

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Kvalitativní parametry kryokonzervovaného hřebčího
ejakulátu s přidavkem specifické proteinové frakce
semenné plazmy**

Diplomová práce

**Bc. Ištvaníková Veronika
Reprodukční biotechnologie**

Ing. Šichtař Jiří, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Kvalitativní parametry kryokonzervovaného hřebčího ejakulátu s přídavkem specifické proteinové frakce semenné plazmy" 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 Ing. Jiřímu Šichtařovi, PhD., za cenné rady, podněty a připomínky při vedení diplomové práce. Ráda bych také poděkovala Ing. Filipě Bubeníčkové, která mi po celou dobu psaní diplomové práce byla nápomocná. Dále bych chtěla poděkovat celé své rodině, která mě po celou dobu studia obětavě podporovala.

Kvalitativní parametry kryokonzervovaného hřebčího ejakulátu s přidavkem specifické proteinové frakce semenné plazmy

Souhrn

Cílem diplomové práce je ověřit hypotézu, že přidavek heparin vázající proteinové frakce semenné plazmy k ejakulátu před zamrazením, zvýší kvalitu rozmrazeného ejakulátu.

Ejakulát byl odebrán standardním způsobem od šesti hřebců. Spermie byly naředěny kryokonzervačním ředidlem. Jednotlivé proteinové frakce byly přidávány k naředěným spermím ve třech koncentracích 150, 250 a 500 µg/ml. Takto připravené semeno se dále manuálně plnilo do plastových pejet o objemu 0,5 ml, ve kterých bylo zmrazeno a dále uchováváno v tekutém dusíku. Po rozmrazení (37°C, 30 s.) byla kvalita kryokonzervovaného ejakulátu hodnocena na úrovni funkčnosti plasmatické membrány (HOS test), integrity plasmatické membrány (testování viability) a integrity akrosomu.

Přidavek heparin-nevázající a heparin-vázající proteinové frakce semenné plazmy do ejakulátu hřebců před zmrazením neměl vliv na vyšší zastoupení spermíí s funkční plasmatickou membránou, spermíí s neporušenou integritou plasmatické membrány a obsah mrtvých spermíí s poškozenou integritou akrosomu po rozmrazení. Zaznamenali jsme signifikantní zvýšení obsahu živých spermíí s neporušenou integritou akrosomu po rozmrazení v inseminačních dávkách s přidavkem heparin-vázající proteinové frakce semenné plazmy před zmrazením.

Na kvalitu rozmrazených spermíí neměl signifikantní vliv přidavek heparin-nevázající a heparin-vázající proteinové frakce v námi vybraných koncentracích.

Na jednotlivé hřebce neměl přidavek heparin-nevázající a heparin-vázající proteinové frakce signifikantní vliv na kvalitu rozmrazených spermíí. Individualita hřebce při přidavku heparin-nevázající a heparin-vázající proteinové frakce měla signifikantní vliv na funkčnost a integritu plasmatické membrány, ovšem neměla signifikantní vliv na integritu akrosomu rozmrazených spermíí.

Na základě výsledků této práce můžeme obecně konstatovat, že přidavek heparin-vázající proteinové frakce neměl zásadní příznivý, ale ani škodlivý, vliv na spermie po rozmrazení. Navíc můžeme říci, že přidavek heparin-nevázající proteinové frakce měl téměř shodný vliv na kvalitu rozmrazených spermíí.

Klíčová slova: HEP+. Hřelec. Hypoosmotický test. Kryokonzervace. Spermie. Viabilita.

Qualitative parameters of cryopreserved stallion ejaculate with addition of specific protein fraction from seminal plasma

Summary

The goal of this thesis is to verify the hypothesis that the addition of heparin binding protein fraction of seminal plasma to ejaculate before freezing will increase the quality of thawed ejaculate.

Ejaculate was collected in a standard way from six stallions. The spermatozoa were diluted with cryopreservative diluent. The individual protein fractions were added to the diluted spermatozoa in three concentrations of 150, 250 and 500 µg/ml. The seed prepared this way was further manually filled into 0.5 ml plastic straws, where in which it was frozen and kept in liquid nitrogen. After thawing (37°C, 30 sec.), was quality of cryopreserved ejaculate quality was assessed at plasma membrane functionality (HOS test), plasma membrane integrity (viability testing) and acrosome integrity.

Addition of non-heparin binding and heparin binding protein fraction of seminal plasma the pre-freezing stallion ejaculate did not affect the higher plasma functional sperm count, sperm with intact plasma membrane integrity, and the content of dead sperm with damaged acrosome integrity after thawing. We noted a significant increase in live sperm content with intact acrosome integrity after thawing in insemination doses with addition of heparin binding protein fraction of seminal plasma before freezing.

The quality of thawed spermatozoa was not significantly affected by the addition of non-heparin binding and heparin binding protein fractions at our selected concentrations.

The addition of non-heparin binding and heparin binding protein fractions did not significantly affect the quality of thawed sperm on individual stallions. The individuality of the stallion with the addition of non-heparin binding and heparin binding protein fraction had a significant effect on the functionality of and plasma membrane integrity, but did not significantly affect the integrity of the acrosome thawed sperm.

Based on the results of this work, we can generally conclude that the addition of heparin binding protein fraction was not essential, but also not harmful, the effect on sperm. after thawing. In addition, the addition of non-heparin binding protein fraction has almost the same effect on the quality of thawed sperm.

Keywords: HEP+. Stallion. Hypoosmotic swelling test. Cryopreservation. Sperm. Viability.

Obsah

1 ÚVOD.....	1
2 CÍL PRÁCE.....	2
3 LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	3
3.1 Anatomie	3
3.2 Hormonální řízení	5
3.3 Spermatogenese	8
3.3.1 Plasmatická membrána	12
3.4 Zrání v nadvarleti	14
3.5 Semenná plazma.....	17
3.6 Kapacitace a akrosomální reakce	19
3.7 Proteiny semenné plazmy a jejich vliv na funkci spermií	21
3.8 Kryokonzervace.....	25
4 MATERIÁL A METODY	28
4.1 Zpracování semenné plazmy	28
4.2 Izolace proteinů semenné plazmy	28
4.3 Odběr ejakulátu	29
4.4 Mrazení a rozmrazení inseminačních dávek	29
4.5 Příprava rozmrazeného vzorku na mikroskopické hodnocení.....	29
4.6 Hodnocení funkčnosti plasmatické membrány (HOS).....	30
4.7 Hodnocení integrity plasmatické membrány a akrosomu	30
4.8 Statistická analýza.....	30
5 VÝSLEDKY	31
5.1 Hypoosmotický test (HOS).....	31
5.2 Integrita plasmatické membrány	35
5.3 Integrita akrosomu	42
5.3.1 Živé spermie s nepoškozeným akrosomem.....	42
5.3.2 Mrtvé spermie s poškozeným akrosomem.....	48
6 DISKUSE	54
7 ZÁVĚR.....	60
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	61

1 ÚVOD

Kryokonzervace je důležitý nástroj jako asistenční reprodukční technika (Patel et al. 2016). Kryokonzervace nabízí několik výhod – dostupnost ejakulátu bez přítomnosti hřebce a tím i větší flexibilitu při inseminaci, přepravu spermatu na mnohem větší vzdálenosti bez omezení přepravní vzdálenosti (jako je tomu u čerstvého či chlazeného spermatu). Stále, ale není možné zmrazit ejakulát některých hřebců úspěšně. V chovu koní se hřebci vybírají hlavně podle jejich výkonu jen s nepatrným ohledem na kvalitu spermatu či schopnost spermií přežít během kryokonzervace. Ve výsledku jsou získávány ejakuláty špatné kvality neschopné přežít skladování a zmrazení (Al-Essawe et al. 2018a). Kryokonzervace může zhoršit funkci spermií již během příprav semene (ředění a chlazení), ale také během zmrazení či rozmrazování (Neuhauser et al. 2013). Tyto procesy způsobují strukturální a funkční poškození plasmatické membrány a vnitřních organel spermií (Al-Essawe et al. 2018b). Odolnost proti poškození během kryokonzervace závisí do značné míry na složení plasmatické membrány. Přestavba plasmatické membrány během zrání v nadvarletí či po kontaktu se semennou plazmou vede k snížené odolnosti při chlazení a mrazení (Neuhauser et al. 2014).

Semenná plasma je spojena se škodlivým účinkem na kapacitaci spermií (Usuga et al. 2017), proto před kryokonzervací dochází k odstranění téměř celé semenné plazmy, aby negativně neovlivňovala kvalitu spermií po rozmrazení (Alghamdi et al. 2002; Moore et al. 2005). U jednotlivých hřebců má na vhodnost kryokonzervace spermatu vliv individuální složení semenné plazmy (Aurich et al. 1996). Mogielnicka-Brzozowska & Kordan (2011) zmínili možnost přidání specifických plasmatických proteinů do semene pro zachování vlastností odpovědných za efektivní oplození po skladování.

2 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je ověřit hypotézu, že přidavek heparin vázající proteinové frakce semenné plazmy k ejakulátu před zamrazením, zvýší kvalitu rozmrazeného ejakulátu.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 Anatomie

Reprodukční soustava hřebců je tvořena penisem, přídatnými pohlavními žlázami, chámovodem, semenným provazcem, nadvarlaty a varlaty.

Penis

Penis obsahuje specifické struktury, které jsou potřebné pro kopulaci (Akers & Denbow 2013). Penis koně je muskulokavernózního typu a v době klidu je asi 50 cm dlouhý. Během maximální erekce se penis stává třikrát delší. Pyj je složen z močové trubice, topořivého tělesa, houbovitého tělesa, nervů, cév a svalů. Ventrálně je uložena močová trubice obklopená houbovým tělesem. V kraniální části penisu tvoří houbovitě těleso žalud pyje. Topořivé těleso je kaudálně připevněno dvěma rameny k sedací kosti pánve, v kraniální části penisu je uloženo především dorzálně. Žalud penisu tvoří houbovitě těleso, které je stavebně měkčí než těleso topořivé. Toto uspořádání má chránit pohlavní orgány klisny během páření (Budras et al. 2009). Topořivé těleso jde kontinuálně s žilami zodpovědnými za naplnění dutin krví při erekci. Po ventrální straně močové trubice se táhne sval obemykající močovou trubici, který je zodpovědný za posun spermií a moči. Předkožka obklopuje žalud penisu a je tvořena dvojitým záhybem pokožky. Předkožka má funkci ochrany vlastního penisu (Munroe & Weese 2011).

Přídatné pohlavní žlázy

Přídatné pohlavní žlázy tvoří tekutinu, která je složkou semenné plazmy. Mezi přídatné pohlavní žlázy se řadí ampule chámovodu, semenné vajíčky, prostata a bulbouretrální žlázy (Akers & Denbow 2013). Hřelec má ve svém pohlavním aparátu zastoupeny všechny tyto žlázy. Semenné vajíčky leží na dorzální ploše močového měchýře a jedná se o lalůčkovitou strukturu. Prostata obklopuje krček močového měchýře. Jedná se o tuboalveolární žlázu. Ampule chámovodu je rozšířená část chámovodu, která se nachází nad močovým měchýřem. Bulbouretrální žláza leží na močové trubici v oblasti, kde vychází z pánve. Má lalůčkovitou strukturu a je párová (Budras et al. 2009).

Chámovod

Jedná se o párovou trubičku, která slouží jako vývodná cesta pro ejakulát. Začíná v ocasu nadvarlete a končí napojením na močovou trubici. Chámovod prochází semenným provazcem a poševním kanálem až do dutiny břišní. V dutině břišní stoupá dorzokaudálním směrem a vstupuje do pánevní dutiny. Zde se chámovody rozšiřují v ampuli chámovodu, a to nad močovým měchýřem. Poté se u krčku močového měchýře zanořují pod prostatu. Spojují se s vývodem měchýřkovité žlázy a společně vstupují do močové trubice (Marvan a kol. 1992).

Semenný provazec

Semenný provazec se skládá z chámovodu, varletní tepny a žíly, mizních cév a nervů. Tento útvar vede od nadvarlete do poševního kanálu (Akers & Denbow 2013). Semenný provazec je obalen útrobním listem poševního obalu. Přes semenný provazec prochází varletní tepna, která se v blízkosti varlat dělí do několika větví a přivádí k varlatům a nadvarlatům živiny. Síť žil naopak opouští tyto dvě struktury a obklopuje varletní tepnu, tím se vytváří žilní pleteň. Jedná se o protiproudé uspořádání tepny a žil, které zajišťují ochlazování krve v tepně, aby nedocházelo k ohřívání varlat a nadvarlat a tím k nesprávné spermatogenezi (Munroe & Weese 2011).

Nadvarle

Nadvarle zajišťuje prostředí potřebné pro dozrávání a skladování spermií (Akers & Denbow 2013). Nadvarle je spletitý nerozvětvený útvar složený z kanálku, který je dlouhý zhruba sedmdesát metrů. Hlava nadvarlete je zploštělá struktura, která se nachází podél kraniální hranice varlat. Tělo leží z dorsolaterální strany varlete a nadále pokračuje jako ocas. Ocas je výrazná struktura, která je spojena s kaudálním pólem varlat (Munroe & Weese 2011). Hlava nadvarlete nepřesahuje kraniální pól varlete, ale ocas je delší (Budras et al. 2009). Stěna kanálku nadvarlete je složena z řídkého vaziva, hladkosvalových buněk a z epitelu, který je na začátku dvojrstvý cylindrický a postupně se snižuje až na jednovrstevný cylindrický či kubický. Tyto buňky vyměšují sekret důležitý pro výživu spermií, ale také resorbují látky, které vznikají při rozpadu neejakulovaných spermií (Marvan a kol. 1992). V nadvarleti spermie podstoupí řadu morfologických a fyziologických změn. Mezi hlavní změny patří změny plasmatické membrány. Tyto změny probíhají při průchodu

hlavou a tělem nadvarlete. Ocas nadvarlete slouží jako skladiště zralých spermií (Munroe & Weese 2011).

K hlavovému konci varlete je pevně připojená hlava nadvarlete. V této části jej též široce překrývá (Marvan a kol. 1992).

Varle

Varle je párový orgán, který slouží k produkci spermií a hormonů. Varlata jsou uložena v šourku mimo dutinu břišní (Akers & Denbow 2013). Varlata mají tvar oboustranně stlačeného a zkráceného vejce (Budras et al. 2009). Povrch varlete je kryt bělavým obalem, který je velmi pevný. Tento obal je protkán krevními cévami, které jsou na pohled viditelné. Vnitřek varlete je rozdělen vazivovými přepážkami, které vybíhají z bělavého obalu. Mezi přepážkami se nachází parenchym varlete, který se skládá z dvou až čtyř stočených semenotvorných kanálků (Marvan a kol. 1992). Semenotvorný kanálek je vystlán semenotvorným epitelem. V semenotvorném epitelu se nacházejí různá stádia vývoje spermií. Nalezneme v něm také Sertoliho buňky (Amann RP. 2011). Kanálek je obklopený peritubulárními buňkami, spojovacími prvky, kapiláry a Leydigovými buňkami. Každý konec semenotvorného kanálku ústí do varletní sítě, která je spojená s nadvarletem (Akers & Denbow 2013).

Šourek

Šourek hřebce je umístěn ve stydké krajině. Šourek se skládá ze dvou oddělených pouzder, která chrání varlata, nadvarle, semenný provazec a sval zvaný zatahovač šourku. Šourek udržuje teplotu varlat o pár stupňů nižší než je teplota těla, což je důležité pro správnou spermatogenezi. Stěna šourku je složena z vrstvy kůže, útrobního listu poševního obalu a bělavého obalu. Právě bělavý obal vytváří pro každé varle samostatné pouzdro (Munroe & Weese 2011).

3.2 Hormonální řízení

Důležitými regulátory reprodukční fyziologie jsou vizuální, hmatové, sluchové a čichové vjemy.

Funkci reprodukčních orgánů řídí neuroendokrinní systém, který zahrnuje specializované skupiny orgánů nervových buněk a endokrinní tkáň, které vylučují chemické posly nazývané hormony. Ty jsou přepravovány pomocí krve od jednoho orgánu k ovládnutí funkce jiného orgánu (Amann RP. 2011). Hypotalamus spojil centrální nervovou soustavu

s endokrinním systémem do hypotalamo-hypofyzárního systému portálním oběhem, aby koordinoval funkci gonád. Nervový systém hraje zásadní roli při regulaci aktivity gonád pomocí mechanismu zpětné vazby. Existuje inhibiční neboli negativní zpětná vazba a stimulační neboli pozitivní zpětná vazba (Hafez et al. 2000).

Šišinka

Šišinka neboli epifýza syntetizuje hormon melatonin. Melatonin hraje důležitou roli v několika oblastech fyziologie. Jeden z vlivů má na reprodukční systém, a to díky pozitivnímu vztahu mezi denním světelným cyklem a tvorbou spermií (Satta et al. 2018). Syntéza a sekrece melatoninu je značně zvýšena během tmy, naopak dlouhé světelné dny u koní jsou zodpovědné za snížení sekrece melatoninu (Hafez et al. 2000). Melatonin má vliv na zlepšení pohyblivosti spermií, progresivní pohyb, rychlost a plodnost spermií. Naopak nebyla zjištěna žádná korelace mezi motilitou, koncentrací a morfologií spermií (Satta et al. 2018).

Hypotalamus

Hypotalamus vyvíjí kontrolu nad hypofýzou vylučováním několika peptidických hormonů. Hypotalamus tvoří tyto hormony: vazopresin, oxytocin, gonadotropin releasing hormon (GnRH), somatostatin a somatokinin (Kannan CR. 2011). Hypotalamus vylučuje gonadotropin releasing hormon - GnRH, který stimuluje hypofýzu k vylučování folikuly stimulujícího hormonu - FSH a luteinizačního hormonu - LH (Brinsko et al. 2011). GnRH poskytuje humorální vazbu mezi nervovým a endokrinním systémem. V reakci na neurální signály se GnRH uvolňuje v pulzech do hypotalamo-hypofyzárního portálního systému a putuje do přední části hypofýzy (Hafez et al. 2000).

Hypofýza

Hypofýza je velmi důležitá endokrinní žláza. Je rozdělena na tři laloky. Největší je adenohypofýza neboli přední lalok hypofýzy. Obsahuje zhuštělé epiteliální buňky, které vylučují mnoho známých hormonů hypofýzy jako je LH, FSH a další (Akers & Denbow 2013). V distální části adenohypofýzy bazofilní epiteliální buňky vylučují hormony, které mají vliv na reprodukční biologii. Jedná se o dva hormony, a to folikuly stimulující hormon a luteinizační hormon. Folikuly stimulující hormon hraje roli při produkci spermií a luteinizační hormon působí na intersticiální buňky ve varlatech (Jones & Lopez 2014). U samců FSH působí na zárodečné buňky v semenotvorných kanálcích varlat a je zodpovědný

za spermatogenesi až do stádia sekundárných spermatocytů. V dalších fázích spermatogenese působí androgeny z varlat. Produkci androgenů stimuluje působení LH na Leydigovy buňky (Hafez et al. 2000). Poté následuje druhý největší lalok, a to neurohypofýza neboli zadní lalok. Neurohypofýza má odlišnou buněčnou strukturu oproti přednímu laloku. V této oblasti se vyskytují nervové buňky a hormony tohoto laloku jsou syntetizovány buňkami v hypotalamu (Akers & Denbow 2013).

Varle

Leydigovy buňky ve varlatech hřebců produkují testosteron a také velké množství estrogenů. Vysoká koncentrace testosteronu je nezbytná pro spermatogenesi (Brinsko et al. 2011). Testosteron reguluje funkce přídatných pohlavních žláz a udržuje libido hřebce – to vše přes krevní oběh (Munroe & Weese 201). Sertoliho buňky produkují proteinový hormon inhibin, ten má vliv na hypofýzu a tlumí sekreci FSH (Brinsko et al. 2011). Aktivin nalezený v tekutině varlat stimuluje sekreci FSH (Hafez et al. 2000). Hormon FSH po navázání na receptory v Sertoliho buňkách signalizuje k sekreci androgen vázajícího proteinu neboli ABP (Sharma & Agarwal 2011). Androgen vázající protein (ABP) má vysokou afinitu na vázání androgenních steroidů, je vylučován do lumen semenotvorných kanálků a transportuje se do nadvarlete. Tento protein je transportován do nadvarlat, což naznačuje funkci místního transportního proteinu pro testosteron z varlat do nadvarlat (Westphal U. 1986). ABP zvyšuje koncentraci androgenů k zahájení nebo pokračování procesu spermatogenese (Sharma & Agarwal 2011).

GnRH se uvolňuje pulsním způsobem v reakci na neurální či hormonální podněty. GnRH je transportován přes hypotalamo-hypofyzární portální systém do přední části hypofýzy, kde ovlivňuje uvolňování gonadotropních hormonů LH a FSH. Hormony LH a FSH působí na buňky varlat, kde regulují spermatogenezi a produkci testosteronu (Munroe & Weese 2011). Primárním efektem LH je nepřímá podpora spermatogenese přes stimulaci Leydigových buněk k produkci testosteronu. Sertoliho buňky uvnitř semenotvorného epitelu udržují spermatogenezi v reakci na působení FSH a testosteronu (Brinsko et al. 2011). Hormon FSH interaguje se Sertoliho buňkami, které poskytují podporu a výživu pro rozvoj a tvorbu spermií (Sharma & Agarwal 2011). Tyto dva proteinové hormony mají zpětnou vazbu k přední části hypofýzy (Munroe & Weese 2011). Testosteron má negativní zpětnou vazbu na vylučování GnRH hypotalamem. Touto vazbou potlačuje také reakci adenohipofýzy na dostupný GnRH a tím nedochází k uvolnění LH. Pokud hladina testosteronu v krvi klesne,

tato vazba se rozruší a dochází k opětovnému vylučování. Syntéza a sekrece FSH je mnohem méně závislá na dostupný GnRH než LH. Sekreci FSH ovlivňují především proteinové hormony Sertoliho buněk inhibin a aktivin. Tyto dva hormony působí na adenohipofýzu, kterou buďto potlačují (inhibin) nebo stimulují (aktivin) k sekreci FSH s malým nebo žádným účinkem na sekreci LH (Amann RP. 2011).

3.3 Spermatogenese

Cyklus spermatogenese je popsán jako řada změn v dané oblasti semenotvorného epitelu (Akers & Denbow 2013). Spermatogenese je proces dělení a diferenciacie, při kterém se spermie produkují v semenotvorných kanálcích. Semenotvorné kanálky jsou složeny ze somatických buněk (Sertoliho buňky) a zárodečných buněk (spermatogonie, spermatocyty a spermatidy). Tři typy zárodečných buněk rozděluje spermatogenesi na spermatocytogenesi, meiósu a spermiogenesi. Spermatocytogenese zahrnuje mitotické dělení buněk pro zvýšení výtěžku spermatogenese, produkci kmenových buněk a primárních spermatocytů. Během meiósy probíhají dvě buněčná dělení, která redukuje počet chromozomů na haploidní počet, a výsledkem jsou čtyři spermatidy. Spermiogenese je diferenciacie ve zralé spermatidy, které jsou uvolňovány z lumen povrchu kanálku jako spermie (Johnson et al. 1997). Ty pokračují přes hlavu, tělo a ocas nadvarlete, kde prodělávají proces dozrávání (Garner & Hafez 2000).

Funkční tkáň varlete zahrnuje semenotvorný epitel a Leydigovy buňky. Leydigovy buňky se nacházejí v intersticiálním prostoru varlat. U podkladové bazální membrány semenotvorného epitelu se nacházejí Sertoliho buňky, které zasahují až do lumen kanálku. Jsou velmi strukturované a obsahují řadu vyvíjejících se buněk, které tvoří stěnu kanálků. Dále se zde nacházejí zárodečné buňky spermatogonie. Sertoliho buňky do značné míry kontrolují osud spermatogonií. Každá Sertoliho buňka se snaží zachytit maximální počet zárodečných buněk. To znamená, že absolutní počet spermií vyprodukovaných za den je spojen s hustotou Sertoliho buněk uvnitř semenotvorných kanálků. Bazální oblast semenotvorného kanálku osídlují spermatogonie a časné spermatocyty. Od bazální membrány směrem do lumen kanálku se nacházejí všechny ostatní zárodečné buňky. Ne všechny buňky v kanálku dozrávají společně, nacházejí se v něm tedy různé stupně zralosti spermií (Akers & Denbow 2013).

Spermatogonie vznikají z gonocytů umístěných v prekurzorových semenných tubulech během druhého měsíce březosti (Johnson et al. 2011). Spermatogonie se objevují jako kulaté buňky s malými kulatými jádry a tmavou skvrnou díky přítomnosti velkého množství chromatinových granul (Garner & Hafez 2000). Spermatogonie jsou nejméně diferencované z hlavních buněk a odlišují se od ostatních typů skutečností, že podstupují mitotické dělení. Spermatogonie s jádrem jsou hladké, hrubé nebo intermediální struktury, označovány jako typ A, typ B a typ I (intermediální). Každá nově vzniklá spermatogonie obdrží dva chromosomy (X a Y) a jejich DNA se replikuje tak, že každá dceřiná buňka po mitotickém dělení obdrží pouze jeden chromosom z páru (jedna buňka X chromosom, druhá Y). Dělení spermatogonií vede k produkci primárních spermatocytů (Ball BA. 2014).

Varlata obsahují primární i sekundární spermatocyty, které se od ostatních odlišují tím, že podstupují meiotické dělení. Primární spermatocyty jsou nejvíce vyvinuté zárodečné buňky po spermatogoniích, které replikují DNA (Ball BA. 2014). Oproti spermatogoniím mají větší jádra (Hafez B. & Hafez ESE. 2000). Podstupují první redukční dělení a tím vznikají sekundární spermatocyty, které obdrží duplicitní kopie pouze jednoho chromozomu z páru. Zatímco u dělení primárního spermatocytu obdrží každá dceřiná buňka (sekundární spermatocyt) dvě kopie buď X chromosomu či Y chromosomu. Sekundární spermatocyty nereplikují DNA, jejich dělení zahrnuje pouze oddělení identických párů chromosomů, což vede k vzniku haploidních spermatid (Ball BA. 2014).

Spermatidy jsou nejvíce vyvinuty ze všech tří zárodečných stádií. Nedělí se, ale procházejí transformačními změnami (Ball BA. 2014).

