k vajíčku (Yanagimachi 1982). Hyperaktivace spermií je spojena se zvýšenou rychlostí, sníženou linearitou a zvýšenou amplitudou pohybu hlavičky při přesunu (Robertson et al. 1988). Kapacitace umožní spermii vazbu na vajíčko a dále akrozomální reakci, ale k proniknutí spermie do vajíčka je nutná hyperaktivace, to znamená, že bez hyperaktivace nemůže dojít k oplození vajíčka (Boatman & Robin 1991). Yanagimachi (1969) zjistil, že mechanický tah způsobený hyperaktivní motilitou je životně důležitý pro spermie, aby pronikly přes zona pellucida oocytu. Spermie uvnitř epididymu jsou neaktivní nebo jen slabě pohyblivé. Jsou-li in vivo nebo do fyziologického média in vitro uvolňovány do semenné plazmy, začnou prudce plavat v téměř přímé trajektorii. Hyperaktivovaná motilita je definována jako plavecký vzor, který ukazuje většina spermií získaných z ampule oviduktu při oplození. Bičík hyperaktivovaných spermií je daleko více ohnutý a jejich pohyb je obvykle méně symetrický než bičík aktivovaných spermií. Hyperaktivované spermie mají tendenci prudce plavat v kruzích na sklíčku mikroskopu. U některých druhů jsou spermie úplně hyperactivované

a pohybují se do tvaru čísla osm (Ho & Suarez 2001). Hyperaktivita má další funkce, jako je uvolňování spermií, které jsou připojeny k epitelu oviduktu (Suarez 2002) a také zlepšení pohybu spermií hlenem vaječníku a cumulus matrix vajíčka (Suarez & Dai 1992). Hyperaktivace je indukována během kapacitace spermií v samičím reprodukčním traktu, ale není známa ani extracelulární spoušť, ani cesta signální transdukce. Řada fyziologických faktorů, jako jsou Ca^{2+}, cAMP, bikarbonátové a metabolické substráty, je nezbytná pro zahájení a udržení hyperaktivované motility in vitro. Ca^{2+} hraje hlavní roli v regulaci hyperaktivované motility (Yanagimachi 1994). Jako intracelulární signál se Ca^{2+} podílí na kontrole hyperaktivity spermií. Ve studii Schmid & Kamp (2004) byla indukována hyperaktivace v intaktních spermiích kondenzačním médiem obsahujícím Ca^{2+} v rozsahu mM. Kondenzace je doprovázena změnami v membránové struktuře, čímž se zvyšuje přítok $Ca^{2+,}$ který spouští hyperaktivaci a akrozomální reakci. V důsledku změn v membránové struktuře mají spermie sklon k agregaci hlaviček, zejména u kanců (Harayama et al. 1998). U intaktních spermií myší a kanců byla pozorována přechodná hyperaktivita, pokud byl přítok Ca^{2+} způsoben ionoforem Ca^{2+} A23187. Zdá se, že stupeň hyperaktivace závisí na různých faktorech, zejména na koncentracích Ca2+ a ionoforu (Suarez *et al.* 1987). Inositol 1,4,5 – trisfosfát (IP3) uvolňuje Ca^{2+} z některých zásob a IP3 receptory byly lokalizovány protilátkami na bázi bičíku. Heterotrimerní G proteiny z rodiny Gq/11 selektivně aktivují β izoformy fosfatidylinositol specifické fosfolipázy C pro produkci IP3. Jak Gaq/11, tak fosfolipáza C – β byly lokalizovány v polovině bičíku spermií (Walensky & Snyder 1995). Kromě Ca^{2+} úložiště s IP3 receptorem může být vyžadován extracelulární Ca^{2+} pro udržení hyperaktivace po dlouhou dobu doplňováním intracelulárního zásobního roztoku a udržováním vysokého cytoplazmatického Ca^{2+}. Pokud není extracelulární Ca^{2+} k dispozici, hyperaktivované spermie se vrátí k aktivované motilitě (Yanagimachi 1994). Aktivace cyklických nukleotidových kanálů pomocí cAMP / cGMP může být jedním z mechanismů poskytujících vstup Ca^{2+}. Zvýšený intracelulární cAMP byl spojován s expresí hyperaktivované motility (White & Aitken 1989). Ca^{2+} a cAMP mohou také modulovat fosforylaci proteinu (Tash 1989). Zvýšená fosforylace proteinové tyrosinu u bičíků je spojena s hyperaktivovanou motilitou (Si & Okuno 1999). Fosforylace tyrosinu, defosforylace a fosforylace 80 kDa proteinu u křeččího spermatu jsou úzce spojeny se získáváním, ztrátou a opětovným získáváním hyperaktivace závislé na teplotě. Při pozorování defosforylace se předpokládá, že fosfatázy se podílejí na regulaci hyperaktivace spermií (Si 1999).

3.5.1 Chemotaxe

Chemotaxe byla dobře dokumentována u bezobratlých, ve kterých jsou velmi nízké koncentrace peptidů, jako je atraktant vylučovaný vajíčky mořských ježků, které přitahují spermie určitým specifickým způsobem (Ho & Suarez 2001). Podle definice je chemotaxe řízený pohyb spermií směrem ke zdroji chemického gradientu, který obvykle pochází z oocytu. Zatímco funkce, které jsou dosud přisuzovány hyperaktivaci, pomáhají spermiím nepřímo dosáhnout oocytu (Chang & Suarez 2010). Intracelulární Ca^{2+} zprostředkovává chemotaxi ve spermiích mořského ježka, přičemž zvýšení intracelulárního Ca^{2+} zvyšuje asymetrii bičíkovitého ohybu a zakřivení dráhy plavání. Podobně jako u mořského hyperaktivované spermie savců vykazují zvýšenou asymetrii bičíkových ohybů a často mění směr. Tyto pohyby by mohly umožnit, aby spermie dosáhly oocytu (Cook et al. 1994). Analogické interakce ligand-receptor u obratlovců nebyla charakterizována, i když lidské spermie jsou přitahovány folikulární tekutinou in vitro (Ralt et al. 1994). Molekuly podobné odorantu by mohly fungovat jako chemoatraktanty pro spermie, které by je vedly k oocytu. V propustných preparátech čichových řas byly zjištěny odoranty stimulující produkci cAMP a IP3. V bičíku spermií jsou interakce chemotaktického ligandu s receptorem, které způsobují uvolnění Ca^{2+}, které jsou indukované IP3, což může přispět k vysokým koncentracím intracelulárních Ca^{2+}, který iniciuje ohyb bičíku a následnou změnu motility (Ho & Suarez 2001).

3.6 Akrozomální reakce

Zona pellucida je místem akrozomální reakce během fertilizace (Florman et al. 1982). Zona pellucida mnoha savčích druhů je konstruována ze čtyř bílkovin (Conner et al. 2005). Progesteron, který je uvolňován kumulárními buňkami, může ovlivnit spermie v blízkosti vajíčka v době oplození. Účinky progesteronu jsou spíše na modulaci flagelární motility a chemotaxe než na akrozomání reakci (Harper et al. 2004). Spermiová interakce s oblastí zona pellucida vyvolává řadu počátečních odpovědí, které jsou potřebné k vytvoření trvalého influxu Ca^{2+}, který vede k akrozomální reakci. Při zvýšení intracelulárního pH je možné použít fluorescenční látky (Florman et al., 1989), které jsou závisle řízeny G proteinem (Arnoult et al. 1996 b). Heterotrimerní GTP-vázající proteiny, G1 a G2, jsou aktivovány ve spermiích pomocí zona pellucidy (Endo et al. 1988). Zvýšení pH je klíčovým krokem v signální transdukci, která je blokována inhibicí ZP3 proteinem, který je aktivovaný G proteinem ve spermiích. Specifická úloha pH v působení ZP3 nebyla objevena, ale může spekulativně zahrnovat zvýšení

Ca^{2+} signálů (Babcock & Pfeiffer 1987). Dále zona pellucida aktivuje spermiovou fosfolipázu C (PLC) (Roldan et al. 1994). V hlavičce spermií jsou přítomny další izoformy PLC, které mohou přispívat k ZP3 reakcím. PLC hydrolyzuje fosfatidylinositol – 1,4 – bisfosfát (PIP2) za vzniku dvou produktů: inositol – 1,4,5 – trifosfát (IP3), který je přítomný v IP3 receptorech umístěných v akrozomální membráně, a diacylglycerol (Walensky & Snyder 1995). ZP3 způsobuje depolarizaci membránového potenciálu, který je dostatečně silný pro aktivaci T kanálů, ale tato reakce je pomalá a lze očekávat, že spustí napěťově závislou inaktivaci předtím, než dojde k významnému proudění (Arnoult et al. 1996 b). Byly popsány alternativní mechanismy aktivace Ca^{2+} kanálů (Perez-Reyes 2003), tyto kanály ve spermiích mohou být regulovány buď fosforylací tyrosinu (Arnoult et al. 1997), nebo kalmodulinem (Lopez-Gonzalez et al. 2001).

Zona pellucida reguluje akrozomální reakci, je ústředním bodem modelů oplodnění. Stupně tohoto signalizačního mechanismu zahrnují: 1) rané události, jako je aktivace G proteinu, intracelulární alkalinizaci a přechodný vstup Ca^{2+}, 2) vedou k trvalému přílivu Ca^{2+}, jehož hlavní složka je nesena kanály TRPC (přechodné kationtové kanály potenciálních receptorů) a 3) následné události, závislé na aktivaci fosfoinositidu protein dependentní kinázy (Florman et al. 2008).

3.7 Oplození

Za normálních okolností jsou spermie přítomny v ampuli oviductu v době ovulace, spermie musí překonat bariéry kumulus oophorus / coronu radiatu a zonu pellucidu (Piko 1969). Při kontaktu membrány spermie s membránou oophorus vajíčka před penetrací chyběl spermii akrozom (Szollosi & Hunter 1973). Zona pellucida se skládá ze tří glykoproteinových receptorů označených ZP1, ZP2 a ZP3. ZP1 a ZP2 poskytují správný prostorový kontext pro ZP3 (Wassarman 1988). ZP3 má řadu charakteristik, které indukují akrozomální reakci (a) ZP3 představuje agonistickou aktivitu, která je detekována buď ve strukturálně neporušené ZP, nebo v rozpustných extraktech ZP, které jsou izolovány z oocytů a z neoplozeného vejce; (b) agonistická aktivita nebyla pozorována u ZP získané z % buněčných embryí a ZP3 izolovaný v této vývojové fázi vykazuje odpovídající neúčinnost; (c) ZP3 se váže na specifickou a nasycenou třídu vazebných míst, které jsou přítomny v přední části hlavičky akrosom-intaktních spermií a které nejsou detekovatelné po AR; (d) ZP3 aktivuje Gi, GTP – vazebný regulační protein (G protein) v permeabilizovaných spermiích (Ward et al. 1992). Bylo prokázáno, že ZP3 má před oplozením dvě funkce, za prvé ZP3 zprostředkovává

