

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Sledování funkčních parametrů kančích spermií během
inhibice proteasomu při in vitro kapacitaci**

Diplomová práce

Lenka Hackerová

Reprodukční biotechnologie

prof. Mgr. Ing. Markéta Sedmíková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Sledování funkčních parametrů kančích spermií během inhibice proteasomu při in vitro kapacitaci" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4.2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D. za ochotu a odborné vedení mé diplomové práce, paní RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za věčný optimismus, energii, ochotu, laskavost, nedocenitelné rady a odbornou pomoc. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům z Katedry veterinárních disciplín, zejména panu Ing. Ondřeji Šimoníkovi, Ph.D. a Ing. Jirímu Šichtařovi, Ph.D., kteří mi byli ochotni věnovat svůj drahocenný čas při řešení nejrůznějších otázek. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, která mi byla i v těch nejtěžších chvílích tou největší oporou a vždy věřila v úspěšné dokončení mého studia.

Sledování funkčních parametrů kančích spermií během inhibice proteasomu při in vitro kapacitaci

Souhrn

Série biochemických a biofyzikálních změn v průběhu kapacitace iniciuje signální dráhu vedoucí k fosforylaci proteinů. Právě tyrozinová fosforylace souvisí nejen se změnou charakteru pohybu spermií v průběhu kapacitačního procesu, takzvanou hyperaktivací, ale reguluje i aktivitu proteazomu zodpovědného za degradaci proteinů. Proteazomální aktivita však může přímo či nepřímo kontrolovat aktivitu proteinkináz, které fosforylační proces katalyzují. Inhibice proteazomu proteazomálním inhibitorem MG132 by se mohla promítnout ve změnách v hlavním oddílu bičíku spermií, což by se mohlo projevit změnou jejich pohyblivosti během kapacitace. Cílem diplomové práce bylo prostřednictvím počítačové analýzy spermatu (computer – aided sperm analysis, CASA) vyhodnotit vliv inhibitoru MG132 na kinetické parametry motility kančích spermií. Efekt inhibitoru MG132 byl sledován na spermiích inkubovaných po dobu 2 hodin v kapacitačním médiu. Spermie byly inkubovány s DMSO a inhibitorem v koncentracích 10, 25, 50 a 100 μM . Funkční parametry motility spermií byly hodnoceny prostřednictvím systému CASA v nulté, první a druhé hodině inkubace. Kromě toho byla po kapacitaci a indukci akrozomální reakce u jednotlivých vzorků spermií sledována integrita akrozomu, který byl značen prostřednictvím PNA lektinu. Šířka oscilace hlavičky (ALH) je jediným parametrem, kde byl vůči kontrolní skupině pozorován významný signifikantní rozdíl u všech sledovaných vzorků s inhibitorem v první i druhé hodině kapacitace. Dvě nejvyšší koncentrace inhibitoru MG132 negativně ovlivnily všechny ostatní sledované kinetické parametry spermií (VAP, VCL, VSL, STR, LIN), což poukazuje na zapojení proteazomu do regulace motility samčích pohlavních buněk během kapacitačního procesu.

Klíčová slova: spermie, kapacitace, kapacitační médium, proteasom

Monitoring of functional parameters of boar spermatozoa during proteasomal inhibition during *in vitro* capacitation

Summary

A series of biochemical and biophysical changes during capacitation initiate a signaling pathway leading to protein phosphorylation. It is the tyrosine phosphorylation that is associated not only with the change in the pattern of sperm movement during the capacitation process, so-called hyperactivation, but it also regulates the activity of the proteasome which is responsible for protein degradation. However, the proteasomal activity can directly or indirectly control the activity of protein kinases that catalyze the phosphorylation process. The proteasome inhibition by proteasome inhibitor MG132 could be reflected in the changes in the main compartment of the sperm flagellum, which could result in a change in their mobility during capacitation. The aim of this thesis was to evaluate the influence of MG132 inhibitor on kinetic parameters of motility of boar sperm via computer aided sperm analysis (CASA). The effect of the MG132 inhibitor was monitored on the sperms incubated for 2 hours in a capacitation medium. The sperms were incubated with DMSO and the inhibitor at 10, 25, 50 and 100 μM concentrations. The sperm motility functional parameters were evaluated by the CASA system at zero, first and second hour of the incubation. In addition, the acrosome integrity, which was labeled with PNA lectin, was monitored after the capacitation and the induction of acrosomal reaction in individual sperm samples. Amplitude of lateral head displacement (ALH) is the only parameter where a major significant difference was observed in all samples with inhibitor in both the first and second hour of capacitation in comparison with the control group. The two highest concentrations of MG132 inhibitor negatively affected all the other monitored sperm kinetic parameters (VAP, VCL, VSL, STR, LIN), which points out the involvement of the proteasome in regulating the motility of male sex cells during the capacitation process.

Keywords: sperm, capacitation, capacitation medium, proteasome

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3 Literární rešerše.....	3
3.1 Morfologie spermie	3
3.1.1 Hlavička	4
3.1.1.1 Jádro	5
3.1.1.2 Akrozom.....	5
3.1.2 Bičík.....	6
3.2 Procesy v samčím reprodukčním traktu.....	8
3.2.1 Spermatogeneze	8
3.2.1.1 Spermatocytogeneze	9
3.2.1.2 Spermioogeneze	9
3.2.2 Epididymální zrání.....	10
3.2.2.1 Získání motility	10
3.2.2.2 Modifikace membrán	12
3.2.2.3 Skladování spermií.....	13
3.2.3 Ejakulace a semenná plazma	14
3.3 Procesy v samičím reprodukčním traktu.....	17
3.3.1 Cervix.....	17
3.3.2 Utero-tubární spoj, ovidukální rezervoár a vejcovod	18
3.3.2.1 Kapacitace	19
3.3.2.2 Hyperaktivace motility.....	23
3.3.2.3 Akrozomální reakce	25
3.4 Ubiquitin-proteazomový systém	27
3.4.1 Proteazom	28
3.4.2 Role proteazomu v procesu kapacitace.....	30
3.4.3 Inhibice proteazomu	31
3.5 Funkční parametry motility a její hodnocení.....	31
3.5.1 CASA (computer-aided sperm analysis)	33
3.5.1.1 Hyperaktivace motility a systém CASA	34
4 Materiál a metodika	35
4.1 Materiál.....	35
4.2 Metodika	35
4.2.1 Příprava spermií	35
4.2.2 Příprava kapacitačního media	36

4.2.3	Kapacitace spermií.....	36
4.2.4	Indukce akrozomální reakce	37
4.2.5	Značení akrozomu pomocí PNA lektinu – vlhká fixace.....	38
4.2.6	Hodnocení motility	38
4.2.7	Statistické vyhodnocení	40
5	Výsledky	41
5.1	Detekce integrity akrozomu po indukci akrozomální reakce	41
5.2	Vliv inhibitoru MG132 na motilitu kančích spermií	42
5.3	Kinetické parametry spermií v inseminační dávce a nativním ejakulátu	44
6	Diskuze	45
7	Závěr	48
8	Literatura	49

1 Úvod

Pro úspěšné oplození oocyty musí spermie od svého vzniku v semenotvorných kanálcích projít celou řadou nezbytných změn. Jednou z nich je i kapacitace, která se za fyziologických podmínek odehrává v reprodukčním traktu samice. Jedná se o komplexní sérii biochemických a biofyzikálních změn v organizaci spermií, jenž iniciují signální dráhu vedoucí k fosforylaci proteinových substrátů. Právě tyrozinová fosforylace, která představuje jeden ze základních kroků úspěšného průběhu kapacitačního procesu, souvisí se změnou charakteru pohybu spermií v průběhu kapacitace, takzvanou hyperaktivací motility. Tento méně progresivní, za to vysoce energický pohyb se zvýšenou amplitudou kmitání bičíku napomáhá spermii uvolnit se z oviduktálního rezervoáru a fúzovat s vajíčkem.

Fosforylaci celé řady cílových proteinů katalyzuje aktivita proteinkinázy A. Právě tato signální molekula fosforyluje i 26S proteazom, ve kterém probíhá specifická degradace buněčných proteinů značených ubikvitinem. Výsledkem fosforylace 26S proteazomu je zvýšení jeho aktivity. V posledních letech bylo zjištěno, že proteazomální inhibitory MG132 a epoxomicin přidané do kapacitačního média blokuje u lidských spermií proteazomální aktivitu, čímž významně mění průběh kapacitace *in vitro*. Zároveň bylo zjištěno, že i když je proteazomální aktivita regulovaná fosforylací, může přímo nebo nepřímo kontrolovat aktivitu proteinkináz (Sutovsky 2011). Inhibice proteazomu by se tedy mohla promítnout nejen ve změnách v akrozomu, ale také v hlavním oddílu bičíku spermií, což by mohlo mít vliv na jejich pohyblivost během kapacitačního procesu.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Na základě současných poznatků byla stanovena hypotéza, že inhibice ubikvitin – proteazomového systému inhibitorem MG132 ovlivní kinetické parametry motility spermií jako markery kapacity.

Pro ověření hypotézy na modelu nativních a komerčních inseminačních dávek kančího ejakulátu v podmínkách in vitro byly stanoveny následující cíle:

- 1) zhodnotit průběh kapacitačního procesu in vitro indukcí akrozomální reakce prostřednictvím Ca – ionoforu a následným sledováním integrity akrozomu mezi kontrolní skupinou a skupinou ovlivněnou inhibitorem MG132
- 2) prostřednictvím systému CASA vyhodnotit vliv inhibitoru MG132 na kinetické parametry motility spermií.

3 Literární rešerše

V živočišné říši jsou známy pouze dva typy pohlavních buněk (gamet), které jsou od sebe radikálně odlišné. Mezi největší buňky organismu patří oocyty – samičí pohlavní buňky, které několikanásobně zvětšují svůj cytoplazmatický objem tak, aby vytvořily dostatečnou zásobu mRNA, proteinů a dalších molekul požadovaných pro přežití zygoty a plnou aktivaci embryonálního genomu. Samčí gamety, spermie, se naopak řadí mezi buňky nejmenší, neboť ztrácí většinu své cytoplazmy i organel a přeměňují se na pohyblivé buňky schopné přežít a fungovat mimo samčí reprodukční systém (Alberts et al. 2002; Tulsiani & Abou-Haila 2012).

Spermie (z řeckého slova sperma = semeno) jsou tvořeny v semenotvorných kanálcích varlat po celou dobu reprodukčního života samce procesem označovaným jako spermatogeneze (Phillips et al. 2010; Toshimori & Eddy 2015). Spermie uvolněné ze semenotvorných kanálek jsou však nezralé a transkripčně i translačně neaktivní. Aby se staly plně kompetentními buňkami schopnými přenést otcovský genom do oocytu, musí během průchodu epididymem dozrát a následně v samičím reprodukčním traktu projít složitým procesem kapacitace a akrozomální reakce (Freitas et al. 2011; Tulsiani & Abou-Haila 2012).

3.1 Morfologie spermie

Antonie Van Leeuwenhoek, holandský obchodník a vynálezce mikroskopu, a jeho pomocník, student medicíny Johann Ham, byli první, kterým se v roce 1677 podařilo pozorovat živé lidské a zvířecí spermie. V této době bylo zřejmé, že jsou spermie tvořeny dvěma hlavními částmi – hlavičkou a bičíkem. S vývojem elektronového mikroskopu však byla objevena celá řada dalších struktur. K tomu se v 2. polovině 20. století podařilo prostřednictvím biochemických studií a vývoje metod pro tvorbu monoklonálních protilátek identifikovat nejen enzymy zodpovědné za produkci energie, ale také hlavní proteiny akrozomu, jádra i bičíku (Sutovsky & Manandhar 2006; Cobb 2012; Toshimori & Eddy 2015; Stévant et al. 2018).

Obecně lze říci, že spermie savců jsou polarizované buňky s vysoce diferencovaným membránovým systémem, který je rozdělený do regionálních domén lišících se složením, funkcí a segregací specifických proteinů. Tato kompartmentalizace je pravděpodobně důležitá pro prevenci předčasné iniciace událostí, jako je například získání motility, hypermotility nebo zahájení akrozomální reakce. Jakmile však dojde k uvolnění zralých spermatid do lumenu semenotvorných kanálek, mohou být některé molekuly, které se v těchto oddílech sekvstrují, různým způsobem redistribuovány. Tyto změny způsobují selektivní mísení a přesouvání

proteinů mezi doménami, což nakonec indukuje koordinované proteinové interakce a specifické signální dráhy vedoucí k funkčním změnám. Jednotlivé domény spermií jsou tedy během života buněk dynamické (Downing Meisner et al. 2005).

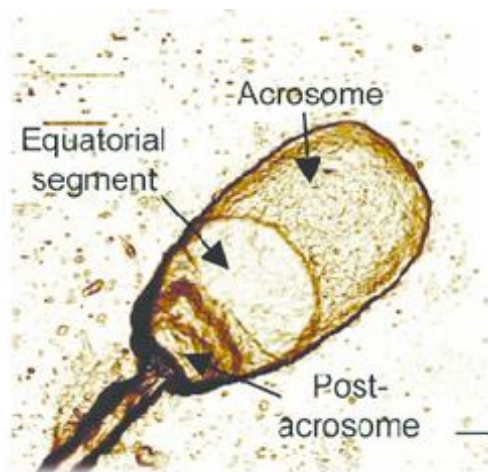
3.1.1 Hlavička

Na hlavičce savčích spermií se nacházejí dvě nezbytně důležité struktury – jádro a akrozom (viz obrázek 1), které jsou obklopené malým množstvím cytoskeletálních složek a plazmatickou membránou. Plazmatickou membránu hlavičky lze rozdělit do dvou hlavních částí, akrozomální a postakrozomální, u kterých jsou popisovány další substruktury (Toshimori & Ito 2003; Toshimori & Eddy 2015).

Akrozomální doména se dělí na přední akrozom, zahrnující apikální a hlavní segment, a na zadní akrozom neboli ekvatoriální segment. Zatímco přední akrozom se podílí na akrozomální reakci, tedy uvolnění akrozomálních enzymů a matricových proteinů, ekvatoriální segment hraje důležitou roli při fúzi membrán gamet (Downing Meisner et al. 2005; Toshimori 2009).

Postakrozomální region se rozprostírá od konce ekvatoriálního segmentu až po zadní prstenec (tzv. posterior ring), který je umístěn na distálním konci hlavy a tvoří hranici mezi hlavou a spojovací částí (krčkem). Zadní prstenec vykazuje zúženou zónu plazmatické membrány, ke které se kotví jaderná membrána obalující jádro. Proximální část postakrozomálního regionu obsahuje komplex signálních proteinů, které jsou souhrnně označovány jako SOAF a které jsou zapojeny do aktivace oocyty (Downing Meisner et al. 2005; Sutovsky & Manandar 2006; Toshimori 2009).

Až na akrozom se oblast mezi jádrem a jadernou membránou souhrnně označuje jako perinukleární théka, která určuje celkový tvar jádra a účastní se procesu fúze membrán. Jedná se o podobu jaderné matrix somatických buněk s tím rozdílem, že u spermie se nachází vně jaderného obalu (Toshimori & Chizuru 2003).



Obrázek 1: Hlavička kančí spermie s vyznačeným akrozomem, ekvatoriálním segmentem a postakrozomální doménou (James et al. 2004).

3.1.1.1 Jádro

Paternální genetický materiál, který se v jádře spermie nachází ve formě komplexu DNA a proteinů, je extrémně kondenzovaný, a to až na 1/13 genetického materiálu oocyty. Celkový objem jádra spermie představuje přibližně 1/7 velikosti jádra somatických buněk. Tato redukce slouží k získání hydrodynamičtějšího tvaru hlavičky pro dosažení optimální rychlosti buňky a k ochraně otcovské DNA před poškozením toxickými metabolity (Toshimori & Eddy 2015; Champroux et al. 2016).

Vysoce kondenzovaný stav jádra zralých spermií je důsledkem nahrazení histonů bazičtějšími protaminy bohatými na arginin a cystein. Právě cysteinové zbytky se podílí na tvorbě intra a intermolekulárních disulfidických vazeb, které dávají jádru spermie mimořádnou mechanickou a chemickou stabilitu (Jager 1990).

Přechod od podoby jádra somatických buněk ke specifickému jádru spermií je zdlouhavý proces, který začíná již v průběhu spermatogeneze. Ačkoli na konci spermiogeneze vypadají spermie zcela cytodiferencované, ve skutečnosti je kondenzace chromatinu dokončena až během průchodu epididymem (Champroux et al. 2016).

3.1.1.2 Akrozom

Termín akrozom zavedený Lenhossekem v roce 1898 a doslovně překládán jako „apikální tělo“ (apical body), odkazuje na sekreční vezikul odvozený od Golgiho aparátu, který obsahuje

nejrůznější lytické enzymy nezbytné pro fúzi gamet, zejména pak pro průnik spermie zónou pellucidou. Tato jedinečná membránová organela se u většiny druhů nachází nad jádrem v anteriorní části hlavičky spermie. Tvar a velikost akrozomu se stejně jako tvar a velikost samotné spermie u jednotlivých druhů značně liší (Franklin 1970; Berruti & Paiardi 2011). Wilson (1925) poznamenal: „Rozmanitost je v tomto ohledu tak velká, že většina druhů zvířat může být identifikována na základě samotných spermií“.

Původně byl akrozom popisován jako modifikovaný lysozom, Berruti et al. (2010) však navrhli definovat akrozom jako novou organelu příbuznou lysozomu. Obě struktury mají několik společných vlastností: (i) jsou odvozené z Golgiho aparátu, (ii) po kontaktu s akridinovou oranží se barví do červena, což indikuje kyselé pH uvnitř organely a (iii) obsahují několik totožných enzymů – kyselé glykozydrolázy, proteázy, esterázy, kyselé fosfatázy a arylsulfatázy. Navzdory těmto podobnostem má akrozom některé specifické rysy. Za prvé je obklopen dvěma membránami – vnější akrozomální membránou, která těsně přiléhá k plazmatické membráně spermie a vnitřní akrozomální membránou, která je úzce spojena s jaderným obalem. Mezi těmito dvěma listy se nachází akrozomální matrix vzniklá z původního granula Golgiho aparátu. Dále na rozdíl od buněčného lysozomu obsahuje akrozom antigeny, jakými jsou například akrogranin nebo protein AM67 (Zaneveld & De Jonge 1991; Abou-Haila & Tulsiani 2000).

3.1.2 Bičík

Funkční bičík je nepostradatelnou součástí spermie. Díky němu získává samčí gameta lokomoční sílu, která je nezbytná nejen pro její transport samičím reprodukčním traktem, ale také pro penetraci do oocyty a následné oplození (Toshimori & Eddy 2015).

Strukturním základem bičíku savčích spermií je axonema, kterou tvoří devět periferních mikrotubulárních dubletů symetricky uspořádaných kolem dvou mikrotubulů centrálního komplexu. Mikrotubuly jsou navzájem propojeny prostřednictvím nexinu, radiálních paprsků a dyneinových ramen, jež představují zdroj hybné síly ohýbající bičík. Vnější dublety jsou paralelně uspořádány s devíti vnějšími hustými vlákny, které poskytují pohyblivému se bičíku pružnou, ale pevnou podporu (Fawcett 1975; Sutovsky & Manandar 2006; Lehtreck et al. 2008; Toshimori & Eddy 2015).

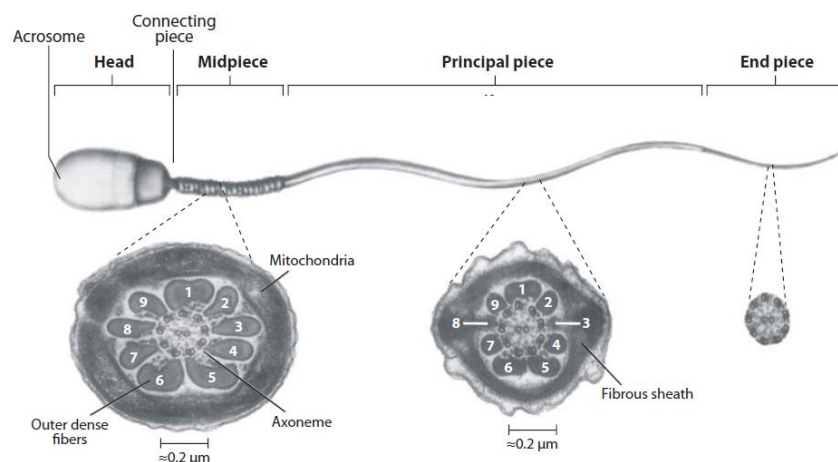
Fawcett (1975) uvádí, že bičík savčích spermií je možné rozdělit do čtyř segmentů, které se od sebe liší svojí vnější substrukturou. Jedná se o koncový, hlavní, střední a spojovací oddíl neboli krček (viz obrázek 2).