Spermatidy podstupují proces zvaný spermiogeneze, během něhož se z kulatých spermatid tvoří spermie. Tento proces nastává až po plně ukončené meióse. Morfologické změny během procesu vedou ke konečnému vzhledu spermií (Sharma & Agarwal 2011). Tyto změny zahrnují kondenzaci jaderného chromatinu, tvorbu spermií s bičíkem a vývoj akrosomu (Garner & Hafez 2000). Vývojová stádia spermatid během procesu spermiogeneze jsou rozděleny do čtyř fází, a to Golgiho fáze, fáze čepičky, prodlužovací fáze a dozrávací fáze (Johnson et al. 2011).

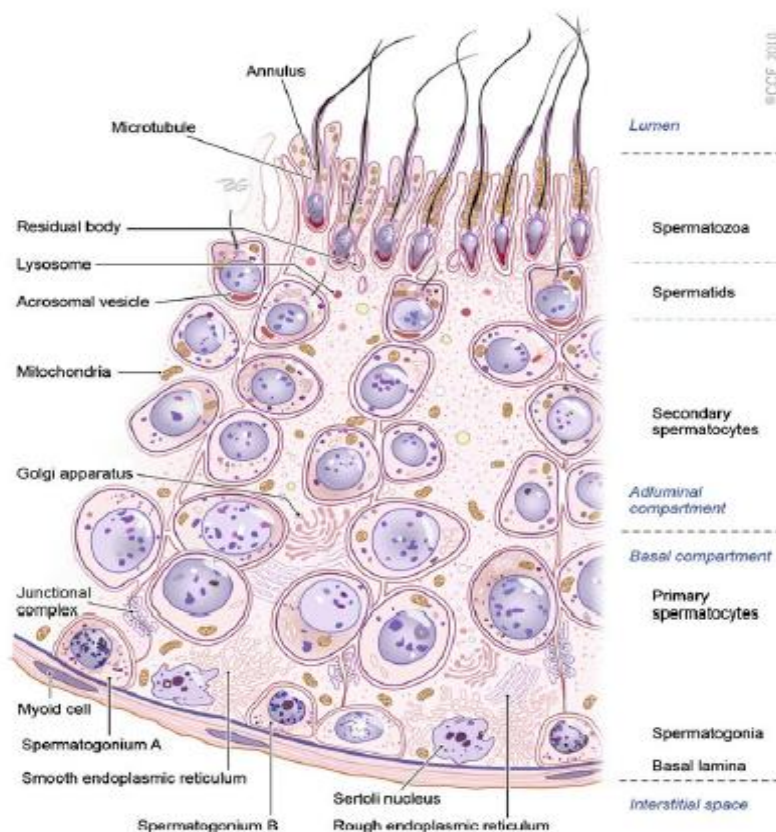
Golgiho fáze spermatid má výrazný Golgiho aparát, který produkuje vezikuly s vazbou na jadernou membránu. Tyto malé vezikuly fúzíjí k vytvoření akrosomálních váčků, které sousedí s jádrem. Tím se vytvoří akrosom, který je spojen s jadernou membránou a obsahuje vezikuly s enzymy (Johnson et al. 2011). Zároveň tím spermatida dostává specificky zploštělý a špičatý tvar hlavičky. Nadále během této fáze migrují centrioly v cytoplasmě na

základnu jádra. Z proximálního centriolu se zakládá implantační přístroj k ukotvení bičíku v blízkosti jádra (Sharma & Agarwal 2011).

Ve fázi čepičky se tvoří výrazná čepice nad jádrem pokrývající asi 30-50 % povrchu (Sharma & Agarwal 2011). Čepička se tvoří tehdy, když se akrosomální vezikuly zploští a začínají se rozprostírat nad jádrem (Johnson et al. 2011). V této fázi se také vyvíjejí komponenty bičíku, které jsou tvořeny z distálního centriolu. Komponenta se protahují až za okraj buněčné cytoplasmy. Raný vývoj bičíku sestává ze dvou centrálních trubiček periferně obklopených devíti páry trubiček (Garner & Hafez 2000).

Prodlužovací fáze spermiogenese je charakterizována výraznými změnami v okolí jádra a vyvíjejících se konců spermatid, tvoří se výrazná hmota akrosomu nad jádrem (Garner & Hafez 2000). Čepička se nadále rozkládá nad jádrem, a to se začíná prodlužovat (Johnson et al. 2011). Akrosom, který těsně přiléhá k jádru, se také kondenzuje a prodlužuje tak, aby odpovídal tvaru jádra (Garner & Hafez 2000). Membrána akrosomu je anatomicky rozdělena na vnitřní akrosomální membránu, která je spojená s vnější akrosomální membránou v úrovni equatoriálního segmentu po obvodu. Úpravami v akrosomální morfologii a biochemii je zajištěn průchod spermií přes nadvarle. Ve zralých spermiích akrosom obsahuje množství aktivních molekul, jak uvnitř akrosomální matrice, tak na vnitřní akrosomální membráně. Tyto aktivní molekuly, které zahrnují sortiment proteinových receptorů a hydrolytické enzymy, jsou považovány za velice důležité pro adhezi a průnik spermií skrz zonu pellucidu a navázání spermie na membránu oocyty (Varner & Johnson 2011). Předposlední fáze se vyznačuje tím, že se tvoří kaudální manžeta, která vystupuje na kaudální hranici akrosomu, kde volně obklopuje axonem (Sharma & Agarwal 2011). V cylindrické manžetě je specializovaná struktura cytoplasmy tzv. „chromatoidní“ těleso, které se kolem axonemy kondenzuje za vzniku struktury podobné kruhu. Tento kruh neboli prstenec vytvoří v blízkosti proximálního centriolu a následně migruje podél ocasu. Mitochondrie dříve distribuované v cytoplasmě spermatidy se koncentrují v blízkosti axonemy, kde tvoří pouzdro, které charakterizuje střední část bičíku. Fáze dozrávání spočívá v konečné transformaci prodloužených spermatid do buněk, které se mají uvolnit do lumen. V rámci živočišného druhu, jádro a chromatinová granule podléhají progresivní kondenzaci. Přečodné proteiny v chromatinu jsou nahrazeny protaminy, protože tvoří jemný homogenní materiál, který rovnoměrně vyplňuje celé jádro. Podkladových devět párů hrubých vláken tvoří vláknitý plášť. Tato hrubá vlákna jsou spojena v sloupky v krčku spermatidy. Prstenec migruje distálně od své polohy v blízkosti jádra podél ocasu až do místa, kde bude střední oddíl hlavní části bičíku. Mitochondrie se stávají těsně sbalenými do kontinuálního pláště

(Garner & Hafez 2000). Většina cytoplasmy ze spermatidy je vyražena jako zbytkové těleso a spermatida se pohybuje směrem k lumen semenotvorného kanálku. Jakmile je prodloužení spermatid kompletní, Sertoliho buňka zbaví spermie přebytečné cytoplasmy, která se okolo vyvíjející se spermie stahuje. Spermie je nakonec uvolněna do lumen kanálku (Sharma & Agarwal 2011).



Obrázek 1: Schéma semenotvorného kanálku (Sharma & Agarwal 2011).

Ne všechny buňky v kanálku dozrávají společně, nacházejí se v něm tedy různé stupně zralosti. Vlna vývoje definuje postupné pořadí stadií spermatogeneze, které vzniká po celé délce kanálku (Akers & Denbow 2013). Vlna tohoto vývoje potřebná k dokončení cyklu semenného epitelu u koní trvá 12 dní (Garner & Hafez 2000). Délka cyklu je definována jako doba mezi uvolněním spermii, novým vývojem buněk a opětným uvolněním spermii (Johnson et al. 2011). Úsek kanálku v jednom stupni vývoje sousedí obvykle s částmi kanálků, které právě prodělaly předchozí stupeň cyklu (Hafez B. & Hafez ESE. 2000). U koní je popsáno osm etap tohoto cyklu (Johnson et al. 2011). V první etapě dochází k uvolnění spermii do lumen kanálku a vzhled epitelu je charakterizován úplnou nepřítomností spermii. Naopak jsou přítomny primární spermatogonie a Sertoliho buňky v blízkosti bazální membrány. Může se v epitelu nacházet i pár kultivovaných spermatid v oblasti blíže lumen. V druhé etapě se

začínají prodlužovat spermatidy. Ve třetí etapě se prodlužující spermatidy začínají hromadit nebo seskupovat v úzkém spojení Sertoliho buněk. Čtvrtá etapa se vyznačuje výskytem sekundárních spermatocytů. Pokračují etapy pět až osm, během kterých nadále expanduje epitel v další stádia, dokud nejsou spermie uvolněny do lumen kanálku, a v daném úseku začíná nový cyklus. Mezi semenotvorným kanálkem a krví je bariéra, která brání prostupu velkým molekulám a imunitním buňkám, které by mohly způsobit autoimunitní reakci. Autoimunitní reakce by mohla mít negativní dopad na vyvíjející se spermie podléhající meióze (Akers & Denbow 2013).

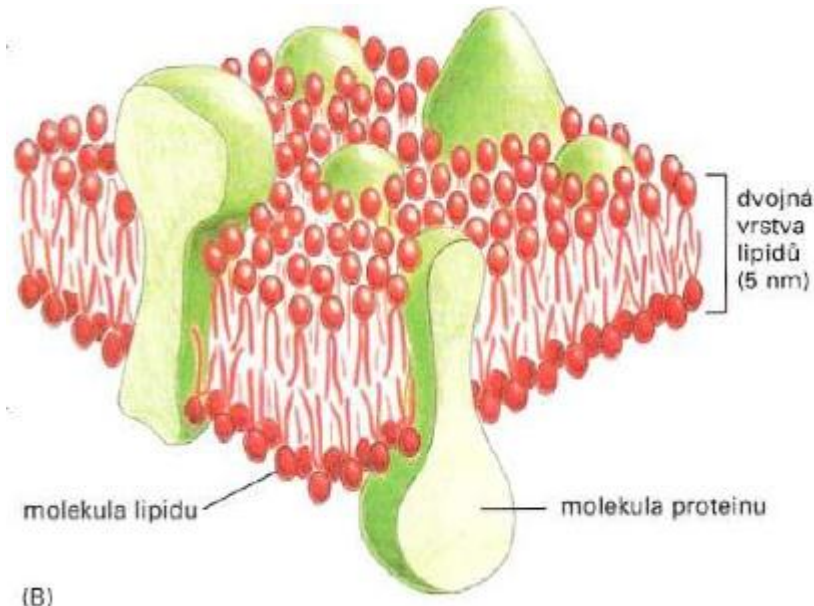
3.3.1 Plasmatická membrána

Obalem živých buněk je plasmatická membrána, která je tenká a průsvitná. Plasmatická membrána pokrývá celou spermii a je kontinuální, a to až do akrosomální reakce, smrti či do stárnutí buňky. Na spermii plasmatická membrána tvoří tři zóny: lipidovou dvojvrstvu, rozhraní (fosfolipid-voda) a glykokalyx (Amann & Graham 2011). Všechny buněčné membrány jsou složeny z lipidů a proteinů. Nejhojnějšími membránovými lipidy jsou fosfolipidy (Albert et al. 2005). Kompozice fosfolipidů přítomných v buňkách tvoří spontánně fosfolipidovou dvojvrstvu. V každé vrstvě tvoří uhlovodíkové řetězce fosfolipidů hydrofobní jádro, které je ve většině membrán tlusté 3 až 4 nm. Povrch membrány tvoří hydrofilní vrstva, tvořena hlavičky fosfolipidů. Tyto hlavičky mají kolem 2 nm (Lodish et al. 2016). Hydrofilní hlavička je spojena se zbytkem molekuly přes fosfátovou skupinu (Albert et al. 2005). Na povrch membrány mohou být absorbovány proteiny. Proteiny se mísí s lipidy a reprezentují přibližně 50% hmotnosti membrány. V membráně převládají fosfolipidy a cholesterol. Proteiny uvnitř těchto lipidů jsou považovány za integrální nebo periferní. Integrální proteiny jsou podstatné pro strukturu membrány a periferně jsou spojené s membránou, ale jsou snadno odstranitelné. Některé integrální proteiny slouží jako póry či kanály přes membránu nebo jsou povrchovými receptory pro jiné molekuly. Mnoho proteinů na vnějším povrchu obsahuje postranní řetězce sacharidů, které mají tendenci mít čistý negativní náboj. Přitahují a volně se váží na další proteiny v médiu okolo spermií. Díky glykokalyxové oblasti se můžou změnit v závislosti na médiu, ve kterém se nacházejí (Amann & Graham 2011).

Hřebci v plasmatické membráně spermií mají poměr cholesterolu a fosfolipidů 0,36 (Amann & Graham 1993), oproti tomu býci v plasmatické membráně spermií mají poměr cholesterolu a fosfolipidů 0,51 (Parks & Graham 1992). Dále se v membráně nachází

cholin, ethanolain a sfingomyelin (Amann & Graham 2011). V plasmatické membráně se nacházejí tři typy lipidů. Typická membrána je složena z fosfoglyceridů, sfingolipidů a steroidů. Všechny tři typy lipidů jsou amfipatické molekuly s hydrofilní hlavou a hydrofobním ocáskem. Tyto molekuly mají amfipatický charakter stejný, jen se liší v chemických strukturách, hojnosti výskytu a funkcí v membráně (Lodish et al. 2016). Fosfatidylcholin je nejběžnější typ fosfolipidů u většiny buněk. Obsahuje malou molekulu cholinu připojenou k fosfátu a jeho hydrofilní hlavičce s dvěma řetězci uhlovodíků, které tvoří hydrofobní konce. V plasmatické membráně se nacházejí glykolipidy v necytosolové polovině dvojvrstvy, tudíž jsou jejich cukerné skupiny vystaveny vnějšímu prostředí. Tyto cukerné skupiny tvoří součást ochranného pláště sacharidů obklopující většinu živočišných buněk. V nízké míře plasmatická membrána obsahuje inositolové fosfolipidy, které hrají roli při přenosu signálu z povrchu buňky do útrob buňky (Albert et al. 2005). Glykolipidy tvoří 2 až 10% z celkového počtu lipidů v plasmatických membránách. V membráně se vyskytují také fosfoglyceridy a jejich deriváty glycerol 3 – fosfát. Jedná se o typickou molekulu fosfoglycerolu tvořící hydrofobní konec. Negativně nabitá fosfátová skupina a kladně nabitá skupina či hydroxylová skupina v hlavové skupině interagují silně s vodou. Druhou třídou membránových lipidů jsou sfingolipidy. Jsou odvozeny od sfingosinu a aminoalkoholu s dlouhým uhlovodíkovým řetězcem a obsahují mastné kyseliny s dlouhým řetězcem připojeným k sfingosinové aminoskupině. Ze sfingolipidů se nejvíce vyskytuje fosfocholin, který je připojen k terminální hydroxylové skupině sfingosinu. Sfingomyelin je fosfolipid, jehož celková struktura je docela podobná fosfatidylcholinu. Jiné sfingolipidy jsou amfipatické glykolipidy, jejichž polární skupiny jsou cukry. Cholesterol a jeho deriváty představují třetí důležitý faktor membránových lipidů, steroidů. Základní struktura je čtyřkruhový uhlovodík. Cholesterol je hlavní steroidní složka tkání zvířat. Má hydroxylový substituent na jednom kruhu, je amfipatický, ale může interagovat s vodou. Cholesterol je charakteristický pro plasmatické membrány savčích buněk (Lodish et al. 2016). Spermie u různých druhů se liší ve složení a lokalizaci fosfolipidů, dále v povaze mastných acylových postranních řetězců, které se liší mezi určitými oblastmi plasmatické membrány. Poměr cholesterolu vůči fosfolipidům určuje tekutost membrány. Obecně platí, že čím větší je podíl cholesterolu, tím méně je membrána tekutá a pružná. Cholesterol pomáhá udržovat fosfolipidy v náhodném lamelárním uspořádání. Za určitých podmínek se mohou lipidy změnit na krystalické pole (ve fázi přechodu) a proteiny se agregují. To vyvolává nestabilitu membrány a může jí nenávratně poškodit. Jedním z faktorů, který to může způsobit, je zchlazování (Amann & Graham 2011).

Plasmatická membrána slouží jako bariéra, která chrání obsah buňky od promíchání s okolním prostředím, dělá ovšem více než jen to. Plasmatickou membránou prochází dovnitř živiny a nazpět skrz membránu odchází odpadní látky, proto je prostoupena vysoce selektivními pumpami a kanály. Ty jsou tvořeny molekulami proteinů. Další proteiny v plasmatické membráně umožňují reakci buňky na změny v jejím okolí. Plasmatická membrána umí měnit svůj tvar tím, že zvětšuje svůj povrch přidáním membránových složek bez ztráty celistvosti. Díky tomu může buňka růst a deformovat se (Albert et al. 2005). Fosfolipidová dvojvrstva má dvě důležité vlastnosti. První je, že hydrofobní jádro je nepropustná bariéra, která brání difúzi ve vodě rozpustných molekul skrz membránu. Důležité je, že tato jednoduchá bariérová funkce je doplněna přítomností membránových proteinů, které zprostředkovávají transport molekul skrz plasmatickou membránu, pro které je jinak tato fosfolipidová dvojvrstva nepropustná. Druhou vlastností membrány je její stabilita. Dvojitá struktura je udržována van der Waalsonovými silami mezi lipidovými řetězci. Spermie mají dlouhé štíhlé rozšíření plasmatické membrány nazývané *cilium* neboli bičík. To umožňuje pohyb spermii v médiu (Lodish et al. 2016). Funkce membrány spermii se regionálně liší (Amann & Graham 2011).



Obrázek 2: Schéma plasmatické membrány (Albert et al. 2005).

3.4 Zrání v nadvarletí

Hlava nadvarlete je počáteční segment a spolu s tělem nadvarlete poskytují prostředí, které alespoň částečně řídí účinky testosteronu na zrání spermii. Ocas nadvarlete slouží jako

nádrž pro zralé spermie. Tam spermie čekají na ejakulaci spuštěnou sexuální stimulací (Brinsko et al. 2011). Funkční schopnosti mají různé epiteliální buňky obklopující nadvarle a androgeny (Garner & Hafez 2000). Rozdíly v prostředí nadvarlete a funkčnosti spermií během průchodu nadvarletem může měnit vývoj schopnosti spermií vázat se na epiteliální buňky vejcovodu a tvořit reservoár spermií (Carneiro et al. 2017). Každá anatomická část nadvarlete se vyznačuje vlastní sekreční aktivitou, což má za následek biochemické prostředí, ve kterém dochází k postupným interakcím s membránou spermie (Sostaric et al. 2008).

Spermie uvolňované do lumen semenotvorného kanálku během spermatogeneze jsou nezralé. Tyto buňky jsou nepohyblivé a z kanálků jsou vyplaveny pomocí tekutin pocházejících ze Sertoliho buněk (Garner & Hafez 2000). Spermie jsou transportovány z varlat do nadvarlat, v němž spermie během průchodu dozrávají. Tím získávají potenciální schopnost oplodnit vajíčko (Guimaraes et al. 2012). Transport do nadvarlete je podporován kontraktilními pohyby varlat a tekutinou, která vyplavuje spermie z kanálků, a také sekrety epiteliálních buněk lemující varletní síť. Tato testikulární tekutina obsahuje několik unikátních proteinů včetně ABP, které jsou vylučovány do lumen semenotvorných kanálků Sertoliho buňkami. ABP tvoří komplex s androgeny. Výsledný komplex pomáhá transportu androgenů do hlavy nadvarlete (Garner & Hafez 2000).

Prostředí v ocasu nadvarlete drží spermie v metabolicky klidovém stavu, aby se zabránilo předčasné aktivaci. U hřebce má odhadovanou kapacitu pro ukládání spermií na deset ejakulátů (Guimaraes et al. 2012).

Zrání zahrnuje několik funkčních změn: postupnou ztrátu vody, ztrátu cytoplasmatické kapky, nepohyblivé spermie získávají schopnost stát se pohyblivými po kontaktu se semennou plazmou (Guimaraes et al. 2012), morfologické a biochemické změny plasmatické membrány spermií v reakci na sekrety nadvarlat a jejich různé proteiny. Hlavní viditelnou změnou při zrání spermií v nadvarleti je, že spermie ztrácí cytoplasmatickou kapku. U většiny druhů se kapka pohybuje distálně podél bičíku během průchodu nadvarletem. Ovšem některé spermie obsahují tuto zbytkovou kapku cytoplasmy i v ocasu nadvarlete (Sostaric et al. 2008). Vzhled plasmatické membrány spermií je pozměněn během zrání. Zrání obvykle zahrnuje zmenšení velikosti a změny tvaru apikálního segmentu, změny v hustotě a distribuci membrány. Kromě toho se akrosom během průchodu přestavuje. Některé proteiny prochází posttranslačním zpracováním a rozštěpením. Dochází tak ke změně složení plasmatické membrány, především díky změně poměru glykoproteinů a sterolů. Zvyšuje se negativní náboj povrchu spermie a přemístění povrchových antigenů. Souběžně nastává přidání, eliminace nebo modifikace povrchových proteinů. Změny fosfolipidové kompozice zahrnují

selektivní a progresivní ztrátu fosfolipidů, což vede ke zvýšenému podílu cholesterolu. Vyšší obsah cholesterolu v kombinaci s aktivní údržbou asymetrické distribuce fosfolipidů stabilizuje membránu zralých spermií pro uchování v ocasu nadvarlete. Změny membrány během zrání nejsou omezeny pouze na hlavičku spermií. Adsorbce či interakce s několika glykoproteiny a peptidy jsou také pozorovány v plasmatické membráně ocasu (Sostaric et al. 2008).

Do lumen nadvarlete je vylučováno několik stovek proteinů. Většina těchto proteinů je vylučována v oblasti hlavy, což představuje asi 73% celkové sekrece nadvarlat. Sekreční aktivita se výrazně snižuje v ocasu nadvarlete. Některé přímo modifikují povrch nebo složení spermií. Další mění charakteristiku plasmatické membrány spermií, a to transportními či vazebnými funkcemi (Dacheux et al. 2003). Během průchodu nadvarletem získávají spermie nové proteiny, z nichž některé tvoří ochranné vrstvy, jiné jsou integrovány jako integrální membránové proteiny (Sostaric et al. 2008). Proteiny, které spermie absorbují během průchodu nadvarletem, jsou klasicky označovány jako „potahovací“ proteiny. Většina ochranných proteinů působí jako hlavní složky membrány a mohou být z povrchu odstraněny pomocí izotonických či hypertonických roztoků (Sullivan et al. 2007). U hřebce je 92% celkové sekrece proteinů v nadvarletí forma zhruba 18 proteinů, které zahrnují laktoferin, klastrin, prokatepsin D, cholesterol transfer protein, glutation peroxidasa, beta-N-acetylhexosaminidáza a prostaglandin D2 syntáza. Různé proteiny v tekutině nadvarlat plní různé role. Například protein clusterin, vázající cholesterol, váže na sebe hydrofobní sloučeniny (Dacheux et al. 2003). Majoritní zastoupení v sekretech nadvarlat má glykosyl fosfatidylinositol (GPI), který je zakotvený na plasmatickou membránu spermií. Ukotvení proteinů na plasmatickou membránu naznačuje, že proteiny vylučované nadvarletem jsou na membránu spermie přenášeny neobvyklým mechanismem (Sullivan et al. 2007).

Přenos některých proteinů na plasmatickou membránu spermií je zprostředkováno epididysomy (Sostaric et al. 2008). Epididymosomy jsou elektronové husté vezikuly vylučované apokrinně. Proteiny asociované s epididymosomy nejsou zpracovány endoplasmatickým retikulem a Golgiho aparátem, tudíž jsou charakterizovány neobvyklou glykosylací a postrádají také signální peptid na svém N-konci (Sullivan a kol. 2007). Epididymosomy jsou bohaté na cholesterol (Rejrati et al. 2006) a pocházejí z různých oblastí nadvarlat, díky čemu mají odpovídající rozdíly ve složení bílkovin. To se odráží ve způsobu interakce bílkovin, které přenášejí na spermie. Dosud však bylo identifikováno velmi málo proteinů asociovaných s epididysomy a přesné funkce zůstávají neznámé (Frenette et al. 2006).

3.5 Semenná plazma

Semeno obsahuje spermie a semennou plazmu, která je tekutá a tvoří se v přídatných pohlavních žlázách samčího reprodukčního traktu (Garner & Hafez 2000). Semenná plazma se skládá ze sekretů varlat, nadvarlat, chámovodu a přídatných pohlavních žláz (Topfer-Petersen et al. 2005). Objem semenné plazmy různých druhů savců se liší přítomností a velikostí přídatných pohlavních žláz. Ty vedou ke změnám v jejich relativním složení a objemu semena. U některých druhů semenná plazma představuje až 95-98 % celkového objemu semene (Rodríguez-Martínez et al. 2011). Očekává se, že složení se bude lišit v závislosti na genetice, stavu zvířete a na prostředí, kde zvíře žije. Hřebci mohou měnit složení ejakulátu pod kontrolou testosteronu, který je schopný reagovat na přítomnost samice s určitou charakteristikou. Semenná plazma je schopna podporovat spermie v ochraně proti oxidačnímu stresu (Jeannerat et al. 2017), protože slouží jako ochranné a výživné médium pro spermie (Garner et Hafez 2000). Obsahuje také dekapacitační faktory, které se adsorbují na povrch plasmatické membrány. Tyto dakapacitační faktory potlačují předčasné zahájení kapacity během průchodu spermií přes krček do vejcovodů (Varner & Johnson 2011). Ukazuje se, že semenná plazma hraje roli v modulaci spermií a jejich schopnosti interagovat s epitelem a sekrety samičího pohlavního traktu. Je také nosičem signálů pro samičí pohlavní trakt, zvláště pro imunitní systém (Rodríguez-Martínez et al. 2011).

Při ejakulaci se spermie setkávají se semennou plazmou a právě tak s prostatomou (Sostaric et al. 2008). Proces, který se běžně považuje za ejakulaci, zahrnuje tři potřebné kroky. Nejprve dochází k erekci, následuje emise a končí to ejakulací. Emise zahrnuje sloučení spermií se semennou plazmou z chámovodu a ocasu nadvarlete. Během ejakulace dochází k vyloučení semene skrze močovou trubici (Amann RP. 2011).