specifickou vazbu akrosom-intaktní spermie na ZP, a za druhé je zodpovědný za indukci akrosomální exocytózy (Florman & Wassarman 1985). U prasat se glykoprotein extracelulární matrice, nazvaný ZP3a, podílí na adhezivní aktivitě spermií (Sacco et al. 1989). Transmembránová signalizace prostřednictvím receptorů spojených G proteinem je běžným mechanismem produkujícím intracelulární sekundární posly a iontové změny (Dohlman et al. 1991). Interní Ca^{2+} je základní efektor ZP3 signalizace. Jedině živé spermie, které obsahují fluorescenční iontové indikátory, vykazují zvýšení Ca^{2+} iontů, které jsou podporovány agonisty ZP a které předcházejí exocytóze (Florman et al. 1989). Agonistická exogenóza ZP je inhibována několika různými skupinami vstupních blokátorů Ca^{2+} (Florman et al. 1992). Ca^{2+} je také důležitým regulátorem AR produkovaných u savčích spermií pomocí alternativních agonistů získaných ze samičího reprodukčního traktu (Blackmore et al. 1991). V důsledku toho se všeobecně předpokládá, že zvýšení Ca^{2+} iontů a následná aktivace downstreamových efektorů poskytuje konečnou společnou dráhu pro indukci exocytózy (Clark et al. 1993). S akrozomální exocytózou souvisí důležité enzymy: akrosin a hyaluronidasa. Hyaluronidasa se účastní minimálně tří hlavních aspektů fertilizace: a) enzymatická degradace kyseliny hyaluronové (HA) čímž pomáhá při pronikání spermií kumulooocytární vrstvou, která obklopuje zona pellucida, (b) vazba na zona pellucida a (c) spolu s proteiny zona pellucida způsobují indukce akrozomální reakce (Cherr et al. 2001). Acrozomální exocytóza zajišťuje expozici a uvolňování rozpustných a akrozomálních matricových proteinů. Současný model procesu penetrace zahrnuje střídání cyklů (1) vazba spermie na ZP při akrozomální reakci (sekundární vazbu), (2) omezenou proteolýzu matrice a (3) uvolnění spermie a penetraci do vajíčka. Acrosin je jedním z hlavních účastníků tohoto modelu. Akrosin se podílí na sekundární vazbě spermie na oocyt s lokalizací akrosinu na vnitřní straně akrozomální membrány. Akrosin se také podílí na vazbě oocytu na povrch spermie, ale účel této vazby je odlišný od sekundární vazby spermie na oocyt (Zigo et al. 2015). Jakmile spermie projde přes zona pellucida, spustí se kaskáda ve vajíčku a vytvoří zablokování zona pellucida, což vytváří ochranu proti polyspermii (Szollosi 1962).

Při penetraci spermie do vajíčka prochází společně se spermií i bičík spermie, to bylo zjištěno na základě rozdílných mitochondrií ve vajíčku. V krčku spermie jsou vlastní mitochondrie spermie (Szollosi & Hunter 1973).

4 Metody

Pro zjištění oplozeníschopnosti spermií lze použít několi metod, nejznámější z nich jsou: fosforylace viz 4.1 fosforylace, computer assisted sperm analyses (CASA) viz 4.2 CASA a průtoková cytometrie. Průtoková cytometrie vyžaduje, aby spermie byly v jednobuněčné suspenzi s minimální aglutinací (monodisperzní suspenze). Během několika minut může průtokový cytometr získat data o všech subpopulacích ve vzorku, což je ideální pro stanovení heterogenních populací, jako jsou spermie. Průtoková cytometrie je nyní aplikována na vyhodnocení vlastností spermatu, jako je životaschopnost buněk, integrita akrozomů, mitochondriální funkce, stav kondenzace, tekutost membrán a stav DNA (Gillan et al. 2005).

4.1 Fosforylace proteinů spermie

Fosforylace proteinů je post-translační modifikační událost, která působí jako jeden z regulačních mechanismů buněk pro regulaci různých procesů, jako je buněčný růst, kontrola buněčného cyklu, cytoskeletová sestava, modulace iontového proudu a regulace receptoru (Pawson 2004). Ve skutečnosti je fosforylace jedním z nejběžnějších mechanismů v eukaryotických buňkách a zabezpečuje regulaci aktivity proteinu přidání nebo odstranění fosfátových skupin ze serinových, threoninových nebo tyrosinových proteinových zbytků. Přidání nebo odstranění fosfátových skupin může vyvolat alosterické modifikace vedoucí ke konformačním změnám v proteinech vedoucí buď k jejich aktivaci, nebo inaktivaci. Zralé spermie jsou terminálně diferencované a specializované buňky. Jsou vysoce kompartmentalizované, ale nemají žádnou významnou transkripční a translační aktivitu. Proto je možné zdůvodnit význam posttranslačních modifikací, jako je fosforylace/defosforylace proteinů, při regulaci důležitých jevů, jako je kondenzace spermií, hyperaktivní motilita a reakce akrosomů, které jsou nezbytné k tomu, aby spermie dosáhly, vázaly, pronikly a fúzovaly s oocytem. Fosforylační / defosforylační stav fosfoproteinů je řízen aktivitou protein kináz a fosfatáz a protizánětlivé aktivity těchto kináz a fosfatáz poskytují buňkám "přepínač", který může zapnout nebo vypnout funkci různých proteinů. Dřívější studie uvádějí přítomnost různých fosfoproteinů, protein kináz a proteinových fosfatáz v savčích spermiích a implikují jejich úlohu v akvizici motility spermií, kapacitaci a akrosomální reakci (Tash 1983). Fosforylace může nastat na serinových, threoninových a tyrosinových zbytcích v proteinech. Ačkoliv fosforylace serinu / threoninu a fosforylace proteinů tyrosinu byla pozorována u spermií, fosforylace tyrosinu je velmi

důležitá a může být primárním nebo dokonce výlučným indikátorem dráhy přenosu signálu v buňce (Naz & Rajesh 2004). Bylo pozorováno, že různé kompartmenty lidských spermií podléhají specifické sekvenci fosforylace během kondenzace a po vazbě na zona pellucida (Sakkas et al. 2003). Aby se vytvořila vazba mezi různými fosforylovanými proteiny a specifickou funkcí spermií, je nutné diferencovaně lokalizovat tyrosinové fosforylované proteiny v různých oblastech spermie. Bičík se jeví jako hlavní složka spermií, která podléhá fosforylaci tyrosinu u většiny druhů kromě kanců (Petrunkina et al. 2001). V kančích spermiích indukuje kondenzace fosforylaci tyrosinových proteinů plazmatických membrán, o kterých se předpokládá, že iniciují vazbu na zona pellucida a indukují reakci akrozomu. Bylo prokázáno, že kondenzace indukuje fosforylaci tyrosinu tří hlavních (27 kDa, 37 kDa a 40 kDa) a tří menších (34 kDa, 47 kDa a 55 kDa) plazmatických membránových proteinů (Flesch et al. 1999). V pozdější studii, vykazovaly dva proteiny plazmatické membrány izolované z kapacitních kančích spermií (35 kDa a 46 kDa) vysokou vazebnou afinitu k zona pellucida (Asquith et al. 2004). Tyto dva proteiny jsou s největší pravděpodobností 34 a 47 kDa proteiny identifikované dříve. Ačkoli je fosforylace proteinů spermií klíčovým znakem kapacitace, není jasné, jak se fosforylace tyrosinu těchto proteinů podílí na rozpoznávání spermií nebo interakci a na exocytóze akrosomů. Ve studii Asquith et al. (2004) zkoumali vztah mezi fosforylací proteinu a schopností spermií myší interakci s zona pellucida. Identifikovali dva chaperonové proteiny, konkrétně endoplasmin (erp99) a protein 60 tepelného šoku (hsp60) exprimovaný na povrchu myších spermií. Proteiny erp99 i hsp60 jsou fosforylovány tyrosinem a jsou lokalizovány na plazmatické membráně hlavičce spermií, oblasti, která se účastní vazby na zona pellucida. Navrhli, že "aktivace" proteinů erp99 a hsp60 fosforylací tyrosinu během kondenzace může vyvolat konformační změny usnadňující tvorbu funkčního komplexu zona pellucida receptoru na povrchu spermií. Zajímavé je, že interakce spermie-oviduktální epiteliální buňky in vitro modifikuje fosforylaci tyrosinu a kapacitaci spermií. Selektivní vazba spermií k oviduktálním epiteliálním buňkám potlačuje fosforylaci tyrosinových proteinů spermií u kanců (Petrunkina et al. 2001). Tato ovulační modulace tyrosinové fosforylace / kapacitace může pomoci synchronizovat funkci spermií s dobou ovulace. Ukázalo se, že zvýšení fosforylace proteintyrosinu během kondenzace je regulováno cestou závislou na cAMP zahrnující protein kinázu A (PKA) ve spermiích různých druhů včetně kanců (Kalab et al. 1998). Studie ukázaly, že fosforylace proteinů spermií je důležitým aspektem kondenzace a bylo prokázáno, že je spojena s hyperaktivovanou motilitou, vazbou zona pellucida a reakcí akrosomů (Naz & Rajesh 2004).

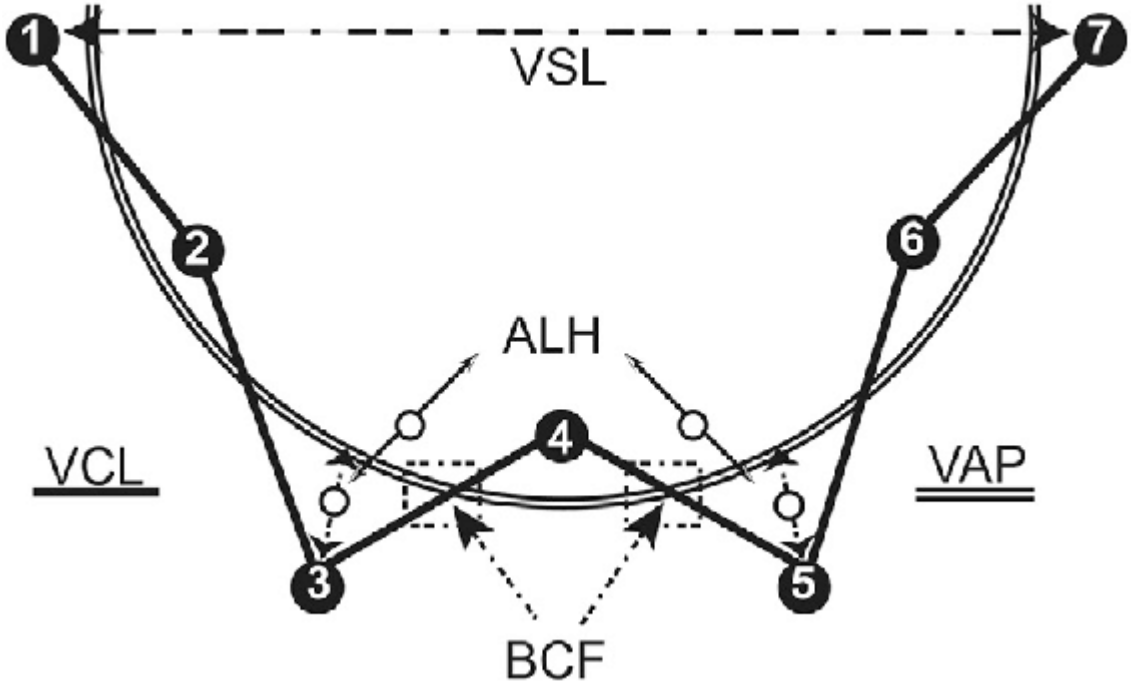
4.2 CASA

Počítačem podporovaná analýza spermií (CASA) je účinným nástrojem pro objektivní hodnocení pohyblivosti spermií, a proto se často používá pro hodnocení kvality spermatu člověka a zvířat. Kvantitativní hodnocení spermatu CASA je však založeno na kinematických parametrech jednotlivých spermií, které jsou rekonstruovány pouze z pohybů jejich hlaviček, protože přístroj CASA obvykle neumožňuje přímou analýzu pohybu bičíků, které generují hyperaktivitu spermií (Mortimer 1997). Proto k detekci hyperaktivních spermií pomocí CASA vyžadují kinematické parametry pohybů spermií, které korelují s charakteristickými změnami pohybu bičíků. Pro přesné stanovení hyperaktivních spermií pomocí CASA musí být definován soubor parametrů pro určitý druh s přihlédnutím ke vzorkovací frekvenci obrazu (Mortimer & Maxwell 1999). Počítačový systém analýzy spermatu (CASA) se vyvíjí zhruba 40 let díky pokrokům v zařízeních zachycujících obraz z mikroskopu. Systém CASA má několik funkcí: (1) zobrazuje několik po sobě jdoucích obrázků suspenze spermií na detektorovém poli; (2) detekuje objekty na základě intenzity pixelů v rámci nebo rozptylu světla; a (3) pomocí speciálního softwaru extrahuje požadované informace a vytváří požadované výstupy. Systémy poskytují mnoho hodnot pro pohyb nebo morfologii každé studované spermie. Moderní systémy CASA mohou automaticky zobrazit několik polí v mělké komůrce pro snímání rychlých snímků o velikosti 500 až 2000 spermií, 50 nebo 60 snímků za sekundu v čirých nebo komplexních rozšiřovačích a za < 2 minuty ukládat informace pro 30 snímků, u kterých poskytuje souhrnné údaje pro každou spermii a populaci. Několik systémů hodnotí morfologii spermií současně s pohybem. CASA nemůže přesně předpovídat „plodnost", která bude získána se vzorkem nebo předmětem spermatu (Amann & Waberski 2014).