Proximální část krátkého spojovacího oddílu, která je zasunutá do takzvané implantační jamky, připojuje bičík k hlavičce. Celý krček tvoří devět příčně žíhaných provazců označovaných jako segmentované chordy, uvnitř nichž se nachází hustá hmota, kapitula. Ta u většiny savců, kromě hlodavců, obsahuje spermiový centriol (Sutovsky & Manandar 2006).

Střední oddíl je pokryt spirálovitou mitochondriální pochvou, kterou tvoří přibližně 75–100 mitochondrií, jejichž hlavním úkolem je produkce energie využívané pro pohyb bičíku. Z důvodů pravděpodobně souvisejících s mutagenním oxidačním stresem, kterému jsou otcovské mitochondrie během spermatického zrání vystaveny, je otcovská mitochondriální DNA uvnitř oplozeného oocyta cílenou proteolýzou eliminována (Sutovsky et al. 2004; Sutovsky & Manandar 2006).

Hlavní a střední část bičíku spojuje vláknitá struktura označovaná jako Jensenův prstenec nacházející se distálně od mitochondriální pochvy. Vyvíjí se společně s plazmatickou membránou, se kterou zůstává v kontaktu. Důležitou strukturou hlavního oddílu je fibrózní pochva, která je tvořena dvěma podélnými sloupci. Ty probíhají rovnoběžně s vnějšími hustými vlákny číslo tři a osm a na obou stranách jsou spojeny řadou úzce uspořádaných půlkruhových žeber. Fibrózní pochva poskytuje nejen podporu pro axonem spermie, ale předpokládá se, že ovlivňuje také stupeň pružnosti a rovinu i rytmus bičíkového pohybu. Současně se zdá, že obsahuje proteiny ovlivňující samotný proces kapacitace a hyperaktivace (Eddy et al. 2003; Sutovsky & Manandar 2006).

Clark et al. (2004) uvádí, že koncovou část bičíku tvoří pouze axonema, tedy 9+2 mikrotubulů. Sutovsky & Manandar (2006) však tvrdí, že kromě axonemy tvoří koncovou část ještě fibrózní pochva a konce vnějších hustých vláken.



Obrázek 2: Schéma příčných řezů jednotlivými oddíly bičíku spermie (Gafney et al. 2011).

3.2 Procesy v samčím reprodukčním traktu

Mezi nedůležitější události odehrávající se v samčím reprodukčním traktu patří spermatogeneze probíhající v semenotvorných kanálcích varlat a průchod spermií epididymem, v němž dochází k jejich zrání a dlouhodobému uchování v klidovém stavu (Tulsiani 2012).

3.2.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze je komplexní proces tvorby samčích haploidních gamet, který probíhá v semenných kanálcích varlat interakcí zárodečných kmenových buněk se somatickými buňkami semenného epitelu – Sertoliho buňkami. Celý proces transformace spermatogoniálních kmenových buněk do funkčních spermií je androgen dependentní a skládá se z mnoha událostí závislých na expresi specifických genů. Obecně lze spermatogenezi rozdělit na čtyři základní celulární události – (i) samoregulaci kmenových buněk udržujících kontinuální produkci spermií (ii) množení a proliferaci spermatogonií prostřednictvím mitózy, (iii) redukci diploidního počtu chromozomů u spermatocytů prostřednictvím meiózy a (iv) transformaci kruhové spermatidy ve spermii neboli spermiogenezi. Po dokončení buněčné diferenciace se nezralé spermie uvolňují ze semenných kanálků a postupují vývodnými kanálky do nadvarlete (Kretser et al. 1998; Hofmann 2008; Bettgowda & Wilkinson 2010).

Frankenhuis et al. (1982) uvádí, že vývoj spermií u kanců vykazuje výraznou podobnost s vývojem spermií u malých laboratorních hlodavců a může být rozdělen do 16 kroků.

3.2.1.1 Spermatocytogeneze

Dle A_s -modelu, který byl navržen Huckinsem a Oakbergem v roce 1971, začíná spermatogeneze u nediferenciovaných pluripotentních spermatogonií typu A, které je možné podle jejich topologie a umístění vzhledem k bazální membráně semenných tubulů rozdělit na A_s (single), A_{pr} (paired) a A_{al} (aligned) (Rooij 2017).

Spermatogonie typu A_s se mitoticky dělí a dávají vzniknout dvojici A_{pr} spermatogonií. Ty buď dokončí cytokinezi a vytvoří dvě nové A_s spermatogonie nebo zůstanou spojeny intracytoplazmatickým můstkem a vytvoří řetězec čtyř A_{al} spermatogonií, které mohou podstoupit jedno nebo více mitotických dělení za vzniku řetězců o počtu 8, 16 nebo výjimečně 32 A_{al} spermatogonií. Tento typ buněk je schopný vytvořit první diferencované spermatogonie A_1 , které podstupují sérii mitotických dělení, během nichž postupně vznikají A_2 , A_3 a A_4 spermatogonie. Ty mohou buď (i) zaniknout apoptózou, (ii) vytvořit další A_4 spermatogonie anebo (iii) se mohou diferencovat ve spermatogonie intermediální (Gilbert et al. 2000; Phillips et al. 2010; Rooij 2017; Fayomi & Orwig 2018).

Intermediální spermatogonie se jednou mitoticky dělí a dávají tak vzniknout spermatogoniím typu B. Tyto buňky jsou prekurzory primárních spermatocytů a jsou posledními buňkami linie, které podstupují mitózu. Vzniklé primární spermatocyty zůstávají propojené cytoplazmatickými můstky, které umožňují synchronní vývoj postupných generací zárodečných buněk. Preleptotenové spermatocyty jsou diploidní, ve svém jádru mají přítomné 2 chromozomy, přičemž každý z nich je tvořen dvojicí sesterských chromatid ($2n$, $4C$). V této formě vstupují do profáze prvního redukčního dělení, meiozy. Z každého primárního spermatocytu vznikají dva sekundární spermatocyty s jedním chromozemem a dvěma chromatidami ($1n$, $2C$), které záhy pokračují do druhého meiotického dělení. Výsledkem je vytvoření čtyř haploidních spermatid ($1n$, $1C$) (Gilbert et al. 2000; Phillips et al. 2010; Fayomi & Orwig 2018).

3.2.1.2 Spermiogeneze

Jaderné a cytoplazmatické komponenty vzniklých haploidních kruhových buněk, spermatid, procházejí v adluminálním kompartmentu semenných kanálků složitými sériemi morfologických, histochemických a biochemických změn, které končí produkcí vysoce diferencovaných a specializovaných zárodečných buněk, spermii. Tento proces, označovaný jako spermiogeneze, zahrnuje čtyři hlavní události: (i) kondenzaci a prodloužení jádra, (ii)

formování akrozomu, (iii) vývoj bičíku a (iv) odstranění nadbytečné cytoplazmy (Leblond & Clermont 1952; Guraya 1987; Russell et al. 1990; Lebelo & Horst 2016).

Ačkoliv je transformace spermatidy ve spermii kontinuální proces, lze ji rozdělit na čtyři základní fáze: (i) Golgiho fázi, (ii) fázi čepičky, (iii) fázi akrozomu a (iv) fázi maturační. Každá z těchto fází je regulována příslušnými geny (Leblond & Clermont 1952; Lebelo & Horst 2016).

3.2.2 Epididymální zrání

Po dokončení spermatogeneze jsou ze semenných kanálků varlat uvolňovány spermie, které jsou sice vysoce morfologicky diferencované, ale nejsou schopny se progresivně pohybovat vpřed a dosud nezískaly oplozovací schopnost. Aby došlo ke zhuštění chromatinu, regulaci jejich objemu, získání progresivní motility a molekul nezbytných pro oplození, musí spermie projít dlouhým spletíým tubulem, takzvaným epidydimem, kde samčí gamety podstupují několik molekulárních modifikací. Ty jsou uskutečňovány sekrecí epididymálního epitelu za účasti epididymozomů (extracelulární mikrovezikuly obohacené cholesterolem a proteiny), miRNA a dalších makromolekul (Meistrich et al. 1975; Gervasi & Visconti 2017; Marchiani 2017).

Celé nadvarle (epididymus) je dle Benoita (1926) děleno na čtyři anatomické oddíly: počáteční segment, hlavu (caput), tělo (corpus) a ocas (cauda). Každá oblast je dále uspořádána do lalůček oddělených septami pojivové tkáně, které slouží nejen jako vnitřní podpora orgánu, ale také jako funkční oddělení jednotlivých laloků. Ty tak mohou představovat jedinečné fyziologické oddíly se specifickou genovou expresí, která zajišťuje sekreci příslušných proteinů do luminalní tekutiny. Zatímco hlava a tělo jsou zodpovědné za časné a pozdní dozrávání spermií, oblast ocasu slouží primárně jako úložiště pro funkčně zralé spermie (Benoit 1926; Dacheux et al. 2005; Robaire et al. 2006; Cornwall et al. 2007).

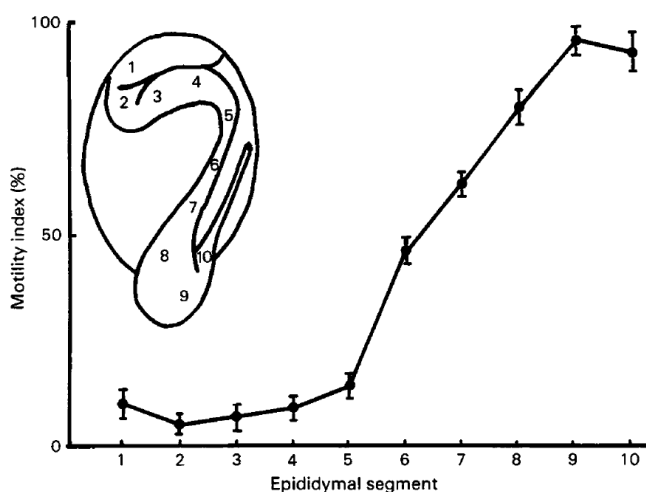
Mezi hlavní funkce a události odehrávající se v epididymu patří transport spermií, vývoj jejich motility, modifikace membrán, kompakce chromatinu, rozvoj oplozovací schopnosti, skladování spermií a regulace jejich objemu (Marchiani et al. 2017).

3.2.2.1 Získání motility

Nezbytnou podmínkou pro schopnost oplození oocyty je rozvoj motility spermií. Spermie z posteriorní části hlavy nadvarlete vykazují jen jeden detekovatelný pohyb, kterým je

bičková oscilace. Pariset et al. (1985) uvádí, že pouze u 1 % spermií získaných z této oblasti byl po 10minutové inkubaci při teplotě 37 ° C pozorován progresivní pohyb vpřed.

Gamety v těle nadvarlete se již pohybují kruhovým nebo nepravidelným progresivním pohybem, který je výsledkem snížení amplitudy a zvýšení frekvence oscilujícího bičku, jehož fáze se však neshoduje s rotačním pohybem hlavičky. Až v ocasu nadvarlete se u spermií objevuje dopředný progresivní pohyb (Jenkins et al. 1980, Pariset et al. 1985). Na obrázku 3 je zobrazen vývoj motility spermií během epididymálního transportu.



Obrázek 3: Motilita spermií během epididymálního transportu (segmenty 1–4 odpovídají caput, 5–7 corpus a 8–10 cauda epididymis) (Pariset et al. 1985).

Pro získání dopředného progresivního pohybu je kromě molekul hydrogenuhličitanů (HCO_3) klíčový zejména antagonistický účinek intracelulárních vápenatých iontů Ca^{2+} a cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Působení cAMP a Ca^{2+} je zprostředkováno jejich vazbou ke specifickým proteinům: regulační podjednotce proteinkinázy závislé na cAMP (proteinkináza A) a proteinů vázajících vápník (kalmodulin), které byly charakterizovány v extraktech spermií a lokalizovány v buňkách nepřímou imunofluorescencí (Jenkins et al. 1980; Pariset et al. 1985).

Jak spermie procházejí epididymem, hladiny cAMP a pH se zvyšují, zatímco celkové hladiny intracelulárního a volného vápníku se snižují a to z 0,8 mM (v hlavě nadvarlete) na 0,5 mM (v ocasu nadvarlete) (Jenkins et al. 1980; Vijayaraghavan et al. 2003). Nízká hladina vápenatých iontů je nutná pro zachování klidového stavu a zabránění předčasné hyperaktivace, čemuž napomáhají i hydrogenuhličitanové ionty udržující nízké lumenální pH, a to i přesto,

že se jejich koncentrace v luminální tekutině zvyšuje z 2 (caput) na 5–7 mM (cauda). Pro srovnání, v samičím reprodukčním traktu roste koncentrace hydrogenuhličitanů na 90 mM a pH se zvyšuje na 7,4 (Pastor–Soler et al. 2003).

Všechny poznatky získané o mechanismech zapojených do kontroly motility poskytují přístupy ke změně motility in vitro. Zvýšení hladin intracelulárního cAMP spermií společně s inhibitory fosfodiesterázy, jako je kofein a isobutyl methyl xanthin, vede k iniciaci motility. Změny vápníku a pH, v závislosti na podmínkách, mohou stimulovat nebo inhibovat pohyblivost spermií. Za optimálních podmínek může motilita indukovaná in vitro u epididymálních spermií z hlavy nadvarlete připomínat motilitu zralých kaudálních spermií (Vijayaraghavan et al. 2003).

3.2.2.2 Modifikace membrán

Během zrání epididymálních spermií dochází k několika membránovým modifikacím ve složení lipidů a proteinů. Spermie získané z ocasu nadvarlete vykazují padesátiprocentní snížení hladin cholesterolu oproti spermiím lokalizovaným v hlavě nadvarlete. Kromě toho spermie většiny savců vykazují změnu složení mastných kyselin v průběhu jejich průchodu epididymem, a to z nasycených na polynenasycené formy. Snížené hladiny cholesterolu spolu v kombinaci s polynenasycenými mastnými kyselinami způsobují během epididymálního zrání zvýšení fluidity membrány, která je nezbytná pro správnou pohyblivost a fertilitu spermií (Marchiani et al. 2017).

Modifikace proteinů membrány samčích gamet je komplexní událost, která vyplývá z kontaktu spermií s luminálními sekrety a epididymosomy, což jsou malé membránové vezikuly různých velikostí nacházející se v epididymální tekutině a asociující s nejrůznějšími proteiny, které se do spermií přenáší během jejich zrání. Modifikace zahrnuje jak ztrátu některých povrchových proteinů působením proteolytických aktivit epididymální tekutiny, tak i jejich získání (Belleannée et al. 2011). Bylo zjištěno, že spermie během transportu epididymem získají přibližně 732 proteinů a 1034 proteinů ztratí. Zajímavé je, že složitost proteinového komplexu dosahuje maxima v těle nadvarlete (1720 proteinů). Většina proteinů je u jednotlivých zvířecích druhů stejná, mění se však jejich koncentrace. Jediný protein nalezený ve velkém množství u všech sledovaných druhů a ve všech částech epididymálního traktu byl klusterin, multifunkční glykoprotein podílející se na zrání, transportu lipidů a remodelaci membrán spermií (Gatti et al. 2004; Dacheux et al. 2005; Dacheux & Dacheux 2013; Moura & Memili 2016).

Tabulka 1: Přehled vybraných proteinů sekretovaných epididymem a asociovaných se spermii (dle Marchiani et al. 2017).

NÁZEV PROTEINU	FUNKCE PROTEINU
ADAM 2, 3, 7 (a disintegrin and metalloproteinase 2, 3, 7)	Interakce spermie – oocyt
Clusterin	Motilita spermii a agregace spermii
CRISP1 (cysteine-rich secretory protein 1)	Podílí se na vazbě spermii na zona pellucida
Kinases cSrc	Kapacitace spermii
GPX4, GPX5 (glutathione peroxidase 4, 5)	Ochrana proti oxidačnímu stresu
Lactoferrin	Protein obrany imunitního systému
Liprin α 3	Akrozomální reakce
MIF (macrophage migration inhibitory factor)	Inhibice motility spermii v epididymu
NPC2 (Niemann–Pick disease type C2)	Transport cholesterolu během epididymálního zrání spermii
PGDS (prostaglandin D2 synthase)	Lipofilní ligand vázající protein
EPPIN	Antimikrobiální ochrana, vazba seminogelinu zapojeného do motility spermii
SED1	Vazba na zona pellucida
SPAM1 (sperm adhesion molecule 1)	Interakce spermie – oocyt
Rnase10	Interakce spermie – oocyt

3.2.2.3 Skladování spermii

Hlavním místem pro skladování spermii je u savců cauda epididymis – ocas nadvarlete. Ačkoli fyziologická doba průchodu samčích gamet přes cauda epididymis je v rozmezí 3 až 10 dnů, spermie mohou být v této tkáni skladovány i po dobu delší než jeden měsíc (Orgebin–Crist et al. 1975).

Pro dosažení dobrých skladovacích podmínek a zachování životaschopnosti spermii je nezbytná reabsorpce vody, ke které z 90 % dochází během průchodu spermii z varlat do eferentních kanálků a počáteční oblasti epididymu (Wong & Yeung 1978; Turner 1984). Kromě ní je pro celou spermatogenezi a úspěšné skladování spermii důležitý také termoregulační mechanismus šourku udržující u varlete a nadvarlete přibližně o 2 ° C nižší teplotu, než je teplota tělesného jádra (Brooks 1973). Foldesy a Bedford (1982) uvádí, že vysoké teploty zmenšují průměr a délku ductu v cauda epididymus, čímž snižují i jeho skladovací kapacitu.

Přežití spermií v cauda epididymis je ovlivněno i androgeny, jejichž nedostatek spouští procesy vedoucí k selhání epitelu a smrti buněk (Jones 2004). Ačkoli mechanismy umožňující dlouhodobé skladování spermií v klidovém stavu nebyly dosud zcela objasněny, zdá se, že inhibice motility by mohla být způsobena (i) mechanickou imobilizací spermií vysokou viskoelastickostí kaudální tekutiny (Acott & Carr 1984; Carr et al. 1985), (ii) snížením Na^{2+} za současného zvýšení K^+ (McGrady & Nelson 1872), (iii) nízkým obsahem kyslíku, (iv) nedostatkem využitelného substrátu – glukózy (Annison et al. 1963), (v) nízkými hladinami hydrogenuhličitanu v tekutině (Okamura et al. 1988) a (vi) snížením extracelulárního i intracelulárního pH spermií (Carr et al. 1985), na kterém se podílí enzym karboanhydráza přítomná v epitelu výstelky. Právě výrazná aktivita karboanhydrázy byla popsána v mnoha epitelových buňkách epididymu kanců (Rodriguez–Martinez et al. 1990).

I přesto, že hlavní funkcí distálních segmentů epididymu je uchovávání zralých živých spermií (Johnson & Varner 1988; Fraile et al. 1996), byla epididymu přiřazena i role při ochraně spermií a při eliminaci defektních buněk (Sutovsky et al. 2001). Existence epididymální „kontrola kvality spermií“ je však vysoce diskutována (Cooper et al. 2002).

3.2.3 Ejakulace a semenná plazma

Od varlete až po ocas nadvarlete se spermie podrobují biochemickým a funkčním modifikacím, které vedou k získání oplozovací schopnosti. Během ejakulace a jejich depozice v samičím reprodukčním traktu jsou spermie transportovány biologickou komplexní tekutinou, semennou plazmou, která kromě sekretů přídatných pohlavních žláz obsahuje také sekrety varlat a nadvarlat. Jelikož je kontakt mezi spermii a semennou plazmou velmi krátký a trvá maximálně několik minut, mohlo by se zdát, že jediným úkolem semenné plazmy je transportovat spermie do samičího reprodukčního traktu. Komplexnost složení semenné plazmy v kombinaci s interakcemi proteinů, cukrů i lipidů s povrchem spermií však naznačuje její významnou biologickou funkci (Gurupriya et al. 2014; Druart & Graaf 2018).