Prostata vylučuje vodnatou tekutinu do pánevní části močové trubice a zlomek tekutiny prostaty je vylučován jako preejakulát. Dále emise a ejakulace jsou frakce bohaté na spermie, sekrety nadvarlat, tekutiny prostaty a vodnaté tekutiny bulbouretrálních žláz. Následuje ne vždy přítomná gelová neboli postspermiová frakce. Ta pochází především z měchýřkovité žlázy. Funkce této frakce není zcela známa. Není úplně známa sekrece žláz ampule chámovodu co se týká přínosu pro ejakulát (Amann RP. 2011).

Semenná plazma obsahuje specifické proteiny, hormony, antimikrobiální látky, supresory imunity, tuky, cukry, soli a různé typy buněk, včetně imunitních buněk (Jeannerat et al. 2017) neobvykle vysoké hladiny kyseliny citrónové, ergothionein, glycerolfosforylcholin, sorbitol. Nachází se tam také znatelné množství kyseliny askorbové,

aminokyselin, mastných kyselin a enzymů (Garner & Hafez 2000). Dále také obsahuje bikarbonát, který moduluje motilitu spermií a destabilizuje plasmatickou membránu během kapacity (Rodríguez-Martínez et al. 2011).

Peptidy a proteiny semenné plazmy vynikají vysokým obsahem (Rodríguez-Martínez et al. 2011). Většina proteinů nalezených v semenné plazmě se váže na plasmatickou membránu spermií (Mogielnicka-Brzozowska et Kordan, 2011), jsou tedy zapojeny do přestavby povrchu spermií, ke které dochází během průchodu spermie samčím i samičím genitálním traktem (Topfer-Petersen et al. 2005). Proteiny jsou důležité pro funkci spermií a vztahují se k interakci spermií s různými prostředími v pohlavním traktu samice směrem k oocyту (Rodríguez-Martínez et al. 2011). Různé hormony jako jsou androgeny, estrogeny, prostaglandiny, FSH, LH a podobné hormony na růst, inzulin, glukagon, prolaktin, relaxin, leptinový hormon a enkefaliny se nacházejí v semenné plazmě, také antimikrobiální složky včetně imunoglobulinů třídy IgA (Garner & Hafez 2000). Iontové prostředí semenné plazmy má silný vliv na funkci spermií (Pesch et al. 2006). V semenné plazmě se nachází vápník, sodík, draslík, zinek a měď (Hamad et al. 2014). Zinek byl ve velkém množství nalezen ve spermatu savců a bylo zjištěno, že je rozhodující pro spermatogenesi (Shquirat et al. 2013), má totiž vliv na motilitu a stabilitu chromatinu (Rodríguez-Martínez et al. 2011). Měď je důležitým prvkem pro mnohé metaloenzymy a metaloproteiny, které se podílejí na energetickém nebo antioxidačním metabolismu (Hamad et al. 2014). V semenné plazmě se vyskytují vitamíny A, C a E. Některé vitamíny byly popsány jako důležité pro buněčný ochranný systém proti oxidativnímu poškození (Almeida et al. 2005). Mimo vitamíny patří mezi komponenty semenné plazmy enzymatické a neenzymatické antioxidanty (Usuga et al. 2017).

Stejně jako tekutina z nadvarlat obsahuje semenná plazma vezikulární struktury (Ronquist & Brody 1985). Tyto vezikuly jsou produkovány prostatickými epiteliálními buňkami, kde se akumulují v takzvaných skladovacích váčcích. Po exocytóze do lumen prostaty se prostasomy mísí s ejakulátem. Membrána obklopující prostasom je bohatá na cholesterol, sfingomyelin a nasycené mastné kyseliny (Arienti et al., 1998). Přestože přesná funkce prostasomů není známa, má několik reprodukčních rolí včetně zvýšení motility spermií (Burden et al. 2006). Bylo také zjištěno, že prostasomy nejspíše zabraňují přes vyšší obsah cholesterolu tomu, aby byl akrosom citlivý na progesteron (Cross & Mehasreshti 1997). Prostasomy mohou také nepřímo ovlivnit oplodnění tím, že spermie chrání před útokem imunitních buněk v samičím pohlavním traktu (Babiker et al. 2002; Katimura et al. 1995).

Byly také popsány prostasomy s antibakteriální, antioxidační a virovou neutralizační aktivitou (Katimura et al. 1995; Andersson et al. 2002).

Ne všechny spermie se setkají se všemi sekrety přídatných pohlavních žláz, protože jsou dodávány do ejakulátu v diferenciálním pořadí. Semenná plazma má různé koncentrace složek, včetně peptidů a proteinů. Specifické peptidy a proteiny působí jako signály pro samičí imunitní systém, aby nedošlo k odmítnutí, ale toleranci spermií (Rodríguez-Martínez et al. 2011).

3.6 Kapacitace a akrosomální reakce

Ejakulované spermie nejsou okamžitě schopné oplození oocyty. Musí absolvovat definitivní dozrání v reprodukčním traktu samice a prochází dvěma procesy. Jedním procesem je kapacitace a druhým je akrosomální reakce (Brinsko et al. 2011). K oplození vajíčka musí být sperma vysoce pohyblivé a schopné podstoupit akrosomovou reakci, díky které penetruje do vajíčka (Hafez B. & Hafez ESE. 2000).

Kapacitace je definována jako soubor změn, které činí spermie schopné podstoupit akrosomovou reakci. Během pobytu v samičím traktu spermie podstupují proces kapacitace, který zahrnuje řadu změn na spermiích, které primárně reagují na signály pocházející od oocyty a jeho kumulárních buněk a tím získávají schopnost oplodnit ocyty. Pokud je kapacitace neúplná, nejsou spermie schopny dokončit proces oplození. Fyziologické změny spermií během kapacitace prokazují hyperaktivovanou motilitu a schopnost podstoupit akrosomovou reakci (Varner & Johnson 2011).

Během kapacitace dochází k membránovým změnám, efluxu cholesterolu z membrány a nesčetnému množství enzymatických procesů. Kapacitační proces značně snižuje životaschopnost spermií (Varner & Johnson 2011). Kapacitace způsobuje destabilizaci fosfolipidové dvojvrstvy, což umožňuje akrosomální aktivaci. Takové změny mohou zahrnovat vyčerpání cholesterolu z membrány spermií, změnu poměru glykosaminoglykanů a změny iontů (Hafez B. & Hafez ESE. 2000). Během kapacitace spermie ztrácejí z povrchu některé proteiny tzv. dekapacitační faktory, které jsou poskytovány nadvarletem a při ejakulaci sekrety semenných váčků. To je doprovázeno bikarbonátovými změnami lipidů plasmatické membrány spermií. Steroly a jejich sírany jsou přítomny ve spermiích a sterolsulfáty jsou přítomny v genitálním traktu samic a folikulární tekutině. Enzymatickým štěpením polárních esterů na nepolární steroly se mění fluidita membrány. Cholesterol odstraněný pomocí bílkovin a vázající sterol mění stav mikrodomény lipidů membrány. Ztráta

cholesterolu z membrány spermií je důležitý krok v důsledku zvýšení membránové fluidity a usnadňuje případnou membránovou fúzi potřebnou pro akrosomovou reakci a vazby spermie na membránu oocyta (Nieschlag et al. 2010).

K akrosomové reakci dochází spontánně (progesteron, folikulární tekutina, prostaglandiny) nebo zprostředkovanými ligandy, jako je zona pellucida. Funkce akrosomální reakce spočívá v tom, že spermie musí projít glykoproteinovými vrstvami obklopující oocyt, aby dosáhly zona pellucida. Akrosomová reakce se může vyskytnout před nebo po připojení hlavičky glykoproteinovým receptorům na zona pellucida. Pro připojení je nezbytný neporušený akrosom. Vazba hlavičky spermie se uskutečňuje přes receptor ZP3 a umožňuje interakci k jiným zónám, které stimulují aktivování akrosomů. Akrosom spermie reaguje na prostředí a v místě průchodu vytváří „díru“, přes kterou spermie prochází. Penetrace spermie přes zona pellucida trvá v rozmezí 5–15 minut po připoutání spermií. Během akrosomové reakce se objevuje masivní příliv Ca_{2+} . Koncentrace intracelulárního Ca_{2+} je ve spermií nízká, především v oblasti hlavy i bičíku, díky přítomnosti antigenu Ca_{2+} zprostředkovaného ATPasou a výměnným systémem Ca_{2+}/H^+ v plasmatické membráně (Hafez B. & Hafez ESE. 2000). Během akrosomové reakce dochází k fúzi vnější akrosomální membrány s plasmatickou membránou spermie za vzniku vezikulů na přední části akrosomu. Ty vedou k uvolnění obsahu akrosomálních váček (Brinsko et al. 2011). Fúze a vezikulování hydrolytických enzymů uvolňují akrosom, jako je například hyaluronidáza a akrosin. Tyto enzymy se podílejí na penetraci spermie přes zona pellucida. Akrosin byl dlouho považován za esenciální oblast lysinu pro penetraci spermií, ale počet přítomných enzymů, které jsou v akrosomální membráně, naznačuje, že kombinace enzymů působí synergicky během penetrace. To je v souladu s heterogenní strukturou glykoproteinového obalu zona pellucida. Enzymy vystavené během akrosomové reakce jsou potřebné pro průchod spermie přes oblast zona pellucida, ale také nutné pro motilitu spermií. Tak jako akrosomální reakce iniciuje průnik zona pellucida, může glykoprotein ZP2 sloužit jako sekundární spermatický receptor, který udržuje připojení spermií během průchodu touto oblastí. Akrosomová reakce je také předpokladem pro fúzi mezi plasmatickou membránou oocyta a plasmatickou membránou spermií. Oocyt nemůže podstoupit fúzi s neakrosomálně aktivovanými spermiemi, přestože jsou připojeny k povrchu membrány (Hafez B. & Hafez ESE. 2000).

Kapacitace tedy vede k akrosomálním změnám potřebným pro penetraci spermií do vajíček. Určité funkce proto zabraňují předčasně aktivaci akrosomu až do okamžiku, kdy spermie dosáhne místa oplození a přichází do kontaktu s vajíčkem

(Hafez B. & Hafez ESE. 2000). To jsou místa signálních transdukčních komplexů zapojených do rozpoznání a vazby v oblasti zona pellucida (Nieschlag et al. 2010).

3.7 Proteiny semenné plazmy a jejich vliv na funkci spermií

Většina proteinů nalezených v semenné plazmě se váže na plasmatickou membránu spermií (Mogielnicka-Brzozowska & Kordan 2011), jsou tedy zapojeny do přestavby povrchu spermií, ke které dochází během průchodu spermie samčím a samičím genitálním traktem. Proteiny pokrývají celý povrch plasmatické membrány spermie, brání aglutinaci spermií, předčasné akrosomové reakci a fagocytóze v pohlavním traktu samic. Bylo prokázáno, že proteiny semenné plazmy přispívají k časným a centrálním krokům při oplození, jako je založení rezervoáru spermií ve vejcovodech a kapacitace (Topfer-Petersen et al. 2005). Proteiny semenné plazmy hrají specifickou roli zejména díky své schopnosti vázat různé typy ligandů, jako jsou například polysacharidy, lipidy a ionty (Mogielnicka-Brzozowska & Kordan 2011). Semenné proteiny koní mají tendenci tvořit multiproteinové agregáty, které představují asi 70 % celkového počtu proteinů semenné plazmy koní. Obsah bílkovin v plazmě koní je relativně nízký (10 mg / ml) oproti semenné plazmě savců obsahující přibližně 20–60 mg/ml. Proteiny semenné plazmy se dělí na heparin-vázající proteiny a heparin-nevázající proteiny (von Fellenberg et al. 1985). Proteiny semenné plazmy koní tvoří HSP-1 až HSP-8 (Calvete et al. 1994).

U koní se heparin váže na ejakulované spermie a moduluje kapacitační proces, čímž zvyšuje schopnost spermií, aby podstoupily akrosomovou reakci indukovanou zona pellucida (Florman & Babcock 1991). Doposud nebyly identifikovány u koní faktory ovlivňující schopnost podstoupit akrosomovou reakci. Lze tedy předpokládat, že specifický účinek heparinu na spermie může být *in vivo* zprostředkován heparin-vázajícími proteiny (Manjunath & Therien 2002). Většina izolovaných proteinů koní, konkrétně HSP-1, HSP-2, HSP5 až HSP8 mají heparin-vazebnou schopnost (Topfer-Petersen et al. 2005). Heparin-vázající proteiny se vážou na plasmatickou membránu a pokrývá hlavičku spermie (Mogielnicka-Brzozowska & Kordan 2011). Schopnost vázat heparin naznačuje potenciální úlohu při oplození. Vazba heparinu je vlastnost, která závisí na stavu agregace proteinů plasmatické membrány spermie. HSP-1 a HSP-2 jsou asociovány k vytvoření oligomerů vázajících heparin, ale také existují jako heparin-nevázající modulace agregačního stavu (Calvete et al. 1995b). Heparin glykosaminoglykany (GAG) jsou vylučovány ve velkém

množství epitelem samičího reprodukčního traktu, zejména během folikulární fáze cyklu. Změny obsahu GAG v plasmatické membráně spermií se vyskytují, během transportu spermií samičím reprodukčním traktem. Bylo zjištěno, že heparin-vázající proteiny semenné plazmy přispívá k akrosomové reakci pomocí interakce s heparin glykosaminoglykany. Disociace těchto látek z povrchu plasmatické membrány během kapacitace spermií pravděpodobně závisí na heparinovém procesu zvyšování iontů Ca_{2+} v akrosomové matici (Mogielnicka-Brzozowska & Kordan 2011). Heparin-vázající proteiny zvyšují schopnost akrosomové reakce v odezvě na heparin a další proteiny v oblasti zona pellucida (Patel et al. 2016). Heparin-nevázající proteiny zvyšují životaschopnost a motilitu spermií, nicméně to vede k drastickému poklesu schopnosti oplození (Caballero et al. 2004b). Brandon et al. (1999) uvádí molekulovou hmotnost SP proteinů (pojmenované také jako HSP proteiny) SP-1 a SP-2 72kDa, SP-3 18kDa, SP-4 16kDa, popsané Killianem et al. (1993). Všechny tyto proteinové skupiny, s výjimkou HSP-4, se váží na povrch spermií.

HSP -1 je polypeptid tvořený 121 aminokyselinami s čtyřmi glykosylačními místy. Obsahuje dvě tandemově uspořádané domény Fn II (fibronektinového typu), jimž předchází dlouhý kyselý N-koncový segment (Calvete et al. 1995a). HSP-1 je přítomný ve všech frakcích ejakulátu (Rodriguez-Martinez et al. 2011). Primární struktura HSP-2 je v podstatě totožná s HSP-1, má pouze kratší N-terminální segment a má dvě glykosylační místa. Tyto dva proteiny jsou přítomny v rovnovážném poměru a jejich neoddělitelná směs je označována jako HSP-1/2 (Calvete et al. 1995a). HSP- 1/2 je spojení dvou malých proteinů tepelného šoku. HSP-1/2 je hlavní protein semenné plazmy koní, který vykazuje aktivitu podobnou chaperonu (CLA) tím, že chrání různé cílové proteiny před tepelným, chemickým a oxidačním stresem. Bylo zjištěno, že polydisperzita a povrchová hydrofobnost HSP -1/2 je pro chaperenovou aktivitu proteinu důležitá (Sankhala et al. 2012; Kumar & Swamy 2016b). Povrchově aktivní látky mění některé vlastnosti proteinů jako je hydrofobnost, náboj či konformace změnou vazby (Chaturvedi et al. 2016) Aniontové povrchové aktivní látky či neutrální povrchově aktivní látky zvyšují chaperonovou aktivitu HSP-1/2, dále také inhibují agregaci cílových proteinů. Kationtové povrchově aktivní látky zvyšují tepelnou agregaci ADH (alkohol dehydrogenasa) a enolázy a také snižují chaperenovou aktivitu HSP-1/2. Chaperenové stroje exprimované buňkou mají antiagregační vlastnosti a solubilizují agregáty nebo je označují za degradační cesty. Agregace bílkovin je důsledkem nesprávného rozložení bílkovin a je příčinou mnoha onemocnění. Proto proteiny tepelného šoku vytvářejí komplexy s nenapojenými bílkoviny a pomáhají při jejich opětovném skládání na aktivní konformaci (Kumar & Swamy 2017). Kulkarni et al. (1996) říkají, že heparin-vázající proteiny chrání

akrosin, chrání proti tepelnému šoku a jako spousta neidentifikovaných proteinů ovlivňuje fertilitní schopnost spermií. HSP-1/2 má afinitu pro cholin fosfolipidy. Interakce HSP-1/2 s fosfolipidovými membránami a heparinem se zdají být fyziologicky významné vzhledem k jejich zapojení do kapacitace spermií (Sankhala et al. 2012). Protein homologní s HSP -1/2 je přítomen u mnoha dalších savců, jako je třeba analog u skotu PDC-109. Ten je nejlépe charakterizovaným členem této rodiny (Kumar & Swamy 2017) a bylo u něj prokázáno, že se účastní počátečních kroků oplození, jako je kapacitace (Topfer-Petersen et al. 2005).

Malé klíčové proteiny typu Fn II jsou charakterizované dvěma konzervovanými tandemově usprádanými moduly fibronektinu, také označovány jako BB domény. Kromě toho nesou jeden nebo dva krátké vysoce kyselé N-koncové peptidové úseky nebo jiné polypeptidy (Calvete et al. 1995a) a prodloužené úseky aminokyselin, které jsou variabilní mezi jednotlivými bílkovinami (Caballero et al. 2012). Proteiny typu Fn II jsou nejhojnější u skotu. Malé proteiny HSP-1 a HSP-2 jsou syntetizovány převážně ampulou chámovodu. Zatímco EQ-12, větší protein typu Fn II, je vylučovaný hlavně v nadvarletí (Saalman et al. 2001; Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005). Tyto proteiny se těsně spojují se spermií během epididymálního přenosu a při ejakulaci jsou přítomny na ejakulovaných spermiích. Nejvýraznější znak proteinů Fn II typu je jejich schopnost interagovat s fosfolipidy spermie a jejich heparin-vazebnou schopností (Calvete et al. 1997). Schopnost vázat spermie je sprostředkována specifickými interakcemi s cholinovými lipidy plasmatické membrány spermií. Vlastnost vázat heparin je v oblasti BB proteinů (Wah et al. 2002).

HSP-5 nesouvisí se známými bílkovinami. Sekvence N-terminálu neodpovídá funkční sekvenci charakterizovaného proteinu jiného druhu.

HSP-6 a HSP-8 jsou různé isoformy proteinu, který patří do kallikreinového typu proteinové rodiny. N-koncové sekvence obou isoformů vykazují vysoký stupeň homologie s lidským prostatickým specifickým antigenem (PSA), o kterém bylo zjištěno, že štěpí semenné koagula (Johnsson et al. 2005).

Protein HSP-7 byl jako jediný protein začleněn do rodiny spermadhesinů a je to homolog prasečího proteinu AWN-1, který vykazuje vazbu na zonna pellucida (Reinert et al. 1996), stejně tak i koňský HSP-7. Protein je vylučovaný do varletní sítě, chámovodu a semenných váčků. Spermadhesiny byly poprvé popsány v semenné plazmě prasat, kde tvoří hlavní frakce malých proteinů vázajících heparin. Představovaly první členy skupiny, které charakterizovala CUB doména obsahující 110 až 133 aminokyselin (Bork & Beckmann 1993) Tato doména je stabilizována dvěma disulfidovými můstky sousedních cysteinových zbytků (Romero et al. 1997). Spermadhesiny jsou multifunkční proteiny vykazující schopnost vázat

ligand na heparin (Topfer-Petersen et al. 2005). Jsou zapojeny do založení rezervoárů v samičím pohlavním traktu, kapacitace a interakce spermie-zona pellucida (Topfer-Petersen et al. 1998). Spemadhesiny jsou glykoproteiny, jejichž biologická aktivita závisí jak na sekvenci, stupni glykosilace či agregaci, tak i na schopnosti vázat heparin. Jsou spojeny s více účinky na spermie. Zdá se, že stabilizují plasmatickou membránu a akrosom těsně před kapacitací (Rodriguez-Martinez et al. 2011). Heparin vázající spermadhesiny inhibují kapacitaci, chlazením indukovanou kapacitaci a kryokonzervací indukované kapacitační změny (Vadnais & Roberts 2010).

Mezi heparin-nevazající proteiny se řadí skupina CRISP, kam se u hřebců řadí HSP-3 (nebo také CRISP-3). Je produkován ampulí chámovodu a semennými vajíčky (Giese et al. 2002). U řady druhů bylo prokázáno, že exprese této genové rodiny je pod androgenní kontrolou. Geny koní exprimují CRISP1 podél celého nadvarlete, zatímco CRISP2 produkují semenné vajíčky, nadvarle, ale i varle. CRISP proteiny jsou charakterizovány 16 invariantními cysteinovými zbytky. U každého člena je vzdálenost mezi příslušnými cysteinovými zbytky přísně zachována. Všechny cysteinové zbytky jsou disulfidově vázány, čímž se molekula dělí ve třech oblastech. N-terminál je prodloužen o zhruba 50 aminokyselin a N-koncový cysteinový klastr je tvořený třemi disulfidy a C-terminální doménou bohatou na cystein obsahující 10 cysteinových zbytků (Guo et al. 2005) Bylo zjištěno, že různé členy rodiny CRISP jsou zapojeny do funkcí týkajících se fúze spermií a oocytů, vrozené obranné funkce samičí pohlavní soustavy a blokace iontového kanálu. Proteiny CRISP spermií koní se nacházejí v postakrosomální oblasti a polovině bičíku (Topfer-Petersen et al. 2005). HSP-3 (u koní také CRISP-3) je spojen s plodností prostřednictvím své role selektivní ochrany proti PMN (polymorfonukleární leukocyty) vazby na buňky. První frakce ejakulátu koní obsahuje inhibitor akrosinu, PSA (prostatický specifický antigen) či proteiny podobné kalikreinu (jako je HSP-6 a HSP-8 reprezentující isoformy) (Rodriguez-Martinez et al. 2011).

Z dostupných zdrojů není zřejmá vazba HSP-4 k heparinu. Calvete et al. (1994) předpokládá, že protein HSP-4 souvisí s produktem podobnému genu kalcitonin. Kalcitonin má korelaci s motilitou spermií u neplodných samců (Mungan et al. 2001), také vysoké hladině kalcitoninu zabraňují „nadměrné kapacitací“ a spontánní akrosomové reakci (Fraser et al. 2005).

3.8 Kryokonzervace

Během kryokonzervace dochází k extrémní změně teploty a osmolarity. Během tohoto procesu vzniká tvorba ledových krystalů, což vede k větší extracelulární koncentraci solutu a následné hyperosmolaritě. Buňka na tyto pochody reaguje ztrátou vody a smršťováním objemu za účelem vyrovnání koncentrace rozpuštěné látky mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem. Naopak objem buňky se zvyšuje pasivně difúzí vody, když jsou buňky vystaveny hypotonickému působení extracelulárního prostředí, jako je tomu v případě rozmrazování (Maziero et al. 2013). Tyto změny vedou k deformaci buněčných membrán od začátku dehydratace až po pohyb molekul ze spermií během rozmrazování. Plasmatická membrána působí jako překážka bránící růstu ledových krystalů z media do buňky (Amann & Pickett 1987).

Propustnost buněčných membrán může být narušena kryoprotektanty, které ovlivňují přesmyk fosfolipidů a bílkovin v plasmatické membráně, což ovlivňuje potenciál fúze membrány (Amann & Pickett 1987).

Při tepelném přechodu dochází k chladovému šoku, kdy plasmatická membrána přechází z kapalného do krystalického stavu či naopak. Tyto změny brání v pohybu lipidů v plasmatické membráně, což vede k tvorbě malých lipidových oblastí. Tato agregace vede k zvýšení propustnosti membrány a poklesu metabolické aktivity (Maziero et al. 2013), nadále dochází k ztrátě intracelulárních molekul a iontů, ke kruhovému pohybu a předčasné ztrátě motility. Během této fáze se mění stav membrány v důsledku změny tvaru fosfolipidů indukované chlazením. Mastné acylové řetězce se rovnají a prodlužují, což molekulám umožňuje těsné paralelní sbalení acylových zbytků. V krystalickém poli se fosfolipidy nemohou pohybovat náhodným způsobem. Zachovávají se pouze malé ostrůvky kapalných lipidů, které zůstávají integrální. Rozsah těchto oblastí, kde se sdružují bílkoviny, závisí na rychlosti zchlazení. Agregace bílkovin může mít za následek zvýšenou propustnost membrány a snížení metabolické funkce. Zvýšená akumulace vápníku ve spermiích koreluje s poškozením membrány. Toto zvýšení může mít za následek aktivaci fosfolipáz, což může zvýšit hydrolýzu fosfolipidů. Taková změna fosfolipidů a akumulace volných mastných kyselin by mohla vést k nárůstu propustnosti mitochondriálních a plasmatických membrán, což vede k potenciální smrti buněk. Výsledkem je hluboká změna propustnosti membrány a buněčná smrt (Amann & Pickett 1987).