Parametry zkoumané metodou Casa jsou VCL – curvilinear velocity – rychlost hlavičky na skutečné dráze, průměrná rychlost mezi body měření (křivočará rychlost), VSL – straight line velocity – rychlost hlavičky na přímé dráze, mezi výchozím a konečným bodem měření (lineární rychlost), VAP – average path velocity – rychlost hlavičky na nepřímé dráze (odvozena matematickou úpravou VCL), slouží k plynulejšímu vyjádření pohybu (střední rychlost), ALH – amplitude of lateral head displacemant – maximální šířka oscilace hlavičky, odvozeno z VCL a VAP, odráží pohyb bičíku, BCF – beat cross frequency – počet, kolikrát je skutečná dráha překřížena napřímenou dráhou, všechny tyto parametry jsou zobrazeny na obrázku číslo 2, STR – straightness – přímost napřímené dráhy (VSL/VAP x 100) [%], LIN – linearity – linearita skutečné dráhy (VSL/VCL x 100) [%] (Věžník et al. 2004; Simonik etal. 2014; Ramió et al. 2008), LIN – také značí progresivní motilitu (Velverde et al. 2018),

WOB – wobble – stupeň oscilace skutečné dráhy kolem její napřímené dráhy (VAP/VCL x 100) [%] (Věžník et al. 2004; Simonik etal. 2014; Ramió et al. 2008). Ve studii Ramió et al. (2008) byly spermie kapacitovány v IVC mediu, byly použity nativní vzorky a byly zjištěny tyto hodnoty metodou CASA po 4 h: totální motilita 69,4 ± 0,9 %, VCL 129,6 ± 1,3 μm/s, VSL 89,6 ± 1,8 μm/s, VAP 97,1 ± 1,1 μm/s, STR 92,0 ± 0,9 %, LIN 69,9 ± 1,0 %. Ve studii Matás et al. (2010) byly spermie s hodnotami VAP < 20 μm/s nemotilní. Ve studii Aparicio et al. (2005) byly spermie s hodnotami VAP < 10 μm/s nemotilní, spermie s hodnotami VAP > 15 μm/s byly motilní, spermie s rychlostí VAP 16 – 35 μm/s byly považovány za spermie se střední rychlostí, spermie s rychlostí VAP > 35 μm/s byly považovány za rychlé. V této studii byly spermie inkubovány v kapacitačním mediu TCM po dobu 1 hodiny, výsledné hodnoty jsou: VCL 67,75 ± 2,55 μm/s, VSL 40,95 ± 5,3 μm/s, VAP 49,65 ± 6,15 μm/s. Ve studii Schmid & Kamp (2004) byly spermie inkubovány v TALP-HEPES mediu po dobu 15 minut, poté byly změřeny hodnoty hyperaktivních a nehyperaktivovaných spermií. Nehyperaktivní spermie měly hodnoty VCL 84,2 ± 24,0 μm/s, VSL 35,5 ± 26,6 μm/s, VAP 71,1 ± 21,5 μm/s, LIN 41,5 ± 23,5 %, STR 48,2 ± 26 %. Hyperaktivní spermie měly hodnoty VCL 151,6 ± 33,5 μm/s, VSL 16,8 ± 9,1 μm/s, VAP 88,1 ± 18,6 μm/s, LIN 11,8 ± 7,3 %, STR 20,8 ± 13,6 %.

Obrázek 2: Schematické zobrazení kinetických parametrů měřených CASA systémem (Gray et al. 2015)



VCL – curvilinear velocity – rychlost na skutečné dráze

VSL – straight-line velocity – rychlost mezi výchozím a konečným bodem měření

VAP – average-path velocity – rychlost na napřímen dráze

ALH – amplitude of later head displacement – šířka oscilace hlavičky

BCF – beat cross frequency – místo křížení skutečné dráhy napřímenou dráhou (Věžník et al. 2004)

5 Materiál a metodika

5.1 Materiál

V pokusu byly použity spermie ze semenné dávky od kance plemene Landrase LDZ-67, které byly získány z inseminační stanice PROAGRO Nymburk a byly skladovány v termoboxu při teplotě 17 °C. Pro zjištění rozdílů v parametrech motility byly porovnány v experimentech používané komerční inseminační dávky a nativní ejakulát od kance plemene duroc DDU z odběrové stanice Skršín, které byly skladovány také v termoboxu při teplotě 17 °C. Pokusy se vzorky probíhaly při pokojové teplotě 21 °C.

Použité chemikálie pocházely od firmy SIGMA-ALDRICH z USA.

Z přístrojů byla použita centrifuga (Benchmark LC-8 series); počítačový program (CASA, computer assisted semen analysis; NIS-Elements, Nikon, Tokyo, Japan a Laboratory Imaging, Praha, Česká republika), která využívá mikroskop Eclipse E600 s fázovým kontrastem (Nikon, Tokyo, Japonsko), vybavený objektivem s negativním fázovým kontrastem (Nikon, Tokio, Japonsko), ohřevnou deskou nastavenou na 38 ºC (Tokai Hit, Shizuoka, Japonsko) a digitální kamerou DMK 23UM021 (The Imaging Source, Bremen, Německo).

5.2 Metodika

5.2.1 Příprava vzorků

Do plastových zkumavek bylo odpipetováno 5 ml suspenze spermií, které byly stočeny na centrifuze po dobu 10 minut při RCF 250 G a teplotě t = 17 °C. Následně byl odsát supernatant a byl přidán 1 ml PBS (0,01M Phospate buffered saline, 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl, pH 7,4), roztok byl resuspendován a byl doplněn PBS na objem 5 ml (tento proces se nazývá promývání). Proces promytí byl zopakován 2x. Po posledním promytí byla zkontrolována koncentrace spermií v Maklerově komůrce (Sefi-Medical instruments, Haifa, Izrael, hloubka komory 10 μm) výpočet viz rovnice 1.

Rovnice 1: Výpočet koncentrace spermií

$$\frac{počet\ spermií \times faktor\ konverze}{velikost\ pole \times počet\ čtverců \times tloušťka\ sklíčka \times ředění} = \frac{77 \times 1000}{(0{,}2 \times 0{,}2) \times 40 \times 0{,}1 \times \frac{1}{100}} = 48\ 125\ 000 \frac{spermií}{ml}$$

Pro kontrolu motility a pohybu spermií byly použity nativní spermie, které byly naředěny v PBS 9:1, a byla změřena jejich motilita, v počítačovém programu NIS AR 4 500.

5.2.2 Kapacitace spermií

K připravené peletce bez ředidla bylo přidáno 10 ml kapacitačního media TL-HEPES-PVA. Spermie resuspendované v kapacitačním mediu byly napipetovány po 0,5 ml do 1 ml ependorfek. Bylo připraveno 6 vzorků: 1. nemodifikovaný, 2. s přídavkem inhibitoru PYR-41 (100 m/M), 3. s přídavkem inhibitoru PYR-41 (10 m/M), 4. s přídavkem inhibitoru PYR-41 (25 m/M), 5. s přídavkem inhibitoru PYR-41 (50 m/M), 6. kontrola s přídavkem DMSO(100 m/M). Dále byly vzorky kapacitovány v termoboxu při 37 °C a 5 % CO_2 po dobu 2 hodiny. Vzorky byly postupně měřeny v počítačovém programu CASA.

5.2.3 Kapacitační medium

Všechny složky kapacitačního media byly rozpuštěny v 500 ml ultra čisté H_2O. Složení kapacitačního media je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1: Komponenty kapacitačního media TL-HEPES-PVA

komponenty	množství
NaCl	3,33165 g
KCl	0,1193 g
NaH2PO4 H2O	0,0204 g
Na laktát	0,70 ml
MgCl2 . 6 H2O	0,05085 g
HEPES	1,1915 g
Na pyruvát	0,011 g
Sorbitol	1,093 g
NaHCO3	0,084 g
CaCl2 . 2 H2O	0,147 g
Gentamicin	0,0125 ml

komponenty	množství
Penicilin G	0,0325 g
PVA	0,05 g

Medium bylo srovnáno za pomocí pH metru na pH 7,3 – 7,4, poté bylo medium přefiltrováno, pokud bylo ihned použito, byly k němu přidáno komponenty z tabulky 2. Složky kapacitačního media jsou uvedeny na množství 50 ml TL-HEPES-PVA media.

Tabulka 2: Přidané komponenty kapacitačního media TL-HEPES-PVA

komponenty	množství
Na pyruvát	0,0275 g
Glukóza	0,099 g
BSA	1 g

5.2.4 Indukce akrosomální reakce

Pro kontrolu, zda proběhla kapacitace spermií, byla provedena akrosomální reakce. K suspenzi spermií jednotlivých vzorků byl po dvou hodinách kapacitace přidán Ca – ionofor do finální koncentrace 5 µM. Následovala šedesátiminutová inkubace v termostatu při teplotě 38 °C s 5 % CO_2. Po ukončení inkubace s Ca – ionofrem byly suspenze buněk 3x odstředěny při RCF 300G, po dobu 5 minut a promyty v PBS. Po každém odstředění byl odsát supernant a bylo dopněno PBS na 5 ml.

5.2.5 Značení akrozomu pomocí PNA lektinu – vlhká fixace

Po promytí byly suspenze spermií připraveny pro prepráty na fluorescenční mikroskopii. Byla zkontrolována koncentrace spermií v suspenzi pod světelným mikroskopem Nicon pro přípravu preparátu na mikroskopická skla. Pokud bylo v připravené suspenzi málo spermií, tak bylo provedeno znovu odstředění a snížení následného objemu PBS, které bylo přidáno po odstranění supernatantu. Pokud byla koncentrace spermií příliš vysoká, bylo přidáno PBS do požadované koncentrace.

Před samotnou aplikací suspenze spermií bylo potřeba nakreslit dvě kolečka za pomoci PAN Pen (LIQUID BLOCKER SUPER PAN PEN, Agar Scientific,) a doprostřed obou koleček bylo kápnuto 20 µl suspenze spermií. U vlhké fixace bylo zároveň aplikováno ke spermiím i 50 µl vymraženého acetonu a methanolu v poměru 1:1. Preparáty pro vlhkou fixaci byly následně ponechány inkubovat 5 minut při pokojové teplotě a následně byly 3x opláchnuty PBS. Takto připravené preparáty byly ponechány schnout na vzduchu a byly uchovávány

v lednici pro další zpracování.