Výzkumy na několika živočišných druzích potvrdily zapojení semenné plazmy do nejrůznějších procesů, a to včetně 1) aktivace a zvýšení motility spermií; 2) pufování pro poskytnutí optimálního osmotického a živného média; 3) prevence předčasné aktivace během fyziologického transportu spermií a stabilizace plazmatické membrány s inhibitory kapacity (Desnoyers & Manjunath 1992; Villemure et al. 2003); 4) ochrana spermií před fagocytózou a destrukcí (Alghamdi et al. 2004); 5) regulace transportu a eliminace spermií (Troedsson et al. 2005); 6) uspišení ovulace u krav (Marion 1950) a indukce ovulace u prasat

(O'Leary et al. 2004) ; 7) interakce spermie a oocyty (Souza et al. 2008); 8) aktivace exprese embryotrofních cytokinů a pomoc při přípravě samičího traktu pro vyvíjející se embryo (Robertson 2005).

I přesto, že se biochemické složení a funkce semenné plazmy mezi druhy i mezi samci jednoho druhu liší, komplexně lze v semenné plazmě kromě iontů (Na^+ , K^+ , Zn^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^{2-}), organických substrátů (fruktóza, sorbitol, glycerylfosfocholin) a organických sloučenin (aminokyseliny, peptidy, nízko a vysokomolekulární proteiny, lipidy, hormony, cytokiny) najít také dusíkaté složky (amoniak, močovina, kyselina močová, kreatinin) či redukující látky (kyselina askorbová) (Mann 1964; Juyena & Stelletta 2013).

Důležitou vysokomolekulární složku tvoří proteiny semenné plazmy, jejichž biosyntéza a sekrece je regulována hladinou testosteronu v krvi. Některé z nich se během ejakulace váží na povrch spermie a účastní se jednotlivých kroků fertilizačního procesu. Mezi tyto proteiny patří spermadheziny, skupina glykoproteinů o velikosti 12–16 kDa, které v kančí semenné plazmě představují více než 90 % všech proteinů. Doposud bylo charakterizováno šest spermadhezínů: AQN–1, AQN–2 (PSP–I), AQN–3, PSP–II, AWN–1, AWN–2 vyznačující se 40–60% identitou aminokyselinové sekvence a obsahující dva konzervované disulfidové můstky. Kromě schopnosti vázat heparin (AQN–1, AQN–2, AQN–3 a AWN) a inhibitory serinové proteázy (AQN–1, AWN) demonstrují také aktivitu podobnou lektinům. Právě heparin vázající spermadheziny (zejména AQN–1) a jejich agregované formy interagují s oviduktálním epitelem a podílí se na vytvoření oviduktálního rezerováru spermií. AWN i AQN–3 jsou pak pevnou součástí fosfolipidové dvojvrstvy membrány spermií, kde plní funkci receptorů zona pellucida (Calvete et al. 1994; Jonáková et al. 1998; Jansen et al. 2001; Caballero et al. 2008)

PSP–I a PSP–II proteiny sekretované semennými vajíčky tvoří heterodimer PSP–I / PSP–II (Calvete et al. 1997), který neváže heparin, ale vykazuje afinitu ke glykoproteinům zona pellucida a trypsinovému inhibitoru. Spermadhezin PSP–I se mimo jiné váže na endo- β -galaktosidázu, která štěpí ZP3 (zona pellucida glycoprotein 3) (Kwok et al. 1993b), a dále vykazuje schopnost vázat IgG různých živočišných druhů i lidských IgA (Kwok et al. 1993a). Může tedy fungovat jako imunosupresivní faktor pro ochranu spermií před imunitními reakcemi během jejich transportu v samičím reprodukčním traktu. Z tohoto důvodu je heterodimer PSP–I / PSP–II označován jako imunosupresivní faktor kančí semenné plazmy (ISF – imunosupresivní seminální faktor) (Veselsky et al. 2002).

Caballero et al. (2008) uvádí, že schopnost agregovaných spermadhezínů vázat cholesterol poukazuje také na jejich roli v „efluxu cholesterolu“, který představuje klíčovou událost kapacity.

Glykoprotein Gp 54 (54 kDa), izolovaný z kančí semenné plazmy a semenných váčků, je schopen tvořit multifaktorové afregované formy. Obsahuje tři spermadhesiny: AQN-3, AWN a pB1. V podjednotce pB1 byl nalezen regulační peptid – faktor inhibující motilitu spermií (SMIF), který způsobuje okamžité potlačení motility bez ovlivnění integrity a permeability plazmalemy. Po kontaktu se spermiemi vyvolává okamžitý pokles hladiny ATP, a to přibližně o 50 %, jak bylo prokázáno bioluminiscenčními studiemi. Inhibice motility spermií SMIF má napříč živočišnými druhy univerzální charakter, byla však prokázána antigenní druhová specifita (Strzezek et al. 1992; Kordan et al. 1998; Mogielnicka–Brzozowska & Kordan 2011). Kordan et al. (1998) uvádí, že SMIF také indukuje změny v molekulární organizaci plazmalemy, v důsledku čehož snižuje citlivost spermií na peroxidaci lipidů.

Radioizotopovou metodou Kordan et al. (1998) prokázali, že SMIF soutěží s heparinem o vazebná místa na plazmalemě. Podle Delgada et al. (1982) se heparin váže na specifické receptory, které jsou umístěné na plazmalemě hlavičky, a vyvolává dekonenzaci chromatinu spermií. Lze tedy předpokládat, že se SMIF váže na heparinové receptory a působí proti spontánní destabilizaci chromatinu spermií.

Strzezek & Holody (1996) tvrdí, že SMIF se pravděpodobně podílí i na imunosupresivních funkcích glykoproteinového komplexu 54 kDa, v důsledku čehož poskytuje spermiím ochranu před imunologickým napadením během jejich transportu v samičím reprodukčním traktu.

Dalším proteinem izolovaným z kančí semenné plazmy je protein DQH s fibronektinovou doménou, který i přes odlišnou strukturu vykazuje velmi podobné vazebné aktivity jako spermadhesiny. Silně interaguje nejen se sulfatovými polysacharidy, jako je heparin, chondroitin sulfát, dextran sulfát či fukoidan, ale také s kyselinou hyaluronovou. Ta byla nalezena ve vejcovodu jak v intraluminální tekutině, tak na povrchu epitelu spermatického rezervoáru, a proto se předpokládá, že se protein DQH podílí na kapacitaci spermií a dalších krocích reprodukce. Na základě vazebných vlastností lze předpokládat, že protein DQH patří obdobně jako některé spermadhesiny (např. rodina AQN nebo AWN) k multifunkčním proteinům (Jelínková et al. 2004a, Jelínková et al. 2004b; Maňásková et al. 2007). Maňásková et al. (2007) uvádí, že protein DQH s největší pravděpodobností pochází z tkáně semenných váčků a je přítomen v semenné plazmě.

Semenná plazma dále obsahuje typ proteinů, které chrání spermie v epididymu, po ejakulaci a v samičím reprodukčním traktu před reaktivními formami kyslíku. Jejich produkce je sice součástí fyziologie spermií, ale v nadbytku narušuje homeostázu peroxidací lipidů a redukcí enzymů regulujících přísun vápníku a ztrátu ATP. Pro kontrolu škodlivých účinků ROS vylučuje epididymis antioxidační enzymy jako je glutathion S-transferáza, tioredoxin peroxidáza, superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza (GSHPx) a kataláza (Alvarez & Storey 1983; Jeulin et al. 1989, Fouchécourt et al. 2000, Dacheux et al. 2006; Moura & Memili 2016). GSHPx je jedním z hlavních antioxidačních enzymů, který katalyzuje redukci peroxidu vodíku (Perry et al. 1992; Halliwell & Gutteridge 1990).

3.3 Procesy v samičím reprodukčním traktu

Přesto, že jsou do samičího reprodukčního traktu ejakulovány miliony spermií, pouze malá subpopulace samčích pohlavních buněk dosáhne oocyty a místa oplodnění. Transport samčích gamet k samičímu oocyty byl dlouho považován za jakýsi závod, ve kterém měla údajně nejrychlejší spermie nejvyšší pravděpodobnost na jeho oplození. Za posledních dvacet let však studie in vitro a in vivo poskytly důkazy o tom, že transport spermií je komplexní proces modifikovaný fyzikálními a biochemickými interakcemi s buňkami lemujícími samičí reprodukční trakt. Tyto interakce, které představují složitý proces kapacitace a akrozomální reakce, jsou nezbytnou podmínkou pro následné úspěšné oplození oocyty (Suarez & Pacey 2005; Holt & Fazeli 2018).

3.3.1 Cervix

Spermie zahajují transport během několika vteřin po ejakulaci. Jejich vlastní motilita je doprovázena koordinovanými vaginálními, cervikálními a děložními kontrakcemi vyvolávanými složkami ejakulátu, především estrogeny. Ačkoli jsou tyto kontrakce krátkodobé, napomáhají rychlé progresi spermií do horní části samičího reprodukčního traktu (Suarez & Pacey 2005).

Pro regulaci transportu spermií z místa deponace ejakulátu do vejcovodu je nezbytný také cervikální hlen vyplňující četné záhyby a drážky děložního krčku (Overstreet 1983), který pro samčí pohlavní buňky zároveň představuje i první selekční bariéru. Tato bifázická tekutina slouží nejen k vyloučení morfologicky abnormálních spermií, ale podílí se i na vyloučení semenné plazmy a poskytuje biochemického prostředí pro transport životaschopných spermií.

Mullins & Saacke (1989) uvádí, že v děložním krčku se nachází prostředí s nízkou viskozitou, které vytváří takzvané "privilegové cesty" usnadňující průchod spermií do dělohy. Tung et al. (2015) využitím mikrofluidního modelu potvrdili, že migrace spermií prostřednictvím těchto privilegovaných cest je řízena mikrovrstvami a jemným prouděním tekutiny.

V závislosti na živočišném druhu jsou spermie deponovány do různých částí samičího reprodukčního traktu. Zatímco velký počet savců, včetně skotu, primátů, psů či koček, ejakuluje sperma do přední části vagíny (Coy et al 2012), kanci během páření deponují asi 250 ml ejakulátu do proximální části děložního čípku, který je následně ucpán gelovou zátkou vytvořenou sekrecí bulbouretrálních žláz zabráňující retrográdnímu toku semene (Viring & Einarsson 1981). Bez ohledu na to, do jaké části samičího reprodukčního traktu jsou spermie ejakulovány, aby vstoupily do vejcovodu a setkaly se s oocytem, musí projít utero–tubálním spojením (Coy et al 2012), který dle Tokuhira et al. (2012) představuje kritický bod v jejich transportu.

3.3.2 Utero-tubární spoj, oviduktální rezervoár a vejcovod

Skladování spermií v samičím reprodukčním traktu po různě dlouhé časové období je fenomén pozorovaný u široké škály živočišných druhů (Miller 2015). Funkční rezervoár spermií se u savců nachází v isthmické části oviduktu (Hunter et al. 1980), kam samčí gamety vstupují pod kontrolou utero–tubálního spoje. Ten přinejmenším u myších spermií vyžaduje rozpoznání specifických membránových proteinů (např. ADAM3, ADAM2, tACE) lokalizovaných na hlavičce samčích pohlavních buněk (Nakanishi et al. 2004; Yamaguchi 2006; Yamaguchi et al. 2012; Okabe 2013).

Hunter (1984) uvádí, že jako rezervoár spermií u prasnic slouží utero–tubální spoj a kaudální část isthmu. Ten kromě skladování spermií umožňuje především jejich postupné uvolňování do místa oplození, což snižuje riziko vzniku polyspermie – patologického stavu vedoucího k selhání vývoje zygoty placentálních savců (Hunter & Leglise 1971). Schopnost zachovat a prodloužit životaschopnost spermií v samičím reprodukčním traktu, udržet stabilitu plazmatické membrány a tím zpomalit proces kapacitace tak, aby spermie dosáhli oocyty ve vhodnou chvíli pro oplození, vyžaduje přímý membránový kontakt mezi spermii a epitelálními buňkami vejcovodu (Yanagimachi 1994; Murray & Smith 1997). V oviduktálním rezervoáru prasnic je stejně jako v ocasu nadvarlete kanců exprimován enzym karboanhydráza, který ovlivňuje hladinu elektrolytu a acidobazický stav, čímž se podílí

na inhibici motility spermií navázaných na epitelální buňky a tím i na zachování jejich životaschopnosti (Rodriguez – Martinez et al. 1991, Rodriguez – Martinez et al. 2005).

Vazba spermií na oviduktální epitel je reverzibilní proces, který je zprostředkován oligosacharidovými zbytky přítomnými na membráně epitelových buněk a Ca^{2+} závislými lektiny lokalizovanými na povrchu hlavičky spermií (Demott et al. 1995; Suárez 1998; Suarez 2002). Molekuly podílející se na tomto procesu se však u jednotlivých živočišných druhů liší (Talevi & Gualtieri 2010).

Interakce spermií a epitelových buněk oviduktu je realizována také díky proteinům majícím vazebnou afinitu k sacharidům. Jedná se především o spermadheziny AQN1 a AWN zmiňované v kapitole 3.2.3 (Dostálová et al. 1995, Calvete et al. 1996).

Ačkoliv mechanismy, kterými se spermie z oviduktálního rezervoáru uvolňují, nejsou ještě zcela dobře pochopeny, zdá se, že toto uvolňování je v korelaci s kapacitačními událostmi probíhajícími v reprodukčním traktu samice (Coy et al. 2012).

3.3.2.1 Kapacitace

Kapacitace je definována jako komplexní série biochemických a biofyzikálních změn v organizaci spermií, které zvyšují intracelulární pH, fluiditu buněčných membrán, amplitudu a celkovou motilitu a iniciují komplexní signální transdukční dráhu včetně fosforylace proteinů. Tyto události jsou nezbytné pro strukturální a funkční remodelaci samčí pohlavní buňky, kterou připravují na interakci s komplexem kumulus – oocyt a exocytózu akrozomu (Abou–Haila & Tulsiani 2009; Ded et al. 2010; Ferramosca & Zara 2014). Kapacitace jakožto významný biologický proces byla popsána nezávisle na sobě dvěma vědci Changem (Chang 1951) a Austinem (Austin 1951) v roce 1951 a stala se zásadním objevem pro vývoj technologie oplodnění in vitro (Coy et al. 2012).

3.3.2.1.1 *Kapacitace in vivo*

Aby se spermie staly funkčně kompetentními buňkami, musí strávit určitý čas, který se liší v závislosti na druhu, v samičím reprodukčním traktu. Přesné místo, kde ke kapacitaci in vivo dochází, je druhově odlišné. Bylo však prokázáno, že k navození funkčních změn u spermií dochází po jejich průchodu dělohou a oviduktem (Abou–Haila 2009).

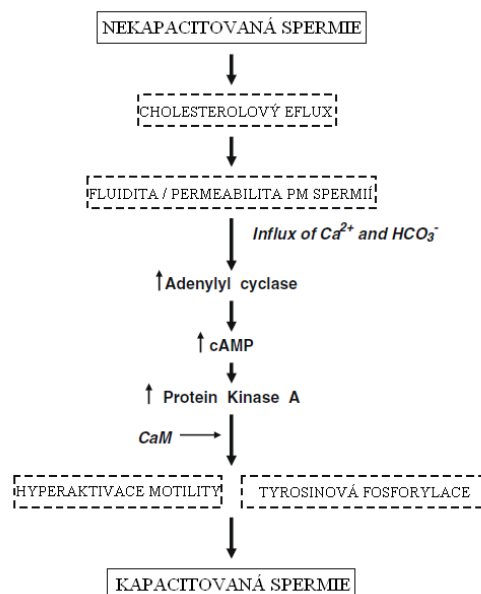
Kapacitace začíná odstraněním dekapacitačních faktorů, tj. plazmatických proteinů / glykoproteinů adsorbovaných na povrchu ejakulovaných spermií, které jsou zodpovědné za stabilizaci membrány (Bedford 1991; Yanagimachi 1994). Kandidátními dekapacitačními

faktory jsou spermadhesiny AQN a AWN u prasete (Jonáková et al. 1998; Ekhlasi–Hundrieser et al. 2005), dále DF glykolový protein, fosfatidylethanolamin vázající protein 1 (PEB1), spermiový antigen 36, CRISP1 (Gibbons et al. 2005; Nixon et al. 2006) a sekreční protein semenných váčků 2 (SVS2) (Araki 2015). Zatímco některé z těchto proteinů jsou složkami semenné plazmy, jiné jsou testikulárního původu a jsou umístěny na vnější akrozomální membráně. Odstranění dekapacitačních faktorů spouští kaskádu událostí, které začínají odtokem cholesterolu z plazmatické membrány spermií (Davis 1981).

Odtok sterolů, především cholesterolu, z plazmatické membrány spermií usnadňuje albumin a vysokodenzní lipoproteiny představující hlavní proteiny samičího reprodukčního traktu. Tento takzvaný cholesterolový eflux má za následek změnu membránového potenciálu a zvýšení permeability i fluidity membrány, což umožňuje přítok (influx) Ca^{2+} a HCO_3^- iontů. Tyto ionty společně s reaktivními formami kyslíku (ROS) aktivují intracelulární druhé posly (Yanagimachi 1994).

Influx bikarbonátu a vápníku reguluje aktivitu rozpustné adenylylcyklázy (SACY) ke zvýšení intracelulárního cAMP. Nárůst cAMP aktivuje protein kinázu A (PKA), která fosforyluje proteinové tyrosinkinázy (PTK) na aktivovaný stav a proteinové tyrosinfosfatázy (PTP) na inhibovaný stav. To urychluje fosforylaci tyrosinu v hlavičce a ocasu spermií, což je jeden ze znaků kapacity (Boatman & Robbins 1991; Kerns et al. 2016).

Herrero & Gagnon (2001) zjistili, že cAMP dráha, která reguluje tyrosinovou fosforylaci, je modulována také zvýšením hladiny oxidu dusnatého během kapacity. U nekapacitovaných spermií je hladina NO nízká, zatímco za kapacitačních podmínek se syntéza NO zvyšuje (Herrero & Gagnon 2001).



Obrázek 4: Model ilustrující možnou sekvenci událostí na počátku intracelulární signální dráhy zapojené do tyrosinové fosforylace a hyperaktivace motility spermii asociované s kapacitací (upraveno dle Abou-Haila & Tulsiani 2009).

Fosforylace proteinů je post–translační modifikační událost, která působí jako jeden z regulačních mechanismů buněk. V eukaryotických buňkách je jedním z nejběžnějších mechanismů regulace aktivity proteinu přidání a / nebo odstranění fosfátové skupiny z proteinových zbytků serinu, threoninu nebo tyrosinu, které může vyvolat alosterické modifikace vedoucí ke konformačním změnám v proteinech způsobující buď jejich aktivaci nebo inaktivaci. Zralé spermie jsou vysoce kompartmentalizované, ale nemají žádnou významnější transkripční a translační aktivitu. Proto má fosforylace a defosforylace proteinů obrovský význam při regulaci důležitých procesů, jakým je právě kapacitace. Fosforylační / defosforylační stav fosfoproteinů je řízen aktivitou proteinkináz a fosfatáz, které umožňují zapnout nebo vypnout funkci různých proteinů. Fosforylace tyrosinu je velmi důležitá a může být primárním nebo dokonce výlučným indikátorem dráhy přenosu signálu v buňce (Naz & Rajesh 2004).

Ukázalo se, že tyrosinová fosforylace proteinů bičíku spermie souvisí s hyperaktivací motility, která je nezbytná pro proniknutí spermie skrz kumulus a zona pellucida oocyty (Nassar et al. 1999). Abou-Haila & Tulsiani (2009) uvádí, že ačkoli je hyperaktivovaná pohyblivost

spermií spojena s procesem kapacitace, obě změny jsou regulovány nezávislými mechanismy. Proto je hyperaktivaci věnována samostatná podkapitola.

V kančích spermiích indukuje kapacitace fosforylaci tyrosinových proteinů plazmatických membrán, o kterých se předpokládá, že iniciují vazbu na zona pellucida a navozují reakci akrozomu. Bylo prokázáno, že se jedná o tři majoritní (27 kDa, 37 kDa a 40 kDa) a tři minoritní (34 kDa, 47 kDa a 55 kDa) plazmatické membránové proteiny (Flesh et al. 1999).