Ke změně povahy plasmatické membrány dochází i během mrazení v návaznosti na započatých změnách během chlazení. Lze předpokládat, že změny na spermiích způsobené

během chladového šoku zhoršuje dopad změn vyvolaných během mrazení či rozmrazování. Spermie poškozené ledovými krystaly, extracelulárními ledovými krystaly či změnami během dehydratace, které vedou k poškození plasmatické membrány, nedávají spermii velkou možnost zůstat životaschopnými při -196°C . Během zmrazování začíná extracelulární voda zamrzat do ledových krystalů a začínají se také vylučovat soli, které se hromadí a zvyšují koncentraci v zatím nezamrzlé extracelulární vodě. Hromadění solí zvyšuje osmotický gradient plasmatické membrány a voda uvnitř spermií začíná vytékat ven, kde nadále zamrzá. Odtokem vody dochází k dehydrataci spermií. Při pomalém chlazení je dostatek času k průchodu vody z buňky ven, aby se koncentrace intracelulárních rozpuštěných látek omezila. Tím dochází k odstranění podchlazení a udržení chemického potenciálu intracelulární vody s vodou extracelulární. Buňka se tak postupně dehydratuje a netvoří se intracelulární led. Naopak pokud je rychlost chlazení velká, rychlost pohybu vody z buňky je nedostatečná pro udržení rovnováhy a buňka se čím dál více ochlazuje. Nakonec se rovnováha chemického potenciálu vody obnoví intracelulárním zmrazením. Buňky, které se dehydratovaly, aby snížily svůj vnitřní obsah vody, mají nízkou pravděpodobnost, že budou tvořit intracelulární led. Tvorba velkých intracelulárních ledových krystalů způsobuje poškození a smrt buněk. Pokud dochází k tvorbě mikrokystalů ledu během pomalého chlazení ve spermiu, nemusí to pro ni být až tak škodlivé. Nicméně buňky, které obsahují tyto mikrokristaly, se musí velmi rychle zahřát, aby nedošlo k rekrystalizaci těchto malých krystalů na velké krystaly, které by buňku poškozovaly. Pokud zůstane 15 % extracelulární vody nezmrazené, přežití buněk zůstává vysoké. Předpokládá se, že při pomalém zmrazování jsou buňky izolovány v úzkých kanálech rozmrazeného roztoku mezi velkými ledovými krystaly. Tyto kanály se s klesající teplotou postupně zmenšují, a tím se rozšiřuje ledové pole. Ačkoliv se buňky během dehydratace zmenšují, zmenšující se prostor vede k poškození buněk. Kryoprotektanty ovlivňují přesmyk fosfolipidů a proteinů v plasmatické membráně a tím i potenciál membránové fúze. Naplnění buňky kryoprotektanty vede ke změně polarity buněčného prostředí a propustnosti buněčných membrán. Typickým kryoprotektantem je glycerol (Amann & Pickett 1987).

Dochází také k mitochondriální dysfunkci související s poklesem životaschopnosti spermií. Všechny procesy během kryokonzervace mohou vést k nadměrné produkci reaktivních druhů kyslíku (ROS), které při homeostáze s antioxidační kapacitou hrají klíčovou roli několika funkcí spermií jako je hyperaktivace, kapacitace, akrosomální reakce a interakce spermií s oocyty. Reaktivní druhy kyslíku mohou být extrémně agresivní vůči struktuře spermií, napadají bílkoviny, sacharidy, lipidy a také organely (Rocha et al. 2018; Al-Essawe

et al. 2018b). Oxidační stres byl identifikován jako hlavní příčina nízké schopnosti oplození spermii. Vysoký obsah polynenasycených mastných kyselin v plasmatické membráně spermii koní způsobuje, že jsou spermie náchylnější k útoku volných radikálů během zmrazování. To omezuje použití kryokonzervovaného spermatu pro procesy, jako je umělá inseminace (Usuga et al. 2017). Mezi výrazné oxidační poškození patří poškození chromatinu, membrán a bílkovin spermii (Ball BA. 2008). Produkty z peroxidace lipidů, tj. malondialdehydy, mohou být škodlivější než ROS. Mají delší poločas rozpadu, což způsobuje redukci motility spermii, fragmentaci DNA a poškození vazebných míst spermie-oocyt, což vede k neplodnosti (Rocha et al. 2018; Al-Essawe et al. 2018b).

Spermie jsou také vystaveny různým osmotickým stresům během skladování, které jsou důsledkem vystavení hypertonickým médiím nebo v důsledku osmotických změn během zmrazení. Řada změn vyvolaných během zpracování a skladování spermii koní může indukovat apoptotické změny, které mohou nepříznivě ovlivnit přežití či funkci spermii. Tyto procesy se v mnoha případech objevují jako vzájemně provázané (Ball BA. 2008). Apoptotické jevy mohou způsobit smrt či způsobit různé stupně poškození struktur spermii, které jsou důležité pro dlouhověkost. Během zahájení apoptózy dochází k ztrátě integrity plasmatické membrány, kdy fosfatidylserin, který je normálně přítomen uvnitř membrány zdravé buňky, je translokován na vnější stranu membrány. Jako spouštěč apoptózy u koní byly detekovány kaspázy tři, sedm a devět. Tyto apoptotické buňky mají sníženou motilitu po rozmrazení, sníženou životaschopnost v reprodukčním traktu samic. To je velmi problematické u koní, jelikož klisny mají dlouhé období estru, a proto je obtížné určit nejlepší čas inseminace s ohledem na ovulaci (Monteiro et al. 2013).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Zpracování semenné plazmy

Ejakulát byl odebrán od hřebce s průměrně mrazitelným semenem v certifikovaném Equinním reprodukčním centru s.r.o. (ERC). Získané vzorky byly centrifugovány 10 000 x g 10 minut, supernatant (semenná plazma) byl odebrán a znovu centrifugován 10 000 x g 10 minut. Poté následovala mikroskopická kontrola přítomnosti spermií v semenné plazmě, a pokud se zde žádné nenacházely, byl supernatant uskladněn při -80°C až do konečného zpracování.

4.2 Izolace proteinů semenné plazmy

Proteiny semenné plazmy byly separovány na afinitním nosiči Heparin-Sepharose (GE Healthcare) na dvě frakce: heparin vázající a heparin nevázající. Vzorek semenné plazmy byl rozmrazen při laboratorní teplotě a následně centrifugován 10 000g x 5 min. Poté byl vzorek nanesen na kolonu Heparin-Sepharose, která byla připojena k pumpě a automatickému sběrači. Průtok pumpy při sběru HEP- frakce byl 1,5 ml/10 min a sběrač měnil zkumavku každých 10 min. Při sběru HEP- frakce byla kolona po nasátí semenné plazmy připojena k zásobníku s roztokem PBS (solný roztok pufovaný sulfátem), kterým byla kolona po dobu separace promývána. Po uplynutí 150 min byla kolona přepojena na roztok 3M NaCl v PBS, který při průtoku 4 ml/10 min po dobu 60 min uvolňoval navázané HEP+ proteiny z kolony. Jednotlivé zkumavky s roztoky po separaci byly proměřeny spektrofotometrem (Biochrom, Libra S22, Fisher Scientific) při vlnové délce 280 nm na obsah proteinů. Frakce s absorbcí nad 0,03 mg/ml byly zamrazeny a ponechány v mrazáku před dalším krokem přípravy proteinových frakcí – dialýzou.

Jednotlivé proteinové frakce byly následně dialyzovány a lyofilizovány. Dialýza přes dialyzační membránu (Membrana-Cel Dialysis Tubing, MWCO 3500, SERVA) probíhala po dobu 48 hodin v 3% roztoku kyseliny octové o obsahu 4,5 litru. Roztok kyseliny octové byl minimálně 3x během 2 dnů vyměněn za čerstvý z důvodu odstranění všech solí z roztoku proteinových frakcí. Po dialýze byly frakce proměřeny na konduktometru (Eutech ECTestr 11, OAKTON Instruments) pro stanovení obsahu solí a kontrolu účinnosti dialýzy. Před následnou lyofilizací se vzorky proteinových frakcí umístily do mrazničky v lyofilizačních baňkách. Zmrazené proteinové frakce v lyofilizačních baňkách byly lyofilizovány (LYOVAC GT 2 E, FINN-AQUA) přes noc až do doby úplného vysušení.

4.3 Odběr ejakulátu

Ejakulát byl odebrán od 6 hřebců v Zemském hřebčinci Písek, s.p.o. Odběry probíhaly od března 2018 do prosince 2018. Před odběrem za účelem výroby inseminačních dávek byli hřebci několikrát odebíráni, dokud nebyla ustálena spermatogenese. Odběr probíhal standardním způsobem pomocí fantomu a umělé pochvy za přítomnosti říjící klisny. Ihned po odběru následovalo laboratorní hodnocení. Pro další zpracování byl vybrán ejakulát s motilitou minimálně 70% a musel splňovat minimální požadavek na koncentraci $300 \times 10^6/\text{ml}$.

4.4 Mrazení a rozmrazení inseminačních dávek

Po hodnocení ejakulátu následovalo předředění ejakulátu mléčným ředidlem (dle Kenneyho) v poměru 1:2-5 a centrifugace 700 g/13 minut. Po odstředění byl odebrán supernatant. Vzniklá peleta spermií byla naředěna kryokonzervacím žloutkovým ředidlem INRA82 s proteinovými frakcemi na finální koncentraci $250 \times 10^6/\text{ml}$. Jednotlivé proteinové frakce byly přidávány k naředěným spermiím ve třech koncentracích 150, 250 a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, dohromady bylo vyprodukováno 88 vzorků zamrazeného spermatu.

Takto připravené semeno se dále manuálně plnilo do plastových pejet o objemu 0,5 ml. Po dvouhodinové ekvilibraci při teplotě 5°C , byly pejety přesunuty do polystyrenového boxu a zmrazeny v horizontální poloze, 4 cm nad parami tekutého dusíku. Po 15 minutách v parách tekutého dusíku byly inseminační dávky uloženy do kontejneru s tekutým dusíkem. Pejety se rozmrazovaly ve vodní lázni o teplotě 37°C po dobu 30 sekund.

4.5 Příprava rozmrazeného vzorku na mikroskopické hodnocení

Po rozmrazení byly dávky ponechány 5 minut ve vodní lázni o teplotě 37°C a posléze bylo odebráno potřebné množství semene pro hodnocení efektu přídavku heparinových frakcí na kvalitu rozmrazených spermií. Před analýzou bylo semeno vždy dostatečně naředěno Tyrodovým roztokem modifikovaným pro spermie (Sp-TALP) (114 mM NaCl; 3,2 mM KCl; 25 mM NaHCO_3 ; 0,34 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 10 mM laktát sodný; 2,0 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 10 mM HEPES, redestilovaná Milli-Q voda).

4.6 Hodnocení funkčnosti plasmatické membárny (HOS)

HOS test neboli hypoosmotický test. Nejdříve jsme si připravili hypoosmotický roztok (7,35 g citrátu sodného; 13,51 g fruktózy rozpuštěné v 1000 ml destilované vody) s konečnou osmolaritou 150 mOsmol/litr. Nadále bylo 100 μ l hypoosmotického roztoku smícháno s 10 μ l naředěného spermatu. Inkubace probíhala po dobu 30 minut v lázni o 37°C. Po uplynutí této doby byl vzorek jemně promíchán a rozetřen na podložní sklíčko. Po zaschnutí došlo k vyhodnocení vzorku na 200 spermích. Spermie byly řazeny do dvou kategorií a to HOS+, neboli s neporušenou plasmatickou membránou (stočený bičík) a HOS-, neboli s porušenou plasmatickou membránou (rovný bičík). Vzorek byl hodnocen objektivem s rozlišením 40x.

4.7 Hodnocení integrity plasmatické membrány a akrosomu

Poměr živých a mrtvých spermíí a poškození a stav akrosomální membrány byl stanoven pomocí průtokového cytometru (BD LSRFortessa™ SORP) s využitím fluorescenčních barev – propidium jodid (PI) barvicí mrtvé spermie, PNA (peanut agglutinin) vázající se k akrosomu (identifikuje vnější akrosomovou membránu ve spermích a indukuje integritu akrosomu) a Hoechst, který zvýrazní jádra buněk a pomůže v odlišení nebuněčných komponent ejakulátu. Pejety byly rozmrazeny (30 s, 37°C), následovala centrifugace v spTalp 5 min 700 x g, po odstranění supernatantu bylo odebráno 5 μ l pelety spermíí. Spermie byly rozředěny v 1 ml spTalp a ke vzorku byly přidány fluorescenční barvy – Hoechst 5 μ l, PI 5 μ l a PNA-FITC 1 μ l. Takto připravené vzorky byly hodnoceny v průtokovém cytometru. Hodnoceno bylo minimálně 30 tisíc buněk na vzorek. Pro zobrazení signálu FITC (PNA) byl použit laser o excitaci 488 nm a emise 525 nm, pro PI excitace 561 nm a emise 610 nm. Pro Hoechst excitace 346 nm a emise 460 nm. Napětí bylo nastaveno pro optimální snímání signálu podle kontrolních vzorků s jednotlivými samostatnými fluorescenčními barvami. Před samotným měřením byly pro vhodné nastavení průtokového cytometru připraveny negativní kontroly bez fluorescenčních barev pro eliminaci případné autofluorescence.

4.8 Statistická analýza

Data byla statisticky vyhodnocena pomocí programu Statistica (ver. 10, StatSoft, CZ). Po testování normálního rozdělení dat a homogenity rozptylů byla použita vhodná analýza rozptylu (parametrická) – jednofaktorová a vícefaktorová analýza rozptylu (ANOVA). Data jsou prezentována, jako LSM \pm SEM a byla hodnocena na hladině významnosti $p < 0,05$.

5 VÝSLEDKY

5.1 Hypoosmotický test (HOS)

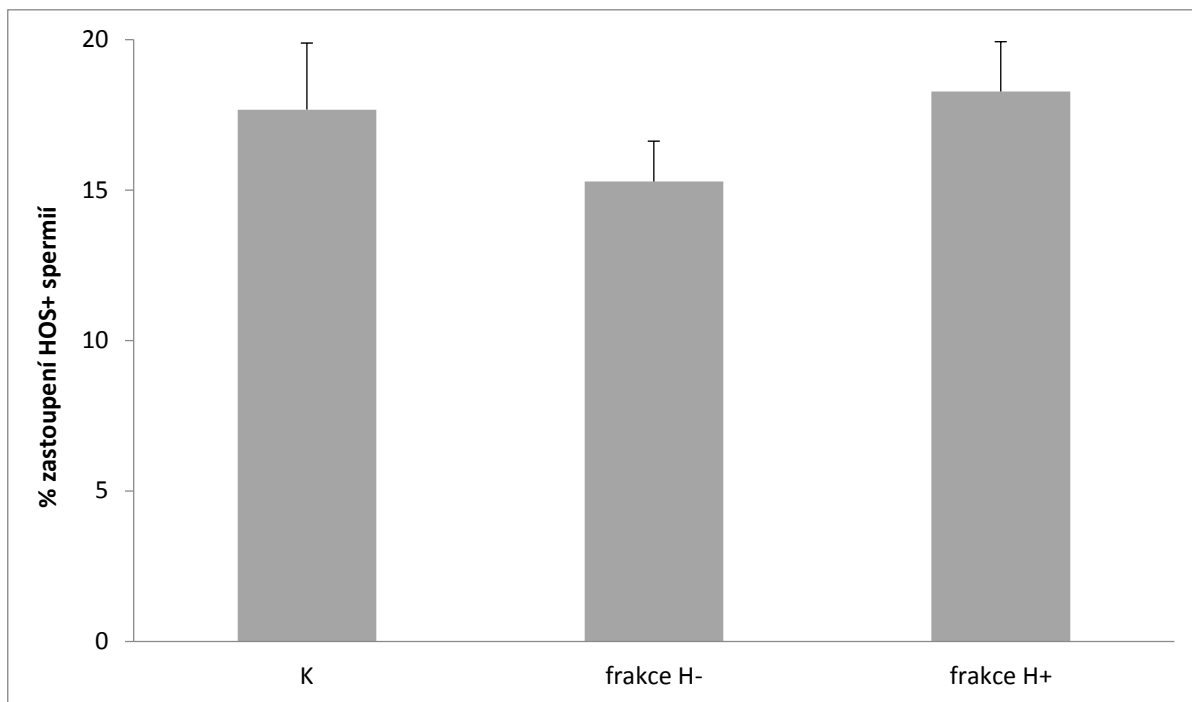
Tabulka 1: Popisné statistiky nabobtnalých spermií (HOS+).

	Medián	Minimum	Maximum	Variační koeficient
Kontrola	17,0	6,0	33,4	44,27
H-	14,5	5,2	32,0	43,21
H+	17,56	3,5	42,0	53,83
H- 125	15,25	6,3	32,0	47,44
H+ 125	14,0	3,5	32,0	55,42
H- 250	15,0	5,2	24,87	40,0
H+ 250	20,35	5,0	39,5	48,8
H- 500	13,75	6,0	26,5	39,1
H+ 500	17,8	6,5	42,0	59,45

K = kontrolní skupina, H- = heparin-nevázající proteinová frakce, H+ = heparin-vázající proteinová frakce, H- 125 = přidavek 125 µg/ml heparin-nevázající proteinové frakce, H+ 125 = přidavek 125 µg/ml heparin-vázající proteinové frakce, H- 250 = přidavek 250 µg/ml heparin-nevázající proteinové frakce, H+ 250 = přidavek 250 µg/ml heparin-vázající proteinové frakce, H- 500 = přidavek 500 µg/ml heparin-nevázající proteinové frakce, H+ 500 = přidavek 500 µg/ml heparin-vázající proteinové frakce.

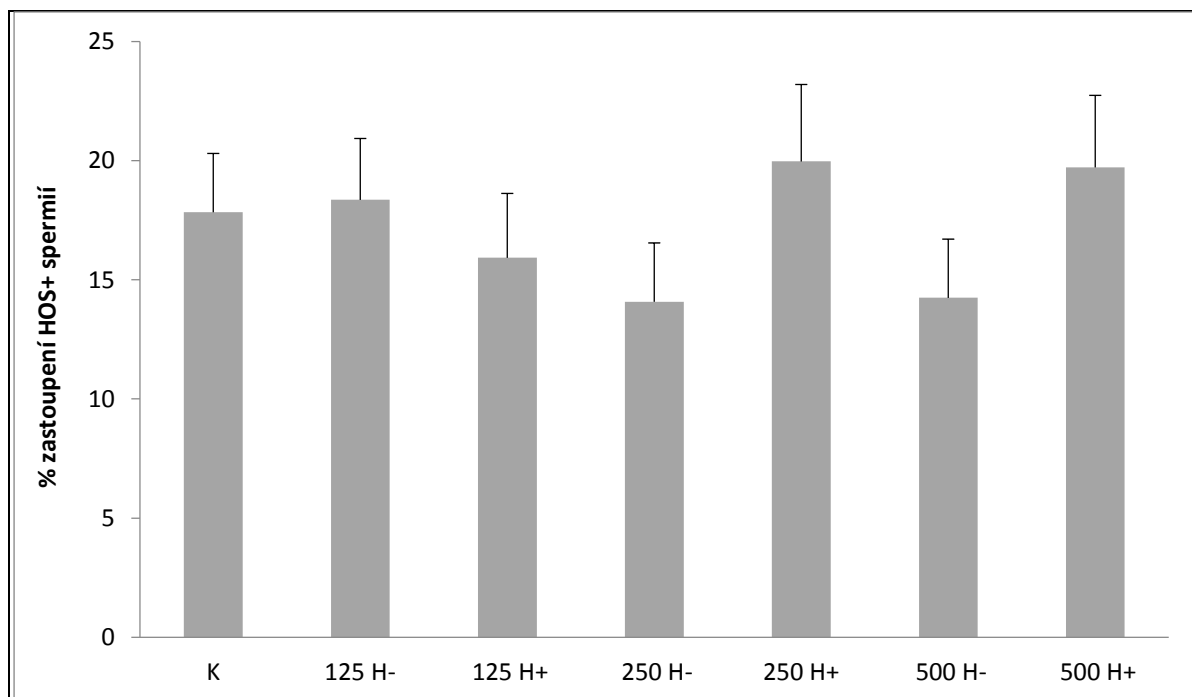
Popisné statistiky pro HOS+ rozmrazené spermie, ke kterým byly před zmrazením přidávány různé proteinové frakce a jejich koncentrace jsou vyjádřeny v Tabulce 1.

Graf 1: Průměrné zastoupení nabobtnalých spermií (HOS+) v kontrolních vzorcích (K) a vzorcích obsahující heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce.



U inseminačních dávek kryokonzervovaných bez přídavku proteinové frakce semenné plazmy (K) bylo průměrné zastoupení nabobtnalých spermií (HOS+) $17,7 \pm 2,2$ %. Inseminační dávky s přídavkem H- po rozmrazení vykazovaly $15,3 \pm 1,3$ % HOS+ spermií. Přídavek H+ do kryokonzervovaných inseminačních dávek vykazovaly $18,3 \pm 1,7$ % HOS+ spermií. Na funkci plasmatické membrány rozmrazených spermií neměl přídavek heparinových frakcí před kryokonzervací signifikantní vliv ($p > 0,05$).

Graf 2: Průměrné zastoupení nabobtnalých spermií (HOS+) ve třech koncentracích (125, 250 a 500 µg/ml) v kontrolních vzorcích (K) a vzorcích obsahující heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce.



Kontrolní skupina (K) inseminační dávek bez přídavku proteinové frakce obsahovala $17,8 \pm 2,5$ % nabobtnalých spermií (HOS+).

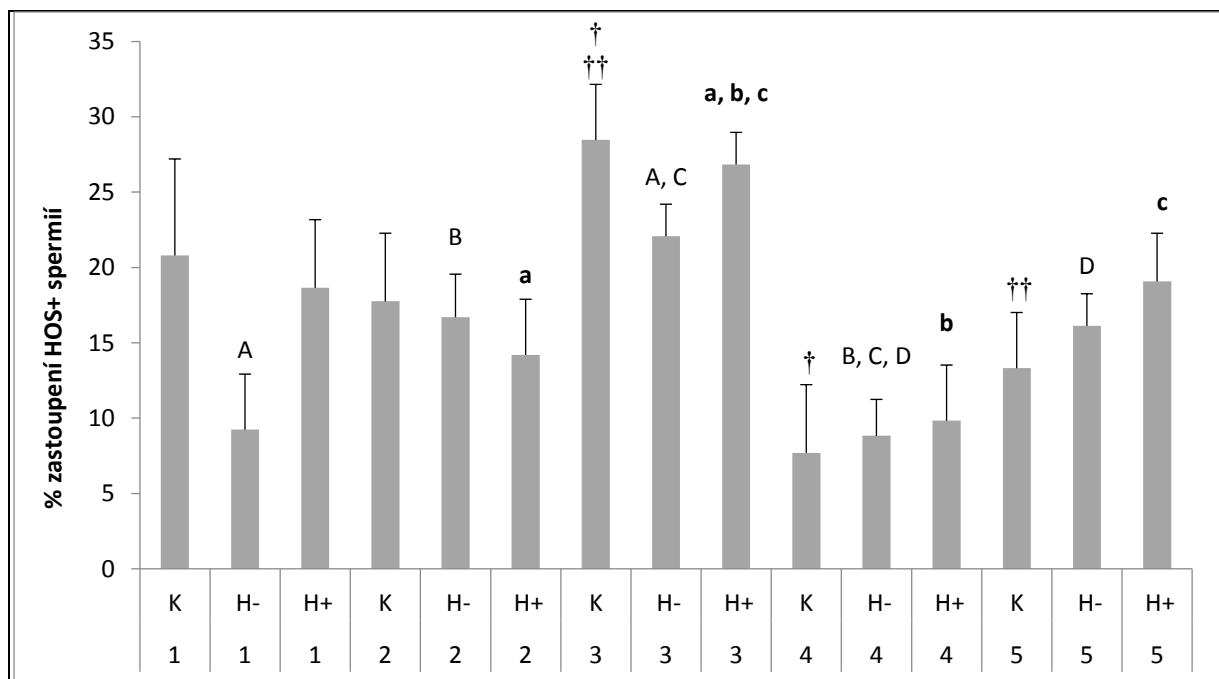
Inseminační dávky s přídavkem 125 µg/ml H- a H+ měly $18,4 \pm 2,6$ % a $15,9 \pm 2,7$ % HOS+ spermií, dle uvedeného pořadí.

Přídavek 250 µg/ml H- a H+ do inseminačních dávek obsahoval $14,1 \pm 2,5$ % a $20,0 \pm 3,2$ % HOS+, dle uvedeného pořadí.

Inseminační dávky s 500 µg/ml H- obsahovaly $14,2 \pm 2,5$ % HOS+ spermií, a inseminační dávky s 500 µg/ml H+ měly obsah $19,7 \pm 3,0$ % HOS+ spermií.

Přídavek heparinových frakcí v různých koncentracích před kryokonzervací inseminačních dávek neměl na funkčnost plasmatické membrány spermií signifikantní vliv ($p > 0,05$).

Graf 3: Průměrné zastoupení nabobtnalých spermií (HOS+) u jednotlivých hřebců (hřelec č. 1, 2, 3, 4 a 5) v kontrolních vzorcích (K) a vzorcích obsahující heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce.



†, †† stejné indexy označují statisticky významné rozdíly mezi kontrolními vzorky ($p > 0,05$).

A, B, C, D stejné indexy označují statisticky významné rozdíly mezi vzorky s obsahem heparin-nevázající (H-) proteinové frakce ($p > 0,05$).

a, b, c stejné indexy označují statisticky významné rozdíly mezi vzorky s obsahem heparin-vázající (H+) proteinové frakce ($p > 0,05$).

Na individuální úrovni jednotlivých hřebců ($n = 5$) nebyl zjištěn signifikantní vliv adice heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce na procentuální zastoupení spermií s funkční plasmatickou membránou ($p > 0,05$).

Kontrolní skupina (K) měla $20,8 \pm 6,4$ % nabobtnalých spermií (HOS+). Inseminační dávky hřebce 1 obohaceny o H- po rozmrazení vykazovaly $9,2 \pm 3,7$ % HOS+ spermií. Dávky s přídatkem H+ frakce měly $18,7 \pm 4,5$ % HOS+ spermií.

Hřelec 2 měl výskyt HOS+ spermií u kontrolní skupiny (K) $17,8 \pm 4,5$ %. Inseminační dávky s přídatkem H- a H+ měly obsah $16,7 \pm 2,9$ % a $14,2 \pm 3,7$ % HOS+ spermií, dle uvedeného pořadí.

Kontrolní skupina bez přídavku specifické proteinové frakce (K) u hřebce 3 měla obsah HOS+ spermií $28,5 \pm 3,7$ %. Inseminační dávky hřebce 3 s přídavkem H- a H+ obsahovaly $22,1 \pm 2,1$ % a $26,8 \pm 2,1$ % HOS+ spermií, dle uvedeného pořadí.

Hřelec 4 měl obsah $7,7 \pm 4,5$ % HOS+ spermií v inseminačních dávkách bez přídavku proteinové frakce (K). Přídavek H- frakce měl obsah $8,8 \pm 2,4$ % HOS+ spermií a H+ byl obsah $9,8 \pm 3,7$ % HOS+ spermií.