Po inkubaci byla znovu sklíčka 3x promyta PBS a dále na ně bylo aplikováno 100 µl sekundární protilátky (Alexa FluorTM 488 goat anti-mouse IgG (H+L), Invitrogen by ThermoFischer Scientific) naředěné v poměru 1:300 v PBS. Inkubace probíhala ve tmě po dobu 1 hodiny ve vlhké komůrce. Poté byly preparáty promyty PBS a na sklíčka naneseno 100 µl PNA lektinu konjugovaného s rhodaminem (Rhodamine Peanut Agglutinin, Vector laboratories) naředěný 1:500 v PBS. Preparáty byly inkubovány ve vlhké komůrce ve tmě při laboratorní teplotě 30 minut. Následně byly preparáty opláchnuty PBS a dále destilovanou vodou. Po osušení bylo aplikováno do jednotlivých koleček přibližně 10 µl montovacího média s DAPI (Vecta-Shield DAPI, Vector Laboratories). Mikroskopická skla byla překryta krycím sklíčkem a zafixována po krajích lakem a takto připravené preparáty byly prohlédnuty pod fluorescenčním mikroskopem Nikon a zdokumentovány v programu NIS.

Takto připravené vzorky byly pozorovány na imunofluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse E 600, nafocení preparátů bylo provedeno pomocí kamery (Nikon Digital Sight DS-Fi 1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements, kde byly počítány akrosomy na hlavičkách spermií a následně bylo spočítáno procento akrosomálně zreagovaných spermií uvedeno v tabulce číslo 6.

5.2.6 Computer assisted sperm analysis (CASA)

CASA je poloautomatická počítačová metoda, kterou se hodnotí morfologie a motilita spermií, převážně se však používá ke zkoumání motility. Optický systém snímá obraz za pomoci světelného mikroskopu, který je digitalizován a přenášen na monitor ve formě pixelů. Pomocí speciálních algoritmů využívajících počty a jasnost pixelů jsou rozlišovány pohyblivé a nepohyblivé spermie a je analyzována každá dráha spermie. Dráha jednotlivých spermií je determinována funkcí jejich bičíku a s charakteristikou pohybu odráží fyziologický stav spermií (Věžník et al. 2004).

K měření vzorků za pomocí metody CASA, byla použita 5 µl pipeta, počítací komůrka Makler (Sefi-Medical instruments, Haifa, Izrael, hloubka komory 10 µm), výhřevná destička, světelný mikroskop s výhřevnou destičkou a kamerou, počítač, počítačový program NIS AR 4 500. Na počítací komůrku Makler, kerá byla na výhřevné destičce zahřáté na teplotu 38°C, bylo naneseno pipetou 5 µl vzorku, poté byl Makler vložen pod mikroskop Eclipse E600 s fázovým kontrastem (Nikon, Tokyo, Japonsko) vybavený objektivem s negativním fázovým kontrastem (Nikon, Tokio, Japonsko), ohřevnou deskou nastavenou na 38 ºC (Tokai Hit, Shizuoka, Japonsko) a digitální kamerou DMK 23UM021 (The Imaging Source, Bremen,

Německo) a za pomoci počítačového programu (CASA, computer assisted semen analysis; NIS-Elements, Nikon, Tokyo, Japan a Laboratory Imaging, Praha, Česká republika) bylo nasnímáno 6 polí na Maklerovi. Následně byla provedena analýza v programu NIS-Elements, hodnoty nastavení byly max object speed 800 μm/s, standard deviacion multiplication factor 2 stdev, join truck up to 3 frames apart, VAP averaging 9 points, remore track shorter than 31 segments, treshold cca 80, size cca 4,25 – 10,84 μm/s, circularity cca 0,4 – 0,76, elongation 1,95 – 4,54. Výsledné hodnoty z CASA byly statisticky vyhodnoceny. Byly použity Casa parametry VAP, VSL, VCL, LIN, STR.

5.2.7 Statistické vyhodnocení

Data z CASA byla hodnocena pomocí vícefaktorové ANOVY v programu statistika 12 (StatSoft CR, Prague, Czech Republic). Hladina statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,05$.

6 Výsledky

6.1 Vliv inhibice proteasomu na integritu akrozomu

Prvním cílem práce bylo zhodnotit vliv inhibitoru PYR-41 na průběh kapacitace a indukované akrozomální reakce prostřednictvím hodnocení integrity akrozomu.

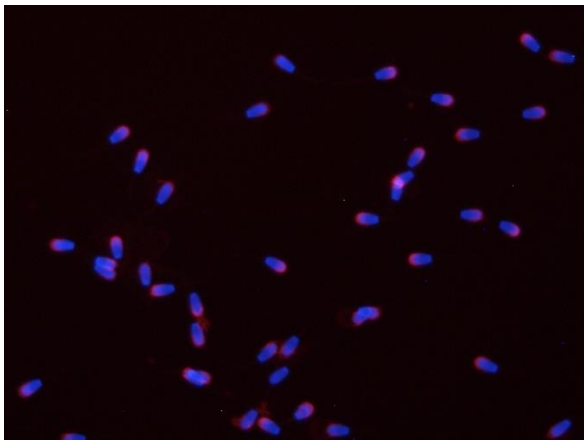
V tabulce 3 je uveden počet spermií s akrozomem u jednotlivých experimentálních skupin a % akrozomálně zreagovaných spermií 16 % u ejakulovaných spermií obrázek 3, 60 % u kapacitovaných spermií obrázek 4 a 86 % u akrozomálně zreagovaných spermií obrázek 5. U 60 % kapacitovaných spermií proběhla akrozomální reakce v rámci kapacitace. Pokud byly spermie inkubovány v kapacitačním médiu s přídavkem inhibitoru PYR-41 (100 μM) nebo DMSO, bylo procento akrozomálně zreagovaných spermií výrazně nižší než při samotné kapacitaci bez inhibitoru. Samotná akrozomální reakce ale inhibitorem potlačena nebyla. Naopak procento akrozomálně zreagovaných spermií bylo vyšší v přítomnosti DMSO i inhibitoru PYR-41.

Tabulka 3: Vliv inhibitoru PYR-41 na kapacitaci procesu a schopnost spermií podstoupit akrozomální reakci.

STAV	**CELKOVÝ POČET SPERMIÍ**	**POČET SPERMIÍ S AKROZOMEM**	**AKROZOMÁLNĚ ZREAGOVANÉ SPERMIE (%)**
EJ	214	180	16
KAP	197	80	60
KAP DMSO	241	189	22
KAP PYR	216	193	11
AR	194	27	86
AR DMSO	221	5	98
AR PYR	197	1	99,5

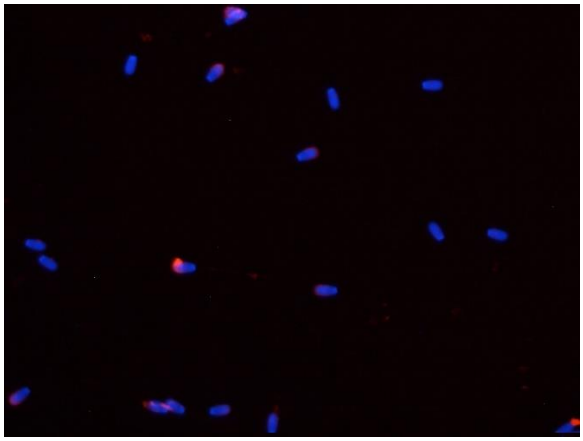
EJ – ejakulované spermi; KAP – kapacitovné spermie; KAP DMSO – kapacitované spermie s přidaným DMSO; KAP PYR – kapacitované spermie s přidaným inhibitorem PYR – 41; AR – akrozomální reakce; AR DMSO – akrozomální reakce s přidaným DMSO; AR PYR – akrozomální reakce s přidaným inhibitorem PYR-41

Obrázek 3: Akrozom u ejakulovaných spermií



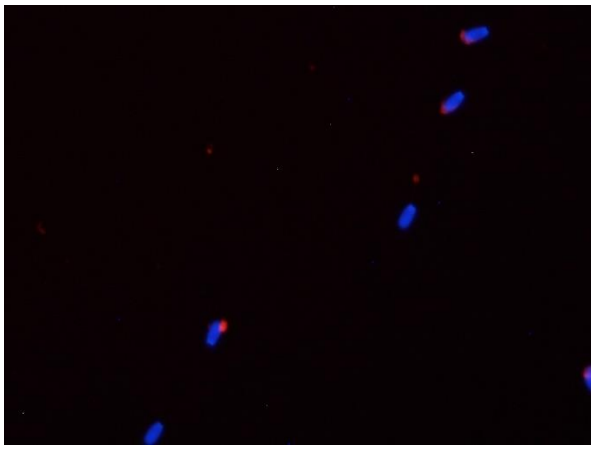
Červeně je vyznačený akrozom, modře hlavička spermie

Obrázek 4: Akrozom u kapacitovaných spermií



Červeně je vyznačený akrozom, modře hlavička spermie

Obrázek 5: Akrozom u akrozomálně zreagovaných spermií



Červeně je vyznačený akrozom, modře hlavička spermie

6.2 Vliv inhibitoru PYR-41 na kinetické parametry motility spermií

Druhým cílem práce bylo vyhodnotit pomoci počítačového systému CASA vliv inhibitoru PYR-41 na motilitu spermií. Inkubace spermií v kapacitačním médiu suplementovaném inhibitorem PYR-41 ovlivňovala kinetické parametry motility spermií. Kontrolní skupina inkubovaná v kapacitačním médiu s DMSO se od skupiny inkubované v nemodifikovaném médiu statisticky významně nelišila ve většině parametrů.

Inhibitor PYR-41 statisticky významně zvyšoval linearitu (LIN) ve všech sledovaných koncentracích inhibitoru PYR-41 s výjimkou nejvyšší koncentrace 100 μM, a to jak po jedné, tak po dvou hodinách inkubace.

Obdobně u parametru přímosti dráhy (STR) byly naměřené hodnoty u spermií inkubovaných v médiu s inhibitorem PYR-41 signifikantní, ale pouze v koncentraci inhibitoru 10 μM a 25 μM. Přímost dráhy signifikantně zvyšoval ale i samotný DMSO.

Průměrná rychlost pohybu (VAP) spermií byla signifikantně snížená u skupin inkubovaných v přítomnosti inhibitoru jak po jedné, tak po dvou hodinách inkubace. Inhibitor snižoval průměrnou rychlost pohybu v závislosti na použité dávce.

Obdobně snižoval inhibitor PYR-41 průměrnou rychlost na skutečné dráze (VSL). Tento parametr byl statisticky významně rozdílný od kontrolní skupiny jen v koncentraci 25 μM a 50 μM. V koncentraci 10 μM a 100 μM nebyl vliv inhibitoru signifikantní ani po jedné ani po dvou hodinách inkubace.

Amplituda oscilace hlavičky (ALH) byla signifikantně snížená u všech skupin spermií, které byly inkubované za přítomnosti inhibitoru PYR-41, a to jak po jedné, tak po dvou hodinách inkubace.

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.