Kontrastní výsledky existují o dopadu extracelulárního Ca^{2+} na fosforylaci tyrosinu ve spermiích. Pokusy na myších (Visconti et al. 1995) a lidských spermiích (Lecler et al. 1998) dokumentují, že zvyšující se množství extracelulárního Ca^{2+} zvyšuje fosforylaci tyrosinu. Naproti tomu Luconi et al. (1999) prokázali opačný účinek, což naznačuje, že Ca^{2+} negativně ovlivňuje fosforylaci tyrosinu během kapacitace spermií. Obdobné výsledky přináší i studie Baker et al. (2004), která uvádí, že Ca^{2+} potlačuje fosforylaci tyrosinu snížením dostupnosti intracelulárního ATP.

Kromě cholesterolového efluxu, fluidity plazmatické membrány, influxu Ca^{2+} a HCO_3^- iontů a fosforylace proteinů je další důležitou změnou, která iniciuje kapacitaci, složení a distribuce fosfolipidů plazmalemy spermie. Celkové množství fosfolipidů se sice v plazmatické membráně téměř nemění, dochází však ke změně jejich distribuce ve vnějším a vnitřním listu membrány. Navíc jsou fosfolipidy zřejmě během kapacitace methylovány (Abou-Haila & Tulsiani 2009).

3.3.2.1.2 Kapacitace *in vitro*

U ejakulovaných savčích spermií nebo spermií získaných z ocasu nadvarlete lze navodit kapacitaci *in vitro*. Její podstatou je odstranění semenné plazmy ejakulátu (např. centrifugací) a následná inkubace získaných spermií v kapacitačním médiu za podmínek, které by co nejvíce měly napodobovat podmínky fyziologické. V minulosti se jako kapacitační média často využívala krevní séra nebo biologické tekutiny – folikulární či oviduktální, které byly později nahrazeny chemicky definovanými médii (např. Tyrodovo, Krebs-Ringerovo). Ty by svým složením měly napodobovat prostředí oviduktální tekutiny (Yanagimachi 1994; Abou-Haila & Tulsiani 2009). Přesto, že se složení kapacitačního média druhově liší, obecně jsou jeho součástí ionty (včetně Ca^{2+} a bikarbonátu), energetické substráty a albumin. O důležitosti jednotlivých složek kapacitačního média však existují rozporuplné informace (Jaiswal et al. 1998).

BSA (bovinní sérový albumin), bikarbonát a vápník jsou obecně přijímány jako složky nezbytné pro in vitro kapacitaci spermií různých druhů savců (Yanagimachi 1994). Suzuki et al. (1994) a Tardif et al. (2003) však shodně tvrdí, že nedodání BSA do kapacitačního média pro in vitro kapacitaci kančích spermií nenarušuje průběh kapacitačního procesu. Protože je poměr cholesterolu vůči fosfolipidům plazmatické membrány kančích spermií již před kapacitací podstatně nižší než u jiných druhů zvířat (0,2 ve srovnání s 0,4 u býčích a 0,99 u lidských spermiích), nemusí během kapacitace docházet k tak významnému efluxu cholesterolu, který je zprostředkováván právě albuminem, respektive BSA (Tardif et al. 2003).

Teplota, čas, mezidruhová variabilita a použití kapacitačního média jsou nejdůležitější faktory, které ovlivňují a regulují průběh kapacitace in vitro. I přesto, že je optimální teplota druhově specifická, u většiny savčích druhů se pohybuje v rozmezí 37–38 °C. I malý rozdíl teplot však může působit na fyzikální stav membránových lipidů spermie a tím ovlivnit celý proces kapacitace. Stejně jako teplota je druhově specifická i celková doba kapacitace. Zatímco například u myši a koček je udávána jedna hodina, u králíka je to až několik hodin. Tyto odlišnosti jsou způsobeny různými fyzikálními a chemickými vlastnostmi plazmatické membrány spermií jednotlivých druhů (Yanagimachi 1994). Kančí spermie se obvykle kapacitují in vitro při fyziologické teplotě 38 °C v 5% CO₂ atmosféře (Gadella & Visconti 2006).

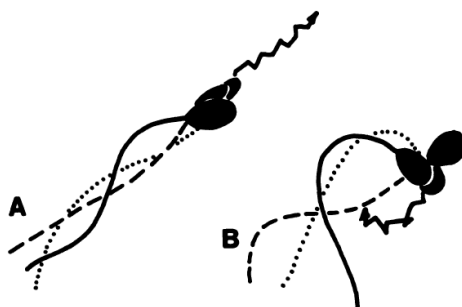
Úroveň a úspěšnost in vitro kapacitace může být hodnocena různými metodami: (1) nepřímou imunofluorescencí, (2) indukci akrozomální reakce (např. ionoforem), (3) barvením chlortetracyklinem (CTC) či (4) barvením merocyaninem 540 s využitím (5) průtokové cytometrie (Rathi et al. 2001).

3.3.2.2 Hyperaktivace motility

Hyperaktivace spermií je často definována jako podmnožina kapacitačního procesu, a to i přes to, že tyto dvě události nejsou bezpodmínečně propojeny. Důkazem je fakt, že snížením koncentrace hydrogenuhličitanů v kapacitačním médiu mohou být spermie plně kapacitovány, aniž by byly současně hyperaktivovány (Boatman & Robbins 1991; Stauss et al. 1995).

Je obtížné přesně definovat vzorec pohybu hyperaktivované spermie. Ten se u jednotlivých druhů liší v závislosti na tloušťce a délce bičíku a podle fyzikálního prostředí, ve kterém se samčí pohlavní buňky právě pohybují. Nejlepším způsobem, jak charakterizovat hyperaktivovanou motilitu, je porovnat ji s aktivní (progresivní) pohyblivostí (viz obrázek 5), a to samostatně pro každý živočišný druh. Aktivní motilitu, pro kterou je typická téměř přímá

trajektorie, lze pozorovat u spermií pohybujících se v děloze. Jakmile se však samčí gamety dostanou do vaječníku, charakter jejich pohybu se mění na hyperaktivovaný. Z přímočarého pohybu se stává méně progresivní, za to vysoce energický pohyb s asymetrickým kmitáním bičíku vyúsťující v kruhovou nebo helikální dráhu. Takto je popisován hyperaktivovaný pohyb v médiu s nízkou viskozitou (Yanagimachi 1970, Suarez 1996). Fyzikální prostředí oviduktu je však zcela odlišné od prostředí mikroskopických sklíček a tato forma pohybu umožňuje spermiím uvolnit se z krypty oviduktální sliznice, pohybovat se ve viskoelastickém oviduktálním hlenu a napomáhá proniknout extracelulární matrix kumulu oophoru obsahující hyaluronan (Katz et al. 1989; Martín – Hidalgo et al. 2018).



Obrázek 5: Vzory aktivovaného (A) a hyperaktivovaného (B) pohybu (Suarez et al. 1992).

Hyperaktivní motilita byla poprvé popsána Yanagimachim (1969), který v in vitro podmínkách pozoroval, že pouze spermie s tímto typem pohybu jsou schopné oplodnit oocyt. Nicméně první poznatky o biochemické podstatě tohoto procesu přišly až o dvě desetiletí později, kdy Suarez et al. (1992) u kančích spermií prokázali, že hyperaktivní pohyb je indukován zvýšením intracelulárních hladin Ca^{2+} za použití ionoforu vápníku.

Hypermotilita je reverzibilní proces vyžadující trvalé zvýšení intracelulárního vápenatých iontů. V důsledku jejich měnící se hladiny je u spermií některých živočišných druhů pozorováno takzvané dvoufázové chování, tedy střídání aktivního a hyperaktivního pohybu. Tento jev, který je obzvláště běžný u lidských spermií, může přispět ke snížení procenta hyperaktivovaných spermií ve vzorcích hodnocených systémem CASA (Yanagimachi 1982; Fraser 1987; Suarez 1996).

U spermií kapacitovaných v médiu obsahujícím hydrogenuhličitanu může probíhat hyperaktivace spontánně v důsledku postupného zvyšování propustnosti membrán spermií

pro vápník, což je však obvykle spojeno se stárnutím buněk, konkrétněji oxidačním poškozením (Alvarez et al. 1987; Suarez 1996).

Důležité je načasování hyperaktivace *in vivo*. Velice malou pravděpodobnost na oplodnění oocyty mají spermie, u nichž dochází k hyperaktivaci před dosažením oviduktu (Shalgi et al. 1992). Cooper et al. (1979) uvádí, že počet hyperaktivovaných spermií ve vaječniku v době ovulace stoupá, což poukazuje na přítomnost specifického signálu oviduktu spojeného s hyperaktivací.

V roce 2001 byla objevena rodina specifických kationtových kanálů permeabilních pro Ca^{2+} a závislých na pH a nízkém napětí. Tyto takzvané CatSper kanály exprimované pouze ve spermiích a lokalizované v membráně hlavního oddílu bičíku jsou nezbytné nejen pro hyperaktivaci spermií, ale i pro všechny fyziologické události vyžadující vstup vápníku, tj. chemotaxi vůči oocyty, kapacitaci a reakci akrozomů. Není proto divu, že samci deficitní v genu pro Catsper, vykazují celkovou neplodnost bez dalších fenotypických abnormalit. Vápníkové kanály Catsper jsou regulovány některými fyziologickými stimulanty, jako jsou cyklické nukleotidy (např. CAMP, cGMP), progesteron, glykoproteiny zona pellucida (ZP) či bovinní sérový albumin (BSA). Všechny tyto faktory stimulují vstup Ca^{2+} do spermií právě přes kanály Catsper (Quill et al. 2003; Sun et al. 2017; Lishko & Mannowetz 2018).

Hyperaktivace poskytuje také mechanismus pro chemotaxi. Jelikož hyperaktivované spermie často mění směr, mohou vysledovat vyhledávací signál oocyty (Suarez 1996).

3.3.2.3 Akrozomální reakce

Jakmile se dostanou kapacitované savčí spermie do kontaktu s extracelulárními obaly oocyty, dochází v samčí pohlavní buňce k aktivaci celé řady proteinů a signálních kaskád, které vedou k sérii nezvratných změn. Ty mají za následek exocytózu akrozomálního váčku, takzvanou akrozomální reakci (AR), jenž je absolutním předpokladem úspěšného oplození. Spermie, které nedokončí akrozomální reakci, nejsou schopné proniknout skrz zona pellucida a navázat se na plazmatickou membránu oocyty (Yanagimachi 1981; Florman et al. 2008).

3.3.2.3.1 *In vivo*

Při akrozomální reakci dochází k fúzi plazmatické a vnější akrozomální membrány spermií, které se dostávají do vzájemného kontaktu po depolymerizaci F – aktinových sítí kortikálního cytoskeletu. To je zahájeno zvýšením koncentrace Ca^{2+} iontů a změnou pH v cytosolu spermií a uskutečňováno prostřednictvím aktin vázajících proteinů a signálních

molekul. Pokud je faloidinem depolymerizaci aktinu zabráněno, celá akrozomová reakce je zablokována (Hunag et al. 1981; Spungin et al. 1995).

Po splynutí obou membrán je obsah akrozomu vyjit do extracelulárního prostředí spermie. Kromě uvolnění akrozomálních enzymů dochází i k odkrytí nových domén a proteinů lokalizovaných na vnitřní akrozomální membráně, která se po fúzi membrán dostává na povrch arteriální části hlavičky. Jedním z proteinů, jenž je vystaven extracelulárnímu prostředí po uskutečnění AR, je membránový protein IZUMO1. Ten spolu s jeho glykoproteinovým receptorem oocyty – JUNO, objeveným v roce 2014, tvoří základní faktory nezbytné pro rozpoznávání samčích a samičích gamet a fúzi jejich plazmatických membrán. Spermie, u nichž dojde ke knockoutu IZUMA, jsou sice schopné projít zona pellucida, ale nedokáží fúzovat s oocytem. Jelikož není prvním místem kontaktu mezi spermii a oolemou vnitřní akrozomální membrána ale membrána v oblasti ekvatoriálního segmentu, musí splynutí obou gamet předcházet translokace IZUMO právě do této oblasti (Inoue et al. 2005; Inoue et al. 2015; Aydin et al. 2016).

Jak, a především kde dochází k iniciaci AR není zcela zřejmé, a to ani po několika desetiletích výzkumu. Do roku 2011 bylo obecně přijímáno, že k indukci AR u savců dochází po kontaktu spermie se zona pellucida a po jejím navázání na zonální protein ZP3. Jin et al. (2011) však publikovali studii, v níž na myším modelu zjistili, že u většiny fertálních spermii dochází k iniciaci AR již během jejich průchodu skrz buněčný extracelulární obal vajíčka – kumulus oophorus. Navíc prokázali, že tyto spermie jsou později schopné bez potíží projít i skrze ZP a oplodnit vajíčko. Za iniciaci AR během průchodu spermii kumulem oophorem by mohl být zodpovědný progesteron, který kumulární buňky sekretují a jehož schopnost iniciovat AR je obecně známá.

Projít fyziologicky aktivovanou akrozomální reakcí mohou pouze plně kapacitované spermie, z čehož vyplývá, že kapacitace a akrozomální reakce jsou dvě události na sobě závislé nejen časově, ale i funkčně (Yanagimachi 1994).

Akrozomální reakce je velice komplikovaný proces, a i přes to, že je mnoho let předmětem intenzivního výzkumu, všechny signální dráhy a molekuly, které se na její regulaci podílí, nebyly dosud nalezeny. Průběh signálních kaskád aktivovaných během akrozomální reakce je značně složitý a zahrnuje několik důležitých událostí včetně aktivace G proteinů a protein kináz, změny pH a přechodného nárůstu Ca^{2+} iontů v cytosolu spermie (Florman et al. 2008).

Vápenaté ionty mají v AR savců klíčovou roli a zvýšení jejich intracelulární koncentrace vede k aktivaci aktin vázajících proteinů v cytosolu hlavičky spermie. Pod jejich vlivem dochází k již zmiňovanému zborcení F – aktinové sítě tvořící přirozenou bariéru mezi plazmatickou a vnější akrozomální membránou. Fúze těchto membrán představuje druhý významný děj, který je aktivován zvýšením koncentrace vápenatých iontů. Ty se na tomto procesu podílí buď přímo tak, že neutralizují záporný náboj membrány, což vede ke změnám jejího lipidového složení, nebo nepřímo aktivací fosfolipázy A2, která štěpí fosfatidyl na dvě vysoce fúzogenní molekuly – lysosfosfatidyl cholin a kyselinu fosfatidovou (Janmey 1994, Yanagimachi 1994; Breintbart & Spungin 1997; Benoff 1998; de Blas et al. 2005).

3.3.2.3.2 *In vitro*

Akrozomální reakci lze vyvolat během kapacitace spermií *in vitro*. Do kapacitačního média se přidávají induktory akrozomální reakce, které mohou být buď fyziologické nebo nefyziologické povahy. Mezi fyziologické patří např. progesteron, folikulární tekutina, zona pellucida, hyaluronová kyselina apod., mezi nefyziologické např. kalcium ionofor, při jehož použití však dochází k obejití části signálních drah účastnících se spouštění fyziologické akrozomální reakce. Přesto je výsledná reakce od AR indukované fyziologickými induktory morfologicky neodlišitelná. Zajímavý je fakt, že i bez přítomnosti jakékoliv látky indukující AR dochází u některých spermií během kapacitace *in vitro* k akrozomální reakci. Tento jev je označován jako spontánní akrozomální reakce (Breintbart & Spungin 1997; Gupta & Bhandari 2011).

3.4 Ubiquitin-proteazomový systém

Všechny intracelulární a některé extracelulární proteiny jsou kontinuálně degradovány a nově syntetizovanými proteiny opět nahrazovány. V rámci zachování homeostázy buněčného metabolismu používá buňka dvou hlavních cest vysoce specifické a kontrolovatelné degradace proteinů. Kromě lysozomální degradace buněčných organel či extracelulárních proteinů s dlouhým biologickým poločasem rozpadu, která probíhá mechanismem autofagie za účasti hydrolytických enzymů katepsinů (Goldberg 2003; Matějčková et al. 2013), využívá buňka při degradaci přibližně 75 % všech eukaryotických proteinů ubikvitin – proteazomovou dráhu (Sutovsky 2011).

Proteazom se nachází jak volně v jádře, tak v cytoplazmě, kde asociuje s centrozomy, cytoskeletálními sítěmi a vnějším povrchem endoplazmatického retikula. Jelikož proteolýza

nastává uvnitř proteazomu, musí být protein určený k degradaci co nejdříve transportován do itra jeho centrální části. K tomu, aby byl daný protein proteazomem rozeznán a odlišen od ostatních proteinů, slouží speciální posttranslační modifikace nazývaná ubikvitinace. Ta je uskutečňována prostřednictvím malého chaperonového proteinu ubikvitinu, který vazbami na protein vytváří polyubikvitinovaný řetězec obsahující minimálně 4 tyto molekuly. Takto označený protein je následně v proteazomu degradován na krátké peptidové sekvence o velikosti do 35 aminokyselinových zbytků, jenž jsou dále štěpeny cytosolovými endopeptidázami. Jednotlivé molekuly ubikvitinu jsou z polyubikvitinovaného řetězce uvolněny a mohou být tak použity k označování dalších proteinů určených k degradaci (Wojcik & DeMartino 2003; Sakai et al. 2004; Sutovsky 2011; Matějíková et al. 2013).

Bylo prokázáno, že ubikvitin – proteazomový systém (UPS) je zapojen nejen do genové exprese, regulace buněčného cyklu a transkripčních faktorů, kontroly nově syntetizovaných proteinů, imunitní odpovědi i patologických a zánětlivých procesů, ale hraje také významnou roli v gametogenezi a v celém procesu oplodnění (Sutovsky 2011; Matějíková et al. 2013).

3.4.1 Proteazom

Proteazom je multikatalytický enzymový komplex se specifickou afinitou pro proteiny značené ubikvitinem, který je tvořen základnou a na ni navázanými regulačními podjednotkami upravujícími jeho aktivitu. K objevení a izolaci proteazomu došlo roku 1968 a pro svůj tvar připomínající dutý válec byl původně označen jako cylindrin (Sutovsky 2011; Matějíková et al. 2013).

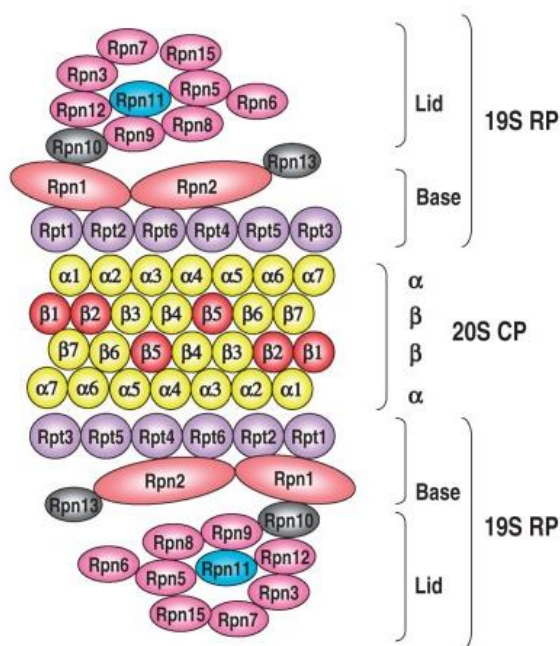
Proteazomový systém savčích buněk představuje 26S proteazom o molekulové hmotnosti 2,5 MDa a s 31 typy podjednotek (Matějíková et al. 2013). Skládá se z dutého 20S jádra poskytujícího prostor pro vlastní proteolýzu. To je uzavřeno na jednom nebo obou koncích regulační částicí 19S, která obsahuje několik aktivních a ubikvitin – vazebných míst (Voges et al. 1999; Sutovsky 2011).