Hřelec 5 měl u kontrolní skupiny (K) obsah $13,3 \pm 3,7$ % HOS+ spermií. Přídavek H- a H+ do inseminačních dávek obsahoval $16,1 \pm 2,1$ % a $19,1 \pm 3,2$ % HOS+ spermií, dle uvedeného pořadí.

Byl zjištěn signifikantní vliv interakce „hřelec a frakce“ na procentuální zastoupení HOS+ spermií v rozmrazených inseminačních dávkách ($p < 0,05$).

5.2 Integrita plasmatické membrány

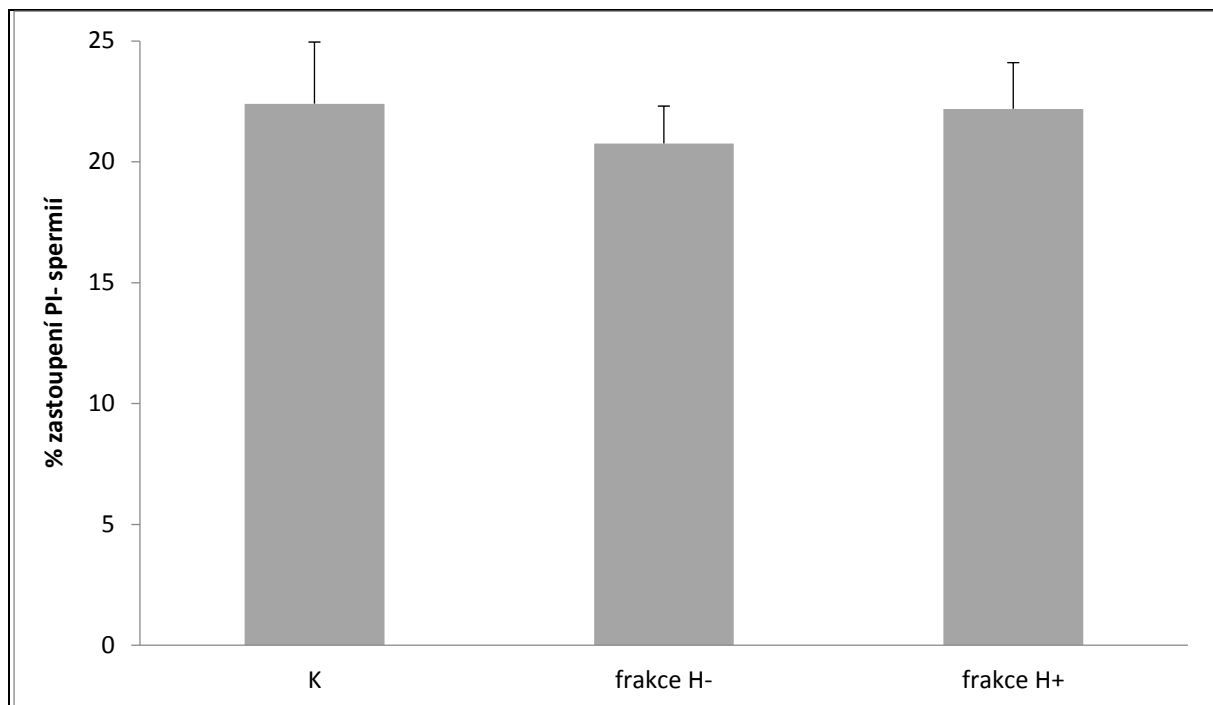
Tabulka 2: Popisné statistiky spermií s neporušenou plasmatickou membránou (PI-).

	Medián	Minimum	Maximum	Variační koeficient
K	23,45	7,1	42,9	41,54
H-	18,1	8,1	43,3	43,85
H+	19,15	9,2	46,7	1,98
H- 125	18,6	9,5	39,9	40,69
H+ 125	25,25	9,9	46,7	46,7
H- 250	20,25	8,1	43,3	48,0
H+ 250	24,05	9,2	40,4	48,26
H- 500	16,3	8,3	38,6	46,4
H+ 500	16,9	13,0	28,9	28,53

K = kontrolní skupina, H- = heparin-nevázející proteinová frakce, H+ = heparin-vázající proteinová frakce, H- 125 = přídavek 125 µg/ml heparin-nevázející proteinové frakce, H+ 125 = přídavek 125 µg/ml heparin-vázající proteinové frakce, H- 250 = přídavek 250 µg/ml heparin-nevázející proteinové frakce, H+ 250 = přídavek 250 µg/ml heparin-vázající proteinové frakce, H- 500 = přídavek 500 µg/ml heparin-nevázející proteinové frakce, H+ 500 = přídavek 500 µg/ml heparin-vázající proteinové frakce.

Popisné statistiky PI- rozmrazené spermie, ke kterým byly před zmrazením přidávány různé proteinové frakce a jejich koncentrace jsou vyjádřeny v Tabulce 2.

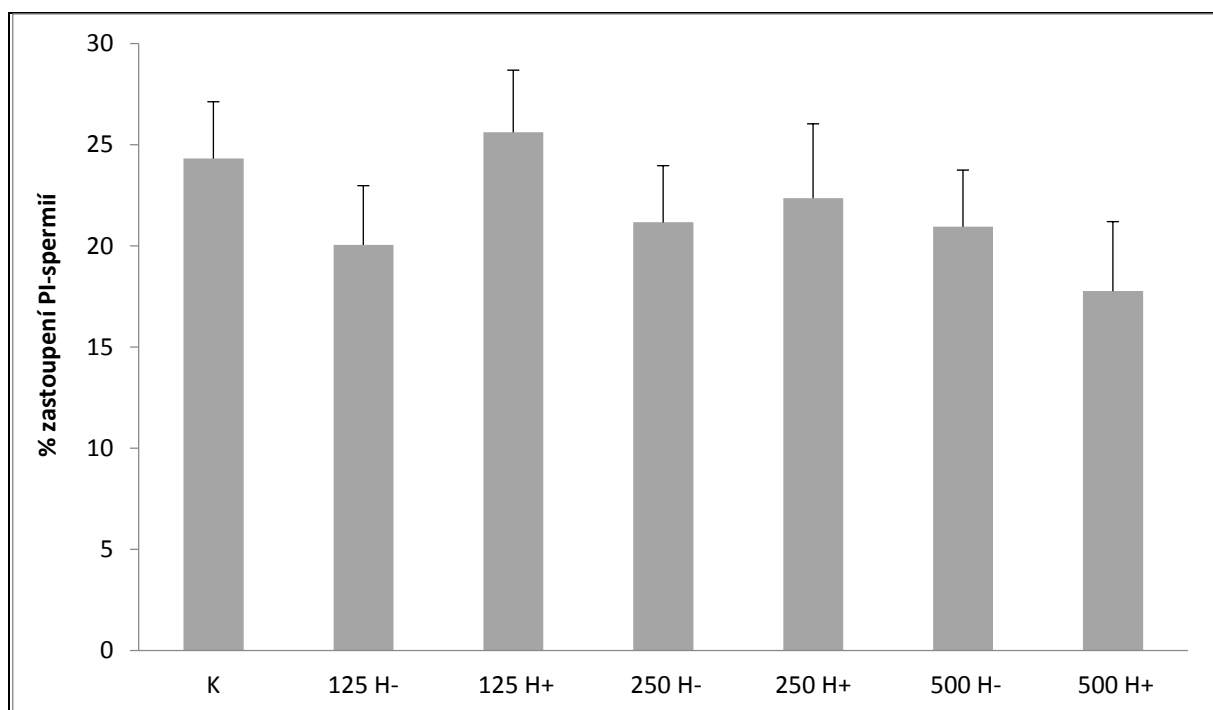
Graf 4: Průměrné zastoupení spermií s neporušenou plasmatickou membránou (PI-) v kontrolních vzorcích (K) a heparin-nevázající (H-) a vzorcích obsahující heparin-vázající (H+) proteinové frakce.



Kryokonzervované inseminační dávky bez přídavku specifické proteinové frakce (K) dosáhly průměrného zastoupení $22,4 \pm 2,6$ % spermií s neporušenou plasmatickou membránou (PI-). Inseminační dávky s přídavkem H- frakce měly $20,8 \pm 1,6$ % PI- spermií. Inseminační dávky s přídavkem H+ frakce obsahovaly $22,2 \pm 1,9$ % PI- spermií.

Na integritu plasmatické membrány spermií neměl přídavek heparinových frakcí před kryokonzervací signifikantní vliv ($p > 0,05$).

Graf 5: Průměrné hodnoty spermií s neporušenou plasmatickou membránou (PI-) ve třech koncentracích (125, 250 a 500 µg/ml) v kontrolních vzorcích (K) a vzorcích obsahující heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce.



Kontrolní inseminační dávky bez přídavku proteinové frakce (K) obsahovaly $24,3 \pm 2,8$ % spermií s neporušenou plasmatickou membránou (PI-).

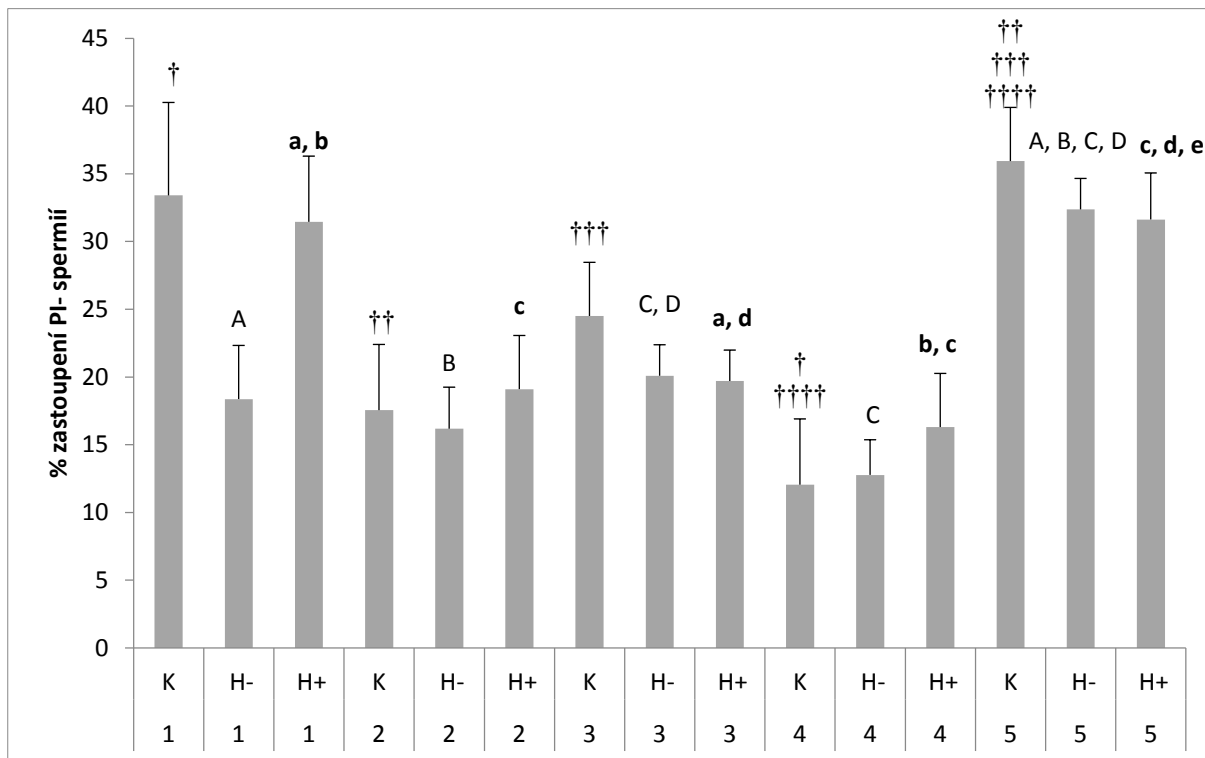
Inseminační dávky s přídavkem 125 µg/ml H- měly obsah $20,0 \pm 2,9$ % PI- spermií. Inseminační dávky s přídavkem 125 µg/ml H+ obsahovaly $25,6 \pm 3,1$ % PI- spermií.

Obohacené inseminační dávky o 250 µg/ml H- a H+ měly $21,2 \pm 2,8$ % a $22,4 \pm 3,7$ % PI- spermií, dle uvedeného pořadí.

Inseminační dávky s přídavkem 500 µg/ml H- a H+ obsahovaly $20,9 \pm 2,8$ % a $17,8 \pm 3,4$ % PI- spermií, dle uvedeného pořadí.

Na viabilitu spermií neměl přídavek heparinových frakcí v různých koncentracích před kryokonzervací inseminačních dávek signifikantní vliv ($p > 0,05$).

Graf 6: Průměrné hodnoty spermií s neporušenou plasmatickou membránou (PI-) u jednotlivých hřebců (hřebci č. 1, 2, 3, 4 a 5) v kontrolních vzorcích (K) a vzorcích obsahující heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce.



†, ††, †††, †††† stejné indexy označují statisticky významné rozdíly mezi kontrolními vzorky ($p > 0,05$).

A, B, C, D stejné indexy označují statisticky významné rozdíly mezi vzorky s obsahem heparin-nevázající (H-) proteinové frakce ($p > 0,05$).

a, b, c, d, e stejné indexy označují statisticky významné rozdíly mezi vzorky s obsahem heparin-vázající (H+) proteinové frakce ($p > 0,05$).

Na individuální úrovni jednotlivých hřebců ($n = 5$) nebyl zjištěn signifikantní vliv přídavku heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce na procentuální zastoupení spermií s neporušenou plasmatickou membránou ($p > 0,05$).

Inseminační dávky hřebce 1 bez přídavku proteinové frakce (K) obsahovaly $33,4 \pm 6,9$ % spermií s neporušenou plasmatickou membránou (PI-). Inseminační dávky s přídavkem H- a H+ obsahovaly $18,4 \pm 4,0$ % a $31,5 \pm 4,9$ % PI- spermií, dle uvedeného pořadí.

Kontrolní inseminační dávky (K) hřebce 2 obsahovaly $17,6 \pm 4,9$ % PI- spermíí. Inseminační dávky hřebce 2, které byly obohaceny o H- a H+ obsahovaly $16,2 \pm 3,1$ % a $19,1 \pm 4,0$ % PI- spermíí, dle uvedeného pořadí.

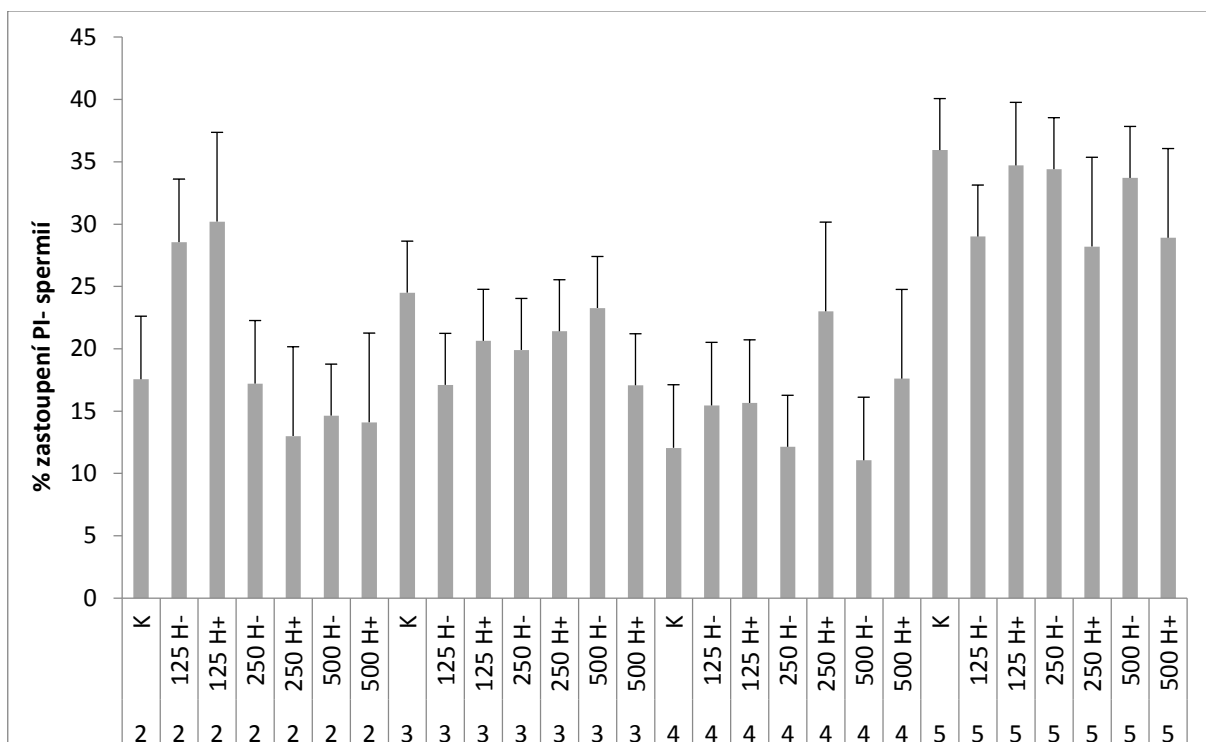
Inseminační dávky bez přídavku specifické proteinové frakce (K) u hřebce 3 obsahovaly $24,5 \pm 3,0$ % PI- spermíí. Přídavky H- a H+ do kryokonzervovaných inseminačních dávek měly obsah $20,1 \pm 3,0$ % a $19,7 \pm 3,0$ % PI- spermíí, dle uvedeného pořadí.

Hřelec 4 obsahoval ve svých kontrolních inseminačních dávkách (K) $12,1 \pm 4,9$ % PI- spermíí. Inseminační dávky s přídavkem H- a H+ obsahovaly $12,8 \pm 2,6$ % a $16,3 \pm 4,0$ % PI- spermíí, dle uvedeného pořadí.

Kontrolní inseminační dávky hřebce 5 měly obsah $36,0 \pm 4,0$ % PI- spermíí. Obsah $32,4 \pm 2,3$ % a $31,6 \pm 3,4$ % PI- spermíí měly inseminační dávky s obsahem H- a H+, dle uvedeného pořadí.

Byl zjištěn signifikantní vliv interakce „hřelec a frakce“ na procentuální zastoupení PI- spermíí v rozmrazených inseminačních dávkách ($p < 0,05$).

Graf 7: Průměrné hodnoty spermií s neporušenou plasmatickou membránou (PI-) u jednotlivých hřebců (hřebci č. 2, 3, 4 a 5) ve třech koncentracích (125, 250 a 500 µg/ml) v kontrolních vzorcích (K) a vzorcích obsahující heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce.



Na individuální úrovni jednotlivých hřebců ($n = 4$) nebyl zjištěn signifikantní vliv přídavku heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce na % zastoupení spermií s neporušenou plasmatickou membránou ($p > 0,05$) a nebyl potvrzen ani signifikantní vliv koncentrace na procentuální zastoupení spermií s neporušenou plasmatickou membránou ($p > 0,05$). Nezávisle proměnná „hřelec“ má signifikantní vliv na procentuální zastoupení PI-spermií v rozmrazených inseminačních dávkách ($p < 0,05$). Kombinace nezávisle proměnných „koncentrace“ a „frakce“ neměl signifikantní vliv na procentuální zastoupení PI-spermií v rozmrazených inseminannčních dávkách ($p > 0,05$).

Kryokonzervované inseminační dávky hřebce 2 bez přídavku proteinové frakce (K) měly zastoupení $17,6 \pm 5,1$ % spermií s neporušenou plasmatickou membránou (PI-). Inseminanční dávky s přídavkem 125 µg/ml H- a H+ měly obsah $28,6 \pm 5,1$ % a $30,2 \pm 7,2$ PI- spermií, dle uvedeného pořadí. Inseminační dávky s přidanými 250 µg/ml H- a H+ obsahovaly $17,2 \pm 5,1$ % a $13,0 \pm 7,2$ % PI- spermií, dle uvedeného pořadí. Inseminační dávky obohacené o 500 µg/ml H- měly obsah $14,6 \pm 4,1$ % PI- spermií a inseminační dávky s přídavkem 500 µg/ml H+ obsahovaly $14,1 \pm 7,2$ % PI- spermií.

U hřebce 3 kontrolní inseminační dávky (K) bez přídavku proteinové frakce obsahovaly $24,5 \pm 4,1$ % PI- spermií. Inseminační dávky hřebce 3 obohacené o $125 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ obsahovaly $17,1 \pm 4,1$ % a $20,6 \pm 4,1$ % PI- spermií, dle uvedeného pořadí. Inseminační dávky s $250 \mu\text{g/ml}$ H- proteinové frakce obsahovaly $19,9 \pm 4,1$ % PI- spermií a s přídavkem $250 \mu\text{g/ml}$ H+ měly obsah $21,4 \pm 4,1$ % PI- spermií. Inseminační dávky hřebce 3 obohacené o $500 \mu\text{g/ml}$ H- obsahovaly $23,3 \pm 4,1$ % PI- spermií, u přídavku H+ obsahovaly $17,1 \pm 4,1$ % PI- spermií.

Kontrolní inseminační dávky hřebce 4 obsahovaly $12,1 \pm 5,1$ % PI- spermií. Přídavek $125 \mu\text{g/ml}$ H- obsahoval $15,5 \pm 5,1$ % PI-. Inseminanční dávky s obsahem $125 \mu\text{g/ml}$ H+ obsahovaly $15,7 \pm 5,1$ % PI- spermií. Inseminační dávky s přídavkem $250 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ obsahovaly $12,1 \pm 4,1$ % a $23,0 \pm 7,2$ % PI- spermií, dle uvedeného pořadí. Obsah $11,0 \pm 5,1$ % PI- spermií měly inseminační dávky s přídavkem $500 \mu\text{g/ml}$ H-. Inseminační dávky obohacené o $500 \mu\text{g/ml}$ H+ obsahovaly $17,6 \pm 7,2$ % PI- spermií.

U hřebce 5 obsahovaly kontrolní inseminační dávky (K) $35,9 \pm 4,1$ % PI- spermií. Inseminační dávky obohacené o $125 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ obsahovaly $29,0 \pm 4,1$ % a $34,7 \pm 5,1$ % PI- spermií, dle uvedeného pořadí. Přídavek $250 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ do inseminačních dávek měl obsah $34,4 \pm 4,1$ % a $28,2 \pm 7,2$ % PI- spermií, dle uvedeného pořadí. Inseminanční dávky obohacené o $500 \mu\text{g/ml}$ H- obsahovaly $33,7 \pm 4,1$ % PI- spermií a přídavek $500 \mu\text{g/ml}$ H+ měl obsah $28,9 \pm 7,2$ % PI- spermií.

5.3 Integrita akrosomu

5.3.1 Živé spermie s nepoškozeným akrosomem

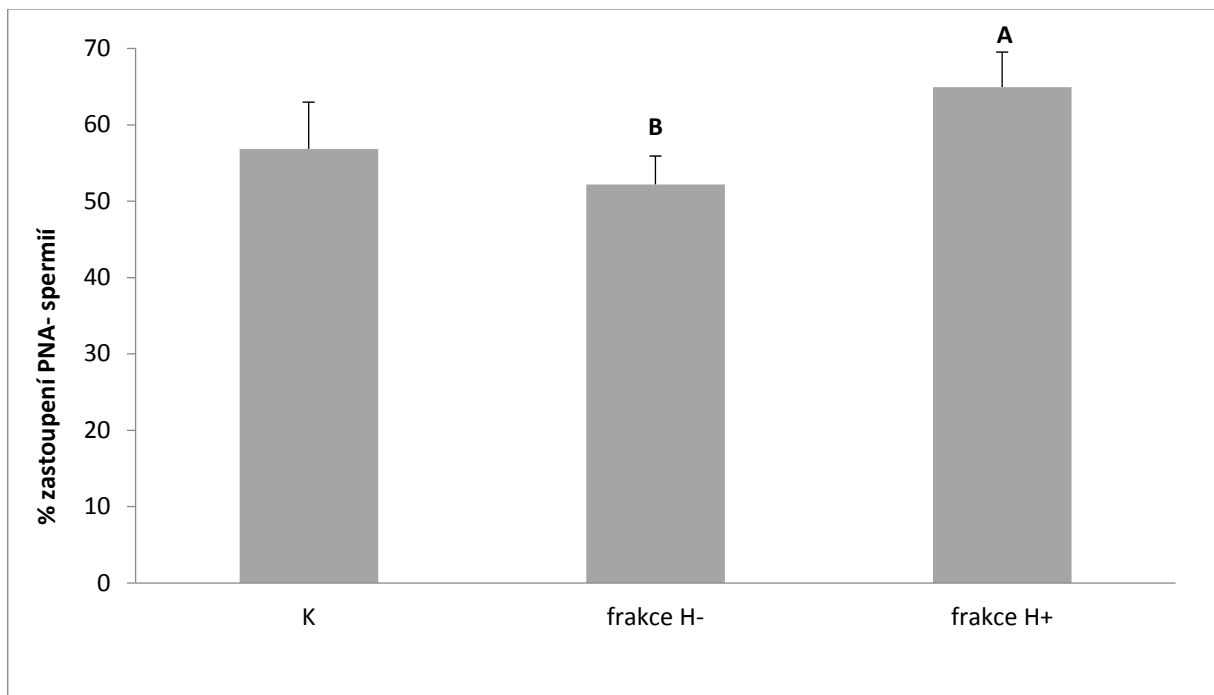
Tabulka 3: Popisné statistiky pro živé spermie s neporušenou integritou akrosomu (PNA-) z celkového počtu živých spermií.

	Medián	Minimum	Maximum	Variační koeficient
K	67,35	31,5	76,2	25,45
H-	64,65	0	87,2	52,84
H+	65,86	16,1	93,6	33,79
H- 125	61,8	0	78,8	65,5
H+ 125	76,95	55,9	92,3	14,99
H- 250	69,7	17,0	87,2	40,24
H+ 250	64,85	16,1	93,6	37,61
H- 500	56,2	0	78,2	54,49
H+ 500	53,95	16,2	73,7	43,05

K = kontrolní skupina, H- = heparin-nevázající proteinová frakce, H+ = heparin-vázající proteinová frakce, H- 125 = přídavek 125 µg/ml heparin-nevázající proteinové frakce, H+ 125 = přídavek 125 µg/ml heparin-vázající proteinové frakce, H- 250 = přídavek 250 µg/ml heparin-nevázající proteinové frakce, H+ 250 = přídavek 250 µg/ml heparin-vázající proteinové frakce, H- 500 = přídavek 500 µg/ml heparin-nevázající proteinové frakce, H+ 500 = přídavek 500 µg/ml heparin-vázající proteinové frakce.