Tabulka 4: Vliv inhibitoru PYR-41 na motilitu kančích spermií během kapacitace spermií

PARAMETR	SKUPINA	ČAS		
		0 h	1 h	2 h
LIN (%)	K	25,61 ± 0,37	35,22 ± 0,82	43,09 ± 4,17
	DMSO		37,92 ± 1,43	46,28 ± 1,66
	PYR 10 μM		**46,58 ± 1,84***	**51,18 ± 2,99***
	PYR 25 μM		**54,96 ± 1,60****	**45,63 ± 3,08****
	PYR 50 μM		**41,78 ± 7,53***	N
	PYR 100 μM		46,57 ± 9,03	34,61 ± 10,43
STR (%)	K	57,76 ± 0,68	61,56 ± 1,08	63, 73 ± 1,16
	DMSO		**77,43 ± 1,94*****	**77,71 ± 1,38****
	PYR 10 μM		**77,87 ± 2,04***	**86,13 ± 3,38***
	PYR 25 μM		**91,64 ± 1,09***	**86,96 ± 2,10***
	PYR 50 μM		87,66 ± 6,84	N
	PYR 100 μM		89,51 ± 1,67	88,09 ± 1,93
VAP (μm/s)	K	48,18 ± 0,86	91,61 ± 1,21	74,96 ± 4,41
	DMSO		87,97 ± 2,16	77,97 ± 2,87
	PYR 10 μM		**85,96 ± 2,17*****	**70,54 ± 3,59*****
	PYR 25 μM		**47,55 ± 2,09*****	**28,16 ± 4,02*****
	PYR 50 μM		**20,82 ± 2,39*****	N
	PYR 100 μM		15,58 ± 2,18	17,42 ± 2,52
VCL (μm/s)	K	97,38 ±1,46	164,77 ± 1,87	143,26 ± 7,65
	DMSO		161,29 ± 2,03	146, 22 ± 5,34
	PYR 10 μM		**150,03 ± 3,21*****	**124,77 ± 5,32*****
	PYR 25 μM		**80,71 ± 3,58****	**54,77 ± 6,89****
	PYR 50 μM		**46,25 ± 5,20*****	N
	PYR 100 μM		34,99 ± 6,90	44,12 ± 7,96
VSL (μm/s)	K	22,46 ± 0,87	70,80 ± 1,56	65,27 ± 2,82
	DMSO		70,61 ± 2,03	66,36 ± 4,63
	PYR 10 μM		68,51 ± 2,63	64,02 ± 4,36
	PYR 25 μM		**43,78 ± 2,01*****	**24,78 ± 3,86*****
	PYR 50 μM		**18,65 ± 2,48*****	N
	PYR 100 μM		13,88 ± 1,99	15,44 ± 2,30
ALH (μm)	K	4,26 ± 0,06	7,31 ± 0,1	6,39 ± 0,42
	DMSO		7,48 ± 0,19	6,03 ± 0,18
	PYR 10 μM		**6,92 ± 0,18*****	**5,53 ± 0,29*****
	PYR 25 μM		**4,24 ± 0,20***	**3,18 ± 0,39***
	PYR 50 μM		**2,53 ± 0,30*****	N
	PYR 100 μM		**1,63 ± 0,09***	**1,63 ± 0,10***

Data představují průměr ± směrodatnou odchylku (SD). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl mezi pokusnou skupinou a kontrolní skupinou v daném čase (*p<0.05; **p≤0.01; ***p≤0.001). Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou u jednotlivých parametrů zvýrazněny tučně.

LIN: linearita, linearity; STR: přímost dráhy, straightness; VAP: průměrná rychlost pohybu, average path velocity; VCL:průměrná rychlost na skutečné dráze, curvilinear velocity; VSL: lineární rychlost, straight-line velocity; ALH: amplituda oscilace hlavičky, amplitude of lateral head displacement; K: kontrola; PYR – inhibitor PYR-41; DMSO – dimethylsulfoxid; N-nehodnotitelné

6.3 Porovnání parametrů motility nativního ejakulátu a inseminační dávky

V experimentech byly využívány z důvodu vyšší standardizace používaných vzorků komerční inseminační dávky kanců. Proto byly zhodnoceny kinetické parametry spermií získaných z inseminačních dávek a porovnány s parametry spermií z nativního ejakulátu (tabulka 5). Signifikantní rozdíly byly zjištěny u parametrů linearity (LIN), přímosti dráhy (STR), rychlosti na skutečné dráze (VCL) a šířce oscilace hlavičky (ALH) u inseminační dávky oproti nativnímu ejakulátu. Zatímco první dva parametry byly u inseminačních dávek nižší, druhé dva parametry byly naopak zvýšené.

Tabulka 5: Rozdíly v kinetických parametrech mezi inseminační dávkou a nativním ejakulátem před kapacitací

KINETICKÝ PARAMETR	**ZDROJ**	
	INSEMINAČNÍ DÁVKA	EJAKULÁT
LIN	**25,61 ± 0,37*** **	30,69 ± 1,11
STR	**57,76 ± 0,68*** **	68,52± 2,05
VAP	48,18 ± 0,86	44,74 ± 1,58
VCL	**97,38 ± 1,46*** **	78,83 ± 3,41
VSL	22,46 ± 0,87	20,73 ± 0,29
ALH	**4,26 ± 0,06*** **	3,52 ± 0,17

Data představují průměr ± směrodatnou odchylku (SD). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl mezi kinetickými parametry spermií z inseminační dávky a nativního ejakulátu (***p≤0.001). LIN: linearita, linearity; STR: přímost dráhy, straightness; VAP: průměrná rychlost pohybu, average path velocity; VCL: průměrná rychlost na skutečné dráze, curvilinear velocity; VSL: lineární rychlost, straight-line velocity; ALH: amplituda oscilace hlavičky, amplitude of lateral head displacement.

7 Diskuze

Kapacitace je proces, který je klíčový pro oplozeníschopnost spermií. Do jeho průběhu je významně zapojen ubikvitin-proteazomový systém, který je nejdůležitějším intracelulárním mechanismem zodpovědný za regulovanou proteolýzu proteinů (Sutovsky 2011). Během kapacitace dochází k degradaci proteinů spermie a zablokování ubikvitin-proteazomového systému pomocí inhibitorů, protilátek či modifikovaného ubikvitinu, který účinně potlačuje fertilizační schopnost spermií (Zimmerman & Sutovsky 2009).

Cílem experimentů bylo zjištění vlivu inhibitoru proteazomu PYR-41 (4[4-(5-itro-furan-2-ylmethylen)-3 ethylester kyseliny 5-dioxopyrazolidin-1-yl] benzoové) na kinetické parametry kančích spermií. PYR-41 blokuje jak ubikvitinaci, tak proteazomální degradaci proteinů (Bence et al. 2005).

V první fázi experimentů byl sledován vliv inhibitoru na průběh akrozomální reakce indukované calcium ionoforem. Testy na AR indukované ionoforem mohou poskytnout další informace o oplozeníschopnosti spermií, ale nemusí uvádět specifické defekty fyziologické akrozomální reakce (Liu & Baker 1998). Inhibitor PYR-41 snižoval procento akrozomálně zreagovaných spermií u spermií kapacitovaných v přítomnosti inhibitoru. U spermií byla potlačena exocytóza akrozomu. Na samotný průběh akrozomální reakce indukované calcium ionoforem inhibitor PYR-41 neměl vliv. Naopak se podle výsledků experimentu zdá, že průběh akrozommální reakci ovlivnilo DMSO, ve kterém byl inhibitor PYR-41 rozpuštěn, protože procento akrozomálně zreagovaných spermií bylo vyšší u spermií, u kterých byla indukována akrozomální reakce v přítomnosti DMSO a v přítomnosti inhibitoru PYR-41 rozpuštěného v DMSO než u spermií kontrolní skupiny.

Inhibice proteazomu mění průběh kapacitace (Yi et al., 2012). Pro kapacitaci jsou charakteristické změny kinetických paramentů motility spermií, které byly v našich experimentech inkubací v kapacitačním médiu s inbitorem PYR-41 signifikantně ovlivněny. DMSO naopak parametry motility neovlivnilo. Námi zjištěné průměrné hodnoty linearity (LIN) u kontrolní skupiny (35,22 ± 0,82 %) a skupiny inkubované v médiu s přídavkem DMSO (37,92 ± 1,43 %) odpovídají podle Valverde et al. (2018) středně neprogresivnímu pohybu a podle Schmid & Kamp (2004) nehyperaktivním spermiím.

Inhibitor PYR-41 statisticky významně zvyšoval linearitu (LIN) a přímost dráhy (STR) spermií v závislosti na době inkubace i koncentraci inhibitoru. Přímost dráhy signifikantně zvyšoval ale i samotný DMSO. Ve studii Yoshida et al. (2018) popsal, že podíl pohyblivých spermií srovnatelný se spermiemi ošetřenými PYR-41 a neošetřenými spermiemi

(84,3 ± 4,7 % vs. 86,7 ± 6,3 % u neošetřených spermií), tedy, že motilita spermií zůstává po ošetření PYR-41 zcela zachována. To odpovídá i našim pozorováním

Průměrná rychlost pohybu (VAP) spermií byla signifikantně snížená u skupin inkubovaných v přítomnosti inhibitoru jak po jedné, tak po dvou hodinách inkubace. Inhibitor snižoval průměrnou rychlost pohybu v závislosti na použité dávce, ale s výjimkou nejvyšší sledované koncentrace (100 μM), byla motilita vyšší než hodnota, která je uváděna pro nemotilní spermie (Aparicio et al. 2005; Matás et al. 2010).

Obdobně snižoval inhibitor PYR-41 průměrnou rychlost na skutečné dráze (VSL). Tento parametr byl statisticky významně rozdílný od kontrolní skupiny jen v koncentraci 25 μM a 50 μM. Námi zjištěné hodnoty odpovídají hodnotám nehyperaktivních spermií (Aparicio et al. 2005; Schmid & Kamp 2004), což ukazuje na inhibici kapacitace inhibitorem PYR-41. Tomuto zjištění odpovídají i naměřené hodnoty amplituda oscilace hlavičky (ALH), která byla signifikantně snížená u všech skupin spermií, které byly inkubované za přítomnosti inhibitoru PYR-41, a to jak po jedné, tak po dvou hodinách inkubace. ALH je považován za nejcitlivější parametr algoritmů (Ramió et al. 2008). ALH 3,83 ± 0,15 μm/s; ve studii Valverde et al. (2018) byly naměřeny hodnoty ALH 2,0 ± 0,01 μm/s značící rapidní progresivitu. V našem experimentu byly naměřeny hodnoty ALH pro kontrolu 7,31 ± 0,1 μm/s, což značí podle studie Valverde et al. (2018) rapidní progresivitu, hodnoty v našem experimentu pro inhibitor PYR-41 s koncentrací 100 μM byly 1,63 ± 0,09 μm/s, to podle Valverde et al. (2018) značí středně neprogresivní pohyb. V tomto parametru byl dobře pozorovatelný vliv efektu na dávce

Porovnáním rozdílů v kinetických parametrech mezi inseminační dávkou a nativním ejakulátem před kapacitací bylo zjištěno, že u spermií v inseinačních dávkách byly signifikantně snížené parametry linearita a přímost dráhy. Zvýšená naopak byla rychlost na skutečné dráze a šířce oscilace hlavičky. Tyto parametry jsou spojovány s průběhem kapacitace (Broekhujise et al. 2012) a tudíž je možné se domnívat, že spermie v inseminační dávce byly již částečně nakapacitovány díky zřeďovacímu mediu. K experimentům cíleným na studium faktorů ovlivňujících průběh kapacitace by bylo vhodnější používat nativní ejakulát. Pro kance je ale typická značná variabilita v parametrech ejakulátu. Nutnou podmínkou pro využití nativního ejakulátu je kontrola motility a důsledné vyřazování ejakultátu z experimentu, pokud nesplní požadované parametry. Protože jsou komerční inseminační dávky více standardizované, je jeich využití v experimentech i přes určité procento spontánně kapacitovaných spermií výhodnější.