Jádrová částice (CP) 20S, jak lze vidět na obrázku 6, se skládá ze čtyř soustředných prstenců, z nichž každý je tvořen buď sedmi podjednotkami α nebo sedmi podjednotkami β , které společně tvoří dutou válcovitou strukturu. Dva vnější kruhy složené z podjednotek PSMA 1–7 (α podjednotky) spojují jádro se základnou komplexu 19S a regulují přístup substrátu do vnitřního proteolytického centra. Jestliže dojde α podjednotkami k rozpoznání substrátu, je vyvolána konformační změna spočívající v odstranění blokády vstupní brány N–konci aminokyselinových zbytků podjednotek α -2, α -3 a α -4. Dva vnitřní prstence tvořené

podjednotkami PSMB 1–7 (β podjednotky) jsou zodpovědné za proteolytickou degradaci substrátu. Proteolytickou aktivitu vykazují konkrétně tři podjednotky katalytického p–typu–PSMB6 (p1), PSMB7 (p2) a PSMB5 (p5), které se nacházejí v proteolytickém centru, tj. ve středu dutiny proteazomu. Podjednotka p1 vykazuje proteolytickou aktivitu podobnou kaspázám štěpící polynukleotidový řetězec v místě za kyselou aminokyselinou, podjednotka p2 má aktivitu podobnou trypsinu štěpící řetězec po bazické aminokyselině a podjednotka p5 odpovídá aktivitě chymotrypsinu štěpící po hydrofobních aminokyselinách (Sutovsky 2011; Matějíková et al. 2013).

Aby nedošlo k nekontrolovatelné degradaci buněčných proteinů, je součástí celého komplexu proteazomový aktivátor 19S o molekulové hmotnosti 700 kDa, který je tvořen 19 samostatnými proteiny. Základna této částice se váže na vnější kruh jádra 20S a je složena ze šesti homologních ATP–ázových podjednotek Rpt1–Rpt6 a čtyř ne ATP–ázových podjednotek Rpn1, Rpn2, Rpn10 a Rpn13. Základní komplex proteazomu má tři funkční role: zachycení polyubikvitovaných proteinů, jejich degradaci a otevírání kanálu v α podjednotce. Konkrétně jsou za rozpoznání a vazbu polyubikvitinových řetězců zodpovědné podjednotky Rpn10 a Rpn13. Devět podjednotek Rpn3, Rpn5–Rpn9, Rpn11, Rpn12 a Sem1 vytvářející strukturu podobnou víku se podílí na rozvinutí substrátu a jeho translokaci od jádra 20S. Na odbourávání polyubikvitinového řetězce a jeho uvolnění do okolí má zásluhu podjednotka Rpn11 obsahující Zn^{2+} dependentní proteolytické centrum (Sharon 2006; Sutovsky 2011; Liu & Jacobson 2013; Matějíková 2013).

Existují i proteazomy, u nichž je 19S regulační částice nahrazena proteazomovými aktivátorovými částicemi PA200 a PA28, které jsou běžně známy jako 11S regulační částice. Jak PA28, tak PA200 mohou asociovat s jádrem 20S a tvořit hybridní proteazomy. Předpokládá se, že takové proteazomy mohou být schopny degradovat proteiny, které nejsou označeny ubiquitinem (Rechsteiner & Hill 2005, Sutovsky 2011).



Obrázek 6: Schéma struktury proteazomu 26S (Tanaka 2009).

3.4.2 Role proteazomu v procesu kapacitace

Studie savčích spermíích odhalila zapojení UPS do regulace procesu oplození. Mezi hlavní nálezy patří: (1) přítomnost proteazomu v a na povrchu akrozomu savčích spermíích, (2) přítomnost ubikvitinovaných proteinů na obalu savčího oocyty, (3) detekce proteazomální proteolytické a deubikvitinující aktivity u životaschopných, pohyblivých savčích spermíích, (4) spojení proteazomů s hlavičkou spermie i po ZP – indukované exocytóze akrozomu a (5) zvýšení polyspermického oplození při experimentální modifikaci deubikvitinačních aktivit spermíích. Při inhibici proteazomální proteolýzy a ubikvitinace byla pozorována blokáce fertilizace savců, blokáce penetrace spermíích zona pellucida a změna průběhu kapacitace a akrozomální reakce savčích spermíích (Zimmerman & Sutovsky 2009).

Kapacitace spermíích je obecně spojována s uvolněním spermíích z oviduktálního rezervoáru, remodelací povrchu akrozomu a aktivací membrán spermíích pro fúzi s oolemou. V současné době existují důkazy, že se na těchto událostech účastní i ubikvitin – proteazomový systém (Sutovsky 2011).

Proteazom 26S degraduje AKAP3, kotvní protein A–kinázy, který částečně reguluje uvolňování proteinkinázy A (PKA), což je molekula nezbytná pro úspěšný průběh kapacitačního procesu, protože katalyzuje fosforylaci proteinů na Tyr a Ser / Thr zbytcích. Ta

je charakteristickým znakem kapacitace (Bailey 2010; Kerns et al. 2016). Studie fosfoproteomu kapacitovaných spermií identifikovaly řadu proteinů UPS procházející fosforylací během kapacitace myších, kančích a krysích spermií. Jedná se o enzym aktivující ubikvitin UBE (Baker et al. 2010), několik proteasomálních podjednotek (Arcelay et al. 2004, Baker et al. 2010), protein obsahující valosin podílející se na prezentaci ubikvitinovaného substrátu 26S proteazomu (Geussova et al. 2002) a samotný ubiquitin (Arcelay et al. 2004).

3.4.3 Inhibice proteazomu

Prostřednictvím funkčních studií bylo zjištěno, že během kapacitace spermií je 26S proteazom fosforylován protein kinázou A (PKA), což vede ke zvýšení aktivity podobné chymotrypsinu 20S proteasomálního jádra. To je ve shodě s fosforylací několika proteasomálních podjednotek na Tyr i Ser / Thr zbytcích (Sutovsky 2011). Kong et al. (2009) uvádí, že proteasomální inhibitory MG132 a epoxomicin přidané do kapacitačního média blokuje u proteazomu lidských spermií aktivitu podobnou chymotrypsinu reverzibilním způsobem, čímž významně mění průběh kapacitace spermií *in vitro*. To koreluje se studií Morales et al. (2007), kde proteasomální inhibitor epoxomicin signifikantně snížil fosforylaci proteinu Ser během kapacitace lidských spermií. Tyto výsledky naznačují, že i když je proteasomální aktivita regulovaná fosforylací, může přímo nebo nepřímo kontrolovat aktivitu protein kináz. To by se mohlo promítnout nejen na akrozomu spermií, ale také na hlavním oddílu bičíku spermií, kde by proteazomy mohly mít vliv na změny pohyblivosti spermií v průběhu kapacitačního procesu (Sutovsky 2011).

MG132 je silný tripeptid–aldehydový (Cbz-Leu-Leu-Leucinal) inhibitor, který se reverzibilně váže na katalytickou podjednotku proteazomu a specificky blokuje její proteolytickou aktivitu podobnou chymotrypsinu (Goldberg et al. 1995; Sutovsky et al. 2003).

3.5 Funkční parametry motility a její hodnocení

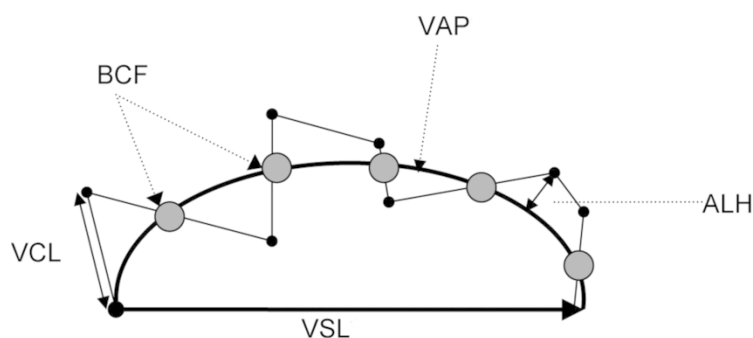
Analýza spermatu nám poskytuje informace o spermatogenezi a potenciální fertilizační schopnosti daného jedince. V humánních klinikách IVF i v chovech zvířat se hodnotí velký počet parametrů včetně motility spermií, která je jedním z ústředních ukazatelů potenciálu plodnosti samců. Ten neovlivňuje pouze celkový počet pohyblivých spermií, ale i rychlost a typ pohybu. Právě aberantní motilita je uváděna jako nejčastější důvod neplodnosti. Jelikož má však na pohyblivost spermií vliv velké množství nejrůznějších mechanismů, je nutné se na ni dívat spíše jako na klinický příznak (Turner 2006; Cooper 2010).

Motilita spermií může být hodnocena manuálně a subjektivně, což sice představuje jednoduchou a levnou metodu, ale měření nebývá přesné. Verstegen et al. (2002) uvádí, že při subjektivním hodnocení parametrů motility u stejných vzorků ejakulátu, ale jinými technickými pracovníky, byly pozorovány variace 30–60 %.

Zavedení systému CASA (computer-aided sperm analysis) před více než čtyřmi desítkami let poskytlo objektivnější prostředky pro hodnocení pohyblivosti spermií. Kromě procenta celkově progresivně motilních spermií umí tento systém zaznamenávat i každou pohybovou stopu spermií, díky čemuž mohou být získány jednotlivé kinetické parametry motility (Yeste et al. 2018), viz tabulka 2 a obrázek 7.

Tabulka 2: Nejběžnější kinematické parametry poskytované systémem CASA (dle Věžník et al. 2004 a Yeste et al. 2018)

ZKRATKA	POPIS ANGLICKY	POPIS ČESKY	DEFINICE	JEDNOTKA
VAP	average path velocity	průměrná rychlost pohybu	rychlost hlavičky na napřímené dráze	$\mu\text{m s}^{-1}$
VSL	straight line velocity	lineární rychlost	rychlost hlavičky na přímé dráze mezi výchozím a konečným bodem měření	$\mu\text{m s}^{-1}$
VCL	curvilinear line velocity	rychlost na skutečné dráze	rychlost hlavičky na skutečné dráze	$\mu\text{m s}^{-1}$
LIN	linearity	linearita	linearita skutečné dráhy vypočítaná jako $VSL/VCL*100$	%
STR	straightness	přímot dráhy	přímot napřímené dráhy vypočítaná jako $VSL/VAP*100$	%
WOB	wobble	kolísání	stupeň oscilace skutečné dráhy kolem její napřímené dráhy vypočítaný jako $VAP/VCL*100$	%
ALH	amplitude of lateral head displacement	šířka oscilace hlavičky	maximální šířka oscilace hlavičky	μm
BCF	beat cross frequency	frekvence křížení	kolikrát je skutečná dráha překřížena napřímenou dráhou	Hz



Obrázek 7: Kinematické parametry spermií měřené pomocí (CASA) (Sloter et al. 2006)

3.5.1 CASA (computer-aided sperm analysis)

Díky vyšší míře objektivitě a možnosti vyhodnocení tisíců trajektorií v jeden okamžik (Contri et al. 2010) je technologie CASA již více než 30 let používána pro kinematickou analýzu pohyblivosti spermií u různých druhů savců včetně člověka (Bompart et al. 2018). Prostřednictvím tohoto systému mohou být kromě údajů o dynamice a motilitě spermií získány i informace o jejich morfologii a koncentraci, ale stupeň automatizace se mezi systémy, kterých v současné době existuje přibližně dvanáct, stále liší (Amman & Katz 2004).

Systém pro analýzu spermií (CASA) se skládá z fázového kontrastního mikroskopu, videokamery a počítače se specifickým softwarem, který kromě identifikace a sledování všech spermií ve videozáznamech umožňuje i výpočet získaných dat. Nasnímaný obraz mikroskopického pole je převeden na digitální obraz za použití vysoce negativního fázového kontrastu zobrazující bílé hlavičky spermií na tmavém pozadí. Obraz každé digitalizované hlavy spermií je počítačem vyhodnocen jako určitý počet obrazových bodů (pixelů). Počítač rozpozná objekt jako hlavičku spermie dle její očekávané minimální a maximální velikosti v závislosti na živočišném druhu. Příklad, kdy je nečistota nesprávně vyhodnocena jako hlavička spermie, je zdrojem chybovosti. Tu však může uživatel softwaru přenastavením hodnoty parametrů (circularity, elongation, size) korigovat. Poté, co byla hlavička spermie identifikována, stanoví počítač její polohu (x, y) dle takzvaného referenčního bodu, který je určen buď středem hlavičky nebo jejím nejjasnějším bodem. Když jsou všechny identifikované hlavičky spermií v jednom poli formou počítačových dat zaznamenány, je analyzováno další pole. Poloměr, ve kterém počítač obraz hlavičky vyhledává, je dán předpokládanou maximální vzdáleností, jenž spermie v daném časovém období urazí. Tato vzdálenost je často nastavena uživatelem a liší se podle toho, zda jsou spermie v semenné plazmě nebo v kultivačním médiu. Následně jsou vypočteny souřadnice spermií (x, y) a analyzováno další pole, dokud není

snímání dokončeno. U každé spermie se rekonstruuje trajektorie referenčního bodu a vypočítává se série kinematických hodnot (Mortimer 2000).

Při použití CASA systému jsou všechny spermie v zorném poli hodnoceny před analýzou dalšího snímku v sekvenci. Z toho vyplývá, že pokud je v zorném poli příliš mnoho spermií, nemusí přístroj přesně zrekonstruovat jejich trajektorie. Jestli že se spermie navzájem srazí, jejich kinematika se na okamžik změní, což může ovlivnit i jednotlivé parametry motility. Z tohoto důvodu musí být zvolena správná koncentrace (Mortimer 2000). Verstegen et al. (2002) uvádí optimální koncentraci spermií pro CASA analýzu v rozmezí $30\text{--}50 \times 10^6/\text{ml}$.

Pro správnou interpretaci výsledků z CASA systému je kromě zmíněné koncentrace důležitý také typ počítačící komůrky a objem vzorku. Pro Maklerovu komůrku se doporučuje objem $4 \mu\text{l}$ (Januskauskas et al. 1999). Pohybové parametry stejně jako celkové procento progresivně se pohybujících spermií může ovlivnit i délka trvání celé analýzy a použité kapacitační médium / ředidlo (Contri et al. 2010).

Příčinou nejčastější chybovosti CASA systému je kromě kolize spermií a nepřenosti trajektorií v důsledku jejich vysoké koncentrace také špatné rozpoznání objektů (Verstegen et al. 2002).

3.5.1.1 Hyperaktivace motility a systém CASA

Jelikož nelze hyperaktivované spermie identifikovat pouhým okem, je využití systému CASA v tomto ohledu nezbytné. Je nutné si však uvědomit, že trajektorie jsou tak komplexní, že nexistuje žádný jediný kinematický parametr, který by spolehlivě definoval hyperaktivovanou motilitu. Proto je nutné souhrnně posoudit všechny parametry a při zhodnocení použít logických argumentů (Mortimer & De Jonge 2018).

Dle Mortimer & Mortimer (1990) je však hlavní rozlišovací charakteristikou hyperaktivace zvýšení amplitudy bičkového ohybu, které může být detekováno prostřednictvím systému CASA jako zvýšení průměrné šířky oscilace hlavičky (ALH).

Broekhuijse et al. (2011) uvádí následující hodnoty kinematických parametrů pro hyperaktivované kančí spermie: VAP $95,1 \pm 20,5$, VSL $68,5 \pm 18,4$, VCL $175,2 \pm 37,3$, ALH $7,3 \pm 1,3$.

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

Pokud není uvedeno jinak, byly pro všechny experimenty použité chemikálie od firmy SIGMA-ALDRICH z USA.

Semenné dávky kance LDZ–67 plemene Ladrance byly získány z inseminační stanice PROAGRO Nymburk a nativní ejakulát kance plemene duroc z inseminační stanice Skršín. Jak inseminační dávky, tak nativní ejakulát byly přepravovány a uchovávány v termoboxu při konstantní teplotě 17 ° C.

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava spermií

Inseminační dávka

Zkumavka typu Falcon, do které bylo odebráno 5 ml inseminační dávky, byla umístěna do centrifugy (Benchmark LC–8 series), kde byla při 300 x g a 17 ° C po dobu 10 minut stáčená. Vzniklý supernatant byl odstraněn pasterkou a k vytvořenému sedimentu spermií byl přidán 1 ml PBS (0,01 M Phosphate buffered Saline; 0,138 M NaCl, 0,0027 M KCl; pH 7,4), ve kterém byly spermie resuspendovány. Objem byl následně doplněn PBS na 5 ml a zkumavka byla opět umístěna do centrifugy. Za účelem promytí spermií od složek ředidla byl tento proces dvakrát opakován. Po dokončení promývání byla provedena kontrola koncentrace spermií prostřednictvím Maklerovy komůrky (Sefi–Medical instruments, Haifa, Izrael, hloubka komory 10 µm), při které byl použit následující výpočet (rovnice 1):

$$\frac{\text{počet spermií} \times \text{faktor konverze}}{\text{velikost pole} \times \text{počet čtverců} \times \text{tloušťka sklíčka} \times \text{ředění}}$$

Rovnice 1: výpočet koncentrace spermií ve vzorku

Pokud byla zjištěna nevyhovující koncentrace, byla upravena ředěním na výslednou koncentraci $2,5 - 5 \times 10^7$ spermií / mililitr.

Nativní ejakulát

Nativní ejakulát byl zředěn v poměru 1:9 s PBS a prostřednictvím Maklerovy komůrky byla provedena kontrola koncentrace.

4.2.2 Příprava kapacitačního média

Pro kapacitaci spermií bylo připraveno kapacitační médium TL–HEPES–PVA. Všechny jeho složky v přesně stanoveném množství byly rozpuštěny v 500 ml ultra čisté H₂O. Složení TL–HEPES–PVA je uvedeno v tabulce 3.

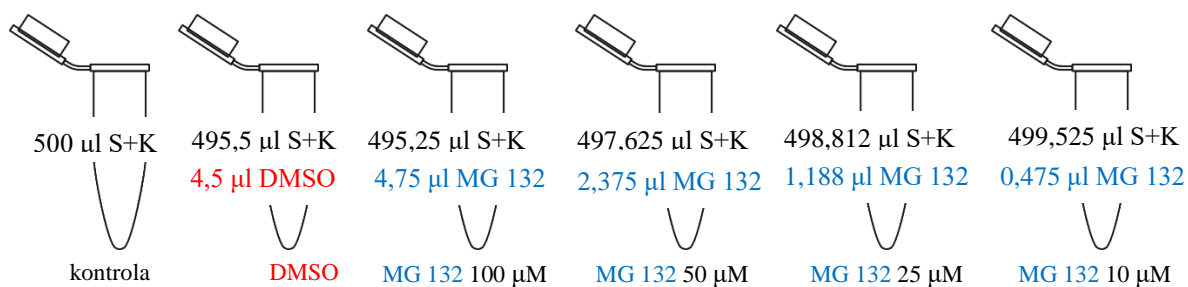
Tabulka 3: Složky kapacitačního média TL–HEPES–PVA.

složka	množství
NaCl	3,33165 g
KCl	0,1193 g
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	0,0204 g
Na laktát	0,70 ml
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	0,05085 g
HEPES	1,1915 g
Na pyruvát	0,011 g
Sorbitol	1,093 g
NaHCO ₃	0,084 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,147 g
Gentamicin	0,0125 ml
Penicilin G	0,0325 g
PVA	0,05 g

pH kapacitačního média bylo prostřednictvím pH metru upraveno na doporučené pH 7,3–7,4. Kapacitační medium bylo následně přefiltrováno přes filtrační papír a do 50 ml vzniklého filtrátu byly přidány následující chemikálie: 0,0275 g Na pyruvátu, 0,099 g glukózy a 1 g BSA.

4.2.3 Kapacitace spermií

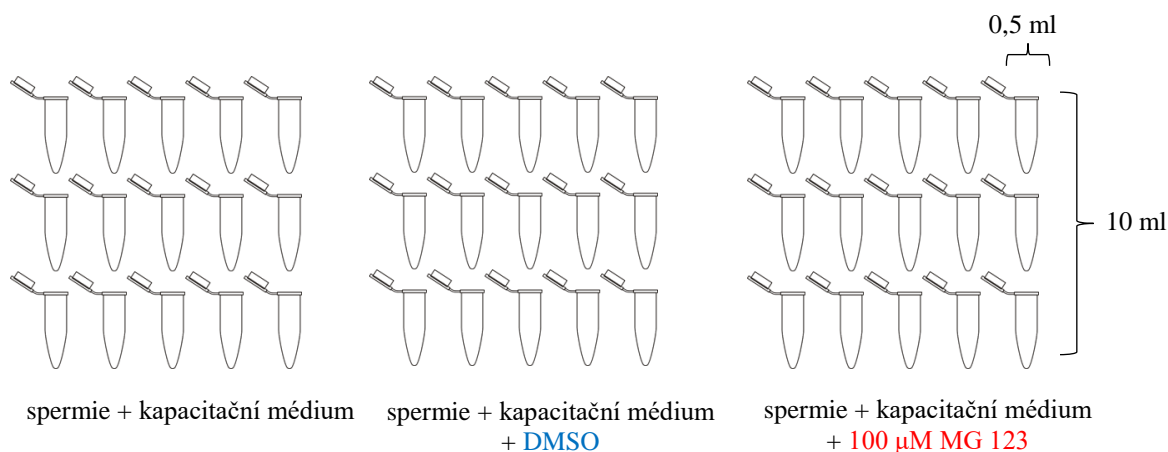
Sediment spermií vzniklý po poslední centrifugaci a zbavený supernatantu byl resuspendován v 10 ml připraveného kapacitačního média TL–HEPES–PVA. Do plastové mikrozkušavky Eppendorf® o objemu 1 ml bylo podle následujícího schématu (obrázek 8) připraveno 6 vzorků. Vzorek s DMSO (dimethylsulfoxid) představoval kontrolu prostředí, ve kterém byl rozpouštěn inhibitor MG 132. Konečná koncentrace DMSO v kapacitačním médiu se spermiemi byla 1%.