Popisné statistiky pro PNA- rozmrazené spermie, ke kterým byly před zmrazením přidávány různé proteinové frakce a jejich koncentrace jsou vyjádřeny v Tabulce 3.

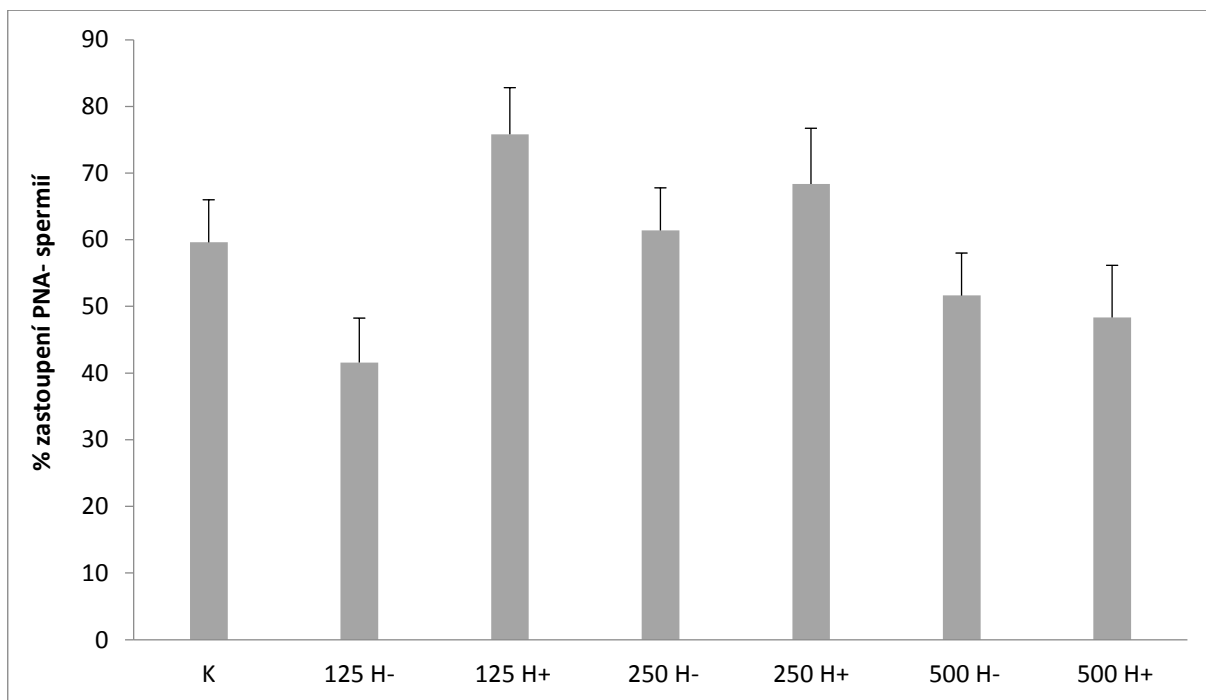
Graf 8: Průměrné hodnoty živých spermii s neporušenou integritou akrosomu (PNA-) z celkového počtu živých spermii v kontrolních vzorcích (K) a vzorcích obsahující heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce.



Kryokonzervované inseminační dávky bez přídavku specifické proteinové frakce (K) měly obsah $56,9 \pm 6,1$ % živých spermii s nepoškozenou integritou akrosomu z celkového počtu živých spermii (PNA).

Inseminační dávky s přídavkem H- měly $52,2 \pm 3,7$ % PNA- spermii a inseminační dávky s přídavkem H+ obsahovaly $64,9 \pm 4,6$ % PNA- spermii, tento rozdíl je statisticky signifikantní ($p < 0,05$).

Graf 9: Průměrné zastoupení živých spermií s neporušenou integritou akrosomu (PNA-) z celkového počtu živých spermií ve třech koncentracích (125, 250 a 500 µg/ml) v kontrolních vzorcích (K) a vzorcích obsahující heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce.



Kontrolní inseminační dávky (K) měly obsah živých spermií s nepoškozenou integritou akrosomu z celkového počtu živých spermií (PNA-) $59,6 \pm 6,4$ %.

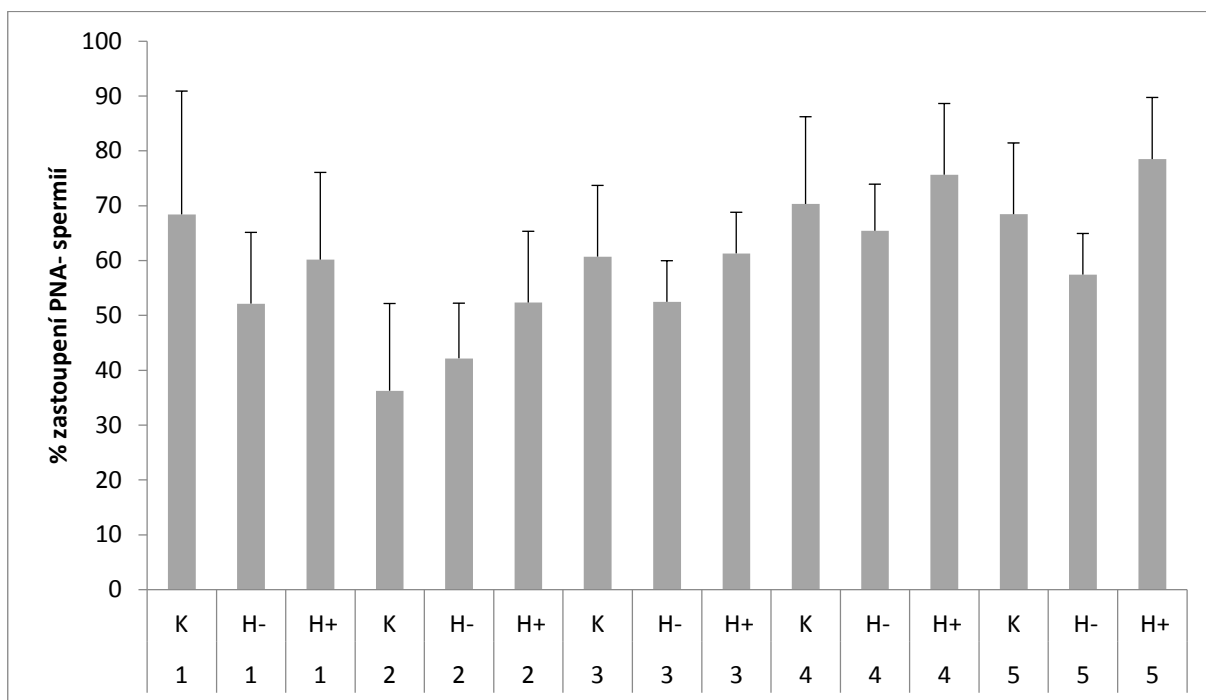
Obsah $41,6 \pm 6,7$ % PNA- spermií měly inseminační dávky s koncentrací 125 µg/ml H-, naopak obsah $75,8 \pm 7,0$ % měly inseminační dávky s přídatkem 125 µg/ml H+.

Přídavek 250 µg/ml H- a H+ obsahoval $61,4 \pm 6,4$ % a $68,4 \pm 8,4$ % PNA- spermií, dle uvedeného pořadí.

Po přidání 500 µg/ml H- a H+ do inseminačních dávek byl obsah $51,6 \pm 6,4$ % a $48,4 \pm 7,8$ % PNA- spermií, dle uvedeného pořadí.

Přídavek heparinových frakcí v různých koncentracích do kryokonzervovaných inseminačních dávek neměl signifikantní vliv ($p > 0,05$) na nepoškozenou integritu akrosomu.

Graf 10: Průměrné zastoupení živých spermií s neporušenou integritou akrosomu (PNA-) z celkového počtu živých spermií u jednotlivých hřebců (hřebci č. 1, 2, 3, 4 a 5) v kontrolních vzorcích (K) a vzorcích obsahující heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce.



Na individuální úrovni jednotlivých hřebců ($n = 5$) nebyl potvrzen signifikantní vliv přídavku heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce na procentuální zastoupení živých spermií s neporušenou integritou akrosomu ($p > 0,05$).

Hřebec 1 měl $68,4 \pm 22,5$ % živých spermií s nepoškozenou integritou akrosomu z celkového počtu živých spermií (PNA-) u kontrolních inseminačních dávek (K). Inseminační dávky s obsahem H- a H+ měly obsah $52,1 \pm 13,0$ % a $60,2 \pm 16,0$ % PNA-spermií, dle uvedeného pořadí.

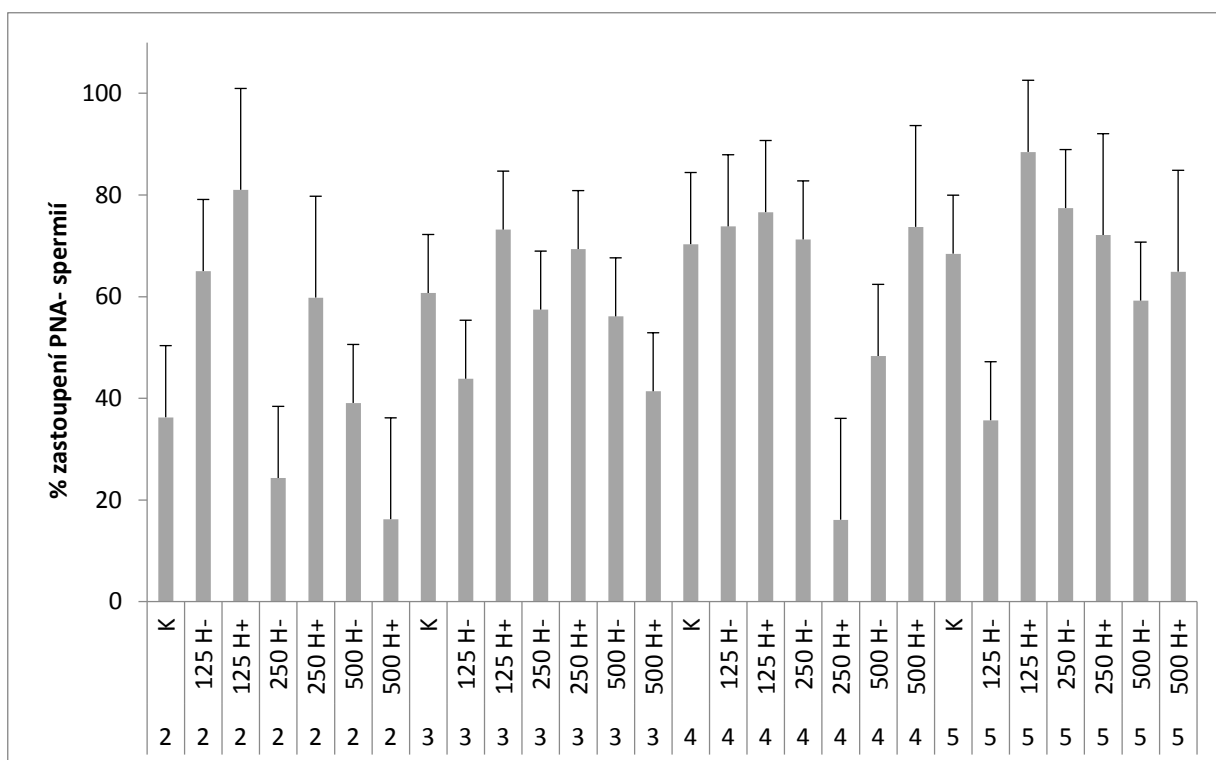
Kontrolní dávky (K) u hřebce 2 obsahovaly $36,3 \pm 16,0$ % PNA- spermií. Přídavek H- a H+ měl obsah $42,2 \pm 10,1$ % a $52,3 \pm 13,0$ %, dle uvedených pořadí.

Hřebec 3 v kontrolních dávkách obsahoval $60,7 \pm 13,0$ % PNA- spermií. Inseminační dávky s přídavkem H- obsahovaly $52,5 \pm 7,5$ % PNA- spermií. Kryokonzervované inseminační dávky obohacené o H+ obsahovaly $61,3 \pm 7,6$ % PNA- spermií.

Inseminační dávky hřebce 4 bez přídavku proteinové frakce (K) měly obsah $70,3 \pm 16,0$ % PNA- spermií. Inseminační dávky s přídavkem H- a H+ obsahovaly $65,4 \pm 8,6$ % a $75,6 \pm 13,0$ % PNA- spermií, dle uvedeného pořadí.

Inseminační dávky hřebce 5, které byly kontrolní (K) obsahovaly $68,4 \pm 13,0$ % PNA- spermií. Přídavek H- a H+ do inseminačních dávek měly obsah $57,4 \pm 7,5$ % a $78,5 \pm 11,2$ % PNA- spermií, dle uvedeného pořadí.

Graf 11: Průměrné zastoupení živých spermií s nepoškozenou integritou akrosomu (PNA-) z celkového počtu živých spermií u jednotlivých hřebců (hřebci č. 2, 3, 4 a 5) ve třech koncentracích (125, 250 a 500 $\mu\text{g/ml}$) v kontrolních vzorcích (K) a vzorcích obsahujících heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce.



Na individuální úrovni jednotlivých hřebců ($n = 4$) nebyl potvrzen signifikantní vliv přídavku heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce na procentuální zastoupení živých spermií s neporušenou integritou akrosomu ($p > 0,05$) a nebyl potvrzen ani signifikantní vliv koncentrace na procentuální zastoupení živých spermií s neporušenou integritou akrosomu ($p > 0,05$). Nezávisle proměnná „hřelec“ má signifikantní vliv na procentuální zastoupení PNA- spermií v rozmrazených inseminačních dávkách ($p < 0,05$).

Kombinace nezávisle proměnných „koncentrace“ a „frakce“ neměli signifikantní vliv na procentuální zastoupení PNA- spermií v rozmrazených inseminačních dávkách ($p > 0,05$).

Kontrolní inseminační dávky (K) hřebce 2 obsahovaly $36,3 \pm 14,1$ % živých spermií s nepoškozenou integritou akrosomu z celkového počtu živých spermií (PNA-). Inseminanční dávky hřebce 2 obohacené o $125 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ obsahovaly $65,0 \pm 14,1$ % a $81,0 \pm 19,9$ % PNA- spermií, dle uvedeného pořadí. Inseminanční dávky s obsahem $250 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ měly obsah $24,3 \pm 14,1$ % a $59,8 \pm 19,9$ % PNA- spermií, dle uvedeného pořadí. Inseminanční dávky s $500 \mu\text{g/ml}$ H- obsahují $39,1 \pm 11,5$ % PNA- spermií a obsah u $500 \mu\text{g/ml}$ H+ byl $16,2 \pm 19,9$ % PNA- spermií.

Kontrolní inseminační dávky (K) hřebce 3 bez přídavku proteinové frakce obsahovaly $60,7 \pm 11,5$ % PNA- spermií. Inseminanční dávky s obsahem $125 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ obsahovaly $43,8 \pm 11,5$ % a $73,2 \pm 11,5$ % PNA- spermií, dle uvedeného pořadí. Inseminanční dávky s $250 \mu\text{g/ml}$ H- měly obsah $57,4 \pm 11,5$ % PNA- spermií. Obohacené inseminační dávky o $250 \mu\text{g/ml}$ H+ obsahovaly $69,3 \pm 11,5$ % PNA- spermií. Inseminanční dávky s přídavkem $500 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ měly obsah $56,1 \pm 11,5$ a $41,4 \pm 11,5$ % PNA- spermií, dle uvedeného pořadí.

Hřelec 4 měl obsah $70,3 \pm 14,1$ % PNA- spermií u kontrolních inseminačních dávek (K). Inseminační dávky s přídavkem $125 \mu\text{g/ml}$ H- obsahovaly $73,8 \pm 14,1$ % PNA- spermií a inseminanční dávky s přídavkem $125 \mu\text{g/ml}$ H+ měly obsah $76,6 \pm 14,1$ % PNA- spermií. Inseminanční dávky hřebce 4 obohacené o $250 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ obsahovaly $71,2 \pm 11,5$ % a $16,1 \pm 19,9$ % PNA- spermií, dle uvedeného pořadí. Inseminanční dávky s obsahem $500 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ obsahovaly $48,3 \pm 14,1$ % a $73,7 \pm 19,9$ % PNA- spermií, dle uvedeného pořadí.

Inseminanční dávky bez přídavku proteinové frakce hřebce 5 obsahovaly $68,4 \pm 11,5$ % PNA- spermií. Obsah $35,7 \pm 11,5$ % PNA- spermií obsahovaly inseminanční dávky hřebce 5 s přídavkem $125 \mu\text{g/ml}$ H-. Naproti tomu inseminanční dávky s obsahem $125 \mu\text{g/ml}$ H+ obsahovaly $88,5 \pm 14,1$ % PNA- spermií. Přídavek $250 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ měl obsah $77,4 \pm 11,5$ % a $72,1 \pm 19,9$ % PNA- spermií, dle uvedeného pořadí. Přídavek $500 \mu\text{g/ml}$ H- měl $59,2 \pm 11,5$ % PNA- spermií, zatímco přídavek $500 \mu\text{g/ml}$ H+ měl obsah $64,9 \pm 19,9$ % PNA- spermií.

5.3.2 Mrtvé spermie s poškozeným akrosomem

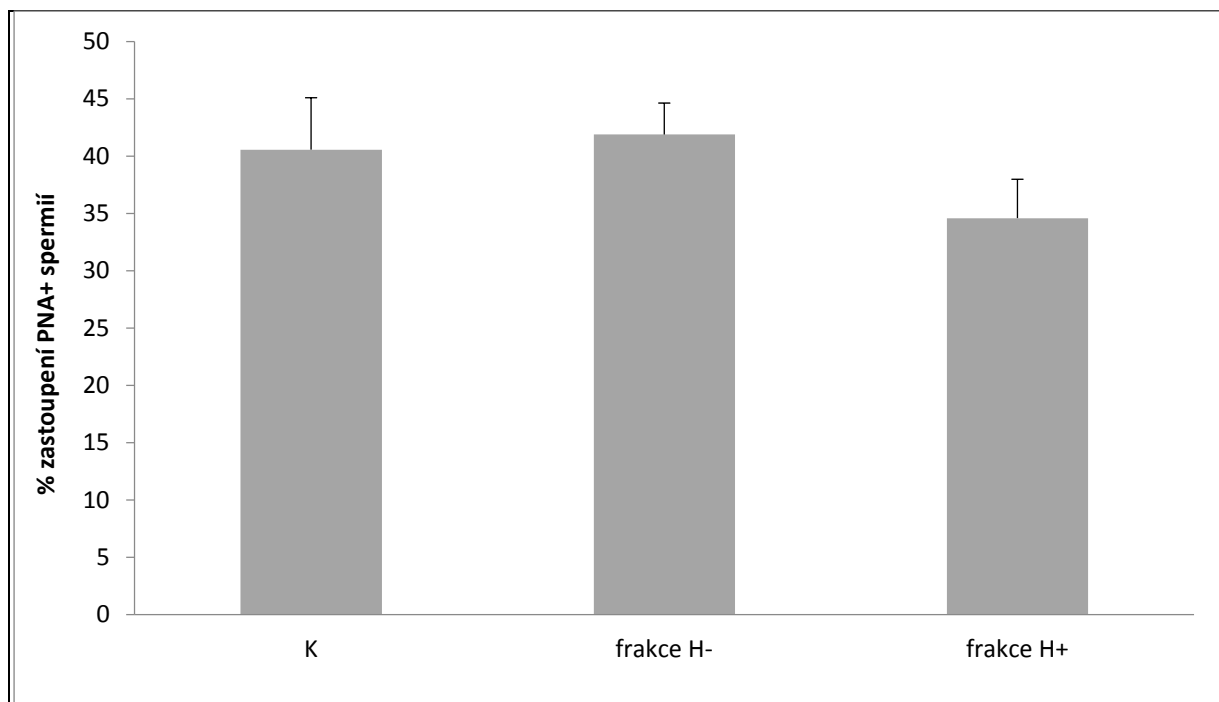
Tabulka 4: Hodnoty popisné statistiky pro mrtvé spermie s poškozenou integritou akrosomu (PNA+) z celkového počtu mrtvých spermií.

	Medián	Minimum	Maximum	Variační koeficient
K	39,9	29,3	54,2	19,53
H-	36,2	0	91,2	51,69
H+	35,2	8,8	80,4	44,99
H- 125	39,3	0	91,2	56,52
H+ 125	29,55	8,9	52,6	48,35
H- 250	31,4	27,5	88,9	53,02
H+ 250	35,95	8,8	80,4	51,11
H- 500	39,9	0	85,1	48,39
H+ 500	403	27,3	59,2	25,82

K = kontrolní skupina, H- = heparin-nevázající proteinová frakce, H+ = heparin-vázající proteinová frakce, H- 125 = přidavek 125 µg/ml heparin-nevázající proteinové frakce, H+ 125 = přidavek 125 µg/ml heparin-vázající proteinové frakce, H- 250 = přidavek 250 µg/ml heparin-nevázající proteinové frakce, H+ 250 = přidavek 250 µg/ml heparin-vázající proteinové frakce, H- 500 = přidavek 500 µg/ml heparin-nevázající proteinové frakce, H+ 500 = přidavek 500 µg/ml heparin-vázající proteinové frakce.

Popisné statistiky pro PNA+ rozmrazené spermie, ke kterým byly před zmrazením přidávány různé proteinové frakce a jejich koncentrace jsou vyjádřeny v Tabulce 4.

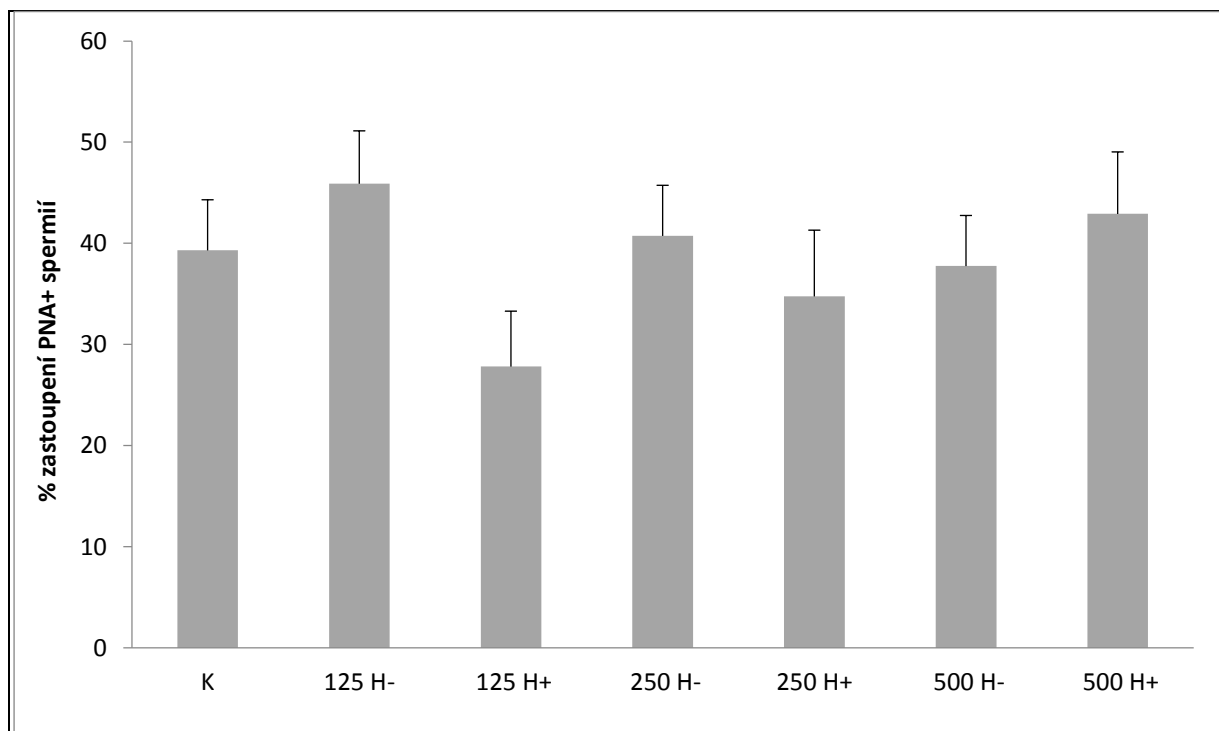
Graf 12: Průměrné zastoupení mrtvých spermií s poškozenou integritou akrosomu (PNA+) z celkového počtu mrtvých spermií v kontrolních vzorcích (K) a vzorcích obsahující heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce.



Kontrolní skupina inseminačních dávek (K) měla výskyt mrtvých spermií s poškozenou integritou akrosomu z celkového počtu mrtvých spermií (PNA+) $40,6 \pm 4,5$ %. Inseminační dávky doplněné o H- dosáhly obsahu $41,9 \pm 2,8$ % PNA+ spermií. Přídavek proteinové frakce H+ obsahovaly $34,6 \pm 3,4$ % PNA+ spermií.

Na poškozenou integritu akrosomu spermií neměl přídavek heparinových frakcí před kryokonzervací signifikantní vliv ($p > 0,05$).

Graf 13: Průměrné zastoupení mrtvých spermií s poškozenou integritou akrosomu (PNA+) z celkového počtu mrtvých spermií ve třech koncentracích (125, 250 a 500 µg/ml) v kontrolních vzorcích (K) a vzorcích obsahující heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce.



Kontrolní skupina kryokonzervovaných inseminačních dávek (K) měla obsah $39,3 \pm 5,0$ % mrtvých spermií s poškozenou integritou akrosomu z celkového počtu mrtvých spermií (PNA+).