Závěrem lze konstatovat na základě námi zjištěných hodnot parametrů motility kančích

spermií, že inhibitor PYR-41 negativně narušuje průběh jejich kapacitace a že je tedy správný průběh kapacitace závislý na plné funkci ubiquitin – proteazomového systému.

8 Závěr

V diplomové práci „Ovlivnění funkčních parametrů kančích spermií během modifikované kapacitace in vitro byla stanovena hypotéza, že inhibice ubikvitin-proteasomového systému PYR-41 ovlivní parametry motility spermií jako markery kapacitace. Pro ověření hypotézy byly stanoveny dva cíle – zhodnotit průběh kapacitace in vitro za pomocí indukce akrozomální reakce a následným pozorováním integrity akrozomu mezi skupinou ovlivněnou inhibitorem PYR-41 a kontrolní skupinou a dalším cílem bylo za pomoci počítačového systému CASA vyhodnotit vliv inhibitoru PYR-41 na kinetické parametry motility spermií. Oba cíle byly naplněny. Výsledky výzkumu ukázaly, že došlo k inhibici ubikvitin-proteasomového systému, který negativně ovlivnil motilitu spermií během kapacitace in vitro. Čím vyšší byla koncentrace inhibitoru PYR-41, tím více byly negativně ovlněny kinetické parametry CASA a s tím byla spojena nižší motilita kapacitovaných spermií. Závěrem lze konstatovat, že hypotéza, která byla formulována, byla potvrzena a experimenty, které byly součástí diplomové práce, napomohly k zjištění motility spermií během kapacitačního procesu, kde dochází k degradaci proteinů ve spermiích.

9 Literární zdroje

Aitken RJ, Clarkson JS. 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. J. Reprod. Fertil. **81**: 459 – 469.

Aitken RNC. 1960. A histochemical study of the accessory genital glands of the boar. Journal list **94 (1)**: 130 – 142.3.

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

Aparicio IM, Gil MC, Garcia-Herreros M, Peňa FJ, Garcia-Marin LJ. 2005. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase modifies boar sperm motion parameters. Society for Reproduction and Fertility **129** (3): 283 – 289. DOI: 10.1530/rep.1.00447.

Arnoult C, Cardullo RA, Lemons JR, Florman HM. 1996 b. Activation of mouse sperm T-type Ca^{2+} channels by adhesion to the egg zona pellucida. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 1300413009.

Arnoult C, Lemons JR, Florman HM. 1997. Voltage-dependent modulation of T-type Ca^{2+} channels by protein tyrosine phosphorylation. EMBO J. **15**: 1593 – 1599.

Arnoult C, Zeng Y, Florman HM. 1996. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. J. cell. Biol. **134**: 637 – 645.

Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B, Aitken RJ. 2004. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. J Cell Sci. **117**: 3645 – 3657. 10.1242/jcs.01214.

Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust. J. Sci. Res. B. **4**: 581 – 596.

Babcock DF, Pfeiffer DR. 1987. Independent elevation of cytosolic Ca^{2+} and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms. J. Biol. Chem. **262**: 15041 – 15047.

Badia E, Britz MD, Pinart E, Sancho S, Garcia N, Bassols J, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M, Casa I, Bonet S. 2006. Structural and ultrastructural features of boar bulbourethral glands.

Tissue and Cell **38 (1) p.**: 7 – 18.

Badia E, Britz MD, Pinart E, Sancho S, Garcia-Gill N, Bassols J, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M, Casa I, Bonet S. 2005. Structural and ultrastrucrural features of boar seminal vesicles. Tissue and Cell **38 (2) p.**: 79 – 91.

Bailey JL. 2010. Factors regulating sperm capacitation. Systém biology in reproductive medicine 56 **(5)**: 334 – 348. DOI: 10.3109/19396368.2010.512377.

Baker MA, Smith ND, Hetherington L, Taubman K, Graham ME, Robinson PJ, Aitken RJ. 2010. Label-free quantitation of phosphopeptide changes during rat sperm capacitation. J Proteome Res **9**: 718 – 729.

Baldi E, Casana R, Falsetti C. 1991. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. J. Androl. **12**: 323 – 330.

Baska KM, Manandhar G, Feng D, Agca Y, Tengowski MW, Sutovsky M, Yi YJ, Sutovsky P. 2008. Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. J Cell Physiol **215**: 684 – 696.

Bathgate R. 2011. Antioxidant mechanism and their benefit on post-thaw boar sperm quality. Reprod. Domest. Anim. **46 (2)**: 23 – 5.

Bedford JM, Chang MC. 1962. Removal of decapacitation factor from seminal plasma by high speed centrifugation. Am. J. Physiol. **202**: 179 – 181.

Bellvé AB, Anderson E, Hanley-Bowdoin L. 1975. Syntesis and amino acid composition of basic proteins in mammalina sperm nuclei. Dev. Biol. **47**: 349 – 365.

Bence NF, Bennett EJ, Kopito RR. 2005. Application and Analysis of the GFP^{u} Family of Ubiquitin-Proteasome System Reporters. Methods Enzymol **399**: 481 – 90.

Ben-Saadon R, Zaaroor D, Ziv T, Ciechanover A. 2006. The polycomb protein Ring1B generates self atypical mixed ubiquitin chains required for its in vitro histone H2A ligase activity. Mol Cell **24**: 701 – 11.

Blackmore PF, Neulen J, Lattanzio F, Beebe SJ. 1991. Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. J. Biol. Chem. **266**: 18655 – 18659.

Boatman DE & Robbins RS. 1991. Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. Biol. Reprod. **44**: 806 – 813.

Breucker H, Schäfer E, Holstein AF. 1985. Morphogenesis and fate of the residual body in human spermiogenesis. Cell Tissue Res **240**: 303 – 9.

Caballero I, Vazquez JM, García EM, Parrilla I, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Martínez EA. 2008. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. Theriogenology **70 (8)**: 1352 – 5.

Calvete JJ, Solís D, Sanz L, Díaz-Mauriño T, Töpfer-Petersen E. 1994. Glycosylated boar spermadhesin AWN-1 isoforms. Biological origin, structural characterization by lectin mapping, localization of Oglycosylation sites, and effect of glycosylation on ligand binding. Biol. Chem. Hoppe Seyler **375 (10)**: 667 – 73.

Carlin RW, Sedlacek RL, Quesnell RR, Pierucci-Alves F, Grieger DM, Schultz BD. 2006. PVD9902, a porcine vas deferens epithelial cell line that exhibits neurotransmitter- stimulated anion secretion and expresse numerous HCO_3^- transporters. American Journal of Physiology-Cell Physiology **290 (6)**.

Carlson AE, Hille B, Babcock DF. 2007. External Ca^{2+} acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. Developmental Biology **312**: 183 – 192. DOI:10.1016/j.ydbio.2007.09.017.

Ciechanover A, Schwartz AL. 2004. The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. Biochim Biophys Acta **1695**: 3 – 17.

Clark EN, Corron ME, Florman HM. 1993. Caltrin, the calcium transport regulátory peptide of spermatozoa, modulates acrosomal exocytosis in response to egg´s zona pellucida.The journal of biological chemistry **Vol 268. no. 7. p.**: 5309 – 5316.

Cohen-Dayag A, Eisenbach M. 1994. Potential assays for sperm capacitation in mammals. Am. J. Physiol. **267**: C1167 – C1176.

Conner SJ, Lefievre L, Hughes DC, Barratt CL. 2005. Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida. Hum. Reprod. **20**: 1148 – 152.

Cook SP, Brokaw CJ, Muller CH, Babcock DF. 1994. Sperm chemotaxis: egg peptides control

cytosolic calcium to regulate flagellar responses. Developmental Biology **165**: 10 – 19.

Cooper TG. 2005. Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? Human Reproduction **209 (11)**. DOI:10.1093/humrep/deh555.

Cooper TG. 2012. The epididymis sperm maturation and fertilisation. Springer Science and Business Media, Germany.

Cross NL. 1998. Role of cholesterol in sperm capacitation. Biology of reproduction **Vol. 59. issue 1. p.**: 7 – 11.

Da Silva N, Pietrement C, Brown D, Breton S. 2006. Segmental and cellular expression of aquaporins in the male excurrent duct. Biochimica et Biophysica Acta **1758**: 1025 – 1033. DOI:10.1016/j.bbamem.2006.06.026.

Dacheux JL, Belleannee C, Guyonnet B, Labas V, Teixeira-Gomes AP, Ecroyd H, Druart X, Gatti JL, Dacheux F. 2012. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. Systems Biology in Reproductive Medicine **58**: 197 – 210. DOI:10.3109/19396368.2012.663233.

Dacheux JL, Dacheux F. 2014. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. Society for reproduction and fertility. **147 issue 2**: 27 – 42. DOI: 10.1530/REP-13-0420.

Dai RM, Li CC. 2001. Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. Nat Cell Biol **3**: 740 – 4.

Davis BK. 1982. Uterine fluid proteins bind sperm cholesterol during capacitation in the rabbit. Experientia **38**: 1063 – 1064.

de Lamirande E, Gagnon C. 1995 a. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. Free Rad. Biol. Med. **18**: 487 – 495.

de Lamirande E, Gagnon C. 1995 b. Impact of reactive oxygen on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. Hum. Reprod. **10 (1)**: 15 – 21.

de Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. 1997. Capacitation as a regulary event. That primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. Molecular human reproduction

Vol. 3 p.: 175 – 194.

Ded L, Dostalova P, Dorosh A, Dvorakova-Hortova K, Peknicova J. 2010. Effect of estrogens of boar sperm capacitation in vitro. Reproductive biology and endokrinology **8**: 87

Demott RP, Lefebyre R, Suarez SS. 1995. Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. Biol. Reprod. **52**: 1395 – 1403.

Dikic I. 2003. Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. Biochem Soc Trans **31**:1178 – 81.

Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1991. Model systems for the study of seven-transmembane-segment receptors. Annu. Rev. Biochem. **60**: 653 – 688.

Du Y, Liu ML, Jia MC. 2008. Identification and characterization of a spermatogenesis-related gene Ube1 in rat testis. Sheng Li Xue Bao **60**: 382 – 390.

Ehrewald E, Foote RH, Parks JE. 1990. Bovine oviductal fluid compone ts and their potential role in sperm cholesterol efflux. Mol. Reprod. Dev. **25**: 195 – 204.

Emiliozzi C, Cordonier H, Guérin JF. 1996. Effects of progesterone on human spermatozoa prepared for in vitro fertilization. Int. J. Androl. **19**: 39 – 47.

Endo Y, Lee MA, Kopf GS. 1988. Characterization of an islet-activating protein sensitive site in mouse sperm that is involved in the zona pellucida induced acrosome reaction. Dev. Biol. **129**: 12 – 24.

Esposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MA, Robben TJ, Strik AM, Kuil C, Philipsen RL, van Duin M, Conti M. 2004. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. PNAS **101**: 2993 – 2998. DOI:10.1073/pnas.0400050101.

Fang S, Weissman AM. 2004. A field guide to ubiquitylation. Cell Mol Life Sci **61**: 1546 – 61.

Flesch FM, Colenbrander B, van Golde LM, Gadella BM. 1999. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. Biochem Biophys Res Commun. **262**: 787 – 792. 10.1006/bbrc.1999.1300.