Obrázek 8: Schematické znázornění připravených vzorků (S+K – spermie v kapacitačním médiu).

Spermie v takto připravených vzorcích byly pro navození kapacity inkubovány v termostatu při teplotě 38 °C s 5% CO₂ po dobu 2 hodin. Tyto vzorky byly určeny k hodnocení kinetických parametrů systémem CASA.

Dále byly připraveny tři skupiny vzorků z inseminačních dávek, každá o objemu 10 ml, který byl rozpipetován do 20 mikrozkušavek Eppendorf®, viz obrázek 9.



Obrázek 9: Schematické znázornění připravených vzorků spermií určených pro kapacitaci a následnou indukci akrozomální reakce.

Spermie v takto připravených mikrozkušavkách byly pro navození kapacity inkubovány v termostatu při teplotě 38 °C s 5% CO₂ po dobu 2 hodin. Tyto vzorky byly určeny k indukci akrozomální reakce.

4.2.4 Indukce akrozomální reakce

U spermií připravených z inseminačních dávek (viz výše) byla indukována akrozomální reakce.

K suspenzi spermií jednotlivých vzorků byl po dvou hodinách kapacity přidán Ca²⁺ ionofor do finální koncentrace 5 µM. Následovala šedesátiminutová inkubace v termostatu při

teplotě 38 °C s 5% CO₂. Po ukončení inkubace s Ca-ionofrem byla suspenze buněk 3 x promyta. K promývání byla použita centrifugace při 250 x g po dobu 10 minut za pokojové teploty.

4.2.5 Značení akrozomu pomocí PNA lektinu – vlhká fixace

Promyté spermie, které podstoupily inkubaci s Ca-ionofrem, byly resuspendovány v PBS a jejich koncentrace byla zkontrolována pod světelným mikroskopem (Nikon, Tokio, Japonsko). V případě nevyhovující koncentrace bylo buď přidáno více PBS (vysoká koncentrace) anebo bylo znovu provedeno odstředění a sníženo množství přidávaného PBS (nízká koncentrace).

Na podložním sklíčku byla prostřednictvím PAN Pen liquid rockeru vymezena plocha v podobě kolečka, do které bylo nanášeno 20 µl suspenze spermií v PBS a 50 µl vymraženého acetonu a methanolu v poměru 1:1. Jako negativní kontrola byly použity ejakulované spermie. Preparáty pro vlhkou fixaci byly inkubovány 5 minut při pokojové teplotě a následně byly 3x opláchnuty PBS. Takto připravené preparáty byly po zaschnutí uloženy do lednice pro další zpracování.

Sklíčka se spermiemi byla po jejich vyjmutí z lednice opláchnuta PBS. Do vyznačeného kolečka bylo přidáno 150 µl SuperBlocku. Spermie na sklíčku byly následně po dobu 30 minut při pokojové teplotě inkubovány ve vlhké komůrce. Po inkubaci bylo sklíčko opláchnuto PBS. Do kolečka bylo nanášeno 100 µl PNA–Rhod (PNA–FITC) 1:500 v PBS a spermie na sklíčku byly po dobu 30 minut při pokojové teplotě inkubovány ve tmě ve vlhké komůrce. Po inkubaci bylo sklíčko opláchnuto PBS a destilovanou vodou. Po okapání byla do kolečka nanášena kapička (cca 10 µl) VectaShield DAPI, kolečko bylo zakryto krycím sklíčkem a zafixováno lakem na nehty. Sklíčka byla dána do krabičky a uložena do lednice na maximálně 14 dní.

Takto připravené vzorky byly vyhodnocovány pod fluorescenčním mikroskopem (Nikon Eclipse E 600, Tokio, Japonsko) a foceny prostřednictvím kamery (Nikon Digital Sight DS-Fi 1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements. Z celkového množství přibližně 200 buněk byly počítány spermie s intaktním akrozomem a následně bylo vypočítáno procentuální zastoupení spermií, které prošly akrozomální reakcí.

4.2.6 Hodnocení motility

Funkční parametry motility spermií byly hodnoceny prostřednictvím systému CASA (computer assisted semen analysis; NIS AR 4 500, Nikon, Tokyo, Japan a Laboratory Imaging,

Praha, Česká republika) využívající mikroskop Eclipse E600 s fázovým kontrastem (Nikon, Tokyo, Japonsko), který byl dále vybavený ohřevnou deskou (Tokai Hit, Shizuoka, Japonsko), objektivem s negativním fázovým kontrastem (Nikon, Tokio, Japonsko) a digitální kamerou DMK 23UM021 (The Imaging Source, Bremen, Německo).

Všechny vzorky byly hodnoceny každou hodinu inkubace. Celkem tedy byla provedena 2 hodnocení. Dále byl hodnocen vzorek ředěného nativního ejakulátu pro porovnání kinetických parametrů motility spermií se spermiemi v inseminační dávce.

Do předehřáté (38 °C) Maklerovy komůrky byl vložen vzorek se spermiemi o objemu 5 µl. Maklerova komůrka se vzorkem byla umístěna na 38 °C vyhřátou ohřevnou desku mikroskopu. Následně byly zaznamenávány parametry kinetiky spermií v šesti náhodných polích, jejichž analýza byla provedena v programu NIS AR 4500. V něm byly nastaveny tyto parametry (tabulka 4):

Tabulka 4: Nastavení parametrů v programu NIS AR 4500 při hodnocení kinetických parametrů spermií z nasnímaných polí.

max object speed	800 µm/s
StDev Multiplication Factor	2.0 stdev
join tracks up to	3 frames apart
remove track shorter than	31 segments
VAP Averaging	9 points
size	4,25 – 10,84 µm
circularity	0,4- 0,76
elongation	1,95 – 4,54

Výsledné hodnoty šesti kinetických parametrů spermií, konkrétně VCL (curvilinear line velocity, rychlost na skutečné dráze) VSL (straight line velocity, lineární rychlost), VAP (average path velocity; průměrná rychlost pohybu), LIN (linearity, linearita), ALH (amplitude of lateral head displacement, šířka oscilace hlavičky) a STR (straightness, přímost dráhy), byly podrobeny statistické analýze. Spermie s VAP \geq 15 µm/s byly klasifikovány jako pohyblivé.

Tento proces byl opakován u všech šesti vzorků.

4.2.7 Statistické vyhodnocení

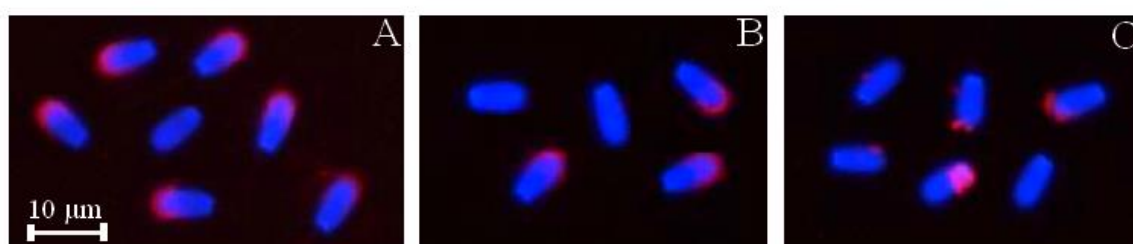
Získaná data byla hodnocena prostřednictvím jednofaktorové a vícefaktorové ANOVY v programu Statistica 12 (StatSoft CR, Prague, Czech Republic). Hladina statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Detekce integrity akrozomu po indukci akrozomální reakce

V prvním experimentu byl sledován vliv inhibitoru proteazomu MG132 na kapacitaci a následnou indukci akrozomální reakce kančích spermií.

Na základě detekce integrity akrozomu pomocí vazby s PNA lektinem byla vyhodnocena indukce akrozomální reakce kalcium ionoforem (kapitola 4.2.4.). Obrázek 10 ukazuje reprezentativní vzorek s detekovaným akrozomem u ejakulovaných (A), kapacitovaných (B) a akrozomálně zreagovaných spermií (C).



Obrázek 10: Detekce integrity akrozomu pomocí vazby PNA lektinu konjugovaného s rhodaminem (červeně), jádra značená DAPI (modře); A – ejakulované, B – kapacitované,

Bylo zjištěno, že přítomnost inhibitoru (100 µM MG132) v kapacitačním médiu snížila procento akrozomálně zreagovaných spermií oproti kontrolním skupinám, samotná akrozomální reakce však inhibitorem potlačena nebyla. Celkové výsledky hodnocení integrity akrozomu u skupiny spermií ejakulovaných, po kapacitaci a po indukci akrozomální reakce ve vzorcích v (nemodifikované médiu, médiu s DMSO a se 100 µM MG132) jsou znázorněny v tabulce 5.

Tabulka 5: Procento akrozomálně zreagovaných spermií u jednotlivých experimentálních skupin.

STAV	CELKOVÝ POČET SPERMIÍ	POČET SPERMIÍ S AKROZOMEM	% AKROZOMÁLNĚ ZREAGOVANÝCH
po ejakulaci	214	180	15,89
po kapacitaci	197	127	35,53
s DMSO	241	189	21,58
se 100 µM MG132	204	159	22,06
po indukci AR	194	25	87,11
s DMSO	221	5	97,73
se 100 µM MG132	202	40	80,19

5.2 Vliv inhibitoru MG132 na motilitu kančích spermií

Dále byl hodnocen vliv inhibitoru MG132 na motilitu kančích spermií během kapacitace *in vitro*. Ten buď neměl na kinetické parametry motility kančích spermií ve sledovaných koncentracích (10, 25, 50 a 100 μM) a časech (0 h, 1 h, 2 h) žádný vliv, anebo byl naopak pozorován negativní efekt inhibitoru, jak je patrné z tabulky 7.

V čase 0 nebyl pozorován signifikantní vliv inhibitoru na kinetické parametry motility v žádné testované koncentraci. Žádný signifikantní rozdíl nebyl pozorován ani při hodnocení všech kinetických parametrů spermií mezi kontrolními vzorky a vzorky s DMSO.

Šířka oscilace hlavičky (ALH) je jediným parametrem, kde byl vůči kontrolní skupině pozorován významný signifikantní rozdíl u všech sledovaných vzorků s inhibitorem (10 μM , 25 μM , 50 μM a 100 μM MG123) v první i druhé hodině kapacitace (10 μM 2h – $p < 0,01$; ostatní $p < 0,001$).

Signifikantní rozdíly u parametru lineární rychlosti (VSL) byly zaznamenány až u skupiny spermií inkubovaných v přítomnosti 50 a 100 μM MG132, a to ve všech hodnocených časech kapacitace (1 h, 2 h). V první hodině kapacitace byl však zaznamenán statisticky významnější rozdíl u skupiny spermií inkubovaných v přítomnosti 50 μM MG132 ($p < 0,01$).

U parametru linearity (LIN) a rychlosti na skutečné dráze (VCL) byly oproti kontrolní skupině spermií zjištěny signifikantní rozdíly ve vzorcích s 50 a 100 μM MG132 v první i druhé hodině inkubace a dále ve vzorcích s 25 μM MG132 v první hodině inkubace ($p < 0,05$).

Negativní efekt inhibitoru na hodnotu průměrné rychlosti pohybu (VAP) spermií byl zjištěn u vzorků s MG132 v koncentracích 25, 50 a 100 μM a to během celé doby inkubace.

U parametru přímost dráhy (STR) byl zjištěn signifikantní rozdíl ve vzorcích s dvěma nejvyššími koncentracemi inhibitoru v první i druhé hodině kapacitace.

Tabulka 6: Vliv inhibitoru MG 132 na motilitu kančích spermií z inseminační dávky během inkubace ve 38 °C

PARAMETR	SKUPINA	ČAS		
		0 h	1 h	2 h
LIN (%)	K	25,79 ± 1,16	35,22 ± 0,82	43,09 ± 4,17
	DMSO	26,16 ± 1,32	37,92 ± 1,43	46,28 ± 1,66
	MG 10 µM	26,52 ± 1,41	38,96 ± 1,61	44,68 ± 4,33
	MG 25 µM	25,48 ± 1,49	40,23 ± 2,06*	43,79 ± 3,91
	MG 50 µM	26,51 ± 1,26	53,57 ± 1,68***	54,53 ± 2,82*
	MG 100 µM	26,22 ± 1,37	54,73 ± 2,03***	54,89 ± 3,47*
STR (%)	K	69,98 ± 2,03	74,91 ± 1,12	73,52 ± 1,18
	DMSO	69,27 ± 2,73	77,43 ± 1,94	77,71 ± 1,38
	MG 10 µM	68,77 ± 2,45	77,08 ± 1,94	72,86 ± 1,97
	MG 25 µM	68,93 ± 2,61	78,82 ± 1,74	78,01 ± 1,89
	MG 50 µM	68,34 ± 2,75	85,42 ± 2,23***	86,06 ± 1,93***
	MG 100 µM	69,02 ± 2,58	82,53 ± 2,35***	81,21 ± 4,53 ***
VAP (µm/s)	K	28,57 ± 1,21	91,61 ± 1,21	74,96 ± 4,41
	DMSO	27,72 ± 1,19	87,97 ± 2,16	77,97 ± 2,87
	MG 10 µM	27,94 ± 1,32	89,99 ± 2,36	63,51 ± 5,8
	MG 25 µM	27,87 ± 1,14	76,53 ± 2,04***	55,34 ± 3,45**
	MG 50 µM	26,99 ± 1,28	73,89 ± 2,47***	59,87 ± 4,24**
	MG 100 µM	28,36 ± 1,42	72,99 ± 2,34***	58,42 ± 3,21**
VCL (µm/s)	K	78,13 ± 1,86	164,77 ± 1,87	143,26 ± 7,65
	DMSO	76,09 ± 1,97	161,29 ± 2,03	146,22 ± 5,34
	MG 10 µM	78,77 ± 1,76	165,36 ± 2,41	133,36 ± 6,27
	MG 25 µM	78,03 ± 1,81	148,05 ± 2,74*	141,07 ± 8,54
	MG 50 µM	77,05 ± 2,01	123,79 ± 2,76***	115,41 ± 6,81*
	MG 100 µM	79,11 ± 1,94	118,54 ± 2,39***	114,12 ± 8,27*
VSL (µm/s)	K	20,11 ± 0,75	70,80 ± 1,56	65,27 ± 2,82
	MG DMSO	19,31 ± 0,92	70,61 ± 2,03	66,36 ± 4,63
	MG 10 µM	19,79 ± 1,03	73,05 ± 1,89	58,19 ± 4,77
	MG 25 µM	19,54 ± 0,96	66,82 ± 1,79	55,63 ± 5,6
	MG 50 µM	19,77 ± 1,12	54,34 ± 2,01**	42,71 ± 3,8*
	MG 100 µM	20,98 ± 0,82	58,76 ± 1,65*	43,54 ± 4,65*
ALH (µm)	K	3,21 ± 0,13	7,31 ± 0,12	6,39 ± 0,42
	DMSO	3,18 ± 0,18	7,48 ± 0,19	6,03 ± 0,18
	MG 10 µM	3,12 ± 0,16	5,82 ± 0,21***	5,79 ± 0,39**
	MG 25 µM	3,19 ± 0,17	5,42 ± 0,27***	4,17 ± 0,44***
	MG 50 µM	3,11 ± 0,12	4,74 ± 0,22***	3,94 ± 0,29***
	MG 100 µM	3,29 ± 0,17	4,59 ± 0,53***	3,79 ± 0,34***

Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl mezi pokusnou skupinou a kontrolní skupinou v daném čase (*p<0.05; ** <0,001 ***p<0.001; LIN: linearita, linearity, STR: přímota dráhy, straightness VAP: průměrná rychlost pohybu, average path velocity; VCL: průměrná rychlost na skutečné dráze, curvilinear velocity; VSL: lineární rychlost, straight-line velocity; ALH: amplituda oscilace hlavičky, amplitude of lateral head displacement; K: kontrola; MG: inhibitor MG123; DMSO – dimethylsulfoxid. Data představují průměr ± směrodatnou odchylku (SD).

5.3 Kinetické parametry spermií v inseminační dávce a nativním ejakulátu

K experimentu byly využívány inseminační dávky z důvodu jejich lepší standardizace. Pro orientační srovnání byl opatřen nativní ejakulát a z jeho vzorků vyhodnoceny kinetické parametry spermií. Při porovnání průměrných hodnot funkčních parametrů motility spermií v inseminační dávce vůči nativnímu ejakulátu byly pozorovány signifikantní rozdíly ($p \leq 0.001$) v linearitě (LIN, linearity), přímosti dráhy (STR, straightness), rychlosti na skutečné dráze (VCL, curvilinear line velocity) a šířce oscilace hlavičky (ALH, average path velocity). Průměrné hodnoty včetně odchylek jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Rozdíly průměrných hodnot kinetických parametrů spermií v inseminační dávce a nativním ejakulátu před kapacitací.

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

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

6 Diskuze

Zralé spermie jsou vysoce kompartmentalizované buňky, které však nemají žádnou významnější transkripční ani translační aktivitu. Z tohoto důvodu má fosforylace a defosforylace proteinů obrovský význam při regulaci důležitých procesů, jakým je právě kapacitace. Během ní dochází nejen ke strukturální a funkční remodelaci samčí pohlavní buňky, ale díky tyrosinové fosforylaci proteinů bičíku i k hyperaktivaci motility, která napomáhá spermii odpoutat se z oviduktálního rezervoáru a následně proniknout skrz kumulus a zona pellucida oocytu (Nassar et al. 1999).

Fosforylační / defosforylační stav proteinů je řízen aktivitou proteinkináz a fosfatáz (Naz & Rajesh 2004). Právě proteinkináza A katalyzuje kromě fosforylace celé řady cílových proteinů také fosforylaci 26S proteazomu, multikatalytického enzymového komplexu, který degraduje proteiny značené ubikvitinem. I přesto, že je proteazomální aktivita regulovaná fosforylací, sama může přímo nebo nepřímo kontrolovat aktivitu proteinkináz (Sutovsky, 2011).

Inhibice proteazomu inhibitorem MG132 mění průběh kapacitace *in vitro* (Kong et al. 2009) a díky současným poznatkům lze předpokládat, že by mohla ovlivnit pohyblivost spermií během kapacitačního procesu a případně i následnou akrozomální reakci.

Zjištěné výsledky na modelu kančích spermií ukazují, že dvě nejvyšší koncentrace (50 a 100 μM) inhibitoru MG132 negativně ovlivnily všechny sledované kinetické parametry motility spermií. V čase 0, tedy ihned po kontaktu spermií s inhibitorem v příslušné koncentraci, nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly, což naznačuje, že pouhý kontakt inhibitoru se samčími pohlavními buňkami změny funkčních parametrů motility nenavozuje.

Studie Songsasen et al. (2002) prokázala, že DMSO (dimethylsulfoxid) ovlivňuje pohyblivost psích spermií. Gilmore et al. (1998) však tvrdí, že u kančích spermií proniká DMSO jejich plazmatickou membránou pomalu, což koreluje i s výsledky z této práce, kdy nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly při hodnocení kinetických parametrů spermií mezi kontrolními vzorky a vzorky s DMSO, ve kterém byl rozpouštěn inhibitor. Tsamakidis et al. (2011) tvrdí, že DMSO jako rozpouštědlo by mělo být u kančích spermií pro aplikace *in vitro* použito v koncentracích nižších než 2 %. Tsamakidis et al. (2011) a Lee et al. (2011)

shodně uvádí, že výrazné snížení motility bylo pozorováno při koncentracích vyšších než 5% DMSO. V této práci byla konečná koncentrace DMSO v kapacitačním médiu se spermii 1%.