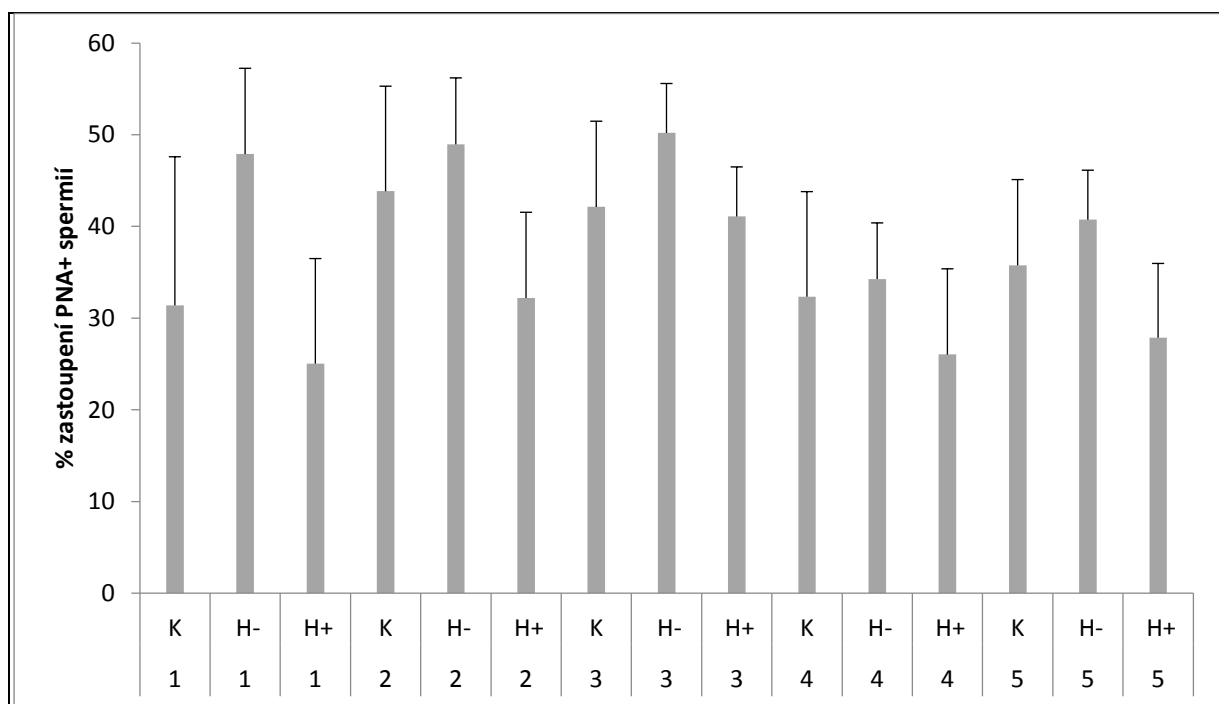
Inseminační dávky s koncentrací 125 µg/ml H- a H+ obsahovaly $45,9 \pm 5,2$ % a $27,8 \pm 5,5$ % PNA+ spermií, dle uvedeného pořadí.

Inseminační dávky obhacené o 250 µg/ml H- proteinové frakce měly $40,7 \pm 5,0$ % PNA+ spermií. Příklad 250 µg/ml H+ do inseminančních dávek obsahoval $34,8 \pm 6,6$ % PNA+ spermií.

Inseminační dávky s koncentrací 500 µg/ml H- měly $37,8 \pm 5,0$ % PNA+ spermií a přídavek 500 µg/ml H+ měl obsah $42,9 \pm 6,1$ % PNA+ spermií.

Přídavek heparinových frakcí v různých koncentracích před kryokonzervací neměl signifikantní vliv ($p > 0,05$) na poškozenou integritu akrosomu.

Graf 14: Průměrné zastoupení mrtvých spermií s poškozenou integritou akrosomu (PNA+) z celkového počtu mrtvých spermií u jednotlivých hřebců (hřebci č. 1, 2, 3,4 a 5) v kontrolních vzorků (K) a vzorcích obsahující heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce.



Na individuální úrovni jednotlivých hřebců ($n = 5$) nebyl potvrzen signifikantní vliv přídavku heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce na procentuální zastoupení mrtvých spermií s porušenou integritou akrosomu ($p > 0,05$).

Kontrolní inseminační dávky (K) bez přídavku proteinové frakce obsahovaly $31,4 \pm 16,2$ % spermií s poškozenou integritou akrosomu z celkového počtu mrtvých spermií (PNA+). Inseminační dávky hřebce 1 s přídavkem H- a H+ obsahovaly $47,9 \pm 9,4$ % a $25,1 \pm 11,5$ % PNA+ spermií, dle uvedeného pořadí.

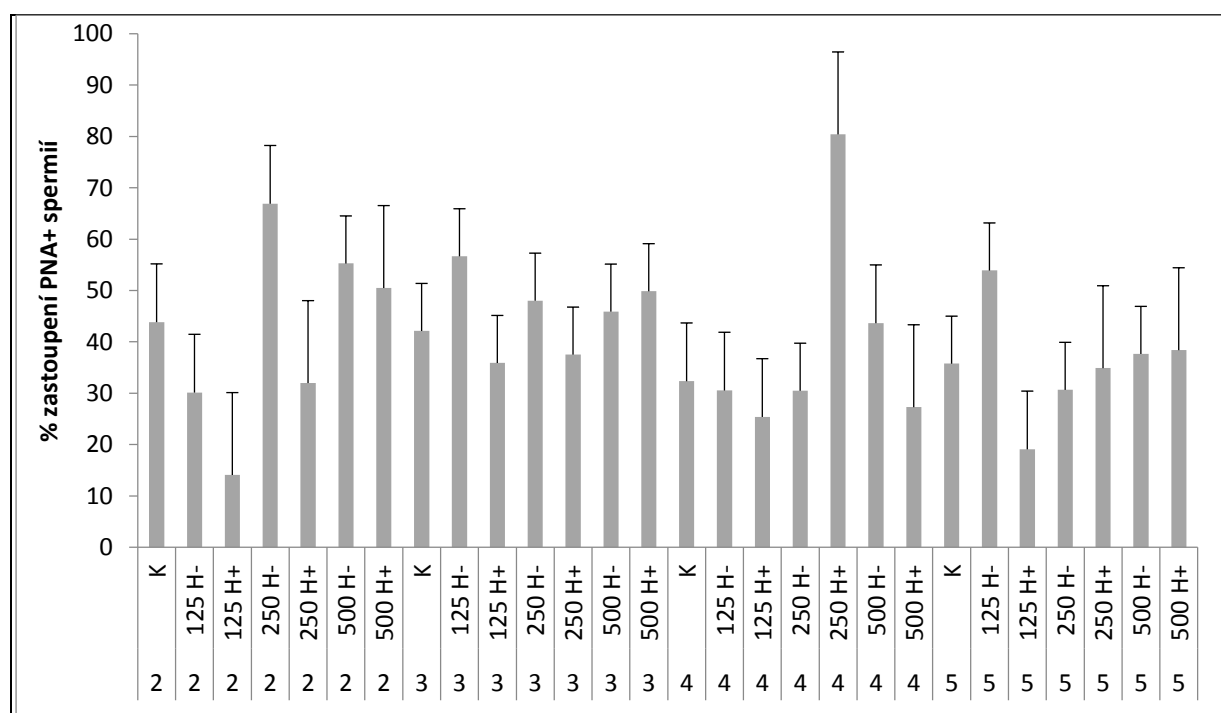
Inseminační dávky hřebce 2 bez přídavku proteinové frakce (K) dosahovaly $43,9 \pm 11,5$ % PNA+. Nejvyšší počet $49,0 \pm 7,3$ % PNA+ u hřebce 2 obsahovaly inseminační dávky obohacené o H- proteinovou frakci. Inseminanční dávky s přídavkem H+ proteinové frakce měly obsah PNA+ spermií $32,2 \pm 9,4$ %.

Hřebec 3 měl obsah $42,1 \pm 9,4$ % PNA+ spermií u kontrolních inseminačních dávek (K). Inseminanční dávky hřebce 3 s přídavkem H- a H+ měly obsah $50,2 \pm 5,4$ % a $41,1 \pm 5,4$ % PNA+ spermií, dle uvedeného pořadí.

Inseminanční dávky bez přídavku proteinové frakce (K) hřebce 4 měly obsah $32,4 \pm 11,5$ % PNA+ spermíí. Inseminační dávky s přídavkem H- proteinové frakce měly $34,3 \pm 6,1$ % PNA+ spermíí. Obohacené inseminační dávky o H+ obsahovaly $26,0 \pm 9,4$ % PNA+ spermíí.

Kontrolní skupina inseminačních dávek (K) u hřebce 5 obsahovala $35,8 \pm 9,4$ % PNA+. Obohacené kryokonzervované inseminační dávky H- a H+ obsahovaly $40,7 \pm 5,4$ % a $27,9 \pm 8,1$ % PNA+ spermíí, dle uvedeného pořadí.

Graf 15: Průměrné zastoupení mrtvých spermíí s poškozenou integritou akrosomu (PNA+) z celkového počtu mrtvých spermíí u jednotlivých hřebců (hřebci č. 2, 3, 4 a 5) ve třech koncentracích (125, 250 a 500 $\mu\text{g/ml}$) v kontrolních vzorcích (K) a vzorcích obsahující heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce.



Na individuální úrovni jednotlivých hřebců ($n = 4$) nebyl potvrzen signifikantní vliv adice heparin-nevázající (H-) a heparin-vázající (H+) proteinové frakce na procentuální zastoupení mrtvých spermíí s porušenou integritou akrosomu spermíí ($p > 0,05$) a nebyl potvrzen ani signifikantní vliv koncentrace na procentuální zastoupení mrtvých spermíí s poškozenou integritou akrosomu spermíí ($p > 0,05$). Nezávisle proměnná „hřebec“ má signifikantní vliv na procentuální zastoupení mrtvých spermíí s porušenou integritou akrosomu spermíí v rozmrazených inseminačních dávkách ($p < 0,05$). Kombinace nezávisle

proměnné „koncentrace a frakce“ neměl signifikantní vliv na procentuální zastoupení zastoupení mrtvých spermií s porušenou integritou akrosomu spermií v rozmrazených inseminančních dávkách ($p > 0,05$).

Kontrolní inseminační dávky (K) bez přídavku proteinové frakce hřebce 2 obsahovaly $43,9 \pm 11,4$ % mrtvých spermií s poškozenou integritou akrosomu z celkového počtu mrtvých spermií (PNA+). Inseminační dávky obohacené o $125 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ měly obsah $30,2 \pm 11,4$ a $14,1 \pm 16,1$ % PNA+ spermií, dle uvedeného pořadí. Inseminanční dávky s přídavkem $250 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ obsahovaly $67,0 \pm 11,4$ a $32,0 \pm 16,1$ % PNA+ spermií, dle uvedeného pořadí. Inseminační dávky hřebce 2 s $500 \mu\text{g/ml}$ H- měly obsah $55,3 \pm 9,3$ % a přídavek $500 \mu\text{g/ml}$ H+ obsahoval $50,5 \pm 16,1$ % PNA+ spermií.

Inseminanční dávky bez přídavku proteinové frakce (K) u hřebce 3 měly obsah $42,1 \pm 9,3$ % PNA+ spermií. U hřebce 3 inseminační dávky s přídavkem $125 \mu\text{g/ml}$ H- obsahovaly $56,7 \pm 9,3$ %. Přídavek $125 \mu\text{g/ml}$ H+ obsahoval $35,9 \pm 9,3$ % PNA+ spermií. Inseminanční dávky hřebce 3 obohacené o $250 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ měly obsah $48,0 \pm 9,3$ % a $37,5 \pm 9,3$ % PNA+ spermií, dle uvedeného pořadí. Přídavek $500 \mu\text{g/ml}$ H- v inseminančních dávkách měl obsah $45,9 \pm 9,3$ % PNA+ spermií. Inseminanční dávky s obsahem $500 \mu\text{g/ml}$ H+ měly $49,9 \pm 9,3$ % PNA+ spermií.

Kontrolní skupina inseminančních dávek u hřebce 4 obsahovala $32,4 \pm 11,4$ % PNA+ spermií. Inseminační dávky s obsahem $125 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ obsahovaly $30,6 \pm 11,4$ % a $25,4 \pm 11,4$ % PNA+ spermií, dle uvedeného pořadí. Inseminanční dávky obohacené o $250 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ obsahovaly $30,5 \pm 9,3$ % a $80,4 \pm 16,1$ % PNA+ spermií, dle uvedeného pořadí. Obohacené inseminační dávky o $500 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ obsahovaly $43,7 \pm 11,4$ % a $27,3 \pm 16,1$ % PNA+ spermií, dle uvedeného pořadí.

Hřelec 5 měl obsah $35,8 \pm 9,3$ % PNA+ spermií v inseminančních dávkách bez přídavku proteinové frakce (K). Inseminanční dávky s přídavkem $125 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ obsahovaly $54,0 \pm 9,3$ % a $19,1 \pm 11,4$ % PNA+ spermií, dle uvedeného pořadí. Inseminanční dávky obohacené o $250 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ měly obsah $30,7 \pm 9,3$ % a $35,0 \pm 16,1$ % PNA+ spermií, dle uvedeného pořadí. Přídavek $500 \mu\text{g/ml}$ H- a H+ do inseminančních dávek u hřebce 5 obsahoval $37,7 \pm 9,3$ % a $38,4 \pm 16,1$ % PNA+ spermií, dle uvedeného pořadí.

6 DISKUSE

Cílem diplomové práce je ověřit hypotézu, že přidavek heparin vázající proteinové frakce semenné plazmy k ejakulátu před zamrazením zvýší kvalitu rozmrazeného ejakulátu.

Před kryokonzervací je standardně téměř celá semenná plazma odstraněna, aby negativně neovlivňovala kvalitu spermií po rozmrazení (Alghamdi et al. 2002; Moore et al. 2005). Nicméně se zdá, že ponechání určitého objemu semenné plazmy u spermií před kryokonzervací by mohlo mít pozitivní efekt na kvalitu rozmrazených spermií (Aurich et al. 1996). Semenná plazma obsahuje supresory imunity, tuky, cukry, soli, různé typy buněk a především pak specifické proteiny (Jeannerat et al. 2017). Některé z nich se označují jako dekapacitační faktory, které se navazují na povrch plasmatické membrány a potlačují předčasné zahájení kapacitace (Varner & Johnson 2011). Semenná plazma hraje též důležitou roli v modulaci spermií a jejich schopnosti interagovat s epitelem a sekrety samičího pohlavního traktu (Rodríguez-Martínez et al. 2011). Proteiny proto hrají u semenné plazmy nezastupitelnou roli v remodelaci plasmatické membrány spermie a ovlivňují tak její funkčnost (Manjunath et al. 2002).

Proteiny semenné plazmy se dělí na heparin-vázající a heparin-nevázající proteiny (Topfer-Petersen et al. 2005). Je předpokládáno, že heparin-vázající proteiny patří mezi proteiny, které by mohly zvýšit schopnost oplození spermií po rozmrazení tím, že se navážou na plasmatickou membránu spermií, čímž se může snížit poškození plasmatické membrány spermií způsobené zmrazením (Lessard et al. 2000). V našem experimentu neměl přidavek heparin-nevázající a heparin-vázající proteinové frakce semenné plazmy do kryokonzervačního ředidla vliv na funkčnost a integritu plasmatické membrány spermií po rozmrazení. V současné době neexistují odborné práce, které by byly zaměřeny na efekt přídatku heparinových frakcí u epididymálních či ejakulovaných spermií hřebců. Existují ovšem odborné práce, které jsou zaměřeny na efekt přídatku heparinových frakcí u epididymálních spermií buvolů (Arangasamy et al. 2005; Harshan et al. 2006; Singh et al. 2007; Kumar et al. 2008) a ejakulovaných spermií býků (Patel et al. 2016). Harshan et al. (2006) ve své práci uvádějí, že přidavek heparin-vázajících proteinů k epididymálním spermiím výrazně zhoršil funkčnost i integritu plasmatické membrány ve srovnání s kontrolní skupinou. Singh et al. (2007) ve své práci vystavili epididymální spermie buvolů heparin-vázajícím proteinům, což vedlo také k výraznému zhoršení funkčnosti i integrity plasmatické

membrány spermií po rozmrazení. Patel et al. (2016) uvádějí, že kryokonzervace býčího ejakulátu s přísávkem heparin-vázající proteinové frakce vedla ke snížení obsahu spermií s funkční plasmatickou membránou po rozmrazení, ovšem v jejich experimentu neměl přísávek heparin-vázající frakce vliv na obsah spermií s neporušenou plasmatickou membránou po rozmrazení.

Naše výsledky se neshodují s výsledky prací kolektivu autorů Harshan et al. (2006) a Singh et al. (2007). Částečně se shodují se studií Patel et al. (2016), a to ve zkoumaném efektu přísávku na integritu plasmatické membrány. Je tedy vidět, že výsledky zmiňovaných studií jsou značně rozporuplné. Rodrigez-Martinez et al. (2011) zmiňují, že změna ve funkčnosti plasmatické membrány během kryokonzervace může být přičítána různým koncentracím membránového cholesterolu. Právě spermie s vyšším obsahem cholesterolu v plasmatické membráně mají lépe odolávat vlivům poškozování během procesu kryokonzervace (Srivastava et al. 2013). V plasmatické membráně spermií hřebců je poměr cholesterolu a fosfolipidů 0,36 (Amann & Graham 1993) a u býků 0,51 (Parks & Graham 1992). I přes vyšší zastoupení cholesterolu v plasmatické membráně býků právě kryokonzervace ejakulátu býků s přísávkem heparin-vázající proteinové frakce nedosáhla lepších výsledků v obsahu spermií s neporušenou integritou plasmatické membrány po rozmrazení (v porovnání s naším experimentem). Dále, oproti našemu experimentu, vyvolal přísávek heparin-vázající proteinové frakce negativní efekt (Patel et al. 2016), což je poměrně překvapivé vzhledem k publikovaným pozitivním efektům proteinů semenné plazmy (Rodriguez-Martinez et al. 2011). Například protein HSP-1/2 chrání různé cílové proteiny před tepelným, chemickým a oxidačním stresem (Kumar et al. 2008). Singh et al. (2007) ve své práci zmiňují, že žloutkové ředidlo vyvolává interakci s heparin-vázajícími proteiny, což zabraňuje heparin-vázajícím proteinům působit na spermie. Můžeme se tedy domnívat, že použití žloutkového ředidla, jak tomu bylo v našem případě i Patel et al. (2016), může potlačovat funkci heparin-vázajících proteinů na spermie. Zdá se ovšem, že tento efekt je výraznější u býků. Salazar et al. (2011) ve své práci uvádějí, že na kvalitu rozmrazených spermií hřebců má vliv složení ředidla. Rozmrazené spermie dosahovaly vyšší kvality, pokud byly zamrazeny ve žloutkovém ředidle na rozdíl od mléčného ředidla. Papa et al. (2011) testovali nahrazení vaječného žloutku sojovým lecitinem a dosáhli podobných výsledků u hřebčích rozmrazených spermií. Ovšem spermie, které se zamrazily spolu se sojovým lecitinem, vykazovaly nižší míru plodnosti. Je tedy patrné, že efektivita proteinových frakcí přidávaných do kryokonzervačního ředidla bude do jisté míry ovlivněna právě složením samotného ředidla, a na to by měl být brán zřetel.

V našem experimentu jsme zaznamenali signifikantní vliv přídavku heparin-nevázající a heparin-vázající proteinové frakce do kryokonzervačního ředidla na zastoupení živých spermií s neporušenou integritou akrosomu po rozmrazení. Přídavek heparin-nevázající a heparin-vázající proteinové frakce do kryokonzervačního ředidla neměl vliv na snížení poškození integrity akrosomu u mrtvých spermií po rozmrazení. Harshan et al. (2006) uvádějí, že přídavek heparin-vázající proteinové frakce k epididymálním spermiím buvolů zvýšil poškození akrosomální integrity po rozmrazení. Singh et al. (2007) ve své práci vystavili epididymální spermie buvolů pouze heparin-vázajícím proteinům, což vedlo k zvýšení poškození integrity akrosomu spermií po rozmrazení. Patel et al. (2016) uvádějí, že kryokonzervace býčího ejakulátu s přídavkem heparin-vázající proteinové frakce nevedla k rozdílnému zastoupení spermií po rozmrazení s akrosomovou reakcí oproti kontrolním inseminačním dávkám. Opět se tedy ukazuje, že jednotlivé proteinové frakce mají pravděpodobně odlišný efekt, pokud jsou přidány k epididymálním a ejakulovaným spermiím. U ejakulovaných spermií je heparin-vázající protein HSP-7 zapojen do stabilizace akrosomu těsně před kapacitací (Rodriguez-Martinez et al. 2011) a nezařazený protein HSP-4 zabraňuje spontánní akrosomové reakci (Fraser et al. 2005). Můžeme tedy říci, že naše výsledky nepřímo potvrzují stabilizační efekt jednotlivých proteinů zastoupených v semenné plazmě.

Semenná plazma obsahuje různé proteinové frakce, do kterých patří mnoho proteinů a jejich koncentrace je zásadní pro jejich efekt (Manjunath et al. 2002). Proto jsme se zaměřili na testování různých koncentrací (125, 250 a 500 $\mu\text{g/ml}$) u jednotlivých testovaných frakcí. V našem experimentu zaměřeném na funkci plasmatické membrány spermií a neporušenou integritu plasmatické membrány po rozmrazení nebyl prokázán vliv přídavku heparin-nevázající a heparin-vázající proteinové frakce v jednotlivých koncentracích do kryokonzervačního ředidla. Arangasamy et al. (2005) testovali buvolí epididymální spermie s přídavkem heparin-vázající proteinové frakce v koncentracích 10, 20, 30, 40, 50 a 60 $\mu\text{g/ml}$. Nejvyššího zastoupení spermií s funkční plasmatickou membránou dosáhly koncentrace 20 a 40 $\mu\text{g/ml}$. Harshan et al. (2006) ve své práci používali přídavek 40 a 80 $\mu\text{g/ml}$ heparin-vázající frakce k epididymálním spermiím buvolů. Skupiny inseminačních dávek s přídavkem 40 $\mu\text{g/ml}$ vykazovaly snížení poškození funkčnosti plasmatické membrány a poškození integrity plasmatické membrány spermií po rozmrazení oproti přídavku 80 $\mu\text{g/ml}$. Patel et al. (2016) ve svém experimentu přidávali do býčího ejakulátu koncentrace 10, 20 a 40 $\mu\text{g/ml}$ heparin-vázající proteinové frakce. Nejlepších výsledků v obsahu spermií s funkční plasmatickou membránou a neporušenou integritou plasmatické membrány dosáhl ejakulát doplněný o 20 $\mu\text{g/ml}$ oproti přídavku 10 a 40 $\mu\text{g/ml}$ heparin-vázající proteinové frakce.

Kumar et al. (2008) přidávali k epididymálním spermím buvolů koncentrace 80 µg/ml heparin-nevázající, 80 µg/ml heparin-vázající proteinové frakce, 80 µg/ml heparin-nevázající a 80 µg/ml heparin-vázající proteinové frakce dohromady, 400 µg/ml heparin-nevázající proteinové frakce, přídavek 80 µg/ml heparin-vázající a 400 µg/ml heparin-nevázající proteinové frakce dohromady. Přídavek heparin-vázající proteinové frakce měl významně nižší zastoupení spermíí u sledovaných parametrů (HOS, viabilita, integrita akrosomu). Ejakulát ošetřený samotným přídávkem heparin-nevázající proteinové frakce měl lepší hodnoty zkoumaných parametrů ve srovnání s kontrolní skupinou, což indikuje, že tento přídavek heparin-nevázající proteinové frakce zlepšil mrazitelnost spermíí. Zdá se, že heparin-nevázající proteinová frakce může omezit poškození spermíí způsobené heparin-vázající proteinovou frakcí během kryokonzervace, pokud jsou přidávány k ejakulátu najednou.

V našem experimentu se oproti ostatním výzkumům neprojevil efekt přídávku koncentrace heparin-vázající proteinové frakce. Manjunath et al. (2002) popisují, že vyšší koncentrace proteinů bovinní semenné plazmy odstraňuje více cholesterolu a fosfolipidů z plasmatické membrány spermíí býků, což má za následek její destabilizaci, a snižuje její odolnost proti poškození během procesu kryokonzervace, což se nepotvrdilo v testování Kumar et al. (2008), kteří přidávali k epididymálním spermím koncentraci 400 µg/ml heparin-nevázající a 80 µg/ml heparin-vázající proteinové frakce. Manjunath et al. (2002) také uvádějí, že ejakulát zředěný žloutkovým ředidlem může snižovat škodlivý účinek proteinů semenné plazmy býků na modifikaci plasmatické membrány spermíí a dosahuje i lepšího skladování spermíí. Právě žloutkové ředidlo ve své práci používali i Kumar et al. (2008), což mohl být jeden z faktorů, proč se neprojevil škodlivý účinek proteinů semenné plazmy. Ani v našich výsledcích není zaznamenána koncentrace, která by výrazně ovlivnila snížení obsahu spermíí s neporušenou plasmatickou membránou oproti kontrolní skupině, používali jsme žloutkové ředidlo stejně jako Kumar et al. (2008).

Přídavek heparinových frakcí v různých koncentracích do kryokonzervačního ředidla nepotvrdil signifikantní vliv na zastoupení živých spermíí s nepoškozenou integritou akrosomu a zastoupení mrtvých spermíí s poškozenou integritou akrosomu po rozmrazení. V práci Harshan et al. (2006) prokázali vliv koncentrace heparin-vázajících proteinů na integritu akrosomu. Lepšího efektu dosáhla nižší koncentrace. V práci Patel et al. (2016) neměla koncentrace signifikantní vliv na integritu akrosomu. Kumar et al. (2008) prokázali efekt koncentrace heparin-vázajících proteinů. Lepší integrity akrosomu dosáhly všechny testované koncentrace heparin-nevázající proteinové frakce (80 a 400 µg/ml) oproti heparin-

vázající proteinové frakci či kombinaci obou heparinových proteinových frakcí. Efekt přidavku heparinových frakcí na integritu akrosomu byl podobný jako efekt u plasmatické membrány. Kumar et al. (2008) uvádějí, že právě heparin-nevázající proteinová frakce pomáhá při udržování membránové integrity stabilizací proteinových prvků v lipidové matici plasmatické membrány.