Flesch FM, Wijnand E, van de Lest CH, Colenbrander B, van Golde LM, Gadella BM. 2001.

Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida. Mol Reprod Dev. **60**: 107 – 115. 10.1002/mrd.1067.

Florman HM, Corron ME, Kim TDH, Babcock D. 1992. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. Deu. Biol. **152**: 304 – 314.

Florman HM, Storey BT. 1982. Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. Dev. Biol. **91**: 121 – 130.

Florman HM, Tombes RM, First NL, Babcock DE. 1989. An adhesion-associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca^{2+} and pH that mediate mammalian sperm acrosomal exocytosis. Development Biology. **Vol. 135 issue 1. p.**: 133 – 146.

Florman HM, Wassarman PM. 1985. O-linked oligosacharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor aktivity. Cell **41**: 313 – 324.

Franca LR, Avelar GF, Almeida FFL. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. Theriogenology. 63 (2). p. 300 – 318.

Franca, L.R., Ye, S.J., Ying, L. 1995. Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. Anat. Rec. **241(2)**:181 – 204.

Frankenhuis MT, Kramer MF, Rooij DG. 1982. Spermatogenensis in the boar. Veterinary Quarterly **42**: 57 – 61.

Fraser LR, Umar G, Sayed S. 1993. Na^{+} requiring mechanisms modulate capacitation and acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. J. Reprod. Fertil. **97**: 539 – 549.

Gadella BM, Harrison RA. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. Development **127 (11)**: 2407 – 20.

Garbers DL, First NL, Lardy HA. 1973. Properties of adenosine 3′5′ monophosphate-dependent protein kinases isolated from bovine epididymal spermatozoa. J. Biol. Chem. **248**: 875 – 879.

Gatti JL, Druart X, Guerin Y, Dacheux F, Dacheux JL. 1999. A 105 – to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. Biology of Reproduction **60**: 937 – 945. DOI:10.1095/biolreprod60.4.937.

Gillan L, Evans E, Maxwell WMC. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. Theriogenology **63**: 445 – 457. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.024.

Glickman MH, Ciechanover A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. Physiol Rev **82**: 373 – 428.

Go KJ, Wolf DP. 1985. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. Biol. Reprod. **32**: 145 – 153.

Gonzalez-Cadavid V, Martins JA, Moreno FB, Andrade TS, Santos AC, Monteiro-Moreira AC, Moreira RA, Moura AA. 2014. Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. Theriogenology **82 (5)**: 697 – 707.

Gray S, Lackey BR, Boone WR. 2015. Effects of panx ginseng, zearalenol, and estradiol on sperm function. Journal of ginseng research **40** (3) DOI: 10.1016/j.jgr.2015.08.004.

Gross MK, Toscano DG, Toscano WA Jr. 1987. Calmodulin.mediated adenylate cyclase from mammalian sperm. J. Biol. Chem. **262**: 8672 – 8676.

Hancock JL. 1955. The morfology of boar spermatozoa. Agricultural Research Council, Institute of Animal Physiology **3 (3)**.

Harayama H, Miyake M, Shidara O, Iwamoto E, Kato S. 1998. Effects of calcium and bicarbonate on head-to-head agglutination in ejaculated boar spermatozoa. Reproduction Fertility and Development **10**: 445 – 450.

Harper CV, Barratt CL, Publicover SJ. 2004. Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradient to simulate approach to the oocyte: Induction of Ca^{2+} oscillations and cyclical transitions on flagellar beating. J. Biol. Chem. **279**: 46315 – 46325.

Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suarez SS. 2005. The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling

events required for fertilization. Developmental Cell **9**: 249 – 259. DOI:10.1016/j.devcel.2005.06.007.

Hess RA, de Franca LR. 2001. Spermatogenesis and cycle od the seminiferous epithelium. Adv. Exp. Med. Biol. **636**: 1 – 15.

Hicke L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. Nat Rev Mol Cell Biol **2**: 195 – 201.

Ho HCh, Suarez SS. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. Reproductio **122**: 519 – 526.

Holt WV. 1995. The sperm plasma membrane. In Fénichel, P., Parinaud, J. (eds) Human sperm acrosome reaction. Colloque Inserm no. 236. John Libbey eurotext Ltd. P. 1 – 16.

Hunter AG, Nornes HO. 1969. Characterization and isolation of sperm-coating antigen from rabbit seminal plasma with capacity to block fertiliztion. J. Reprod. Fertil. **20**: 419 – 427.

Hunter RHF, Nichol R. 1986. A proevulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. J. reprod. Fertil. **77**: 599 – 606.

Hyne RV, Garbes DL. 1979. Regulation of Guinea pig sperm adenylate cyclase by calcium. Biol. Reprod. **21**: 1135 – 1142.

Chang H, Suarez SS. 2010. Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. Biology of Reproduction **Vol. 83 issue 4 p.** 507 – 513. DOI: 10.1095/biolreprod.109.083113.

Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in Fallopian tubes. Nature **168**: 997 – 998.

Chen ZJ. 2005. Ubiquitin signalling in the NF-κB pathway. *Nat Cell Biol* **7**: 758 – 65.

Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. 2001. The dual functions of GPIanchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. Matrix Biology **20**: 515 – 525. In book: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis p. 1 – 15.

Jaiswal BS, Conti M. 2003. Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. PNAS **100**: 10676 – 10681. DOI:10.1073/pnas.1831008100.

Jelínková P, Maňásková P, Tichá M, Jonáková V. 2003. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. Int. J. Biol. Macromol. **32 (3-5)**: 99 – 107.

Jones RC. 1971. Studies of the structure of the head of boar spermatozoa from the epididymis. Journal of reproduction and fertility. Supplement **13**: 51 – 64.

Kalab P, Peknicova J, Geussova G, Moos J. 1998. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. Mol Reprod Dev. **51**: 304 – 314.

Kerns K, Morales P, Sutovsky P. 2016. Regulation of Sperm Capacitation by the 26S Proteasome: An Emerging New Paradigm in Spermatology. Biology of Reproduction 94 **(5)**: 117, 1 – 9. DOI: 10.1095/biolreprod.115.136622.

Kim ST, Zhang K, Dong J, Lord EM. 2006. Exogenous free ubiquitin enhances lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix and may facilitate endocytosis of SCA. Plant Physiology **142**: 1397 – 1411. DOI:10.1104/pp.106.086801.

Kondracki S, Iwanina M, Wysokińska A, Huszno M. 2012. Comparative analysis of Duroc and Pietrain boar sperm morphology. Acta vet, Brno **81**: 195 – 199; DOI:10.2754/avb201281020195.

Langais J, Roberts KD. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. Gamete Res. **12**: 183 – 224.

Langlais J, Zollinger M, Plante L. 1981. Localization of cholesterol sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**: 7266 – 7270.

Lapointe S, Sirard MA. 1996. Importance of calcium for the binding of oviductal fluid proteins to the membranes of bovine spermatozoa Mol. Reprod. Dev. **44**: 234 – 240.

Leahy T, Gadella BM. 2015. New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. Asian Journal of Andrology 17**(4)**: 561 – 567. DOI: 10.4103/1008-682X.153309.

Leboln E, Desnoyers L, Manjunath P. 1993. Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids od different species share antigenic determinants with the major

proteins of bovine seminal plasma. Mo. Reprod. Dev. **34**: 443 – 449.

Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. 1997. Regulation of protein tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. Free Rad. Biol. Med. **22**: 643 – 656.

Lippes J, Wagh PV. 1989. Human oviductal fluid (hOV) proteins. IV. Evidence for of proteins binding to human sperm. Fertil. Steril. **51**: 89 – 94.

Lopez-Gonzalez I, de la Vega-Beltrán JL, Santi CM, Florman H, Felix R, Darszon A. 2001. Calmodulin antagonists inhibit T-type Ca^{2+} currents in mouse spermatogenic cells and the zona pellucida-induced sperm acrosome reaction. Dev. Biol. **236**: 210 – 219.

Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C. 1995. Stimulation of protein phosphorylation by platelet-activating factor and progesterone in human spermatozoa. Mol. Cell. Endocrinol **108**: 35 – 42.

Maas DHA, Storey BT, Mastroianni L. 1976. Oxygen tension in oviduct of the Rhesus monkey (Macaca mulatta). Fertil. Steril. **27**: 1312 – 1318.

Maňásková-Postlerová P, Davidová N, Janáková V. 2010. Biochemical and binding characteristics of boar epididymal fluid proteins. Journal of Chromatography B. **879 1. p.**: 100 – 106.

Matás C, Sansegundo M.. Ruiz S, García-Vázquez FA, Gadea J, Romar R, Coy P. 2010. Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. Theriogenology 74 **(8)**: 1327 – 1340. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.002.

Mortimer ST. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. Human Reproduction Update **3**: 403 – 439.

Mortimer ST. Maxwell WM. 1999. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. Reproduction Fertility and Development **11**: 25 – 30.

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 – 41

Naz RK, Ahmed K, Kumar R. 1991. Role of membrane tyrosine proteins in human spermatozoal functions. J. Cell Sci. **99**: 157 – 165.

Naz RK, Rajesh PB. 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. Reproductive Biology and Endocrinology 4**2**: 75. DOI: 10.1186/1477-7827-2-75.

Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW. 2009. Arthur's veterinary reproduction and obstetrics. Elsevier Health Sciences. **p. 960**. ISBN: 9780702039904.

Odorisio T, Mahadevaiah SK, McCarrey JR, Burgoyne PS. 1996. Transcriptional analysis of the candidate spermatogenesis gene Ube1y and of the closely related Ube1x shows that they are coexpressed in spermatogonia and spermatids but are repressed in pachytene spermatocytes. Dev Biol **180**: 336 – 343.

Pang PC, Chiu PC, Lee CL, Chang LY, Panico M, Morris HR, Haslam SM, Khoo KH, Clark GF, Yeung WS, Dell A. 2011. Human sperm binding is mediated by the sialyl-Lewis(x) oligosaccharide on the zona pellucida. Science **333 (6050)**: 1761 – 4.

Parks JE, Ehrenwald E. 1990. Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. In Gagon, C. (ed.) Controls of sperm motility: Biological and clinical aspects. CRC Press, Boca Raton, Fl, USA, p. 155 – 167.

Pawson T. 2004. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. Cell **116**: 191 – 203. 10.1016/S0092-8674(03)01077-8.

Perez-Patino C, Barranco I, Parrilla I, Valero ML, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H, Roca J. 2016 Characterization of the porcine seminal plasma proteome comparing ejaculate portions. Journal of Proteomics. **142**: 15 – 23.

Perez-Reyse E. 2003. Molecuůar physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. Physiol. Rev. **83**: 171 – 161.

Petrunkina AM, Friedrich J, Drommer W, Bicker G, Waberski D, Topfer-Petersen E. 2001. Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca2+ concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. Reproduction **122**: 469 – 480. 10.1530/rep.0.1220469.

Piko L. 1969. Gamete structure and sperm entry in mammals. ln “Fertilization” (C. B. Metz and A. Monroy, eds.). Academic Press, New York **Vol. 2 Chap. 18**.

Puigmulé M, Fàbrega A, Yeste M, Bonet S, Pinart E. 2011. Study of the proacrosin-acrosin system in epididymal, ejaculated and in vitro capacitated boar spermatozoa. Reprod. Fertil. Dev. **23 (7)**: 837 – 45.

Quill TA, Wang D, Garbers DL. 2006. Insights into sperm cell motility signaling through sNHE and the CatSpers. Molecular and Cellular Endocrinology **250**: 84 – 92. DOI:10.1016/j.mce.2005.12.031.