Šířka oscilace hlavičky (ALH) je jediným parametrem, kde byl pozorován signifikantní rozdíl ve všech sledovaných koncentracích po první i druhé hodině inkubace. Právě tento parametr, který je odrazem zvýšené amplitudy ohybu bičíku, je dle Mortimer & Mortimer (1990) hlavní rozlišovací charakteristikou hyperaktivace. U kontrolní skupiny byla nejvyšší průměrná hodnota ALH, tj. $7,31 \pm 0,12$ zjištěna v první hodině kapacitace. To zcela koreluje s výsledky Broekhuijse et al. (2011), který udává hodnotu ALH pro hyperaktivované spermie $7,3 \pm 1,3$, či se studií Schmidt & Kamp (2004) udávající hodnotu $8,0 \pm 1,8$.

Zatímco hodnota ALH se v průběhu kapacitace zvyšuje, linearita (LIN, index odchylky dráhy od přímky) dle Mortimer (2000) u kančích spermii v průběhu kapacitace klesá. To je v nesouladu s výsledky z této práce, kdy průměrná hodnota LIN s postupujícím kapacitačním procesem u všech sledovaných vzorků rostla. To by však mohlo být způsobeno v důsledku přítomnosti hydrogenuhličitanu v kapacitačním médiu TL-HEPES-PVA. Efekt zvýšení LIN v přítomnosti hydrogenuhličitanů v inkubačním médiu byl popsán Holtem & Harrisonem (2005). Zvýšení LIN během inkubace spermii popisuje ve své studii i Herreros et al. (2005). Sama o sobě je diskutující již průměrná hodnota LIN před začátkem kapacitace, která se u všech vzorků pohybovala v rozmezí 25,48 – 26,52 %. To by korelovalo s vyšší hodnotou ALH (3,11 – 3,21), neboť dle Mortimer (1997) lze obecně říci, že s rostoucím ALH se LIN zmenšuje. U nehyperaktivovaných spermii by měla být dle Schmidt & Kamp (2004) hodnota ALH $1,3 \pm 0,5$ a hodnota LIN $41,5 \pm 23,5$. Jedno z vysvětlení, proč byly naměřeny výše uvedené hodnoty u ALH a LIN by bylo možné nalézt ve studii Harayama (2018). Ten popisuje u kanců a býků takzvanou „nonfull-type hyperaktivaci“, při které nekapacitované spermie vykazují kruhový pohyb proti směru hodinových ručiček. Yamada et al. (2018) popsali tento typ pohybu u rozmražených býčích spermii, pro kančí spermie však tyto informace chybí. Jelikož probíhala většina experimentů v zimních měsících, vyvstává otázka, zda nebyly spermie vystaveny chladovému šoku.

Pro orientační srovnání byl opatřen nativní ejakulát a z jeho vzorků vyhodnoceny kinetické parametry spermii. Mezi inseminační dávkou a nativním ejakulátem byly zjištěny signifikantní rozdíly v parametrech LIN, STR, VCL a ALH. Vzhledem ke zjištěným hodnotám parametrů motility spermii z inseminační dávky by bylo pro další experimenty vhodnější použít nativní ejakulát, avšak za předpokladu, že bude splňovat předem stanovené parametry.

Ty mohou být u nativních ejakulátů na rozdíl od inseminačních dávek poměrně variabilní, a ne každý nativní ejakulát musí tyto parametry splňovat.

Vliv inhibice proteazomu na kinetické parametry nebyl doposud na kančích spermích zkoumán. Zjištění, že 10 μM koncentrace MG132 neovlivnila (až na hodnotu ALH) motilitu kančích spermíí koreluje s výsledky studie Saldívar-Hernández et al. (2015), která byla provedena na lidských spermích. Vyšší koncentrace inhibitoru MG132 na motilitu spermíí však zkoumána nebyla. Dle zjištěných výsledků je zlomovou hranicí vlivu inhibitoru na motilitu koncentrace 50 μM MG132. Zdá se, že mezi koncentracemi 50 a 100 μM MG132 nejsou s ohledem na funkční parametry motility spermíí významné signifikantní rozdíly.

Akrozomální reakce, která byla po dvou hodinách kapacitace indukována kalcium ionoforem, nastala u 80,19 % spermíí inkubovaných v přítomnosti 100 μM inhibitoru MG132. V kontrolním vzorku proběhla akrozomální reakce u 87,11 % spermíí. Tyto výsledky opět korelují s výsledky studie Saldívar-Hernández et al. (2015), kde akrozomální reakce indukovaná kalcium ionoforem nastala u 75 % spermíí inkubovaných s MG132. To by naznačovalo, že inhibice proteazomu nemá vliv na akrozomální reakci. Je však nutné si uvědomit, že kalcium ionofor je nefyziologickým induktorem, při jehož použití nedochází k aktivaci všech signálních drah účastnících se spouštění fyziologické akrozomální reakce. Indukci akrozomální reakce v přítomnosti inhibitoru MG132 fyziologickým induktorem, progesteronem, provedli ve své studii na lidských spermích Kong et al. (2009), při níž podstoupilo exocytózu akrozomu necelých 20 % spermíí. Ještě důležitější však bylo zjištění, že poté, co byly spermie promyty od MG132, resuspendovány v čerstvém médiu a ošetřeny progesteronem, nebyly schopny akrozomovou reakci stále podstoupit (Kong et al. 2009). Z tohoto důvodu by bylo vhodné při dalších pokusech používat fyziologické induktory (solubilizované glykoproteiny zona pellucida či progesteron), aby byly co nejvíce napodobeny podmínky reprodukčního traktu samice a funkce proteazomu při regulaci akrozomální reakce tak byla lépe pochopena.

7 Závěr

Na základě výsledku experimentu zaměřeného na sledování kinetických parametrů spermií při inhibici proteazomu během kapacitace in vitro byla potvrzena hypotéza, že inhibice ubikvitin–proteazomového systému inhibitorem MG132 ovlivňuje kinetické parametry motility spermií jako markery kapacitace. Zatímco nejnižší koncentrace inhibitoru neměla na motilitu spermií žádný vliv, dvě nejvyšší koncentrace inhibitoru MG132 negativně ovlivnily všechny sledované kinetické parametry spermií, což poukazuje na zapojení proteazomu do regulace motility samčích pohlavních buněk během kapacitačního procesu. Indukce akrozomální reakce nefyziologickým induktorem kalcium ionoforem proběhla u 80,19 % spermií. S ohledem na výsledky studií fyziologicky indukované akrozomální reakce s inhibitorem MG132, nelze s jistotou říci, že by proteazom nebyl do exocytózy akrozomu spermií zapojen. Závěrem lze tedy konstatovat, že role ubikvitin – proteazomového systému v reprodukci by měla být i nadále intenzivně zkoumána.

8 Literatura

- Abou-Haila A, Tulsiani DR. 2000. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of biochemistry and biophysics* **379**:173–82.
- Abou-haila A, Tulsiani DR. 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of biochemistry and biophysics* **485**:72–81.
- Acott TS, Carr DW. 1984. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: 11. Interaction of pH and a quiescence factor. *Eidogy of Reproduction* **30**:926–935.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York.
- Alghamdi AS, Foster DN, Troedsson MHT. 2004. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils and improves fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction* **127**:593–600.
- Alvarez JG, Storey BT. 1983. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O₂ toxicity due to lipid peroxidation. *Biology of Reproduction* **28**:1129–1136.
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as a major enzyme against oxygen toxicity. *Journal of Andrology* **8**:338–348.
- Amann RP, Katz DF. 2004. Andrology lab corner: reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology* **25**:317–325.
- Annison EF, Scott TW, Waites GM. 1963. The role of glucose and acetate in the oxidative metabolism of the testis and epididymis of the ram. *Biochemistry Journale* **88**:482–8.
- Araki N, Trencsenyi G, Krasznai ZT, Nizsaloczki E, Sakamoto A, Kawano N, Miyado K, Yoshida K, Yoshida M. 2015. Seminal vesicle secretion 2 acts as a protectant of sperm sterols and prevents ectopic sperm capacitation in mice. *Biology of Reproduction* **92**:8.
- Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE. 2004. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *International Journal of Developmental Biology* **52**:463–72.
- Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Australian Journal of Scientific Research Series B: Biological Sciences* **4**:581–596.
- Aydin H, Sultana A, Li S, Thavalingam A, Lee JE. 2016. Molecular architecture of the human sperm IZUMO1 and egg JUNO fertilization complex. *Nature* **534**:562.
- Bailey JL. 2010. Factors regulating sperm capacitation. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **56**:334–348.

- Baker MA, Hetherington L, Ecroyd H, Roman SD, Aitken RJ. 2004. Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *Journal of cell science* **117**:211–222.
- Baker MA, Smith ND, Hetherington L, Taubman K, Graham ME, Robinson PJ, Aitken RJ. 2010. Label-free quantitation of phosphopeptide changes during rat sperm capacitation. *Journal of Proteome Research* **9**:18–729.
- Bedford JM. 1991. The co-evolution of mammalian gametes. Pages 3–28 in: Dunbar BS, O’Rand MG, editors. *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*. Plenum Press, New York.
- Belleannee C, Belghazi M, Labas V, Teixeira-Gomes AP, Gatti JL, Dacheux JL, Dacheux F. 2011. Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. *Proteomics* **11**:1952–64.
- Benoff S. 1998. Modelling human sperm–egg interactions in vitro: signal transduction pathways regulating the acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction* **4**:453–471.
- Benoit MJ. 1926. Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques sur les voies excrétoires du testicule, chez les mammifères. *Arch Anat Histol Embryol* **5**:173–412.
- Berruti G, Paiardi C. 2011. Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis* **1**:95–98.
- Berruti G, Ripolone M, Ceriani M. 2010. USP8, a Regulator of Endosomal Sorting, Is Involved in Mouse Acrosome Biogenesis Through Interaction with the Spermatid ESCRT-0 Complex and Microtubules. *Biology of Reproduction* **82**:930–939.
- Bettgowda A, Wilkinson MF. 2010. Transcription and post-transcriptional regulation of spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**:1637–51.
- Boatman DE, Robbins RS. 1991. Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biology of Reproduction* **44**:806–813.
- Bompart D, García-Molina A, Valverde A, Caldeira C, Yániz J, de Murga MN, Soler C. 2018. CASA-Mot technology: how results are affected by the frame rate and counting chamber. *Reproduction, Fertility and Development* **30**:810–9.
- Breitbart H, Spungin B. 1997. The biochemistry of the acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction* **3**:195–202.
- Broekhuijse ML, Šoštarić E, Feitsma H, Gadella BM. 2012. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *Journal of animal science* **90**:779–89.
- Brooks DE. 1973. Epididymal and testicular temperature in the unrestrained conscious rat. *Journal of Reproduction & Fertility* **35**:157–60.

- Caballero I, Vazquez JM, García EM, Parrilla I, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Martinez EA. 2008. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology* **70**:1352–5.
- Calvete JJ, Carrera E, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1996. Boar spermadhesins AQN-1 and AQN-3: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *Biological Chemistry* **377**:521–527.
- Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Töpfer-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.
- Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1994. Spermadhesins: structure–functions, relationships. *Ass Rep Androl* **6**:316–330.
- Carr DW, Usselman MC, Acott TS. 1985. Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biology of Reproduction* **33**:588–595.
- Clark AT, Firozi K, Justice MJ. 2004. Mutation in a novel locus on mouse chromosome 11 resulting in male infertility associated with defect ion microtubule assembly and sperm tail function. *Biology of reproduction* **70**:1317–1324.
- Cobb M. 2012. An amazing 10 years: the discovery of egg and sperm in the 17th century. *Reproduction in domestic animals* **47**:2–6.
- Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A. 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* **74**:424–35.
- Cooper GW, Overstreet JW, Katz DF. 1979. The motility of rabbit spermatozoa recovered from the female reproductive tract. *Gamete Research* **2**:35–42.
- Cooper TG, Yeung CH, Jones R, Orgebin-Crist MC, Robaire B. 2002. Rebuttal of a role of the epididymis in sperm quality control by phagocytosis of defective sperm. *Journal of Cell Science* **115**:5–7.
- Cooper TG. 2010. Semen analysis. Pages 125–138 in *Andrology*. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. *Andrology*. Springer, Berlin.
- Cornwall GA, Von Horsten HH, Swartz D, Johnson S, Chau K, Whelley S. 2007. Extracellular quality control in the epididymis. *Asian journal of andrology* **9**:500–7.
- Coy P, García-Vázquez FA, Visconti PE, Avilés M. 2012. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction* **144**:649–660.
- Dacheux JL, Belghazi M, Lanson Y, Dacheux F. 2006. Human epididymal secretome and proteome. *Molecular and Cellular Endocrinology* **250**:36–42.
- Dacheux JL, Castella S, Gatti JL, Dacheux F. 2005. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* **63**:319–41.

- Dacheux JL, Dacheux F. 2013. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction* **147**:R27–42.
- Dapino DG, Marini PE, Cabada MO. 2006. Effect of heparin on in vitro capacitation of boar sperm. *Biological research* **39**:631–9.
- Davis BK. 1981. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/ phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**:7560–7564.
- De Blas GA, Roggero CM, Tomes CN, Mayorga LS. 2005. Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS biology* **3**:e323.
- De Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. 1998. Spermatogenesis. *Human reproduction* **13**:1–8.
- de Lamirande E, Gagnon C. 1993. Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertility and Sterility* **59**:1291–1295.
- De Rooij DG. 2017. The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development* **144**:3022–30.
- Ded L, Dostalova P, Dorosh A, Dvorakova-Hortova K, Peknicova J. 2010. Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology* **81**:87.
- Delgado NM, Reyes R, Huacuja L, Merchant H, Rosado A. **1982**. Heparin binding sites in human spermatozoa membrane. *Archives of Andrology* **8**:87–95.
- DeMott RP, Lefebvre R, Suarez SS. 1995. Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviduct epithelium. *Biology of Reproduction* **52**:1395–1403.
- Desnoyers L, Manjunath P. 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *The Journal of Biological Chemistry* **267**:10149–10155.
- Dostálová Z, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E. 1995. Boar spermadhesin AWN-1: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. *European journal of biochemistry*. **230**:329–36.
- Downing Meisner A, Klaus AV, O'Leary MA. 2005. Sperm head morphology in 36 species of artiodactylans, perissodactylans, and cetaceans (Mammalia). *Journal of Morphology* **263**:179–202.
- Druart X, de Graaf S. 2018. Seminal plasma proteomes and sperm fertility. *Animal Reproduction Science* **194**:33–40.
- Eddy EM, Toshimori K, O'Brien DA. 2003. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microscopy research and technique* **61**:103–15.

- Ekhlas-Hundrieser M, Gohr K, Wagner A, Tsoлова M, Petrunkina A, Töpfer-Petersen E. 2005. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biology of Reproduction* **73**:536–545.
- Fawcett DW. 1975. The mammalian spermatozoon. *Developmental biology* **44**:394–436.
- Fayomi AP, Orwig KE. 2018. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men, *Stem Cell Research* **29**:207–214.
- Ferramosca A, Zara V. 2014. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *BioMed research international*.
- Flesch FM, Colenbrander B, van Golde LM, Gadella BM. 1999. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **262**:787–792.
- Flesch FM, Wijnand E, van de Lest CH, Colenbrander B, van Golde LM, Gadella BM. 2001. Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida. *Molecular Reproduction and Development* **60**:107–115.
- Florman HM, Arnoult C, Kazam IG, Li C, O'Toole CM. 1998. A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels. *Biology of Reproduction* **59**:12–6.
- Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. 2008. Regulating the acrosome reaction. *The International Journal of Developmental Biology* **52**:503–10.
- Foldesy RG, Bedford JM. 1982. Biology of the scrotum. I. Temperature and androgen as determinants of the sperm storage capacity of the rat cauda epididymidis. *Biology of Reproduction* **26**:673–82.
- Fouchécourt S, Métayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux JL. 2000. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biology of Reproduction* **62**:1790–1803.
- Fraile B, Martin R, De Miguel MP, Arenas MI, Bethencourt FR, Peinado F, Paniagua R, Santamaria L. 1996. Light and electron microscopic immunohistochemical localization of protein gene product 9.5 and ubiquitin immunoreactivities in the human epididymis and vas deferens. *Biology of Reproduction* **55**:291–7.
- Frankenhuis MT, Kramer MF, De Rooij DG. 1982. Spermatogenesis in the boar. *Veterinary quarterly* **4**:57–61.
- Franklin LE. 1970. Fertilization and the role of the acrosomal region in non-mammals. *Biology of Reproduction* **2**:159–76.
- Fraser LR. 1987. Minimum and maximum extracellular Ca² requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *Journal reproduction and fertility* **81**:77–89.

- Freitas MJ, Vijayaraghavan S, Fardilha M. 2017. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biology of reproduction* **96**:2–12.
- Gadella BM, Visconti PE. 2006. Regulation of capacitation. *The sperm cell: Production, maturation, fertilization, regeneration* **1**:134–69.
- Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Métayer S, Thimon V, Dacheux JL. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal Reproduction Science* **82–83**:321–39.
- Gervasi MG, Visconti PE. 2016. Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. *Molecular reproduction and development* **83**:1.
- Geussova G, Kalab P, Peknicova J. 2002. Valosine containing protein is a substrate of cAMP-activated boar sperm tyrosine kinase. *Molecular Reproduction and Development* **63**:366–375.
- Gibbons R, Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR. 2005. A mouse sperm decapacitation factor receptor is phosphatidylethanolamine-binding protein 1. *Reproduction* **130**:497–508.
- Gilbert SF. 2000. *Developmental Biology*. 6th edition. Palgrave Macmillan, London.
- Gilmore JA, Liu J, Peter AT, Critser JK. 1998. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biology of Reproduction* **58**:28–36.
- Goldberg AL, Stein R, Adams J. 1995. New insights into proteasome function: from archaeobacteria to drug development. *Chemistry & biology* **2**:503–8.
- Goldberg AL. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**:895–899.
- Gupta SK, Bhandari B. 2011. Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian journal of andrology* **13**:97.
- Guraya SS. 1987. Spermatids and Spermiogenesis. Pages 108–169 in: Guraya S. *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*. Springer, Berlin.
- Gurupriya VS, Roy SC, Dhama K, Gopinath D, Rekha V, Aswathi PB, John JK, Gopalakrishnan A. 2014. Proteases and proteases inhibitors of semen—a review. *Adv. Anim. Vet. Sci* **2**:447–56.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **280**:1–8.
- Harayama H. 2018. Flagellar hyperactivation of bull and boar spermatozoa. *Reproductive medicine and biology* **17**:442–8.
- Herrero MB, Gagnon C. 2001. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *Journal of Andrology* **22**:349–356.

- Herreros MG, Aparicio IM, Núñez I, García-Marín LJ, Gil MC, Vega FP. 2005. Boar sperm velocity and motility patterns under capacitating and non-capacitating incubation conditions. *Theriogenology* **63**:795–805.
- Hofmann MC. 2008. Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Molecular and Cellular Endocrinology* **288**:95–103.
- Holt W, Fazeli A. 2018. Sperm Transport and Selection in Mammals. Reference Module in Biomedical Sciences.
- Huang TT, Fleming AD, Yanagimachi R. 1981. Only acrosome-reacted spermatozoa can bind to and penetrate zona pellucida: a study using the guinea pig. *Journal of Experimental Zoology* **217**:287–90.
- Hunter RH, Leglise PC. 1971. Polyspermic fertilization following tubal surgery in pigs, with particular reference to the role of the isthmus. *Journal of Reproduction & Fertility* **24**:233–246.
- Hunter RHF. 1984. Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory distribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *Journal of Reproduction & Fertility* **72**:203–211.
- Hunter RH, Nichol R, Crabtree SM. 1980. Transport of spermatozoa in the ewe: timing of the establishment of a functional population in the oviduct. *Reproduction Nutrition Development* **20**:1869–1875.
- Champroux A, Torres-Carreira J, Gharagozloo P, Drevet JR, Kocer A. 2016. Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic and clinical andrology* **1**:17.
- Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* **168**:697–698.
- Inoue N, Hagihara Y, Wright D, Suzuki T, Wada I. 2015. Oocyte-triggered dimerization of sperm IZUMO1 promotes sperm–egg fusion in mice. *Nature communications* **6**:8858.
- Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* **434**:234.
- Jager S. 1990. Sperm Nuclear Stability and Male Infertility. *Archives of Andrology* **25**:253–259.
- Jaiswal BS, Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Eisenbach M. 1998. Sperm capacitation is, after all, a prerequisite for both partial and complete acrosome reaction. *FEBS letters* **427**:309–13.
- James PS, Hennessy C, Berge T, Jones R. 2004. Compartmentalisation of the sperm plasma membrane: a FRAP, FLIP and SPFI analysis of putative diffusion barriers on the sperm head. *Journal of Cell Science* **117**:6485–6495.
- James PS, Hennessy C, Berge T, Jones R. 2004. Compartmentalisation of the sperm plasma membrane: a FRAP, FLIP and SPFI analysis of putative diffusion barriers on the sperm head. *Journal of cell science* **117**:6485–95.