Dále jsme v předkládané diplomové práci sledovali zastoupení spermií s funkční plasmatickou membránou a neporušenou integritou plasmatické membrány po rozmrazení u jednotlivých hřebců ($n = 5$) v inseminačních dávkách s přidavkem heparin-nevázající a heparin-vázající proteinové frakce do kryokonzervačního ředidla. Ani zde nebyl prokázán signifikantní vliv heparin-nevázající a heparin-vázající proteinové frakce na individuální úrovni jednotlivých hřebců. Byl zjištěn signifikantní vliv interakce „hřebec a frakce“ na procentuální zastoupení spermií s funkční plasmatickou membránou a neporušenou integritou plasmatické membrány po rozmrazení mezi hřebci. Stejné závěry publikovali Patel et al. (2016) ve své práci, kde popisují rozdílnou funkčnost plasmatické membrány a zastoupení spermií s nepoškozenou integritou plasmatické membrány mezi jednotlivými testovanými býky ($n = 6$) s ejakulátem doplněným o heparin-vázající proteinovou frakci. Na individuální úrovni jednotlivých hřebců ($n = 5$) nebyl potvrzen signifikantní vliv přidavku heparinových frakcí na zastoupení živých spermií s neporušenou integritou akrosomu a mrtvých spermií s poškozenou integritou akrosomu. V práci Patel et al. (2016) se lišilo zastoupení akrosomálního poškození spermií po rozmrazení mezi jednotlivými testovanými býky ($n = 6$).

Rozdíly v míře přežití spermií během kryokonzervace existují nejen mezi druhy (Darin-Bennett & White 1977), ale také mezi jednotlivými samci v rámci druhu. Tyto rozdíly jsou pravděpodobné vzhledem k inherentním rozdílům mezi oběma druhy a jedinci v rámci biochemie a metabolismu spermií. Nejpravděpodobnější důvod variability mezi jednotlivými hřebci je, jak dobře si jejich sperma uchová svou schopnost oplození během kryokonzervace (Loomis & Graham 2008). Hřebci se vybírají do chovu hlavně podle jejich výkonu jen s nepatrným ohledem na kvalitu spermatu či schopnost spermií přežít proces kryokonzervace. Tím, že téměř neexistuje selekce znaků reprodukce, produkuje pouze 20 % hřebců sperma, které lze zmrazit dobře, a přibližně 20 – 50 % hřebců produkuje sperma, které lze zmrazit špatně (Vidament et al. 1997; Hoffmann et al. 2011). Spermie od špatně mrazitelných hřebců vykazovaly nižší limity osmotické tolerance během kryokonzervace. Byla u nich také snižena

životaschopnost a zvýšená akrosomová reakce, pokud byly mrazeny s více než 2 % kryoprotetivních látek, zatímco spermie od dobře mrazitelných hřebců jsou schopny odolávat koncentracím kryoprotektivních látek až do 3 % (Hoffman et al. 2011). Jeden z možných přístupů pro zvýšení kvality kryokonzervování ejakulátu je výběr pouze vysoce kvalitního ejakulátu (Loomis & Graham 2008). Hladina celkových proteinů přítomných v čerstvém ejakulátu je důležitou charakteristikou pro mrazitelnost a plodnost býků (Arangasamy et al. 2005). Právě individuální obsah proteinů v semenné plazmě může hrát klíčovou roli na mrazitelnost ejakulátu mezi jednotlivými hřebci. Vliv semenné plazmy na vlastnosti rozmrazených spermií je kontroverzní u různých druhů (Pini et al. 2018). Dle Jeannerat et al. (2017) se očekává, že složení semenné plazmy bude vykazovat rozdíly v závislosti na genetice, stavu zvířete a prostředí, kde zvíře žije. Hřebci mohou měnit složení ejakulátu pod kontrolou testosteronu, který je schopný reagovat na přítomnost samice s určitou charakteristikou. Semenná plazma je schopna podporovat spermie v ochraně proti oxidačnímu stresu. U dobře mrazitelných hřebců některé studie uvádějí příznivý vliv semenné plazmy na integritu akrosomu (de Andrade et al. 2011). Na druhé straně v některých studiích nebyl nalezen žádný účinek (Moore et al. 2005; Al-Essawe et al. 2018a).

7 ZÁVĚR

Přídavek heparin-nevázající a heparin-vázající proteinové frakce semenné plazmy do ejakulátu hřebců před zmrazením neměl vliv na vyšší zastoupení spermií s funkční plasmatickou membránou, spermií s neporušenou integritou plasmatické membrány a obsah mrtvých spermií s poškozenou integritou akrosomu po rozmrazení. Zaznamenáno ovšem bylo signifikantní zvýšení obsahu živých spermií s neporušenou integritou akrosomu po rozmrazení v inseminačních dávkách s přídavkem heparin-vázající proteinové frakce semenné plazmy.

Zjistili jsme, že námi vybrané koncentrace heparin-nevázajících a heparin-vázajících proteinových frakcí neměly vliv na kvalitu rozmrazených spermií.

Individualita hřebce při přídavku heparin-nevázající a heparin-vázající proteinové frakce měla signifikantní vliv na funkčnost a integritu plasmatické membrány, ale neměla signifikantní vliv na integritu akrosomu rozmrazených spermií. Na úrovni hřebce neměl přídavek heparin-nevázající a heparin-vázající proteinové frakce signifikantní vliv na kvalitu rozmrazených spermií.

Hypotéza, že přídavek heparin-vázající proteinové frakce semenné plazmy před zmrazením zvýší kvalitu rozmrazeného ejakulátu, se nepotvrdila. Navíc jsme v této diplomové práci otestovali i efekt přídavku heparin-nevázající frakce a došli jsme ke stejným závěrům jako při použití heparin-vázající frakce.

Semenná plazma obsahuje mnoho různých látek, a jestliže se zabýváme pouze jednotlivými proteinovými frakcemi, je vidět dle výsledků této diplomové práce a jiných studií, že efekt se může a nemusí projevit. Dle dostupných zdrojů je zřejmé, že nejsou stále objeveny všechny proteiny semenné plazmy a prozkoumány interakce mezi nimi. Navrhují, aby se izolovaly jednotlivé proteiny semenné plazmy, u kterých je prokázán vztah k mrazitelnosti, a v dalších studiích tyto jednotlivé proteiny testovat zvlášť. Tyto studie by mohly být přínosné pro zajištění úspěšné kryokonzervace hřebčího ejakulátu.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Akers RM, Denbow DM. 2013. Anatomy a physiology of domestic animals. John Wiley and Sons Ltd, London.
2. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts PW. 2005. Základy buněčné biologie. Espero, Česká republika.
3. Al-Essawe E, Johannisson A, Wulf M, Aurich C, Morrell JM. 2018a. Improved cryosurvival of stallion spermatozoa after colloid centrifugation is independent of the addition of seminal plasma. *Cryobiology* **81**: 145-152.
4. Al-Essawe EM, Johannisson A, Wulf M, Aurich C, Morrell M. 2018b. Addition of seminal plasma to thawed stallion spermatozoal did not repair cryoinjuries. *Animal Reproduction Science* **196**: 48-58.
5. Alghamdi AS, Troedsson MHT, Xue JL, Crabo BG. 2002. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. *American Journal of Veterinary Research* **63**: 880-885.
6. Almeida J, Ball BA. 2005. Effect of a-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **87**:321–37.
7. Amann RP, Graham JK. 1993. Spermatozoal function. *Equine reproduction* **1**: 715-745.
8. Amann RP, Graham JK. 2011. Spermatozoal function. Pages 1053-1084 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala W, Varner DD, editors. *Equine reproduction*. Blackwell Publishing Ltd, Lexington, USA.
9. Amann RP, Pickett BW. 1987. Principles of cryopreservation and a rewiw of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* **7(3)**: 145-173.
10. Amann RP. 2011. Functional Anatomy of the Adult Male. Pages 687-880 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, editors. *Equine reproduction*. Blackwell Publishing Ltd, USA.
11. Amann RP. 2011. Physiology and endokrinology. Pages 881-908 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala W, Varner DD, editors. *Equine reproduction*. Blackwell Publishing Ltd, Lexington, USA.
12. Andersson E, Sorensen OE, Frohm B, Borregaard N, Egesten A, Malm J. 2002.

- Isolation of human cationic antimicrobial protein-18 from seminal plasma and its association with prostasomes. *Human Reproduction* **17**: 2529–2534.
13. Arangasamy A, Singh LP, Ahmed N, Ansari M., Ram GC. 2005. Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **90**: 243-254.
 14. Arienti G, Carlini E, De Cosmo AM, Di Profio P, Palmerini CA, 1998. Prostate-like particles in stallion semen. *Biological of Reproduction* **59**: 309–313.
 15. Aurich JE, Kuhne A, Hoppe H, Aurich C. 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* **46**: 791-797.
 16. Babiker AA, Ronquist G, Nilsson UR, Nilsson B, 2002. Transfer of prostatic CD59 to CD59-deficient red blood cells results in protection against complement-mediated hemolysis. *American Journal of Reproductive Immunology* **47**:183–192.
 17. Ball BA. 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science* **107**: 257-267.
 18. Ball BA. 2014. Applied andrology in horses. Pages 254-296 in Chenoweth P, Lorton S, editors. *Animal Andrology: theories and application*. ChenoVet Animal Andrology, New South Wales, Australia.
 19. Bork P, Beckmann G, 1993. The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *Journal of Molecular Biology* **231**: 539–545.
 20. Brandon CI, Heussner GL, Caudle AB, Fayrer-Hosken RA. 1999. Two-dimensional polyacrylamide electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility *Theriogenology* **52**: 863–873.
 21. Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J, Love CHC, Hinrichs K, Hartman D. 2011. *Manual of equine reproduction*. Mosby Elsevier, Riverport Lane.
 22. Budras KD, Sack WO, Rock S. 2009. *Anatomy of the Horse*. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co., Hannover.
 23. Burden HP, Holmes CH, Persad R, Whittington K. 2006. Prostate—its effects on human male reproduction and fertility. *Human Reproduction Update* **12**: 283–292.
 24. Caballero I, Parrilla I, Alminana C, del Olmo D, Martínez EA, Vázquez JM. 2012. Seminal Plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. *Reproduction Domestic Animals* **47 (3)**: 12-21.

25. Caballero I, Vázquez JM, Gil MA, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, García EM, Rodríguez-Martínez H, Martínez EA. 2004b. Does seminal plasma PSP-I / PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes in vitro? *Journal Andrology* **25**: 1004–1012.
26. Calvete JJ, Mann KH, Schafer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Topfer-Petersen E, 1995a. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochemistry* **310**: 615–622.
27. Calvete JJ, Nessau S, Mann K, Sanz L, Sieme H, Klug E, Topfer-Petersen E. 1994. Isolation and Biochemical characterization of stallion seminal-plasma proteins. *Reproduction Domestication Animals* **29**: 411–426.
28. Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Topfer-Petersen E. 1997. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Letters* **407**: 201–206.
29. Calvete JJ, Reinert M, Sanz L, Topfer-Petersen E. 1995b. Effect of glycosylation on the heparin-binding capability of boar and stallion seminal plasma proteins. *Journal Chromatography* **711**: 167–173.
30. Carneiro JAM, Monteiro GA, Martin I, Maziero RRD, Sancler-Silva YFR, Freitas-Dell'Água CP, Guasti PN, Bandeira R, Hartwig FP, Ignácio FS, Landim FC, Alvarenga MA, Papa FO, Dell'Aqua JA. 2017. Heterologous oviductal Cells binding capacity of cryopreserved equine ejaculated and epididymal spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* **59**: 40-48.
31. Cross NL, Mahasreshti P. 1997. Prostate fraction of human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist progesterone. *Archives of Andrology* **39**: 39–44.
32. Dacheux J, Gatti JL, Dacheux F. 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy Research of Technique* **61**: 7–17.
33. Darin-Bennett A, White IG, 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* **14**: 466–470.
34. de Andrade AFC, Zaffalon FG, Celeghini ECC, Nascimento J, Bressan FF, Martins SMMK, de Arruda RP. 2012. Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. *Theriogenology* **77**: 1866-1872.

35. Ekhlasi-Hundrieser M, Schafer B, Kirchhoff C, Hess O, Bellair S, Muller P, Topfer-Petersen E. 2005. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Molecular Reproduction and Development* **70**: 45–57.
36. Florman HM, Babcock DF. 1991. Progress toward understanding the molecular basis of capacitation. Pages 105-132 in Wassarman PM, editors. *Elements of Mammalian Fertilization: Basic Concepts*. CRC Press, BocaRaton.
37. Fraser LR, Adeoya-Osiguwa S, Baxendale RW, Mededovic S, Osiguwa OO. 2005. First messenger regulativ of mammalian sperm function via adenylyl cyclase/cAMP. *Journal Reproduction Device* **51**: 37–46.
38. Frenette G, Girouard J, Sullivan R. 2006. Comparison between epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine caput and cauda epididymidis. *Biology of Reproduction* **75**: 885–890.
39. Garnel DL, Hafez ESE.2000. Spermatozoa and seminal plasma. Pages 96-109 in Hafez B, Hafez ESE, editors. *Reproduction in farm animals*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
40. Giese A, Jude R, Kuiper H, Raudsepp T, Piumi F, Schambony A, Guerin G, Chowdhary BP, Distl O, Topfer-Petersen E, Leeb T. 2002. Molecular characterization of the equine testis-specific protein 1 (TPX1) and acidic epididymal glycoprotein 2 (AEG2) genes encoding members of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Gene* **299**: 101–109.
41. Guimarae T, Lopes G, Ferreira P, Leal I, Rocha A. 2012. Characteristic of stallion epididymal spermatozoa st collection and effect two refrigeration protocols on the quality of the frozen/thawed sperm cells. *Animal Reproduction Science* **136**: 85-89.
42. Guo M, Teng M, Niu L, Liu Q, Huang Q, Hao Q. 2005. Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein stecrisp reveals that the cysteine-rich domain has a K⁺ channel inhibitor-like fold. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 12405–12412.
43. Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in farm animals*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
44. Hafez ESE, Jainudeen MR, Rosnina Y. 2000. Hormones, Growth factors, and reproduction. Pages 33-54 in Hafez B, Hafez ESE, editors. *Reproduction in farm animals*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimor, USA.
45. Hamad AWR, Al-Daghistani HI, Shquirat WD, Abdel-Dayem M, Al- Swaif M. 2014. Sodium, Potassium, calcium and copper levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertilemen. *Biochemical Pharmacology* **3**: 141.

46. Harshan HM, Singh LP, Arangasamy A, Ansari MR, Umar S. 2006. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and *in vitro* fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **93**: 124-133.
47. Hoffmann N, Oldenhof H, Morandini C, Rohn K, Sieme H. 2011. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Animal Reproduction Science* **125**: 112-118.
48. Chaturvedi SK, Khan JM, Siddiqi MK, Alam P, Khan RH. 2016. Comparative insight into surfactants mediated amyloidogenesis of lysozyme. *International Journal of Biological Macromolecules* **83**: 315-325.
49. Jeannerat E, Janett F, Sieme H, Wedekind C, Burger D. 2017. Quality of seminal fluids varies with type of stimulus at ejaculation. *Scientific reports* **7**: 44339.
50. Johnson L, Blanchard TL, Varner D, Scrutchfield WL. 1997. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology* **48 (7)**: 1199-216.
51. Johnson L, Griffin CE, Martin MT. 2011. Spermatogenesis. Pages 1026- 1052 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala W, Varner DD, editors. *Equine reproduction*. Blackwell Publishing Ltd. Second edition, Lexington, USA.
52. Jones RE, Loper KH. 2014. *Human reproductive biology*. Academic Press, Cambridge, USA.
53. Jonsson M, Linse S, Frohm B, Lundwall A, Malm J. 2005. Semenogelins I and II bind zinc and regulate the activity of prostate-specific antigen. *Biochemistry Journal* **387**: 447-453.
54. Kannan CR. 2011. *The pituitary gland*. Springer, Berlin.
55. Killian JG, Chapman DA, Rogowski LA. 1993. Fertility associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biological Reproduction* **49**: 1202-1207.
56. Kitamura M, Namiki M, Matsumiya K, Tanaka K, Matsumoto , Hara, T, Kiyohara H, Okabe M, Okuyama A, Seya T. 1995. Membrane cofactor protein (CD46) in seminal plasma is a prostasome-bound form with complement regulatory activity and measles virus neutralizing activity. *Immunology* **84**: 626-632.
57. Kulkarni, B.A., Dhande, S.G., Patnakar, D.D., 1996. Seminal plasma protein profiles of Holstein Friesian, Jersey and cross bred bulls. *Indian Journal Animal Science* **11**: 133-137.
58. Kumar A, Singh LP, Harshan HM, Majumdar AC. 2008. Seminal plasma non-heparin binding proteins (NHBP) reduce the cryoinjury to buffalo cauda epididymal

- spermatozoa induced by heparin binding proteins (HBP). *Animal Reproduction Science* **104**: 220-226.
59. Kumar CS, Swamy MJ. 2016a. A pH switch regulates the Inverse relationship between membranolytic and chaperon-like activities of HSP-1/2, a major protein of horse seminal plasma. *American chemical society* **55**: 3650-3657.
 60. Kumar CS, Swamy MJ. 2016b. HSP-1/2, a major horse seminal plasma protein, acts as a chaperone against oxidative stress. 2016. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **473**: 1058-1063.
 61. Kumar CS, Swamy MJ. 2017. Differential modulation of the chaperone-like activity of HSP-1/2, a major protein of horse seminal plasma by anionic and cationic surfactants. *International Journal of Biological Macromolecules* **96**: 524-531.
 62. Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey J L, Sullivan R. 2000. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *Journal of Andrology* **21**: 700-707.
 63. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A, Martin C. 2016. *Molecular cell biology*. W.H.Freeman & Co., New York, USA.
 64. Loomis PR, Graham JK. 2008. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science* **105**: 119-128.
 65. Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Me'nard M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction* **67**: 1250-1258.
 66. Manjunath P, Therien I. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproduction Immunology* **53**: 109-119.
 67. Marvan F, Hampl A, Hložánková E, Kresan J, Massanyi L, Vernerová E. 1992. *Morfologie hospodářských zvířat*. Česká zemědělská univerzita v Praze.
 68. Maziero RRD, Guasti PN, Monteiro GA, Avanzi BR, Hartwig FP, Lisboa FP, Martin I, Papa FO. 2013. Evaluation of sperm kinetics and plasma membrane integrity of frozen equine semen in different storage volumes and freezing conditions. *Journal of Equine Veterinary Science* **33**: 165-168.
 69. Mogielnicka-Brzozowska M, Kordan W. 2011. Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive processes in mammals. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **14 (3)**: 489-499.

70. Mogielnicka-Brzozowska M, Wysocki P, Strzezek J, Kordan W. 2011. Zinc-binding proteins from boar seminal plasma – isolation, biochemical characteristics and influence on spermatozoa stored at 4°C. *Acta Biochimica Polonica* **58**: 171-177.
71. Monteiro GA, Freitas-Dell'Aqua P, Guasti PN, Dell'Agua JA, Alvarenga MA, Landim FC, Papa FO. 2013. Comparison of apoptotic cells between cryopreserved ejaculated sperm and epididymal sperm in stallions. *Journal of Equine Veterinary Science* **33**: 552-556.
72. Moore AI, Squires EL, Graham JK. 2005. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* **63**: 2372-2381.
73. Mungan NA, Mungan G, Basar MM, Baykam M, Atan A. 2001. Effect of seminal plasma calcitonin levels on sperm mobility. *Arch Andrology* **47**: 113–117.
74. Munroe GA, Weese JS. 2011. *Equine clinical medicine, Surgery, and reproduction*. Manson publishing Ltd., London.
75. Neuhauser S, Rheinfeld S, Handler J. 2013. Motility of fresh and frozen-thawed stallion sperm from free segment of the epididymal cauda and the effect of post-thaw seminal plasma addition on motility. *Journal of Equine Veterinary Science* **33**: 942-949.
76. Neuhauser S, Rheinfeld S, Handler J. 2014. Comparison of the effects of four freezing methods on motility characteristics, morphology, and viability of postthaw stallion epididymal sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* **34**: 882-888.
77. Nieschlag E, Hermann MB, Nieschlag S. 2010. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
78. Papa FO, Felício GB, Melo-Ona CM, Alvarenga MA, de Vita B, Trinque C, Puolifilho, JNP, Dell'Aqua JA. 2011. Replacing egg yolk soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Animal Reproduction Science* **129**: 73-77.
79. Parks JE, Graham JK. 1992. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* **38**: 209-222.
80. Patel M, Gandotra VK, Cheema RS, Bansai AK, Kumar A. 2016. Seminal plasma heparin binding proteins improve semen quality by reducing oxidative stress during cryopreservation of cattle bull semen. *Asian Australasian Journal of Animal Science* **29** (9): 1247-1255.
81. Pesch S, Bergmann M, Bostedt H. 2006. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology* **66**:307–13.

82. Pini T, Leahy T, de Graaf SP, 2018. Sublethal sperm freezing damage: Manifestations and solutions. *Theriogenology* **118**: 172-181.
83. Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, Topfer-Petersen E. 1996. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida binding protein of the spermadhesin family. *European Journal Biochemistry* **242**: 636–640.
84. Rejraji H, Sion B, Prensier G, Carreras M, Motta C, Frenoux JM, Vericel E, Grizard G, Vernet P, Drevet JR. 2006. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biology of Reproduction* **74**: 1104–1113.
85. Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete J. 2011. Seminal Plasma Proteins: What Role Do They Play? *American Journal Reproductive Immunology* **66** (1): 11-22.
86. Rocha CC, Kawai GKV, de Agostini Losano JD, Angrimani DSR, Rui BR, Bicudo LC, Simões da Silva BC, Alonso MA, Mendes CM, Assumpcao MEO, Pereira RJG, Barnabe VH, Nichi M. 2018. Carnosine as malondialdehyde scavenger in stallion seminal plasma and its role in sperm function and oxidative status. *Theriogenology* **199**: 10-17.
87. Romero A, Romão MJ, Varela PF, Kolln I, Dias JM, Carvalho AL, Sanz L, Topfer-Petersen E, Calvete JJ. 1997. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nature Structural & Molecular Biology* **4**: 783–788.
88. Ronquist G, Brody I, 1985. The prostasome: its secretion and function in man. *Biochimica et Biophysica Acta* **822**: 203–21.
89. Saalman A, Munz S, Ellerbrock K, Ivell R, Kirchhoff C. 2001. Novel sperm-binding proteins of epididymal origin contain four fibronectin type II-modules. *Molecular Reproduction and Development* **58**: 88–100.
90. Salazar JL, Teague SR, Love CC, Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD. 2011. Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology* **76**: 409-418.
91. Sankhala RS, Kumar CS, Singh BP, Arangasamy A, Swamy MJ. 2012. HSP-1/2, a major protein of equine seminal plasma, exhibits chaperone-like activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **427**: 18-23.
92. Satta V, Manca ME, Torres-Rovira L, Succu S, Mereu P, Nehme M, Epifany G, Gallus M, Berlinguer F, Naitana S, Leoni GG. 2018. Effects of melatonin administration on seminal plasma metabolites and sperm fertilization competence during the non-reproductive season in ram. *Theriogenology* **115**: 16-22.

93. Sharma R, Agarwal A. Spermatogenesis: An Overview. Pages in Zini A, Agarwal A. 2011. Sperm Chromatin: Biological and Clinical Application in Male Infertility and Assisted Reproduction,
94. Shquirat WD, Daghistani HIA, Hamad AWR, Dayem MA, Swaifi MA. 2013. Zinc, Manganese, and Magnesium in seminal fluid and their relationship to male infertility in Jordan. *International Journal Pharmaceutical and Medicinal Sciences* **3**: 1–10.
95. Singh LP, Harshan HM, Ansari MR. 2007. Effect of egg yolk and seminal plasma heparin binding protein interaction on the freezability of buffalo cauda epididymal spermatozoa. *Animal Reproductin Science* **90**: 395-400.
96. Sostaric E, Aalberts M, Gadella BM, Stout TAE. 2008. The roles of the epididymis and prostasomes in attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Animal Reproduction Science* **107**: 237–248.
97. Srivastava N, Jerome A, Srivastava SK, Ghosh SK, Kumar A. 2013. Bovine seminal PDC-109 protein: An overview of biochemic and functional properties. *Animal Reproduction Science* **138**: 1-13.
98. Srivastava N, Srivastava SK, Ghosh SK, Kumar A, Perumal P, Jerome A. 2013. Acrosome membrane integrity and cryocapacitation are related to cholesterol content of bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction* **2**: 126-131.
99. Sullivan R, Frenette G, Girouard J. 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian Journal of Andrology* **9**: 483–491.
100. Topfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, Kirchhoff,C, Leeb T, Sieme H. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Animal Reproduction Science* **89**: 159-170.
101. Topfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlesi-Hundrieser M, Dostalova Z, Sanz L, Calvete JJ. 1998.Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* **30**: 217–224.
102. Usuga A, Rojano B, Restrepo G. 2017. Effect of Seminal Plasma Components on the Quality of Fresh and Ceyopreserved Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science* **58**: 103-111.
103. Vadnais ML, Roberts K.P. 2010. Seminal plasma proteins inhibit in vitro- and cooling induced capacitation in boar spermatozoa. *Reproduction Fertilization Deviace* **22**: 893–900.

104. Varner DD, Johnson L. 2011. From sperms eye view: revisiting our perception of this intriguing cell. Pages 909-990 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala W, Varner DD. Equine reproduction. Blackwell Publishing Ltd, Lexington, USA.
105. Vidament M, Dupere AM, Julienne P, Evain A, Noue P, Palmer E. 1997. Equine frozen semen: Freezability and fertility field results. *Theriogenology* **48**: 907-917.
106. von Fellenberg R, Zweifel HR, Grunig G, Pellegrini A. 1985. Proteinase inhibitors of horse seminal plasma. A high molecular mass, acid-soluble proteinase inhibitor. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **366**: 705–712.
107. Wah DA, Fernandez-Tornero C, Sanz L, Romero A, Calvete JJ. 2002. Sperm coating mechanism from the 1.8 Å crystal structure of PDC-109-phosphorylcholine complex. *Structure* **10**: 505–514.
108. Westphal U. 1986. *Steroid-Protein Interactions II (Monographs on Endocrinology)*. Springer-Verlag, Berlin.