Ralt D, Manor M, Cohen-Dayag A. 1994. Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors. Biology of Reproduction **50**: 774 – 785.

Ramió L, Rivera MM, Ramírez A, Concha II, Peňa A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2008. Dynamics of motile-sperm subpopulation structure in boar ejaculates subjected to ‘‘in vitro’’ capacitation and further ‘‘in vitro’’ acrosome reaction. Theriogenology **69**: 501 – 512. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.10.021.

Ravnik SE, Albers JJ, Muller CH. 1995. Stimulation of human sperm capacitation by purified lipid transfer protein. J. Exp. Biol. **272**: 78 – 83.

Reece WO. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. Grada Publishing a.s. **p. 473**. ISBN: 8024732823.

Revelli A, Modotti M, Piffaretti-Yanez A. 1994. Steroid receptors in human spermatozoa. Hum. Reprod. **9**: 760 – 766.

Rivkin E, Kierszenbaum AL, Gil M, Tres LL. 2009. Rnf19a, a ubiquitin protein ligase, and Psmc3, a component of the 26S proteasome, tether to the acrosome membranes and the head–tail coupling apparatus during rat spermatid development. Developmental Dynamics **238**: 1851 – 1861. DOI: 10.1002/dvdy.22004.

Robertson L, Wolf DP, Tash JS. 1988. Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterizaion of populations of hyperactivated spermatozoa. Biol. Reprod. **39**: 797 – 805.

Roca J, Broekhuijse ML, Parrilla I, Rodriguez-Martinez H, Martinez EA, Bolarin A. 2015. Boar

Differences In Artificial Insemination Outcomes: Can They Be Minimized? Reprod. Domest. Anim. **50 (S2)**: 48 – 55.

Roldan ER, Murase T, Shi QX. 1994. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. Science **266**: 1578 – 1581.

Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP. 1993. Histological and histopathological evaluation of the testis. International journal of andrology **Vol. 16 issue 1. p. 83**.

Sacco AG, Yurewicz EC, Subramanian MG, Matzat PD. 1989. Porcine zona pellucida: association of sperm receptor activity with the α-glycoprotein component of the Mr = 55,000 family. Biol. Reprod. **41**: 523 – 532.

Sakaue T, Takeuchi K, Maeda T, Yamamoto Y, Nishi K, Ohkubo I. 2010. Factor H in porcine seminal plasma protects sperm against complement attack in genital tracts. J. Biol. Chem. **285 (3)**: 2184 – 92.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. Cell **75**: 495 – 505.

Schmid H, Kamp G. 2004. Induced hyperactivity in boar sprematozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. Society for Reproduction and Fertility **Vol. 128 issue 2. p.**: 171 – 179. DOI: 10.1530/rep.1.00153.

Si Y, Okuno M. 1999. Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. Biology of Reproduction **61**: 240 – 246.

Si Y. 1999. Hyperactivation of hamster sperm motility by temperaturedependent tyrosine phosphorylation of an 80-kDa protein. Biology of Reproduction **61**: 247 – 252.

Siciliano L, Marcianò V, Carpino A. 2008. Prostasome-like vesicles stimulate acrosome reaction of pig spermatozoa. Reprod. Biol. Endocrinol. **6**: 5.

Sigismund S, Polo S, Di Fiore PP. 2004. Signaling through monoubiquitination. Curr Top Microbiol Immunol **286**: 149 – 85.

Simonik O, Sichtar J, Krejcarkova A, Rajmo R, Stadnik L, Beran J, Dolezalova M, Biniova Z. 2014. Computer assisted sperm analysis – the relationship to bull field fertility, possible wrrors

and their impact on outputs: A review. Indian Journal of Anima Science **85** (1): 3 – 11.

Spinaci M, Volpe S, Bernardini C, De Ambrogi M, Tamanini C, Seren E, Galeati G. 2005. Immunolocalization of heat shock protein 70 (Hsp 70) in boar spermatozoa and its role during fertilization. Mol. Reprod. Dev. **72 (4)**: 534 – 41.

Stephen AG, Trausch-Azar JS, Handley-Gearhart PM, Ciechanover A, Schwartz AL. 1997. Identification of a region within the ubiquitinactivating enzyme required for nuclear targeting and phosphorylation. J Biol Chem **272**: 10895 – 10903.

Stringer DK, Piper RC. 2011. Terminating protein ubiquitination. Cell Cycle **10** (18): 3067 – 3071. DOI: 10.4161/cc.10.18.17191.

Strzezek J. 2002. Secretory Activity of boar seminal vesicle glands. Reproductive biology **2 (3) p.** 243 – 266.

Suarez SS, Dai X. 1992. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. Biology of Reproduction **46**: 686 – 691.

Suarez SS, Dai X. 1995. Intracellular calcium reaches different levels of elevation in hyperactivated and acrosome reacted hamster sperm. Mol. Reprod. Dev. **42**: 325 – 333.

Suarez SS, Vincenti L, Ceglia MW. 1987. Hyperactivated motility induced in mouse sperm by calcium ionophore A23187 is reversible. Journal of Experimental Zoology **244**: 331 – 336.

Suarez SS. 2002. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. Reproduction in Domestic Animals **37**: 140 – 143.

Sutovsky P, Manandhar G, McCauley TC, Caamano JN, Sutovsky M, Thompson WE, Day BN. 2004. Proteasomal interference prevents zona pellucida penetration and fertilization in mammals. Biology of Reproduction **71**: 1625 – 1637. DOI: 10.1095/biolreprod.104.032532.

Sutovsky P. 2011. Sperm proteasome and fertilization. Society for reproduction and fertility **142 (1):** 1 – 14. DOI: 10.1530/REP-11-0041.

Szollosi D, Hunter RHF. 1973. Ultrastructural aspects of fertilization in the domestic pig: sperm penetration and pronukleus formation. Journal Anatomy **116 (2) p.** 181-206.

Szollosi D. 1962. Cortical granules: a general feature of mammalian eggs? Journal of Reproduction and Fertility **4**: 223 – 224.

Tash JS, Means AR. 1983. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. Biol Reprod. **28**: 75 – 104.

Tash JS. 1989. Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility. Cell Motility and the Cytoskeleton **14**: 332 – 339.

Tash JS. 1990. Role of cAMP, calcium and protein phosphorylation in sperm motility. In Gagnon, C. (ed.), Controls of Sperm Motlity: Biological and Clinical Aspects. CRC Press, Boca Raton, FL, USA **p. 229 – 241**.

Therien I, Bleau G, Manjunath P. 1995. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. Biol. Repro. **52**: 1372 – 1379.

Thérin I, Manjunath P. 1996. Phospholipid-binding proteins of bovine seminal vesicles modulate HDL and heparin-induced capacitation of spermatozoa. Biol. Reprod. **54 (l 1)**: 23.

Věžník Z. 2004. Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy. Brno: Výzkumný ústav veterinárního lékařství. ISBN 80-86895-01-7.

Vivacqua A, Siciliano L, Sabato M, Palma A, Carpino A. 2004. Prostasomes as zinc ligands in human seminal plasma. Int. J. Androl. **27 (1)**: 27 – 31.

Wagner A, Ekhlasi-Hundrieser M, Hettel C, Petrunkina A, Waberski D, Nimtz M, Töpfer-Petersen E. 2002. Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation-studies in the pig. Mol. Reprod. Dev. **61 (2)**: 249 – 57.

Walensky LD, Snyder SH. 1995. Inositol 1,4,5-triphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. J. Cell Biol. **130**: 857 – 869.

Wandernoth PM, Raubuch M, Mannowetz N, Becker HM, Deitmer JW, Sly WS, Wennemuth G. 2010. Role of carbonic anhydrase IV in the bicarbonate-mediated activation of murine and human sperm. PLoS ONE **5 (e15061)**. DOI:10.1371/journal.pone.0015061.

Ward CR, Storey BT, Kopf GS. 1992. Activation of a Gi Protein in Mouse Sperm Membranes by Solubilized Proteins of the Zona Pellucida, the Egg's Extracellular Matrix. J. Biol. Chem.

267: 14061 – 14067.

Wassarman PM. 1988. Zona pellucida glycoproteins. Annu. Rev. Biochem. **57**: 415 – 442.

White DR, Aitken RJ. 1989. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. Gamete Research. **22**: 163 – 177.

Wolf DE, Hagopian SS, Isogima S. 1986. Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse. J. Cell Biol. **102**: 1372 – 1377.

Xie F, Garcia MA, Carlson AE, Schuh SM, Babcock DF, Jaiswal BS, Gossen JA, Esposito G, van Duin M, Conti M. 2006. Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. Developmental Biology **296**: 353 – 362. DOI:10.1016/j.ydbio.2006.05.038.

Yamada Y, Aketa K. 1981. Vitelline layer lytic aktivity in sperm extracts of sea urichin, *Hemicentrotus pulcherrismus*. Gamete Res. **4**: 193 – 202.

Yanagimachi R. 1969. In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. Journal of Reproduction and Fertility **18**: 275 – 286.

Yanagimachi R. 1982. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization related phenomena in the hamster. Gamete res. **5**: 323 – 344.

Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil E et al. (Eds.), The Physiology of Reproduction. Raven Press, New York, p. 81 – 182.

Yi YJ, Zimmerman SW, Manandhar G, Odhiambo JF, Kennedy C, Jonáková V, Maňásková-Postlerová P, Sutovsky M, Parks CS, Sutovsky P. 2012. Ubiquitin-activating enzyme (UBA1) is required for sperm capacitation, acrosomal exocytosis and sperm–egg coat penetration during porcine fertilization. International Journal of Andrology **35**: 196 – 210. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2011.01217.x.

Zhu JJ, Barratt CLR, Lippes J. 1994. The sequential effect of human cervical mucus, oviductal fluid, and follicular fluid on sperm function. Fertil. Steril. **61**: 1129 – 1135.

Zigo M, Dorosh A, Pohlová A, Jonáková V, Šulc M, Maňásková-Postlerová P. 2015. Panel

of monoclonal antibodies to sperm surface proteins as a tool for monitoring localization and identification of sperm-zona pellucida receptors. Cell and Tissue Research. **Vol. 359 issue 3. p.**: 895 – 908.

Zimmerman S, Sutovsky P. 2009 The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization. Journal of Reproductive Immunology **83**: 10 – 25. DOI: 10.1016/j.jri.2009.07.006.

Zini A, Agarwal A. 2014. Spermatogenesis: An Overview from book Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction. DOI: 10.1007/978-1-4419-6857-9_2.

Broekhuijse MLWJ, Šoštarić E, Feitsma H, Gadella BM. 2012. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. Journal of animal science 90**(3)**: 779 – 789.

Yoshid K, Kang W, Nakamura A, Kawano N, Hanai M, Miyado M, Miyamoto Y, Iwai M, Hamatani T, Saito H, Miyado K, Umezawa A. 2018. Ubiquitin-activating enzyme E1 inhibitor PYR-41 retards sperm enlargement after fusion to the egg. Reproductive Toxicology **76**: 71 – 77. DOI: 10.1016/j.reprotox.2018.01.001.

Valverde A, Madrigal M, Caldeira C, Bompart D, de Murga JN, Arnau S, Soler C. 2018. Effect of frame rate capture frequency on sperm kinematic parameters and subpopulation structure definition in boars, analysed with a CASA-Mot system. Reprod Dom Anim **54**: 167 – 175. DOI: 10.1111/rda.13320.

Liu DY, Baker HW. 1998 Calcium ionophore-induced acrosome reaction correlates with fertilization rates in vitro in patients with teratozoospermic semen. Human reproduction 13**(4):** 905 – 910.