- Janmey PA. 1994. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annual Review of Physiology* **56**:169–191.
- Jansen S, Ekhlesi-Hundrieser M, Töpfer-Petersen E. 2001. Sperm adhesion molecules: structure and function. *Cells Tissues Organs* **168**:82–92.
- Januskauskas A, Gil J, Söderquist L, Hrd MG, Hrd MC, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 1999. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* **52**:641–58.
- Jelinkova P, Liberda J, Manaskova P, Ryslava H, Jonakova V, Ticha M. 2004a. Mannan-binding proteins from boar seminal plasma. *Journal Reproductive Immunology* **62**:167–182.
- Jelinkova P, Ryslava H, Liberda J, Jonakova V, Ticha M. 2004b. Aggregated forms of bull seminal plasma proteins and their heparin-binding activity. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **69**:616–630.
- Jenkins AD, Lechene CP, Howards SS. 1980. Concentrations of seven elements in the intraluminal fluids of the rat seminiferous tubules, rate testis, and epididymis. *Biology of Reproduction* **23**:981–7.
- Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R. 1989. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Research* **24**:185–196.
- Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, Chiba K, Hirohashi N. 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**:4892–6.
- Johnson L, Varner DD. 1988. Effect of daily spermatozoan production but not age on transit time of spermatozoa through the human epididymis. *Biology of Reproduction* **39**:812–7.
- Jonakova V, Kraus M, Veselsky L, Cechova D, Bezouska K, Ticha M. 1998. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *Journal of Reproduction & Infertility* **114**:25–34.
- Jones R. 2004. Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: a hypothesis. 2004. *Biology of Reproduction* **71**:1405–11.
- Juyena NS, Stelletta C. 2013. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology* **33**:536–551.
- Katz DF, Drobnis EZ, Overstreet JW. 1989. Factors regulativ mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Research* **22**:443–469.
- Kerns K, Morales P, Sutovsky P. 2016. Regulation of sperm capacitation by the 26S proteasome: an emerging new paradigm in spermatology. *Biology of reproduction* **94**:117.

- Kim S, Lee YJ, Ji DB, Kim YJ. 2011. Evaluation of different cryoprotectants (CPAs) in boar semen cryopreservation. *Journal of Veterinary Medical Science* **73**:961–3.
- Kong M, Diaz ES, Morales P. 2009. Participation of the human sperm proteasome in the capacitation process and its regulation by protein kinase A and tyrosine kinase. *Biology of reproduction* **80**:1026–35.
- Kordan W, Holody D, Eriksson B, Fraser L, Rodriguez-Martinez H, Strzezek J. 1998. Sperm Motility Inhibiting Factor (SMIF) – A Plasmatic Peptide with Multifunctional Biochemical Effects on Boar Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* **33**:347–354.
- Kwok SC, Soares MJ, McMurtry JP, Yurewicz EC. 1993a. Binding characteristics and immunolocalization of porcine seminal protein, PSP-I. *Molecular Reproduction and Development* **35**:244–250.
- Kwok SC, Yang D, Dai G, Soares MJ, Chen S, McMurtry JP. 1993b. Molecular cloning and sequence analysis of two porcine seminal proteins, PSP-I and PSP-II: new members of the spermadhesin family. *DNA Cell Biology* **12**:605–610.
- Lamirande E, Gagnon C. 2006. Controls of sperm motility. The sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration. Cambridge, UK. **2006**:108–33.
- Lebelo SL, Van Der Horst G. 2016. Ultrastructural changes occurring during spermiogenesis of the vervet monkey, *Chlorocebus aethiops*. *Asian Journal of Animal Sciences* **10**:247–54.
- Leblond CP, Clermont Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences* **55**:548–73.
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. 1998. Interaction between Ca²⁺, cyclic 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation. *Journal of andrology* **19**:434–443.
- Lee YJ, Kim S, Ji DB, Kim YJ. 2011. Evaluation of Different Cryoprotectants (CPAs) in Boar Semen Cryopreservation. *Journal of Veterinary Medicine Science* **73**:961–3.
- Lechtreck KF, Delmotte P, Robinson ML, Sanderson MJ, Witman GB. 2008. Mutations in *Hydin* impair ciliary motility in mice. *Journal of Cell Biology* **180**:633–643.
- Lishko PV, Mallowitz N. 2018. CatSper: a unique calcium channel of the sperm flagellum. *Current opinion in physiology* **2**:109–13.
- Liu CW, Jacobson AD. 2013. Functions of the 19S complex in proteasomal degradation. *Trends in biochemical sciences* **38**:103–10.
- Luconi M, Krausz C, Forti G, Baldi E. 1996. Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biology of Reproduction* **55**:207–216.

- Maňásková P, Pěkníková J, Elzeinova F, Ticha M, Jonakova V. 2007. Origin, localization and binding abilities of boar DQH sperm surface protein tested by specific monoclonal antibodies. *Journal of reproductive immunology* **74**:103–13.
- Mann T. 1964. *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. 2nd ed. Methuen, London, United Kingdom.
- Marchiani S, Tamburrino L, Muratori M, Baldi E. Pages 457–478 in: Simoni M, Huhtaniemi IT, editors. *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction*. Springer, Berlin.
- Marion GD. 1950. The effect of sterile copulation on time of ovulation in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*. **33**:885–889.
- Martin-Hidalgo D, Gil MC, de Llera AH, Perez CJ, Bragado MJ, Garcia-Marin LJ. 2018. Boar sperm hyperactivated motility is induced by temperature via an intracellular calcium-dependent pathway. *Reproduction, Fertility and Development* **30**:1462–71.
- Matějčíková J, Kubíčková L, Sedlářiková L, Potáčová A, Hájek R, Sevčíková S. 2013. Degradation of proteins by ubiquitin proteasome pathway. *Klinická onkologie: časopis České a Slovenské onkologické společnosti* **26**:251–6.
- McGrady AV, Nelson L. 1872. Cationic influences on sperm biopotentials. *Experimental Cell Research* **73**:192–196.
- Meistrich ML, Hughes TJ, Bruce WR. 1975. Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by oestrogen and testosterone. *Nature* **258**:145.
- Miller DJ. 2015. Regulation of Sperm Function by Oviduct Fluid and the Epithelium: Insight into the Role of Glycans. *Reproduction in Domestic Animals* **50**:31–39.
- Millette CF. 1999. Spermatozoa. *Encyclopedia of Reproduction* **1**:586–596.
- 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**:489–99.
- Morales P, Diaz ES, Kong M. Proteasome activity and its relationship with protein phosphorylation during capacitation and acrosome reaction in human spermatozoa. *Society for Reproduction and Fertility* **65**:269–273.
- Mortimer ST, De Jonge CH. 2018. *CASA dComputer-Aided Sperm Analysis*. Reference Module in Biomedical Sciences.
- Mortimer ST, Mortimer D. 1990. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *Journal of Andrology* **11**:195–203.
- Mortimer ST. 2000. CASA—practical aspects. *Journal of andrology* **21**:515–24.
- Mortimer TS. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction* **3**:403–439.

- Moura AA, Memili E. 2016. Functional aspects of seminal plasma and sperm proteins and their potential as molecular markers of fertility. *Animal Reproduction* **13**:191–9.
- Mullins KJ, Saacke RG. 1989. Study of the functional anatomy of bovine cervical mucosa with special reference to mucus secretion and sperm transport. *Anatomical Record* **225**:106–117.
- Murray SC, Smith TT. 1997. Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation. *Fertility and Sterility* **68**:351–357.
- Nakanishi, T, Isotani, A, Yamaguchi, R, Ikawa, M, Baba, T, Suarez, SS, Okabe, M. 2004. Selective passage through the uterotubal junction of sperm from a mixed population produced by chimeras of calmegin-knockout and wild-type male mice. *Biology of Reproduction* **71**:959–965.
- Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, Oehninger S. 1999. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertility and Sterility* **71**:919–923.
- Naz RK, Rajesh PB. 2004. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology* **2**:75.
- Nixon B, MacIntyre DA, Mitchell LA, Gibbs GM, O'Bryan M, Aitken RJ. 2006. The identification of mouse sperm-surface-associated proteins and characterization of their ability to act as decapacitation factors. *Biology of Reproduction* **74**:275–287.
- O'Leary S, Jasper MJ, Warnes GM, Armstrong DT, Robertson SA. 2004. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. *Reproduction* **128**:237–247.
- Okabe M. 2013. The cell biology of mammalian fertilization. *Development* **140**:4471–4479.
- Okamura N, Tajima Y, Sugita Y. 1988. Decrease in bicarbonate transport activities during epididymal maturation in porcine sperm. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **157**:1280–1287.
- Orgebin-Crist MC, Danzo BJ, Davies J. 1975. Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. Pages 319–338 in Greep RO, Astwood EB, editors. *Handbook of Physiology*. American Physiological Society, Washington, DC.
- Overstreet JW, 1983. Transport of gametes in the reproductive tract of the female mammal. Pages 499–543 in Hartmann JF, editor. *Mechanism and Control of Animal Fertilization*. Academic Press, New York.
- Pariset CC, Feinberg JM, Dacheux JL, Weinman SJ. 1985. Changes in calmodulin level and cAMP-dependent protein kinase activity during epididymal maturation of ram spermatozoa. *Reproduction* **74**:105–12.

- Pastor-Soler N, Beaulieu V, Litvin TN, Da Silva N, Chen Y, Brown D, Buck J, Levin LR, Breton S. 2003. Bicarbonate-regulated adenylyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling. *Journal of Biological Chemistry* **278**:49523–9.
- Perry AC, Jones R, Niang LS, Jackson RM, Hall L. 1992. Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. *Biochemical Journal* **285**:863–870.
- Phillips BT, Gassei K, Orwig KE. 2010. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**:1663–78.
- Quill TA, Sugden SA, Rossi KL, Doolittle LK, Hammer RE, Garbers DL. 2003. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**:14869–74.
- Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. 2001. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of reproduction* **65**:462–70.
- Rechsteiner M, Hill CP. 2005. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends in Cell Biology* **15**:27–33.
- Robaire B, Hinton BT, Orgebin-Crist MC. 2006. The epididymis. Pages 1071–1148 in: Neill JD. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier, London.
- Robertson SA. 2005. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Research* **322**:43–52.
- Rodriguez-Martinez H, Ekstedt E, Einarsson S. 1990. Acidification of epididymal fluid in the boar. *International Journal of Andrology* **13**:238–243.
- Rodriguez-Martinez H, Ekstedt E, Ridderstråle Y. 1991. Histochemical localization of carbonic anhydrase in the female genitalia of pigs during the oestrous cycle. *Acta Anatomica (Basel)* **140**:41–47.
- Rodriguez-Martinez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A, Vazquez JM, Martinez E, Roca J, Sanz, L Calvete, JJ. 2005: Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology* **63**:514–535.
- Russell LD, Russell JA, MacGregor GR, Meistrich ML. 1991. Linkage of manchette microtubules to the nuclear envelope and observations of the role of the manchette in nuclear shaping during spermiogenesis in rodents. *American journal of anatomy* **192**:97–120.
- Sakai N, Sawada MT, Sawada H. 2004. Non-traditional roles of ubiquitin–proteasome system in fertilization and gametogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**:776–84.
- Saldívar-Hernández A, González-González ME, Sánchez-Tusié A, Maldonado-Rosas I, López P, Treviño CL, Larrea F, Chirinos M. 2015. Human sperm degradation of zona pellucida proteins contributes to fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology* **13**:99.

- Shalgi R, Smith TI, Yanagimachi R. 1992. A quantitative passage of capacitated and uncapacitated hamster spermatozoa through the uterotubal junction. *Biology of Reproduction* **46**:419–424.
- Sharon M, Taverner T, Ambroggio XI, Deshaies RJ, Robinson CV. 2006. Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes. *PLoS biology* **4**:e267.
- Schmidt H, Kamp G. 2004. Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction* **128**:171–9.
- Sloter E, Schmid TE, Marchetti F, Eskenazi B, Nath J, Wyrobek AJ. 2006. Quantitative effects of male age on sperm motion. *Human Reproduction* **21**:2868–75.
- Songsasen N, Yu I, Murton S, Paccamonti DL, Eilts BE, Godke RA, Leibo SP. 2002. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. *Cryobiology* **44**:79–90.
- Souza CE, Moura AA, Monaco E, Killian GJ. 2008. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Animal Reproduction Science* **105**:72–89.
- Spungin B, Margalit I, Breitbart H. 1995. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system. Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *Journal of Cell Science* **108**:2525–2535.
- Stauss CR, Votta Ti, Suarez SS. 1995. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biology of Reproduction* **53**:1280–1285.
- Stévant I, Papaioannou MD, Nefa S. 2018. A brief history of sex determination. *Molecular and Cellular Endocrinology* **468**:3–10.
- Strzezek J, Holody D. 1996. Separation of 54 kDa glycoprotein with suppressive properties from boar seminal plasma. *Adv Contra Deliv Syst* **12**:235–246.
- Strzeżek J, Kordan W, Kostyra H, Zaborniak A. 1992. Purification and partial characterization of a 5700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. *Animal Reproduction Science* **29**:35–52
- Suarez S. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. 2002. *Reproduction in Domestic Animals* **37**:140–143.
- Suarez SS, Dai XB, Demott RP, Redfern K, Miranda MA. 1992. Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated in vitro. *Journal of Andrology* **13**:75–80.
- Suarez SS, I Revah, M Lo, S Kölle. 1998. Bull sperm binding to oviductal epithelium is mediated by Ca²⁺-dependent lectin on sperm that recognizes lewis-a trisaccharide. *Biology of Reproduction* **59**:39–44.

- Suarez SS, Pacey AA. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human reproduction update* **12**:23–37.
- Suarez SS. 1996. Hyperactivated motility in sperm. *Journal of andrology* **17**:331–5.
- Sun XH, Zhu YY, Wang L, Liu HL, Ling Y, Li ZL, Sun LB. 2017. The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology* **15**:65.
- Sutovsky P, Manandhar G. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. Pages 1–30 in: Jonge CHJ, Barratt CH, editors. *The Sperm Cell : Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sutovsky P, McCauley TC, Sutovsky M, Day BN. 2003. Early degradation of paternal mitochondria in domestic pig (*Sus scrofa*) is prevented by selective proteasomal inhibitors lactacystin and MG132. *Biology of Reproduction* **68**:1793–800.
- Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE, Schatten G. 2001. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *Journal of Cell Science* **114**:1665–75.
- Sutovsky P, Van Leyen K, McCauley T, Day BN, Sutovsky M. 2004. Degradation of paternal mitochondria after fertilization: implications for heteroplasmy, assisted reproductive technologies and mtDNA inheritance. *Reproductive biomedicine online* **8**:24–33.
- Sutovsky P. 2011. Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction* **142**:1.
- Suzuki K, Mori T, Shimizu H. 1994. In vitro fertilization of porcine oocytes in chemically defined medium. *Theriogenology* **42**:1357–1368.
- Talevi R, Gualtieri R. 2010. Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release. *Theriogenology* **73**:796–801.
- Tanaka K. 2009. The proteasome: overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **85**:12–36.
- Tardif S, Dubé C, Bailey JL. 2003. Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biology of reproduction* **68**:207–13.
- Tokuhiro K, Ikawa M, Benham AM, Okabe M. 2012. Protein disulfide isomerase homolog PDILT is required for quality control of sperm membrane protein ADAM3 and male fertility. *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America* **109**:3850–3855.
- Toshimori K, Eddy EM. 2015. The spermatozoon. Pages 99–148 in: Plant TM, Zeleznik AJ, Albertini, editors. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Elsevier/Academic, New York.
- Toshimori K, Chizuru I. 2003. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Archives of Histology and Cytology* **66**:383–396.

- Toshimori K, Ito C. 2003. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Archives of histology and cytology* **66**:383–96.
- Toshimori K. 2009. Dynamics of the mammalian sperm head: modifications and maturation events from spermatogenesis to egg activation. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology* **204**:5–94.
- Troedsson MHT, Desvousges A, Alghamdi AS, Dahms B, Dow CA, Hayna J, Valesco R, Collahan PT, Macpherson ML, Pozor M, Buhi MC. 2005. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science* **89**:171–186.
- Tsakmakidis IA, Khalifa T, Lymberopoulos AG, Michos IA, BOSKOS C. 2017. Evaluation of common in vitro used chemicals' effect on motility and chromatin stability of boar spermatozoa. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* **62**:118–24.
- Tulsiani DR, Abou-Haila A. 2012. Biological processes that prepare mammalian spermatozoa to interact with an egg and fertilize it. *Scientifica*.
- Tung CK, Hu L, Fiore AG, Ardon F, Hickman DG, Gilbert RO, Suarez SS and Wu M. 2015. Microgrooves and fluid flows provide preferential passageways for sperm over pathogen tritrichomonas foetus. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America* **112**:5431–5436.
- Turner RM. 2006. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development* **18**:25–38.
- Turner TT. 1984. Resorption versus secretion in the rat epididymis. *Journal of reproduction and fertility* **72**:509–14.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* **57**:149–179.
- Veselsky L, Dostal J, Kraus M, Peknicova J, Holan V, Zajicova A, Jonakova V, Zelezna B. 2002. Reverse effect on indomethacin on the immunosuppressive activity of boar seminal immunosuppressive fraction. *Animal Reproduction Science* **71**:111–123.
- Vijayaraghavan S, Bhattacharyya A, Hoskins DD. 1989. Calcium uptake by bovine epididymal spermatozoa is regulated by the redox state of the mitochondrial pyridine nucleotides. *Biology of Reproduction* **40**:744–51.
- Villemure M, Lazure C, Manjunath P. 2003. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1**:39–48.
- Viring S, Einarsson S. 1981. Sperm distribution within the genital-tract of naturally inseminated gilts. *Nord Vet Med* **33**:145–9.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121**:1129–1137.

- Wilson EB. 1925. *The Cell in Development and Heredity*. Macmillan, New York.
- Wojcik C, DeMartino GN. 2003. Intracellular localization of proteasomes. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **35**:579–589.
- Wong PY, Yeung CH. 1978. Absorptive and secretory functions of the perfused rat cauda epididymidis. *The Journal of Physiology* **275**:13–26.
- Yamada A, Sakase M, Fukushima M, Harayama H. 2018. Reconsideration of the evaluation criteria for bull ejaculated sperm motility in the context of rotation. *Journal of Reproduction and Development* **64**: 377–384.
- Yamaguchi R, Yamagata K, Ikawa M, Moss SB, Okabe M. 2006. Aberrant distribution of adam3 in sperm from both angiotensin-converting enzyme (ace)- and calmegin (clgn)-deficient mice. *Biology of Reproduction* **75**:760–766.
- Yamaguchi, R, Fujihara, Y, Ikawa, M, Okabe, M. 2012. Mice expressing aberrant sperm-specific protein PMIS2 produce normal-looking but fertilization-incompetent spermatozoa. *Molecular Biology of the Cell* **23**:2671–2679.
- Yanagimachi R. 1969. In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *Journal of reproduction and fertility* **18**:275–286.
- Yanagimachi R. 1970. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *Journal of reproduction and fertility* **23**:193–196.
- Yanagimachi R. 1981. Mechanisms of fertilization in mammals. Pages 81–182 in: Mastroianni L Jr, Biggers JD, editors. *Fertilization and Early Embryonic Development In Vitro*. Plenum Press, New York.
- Yanagimachi R. 1982. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. *Gamete Research* **5**:323–344.
- Yanagimachi R. 1994. The spermatozoon. Pages 189–317 in: Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York.
- Yeste M, Bonet S, Rodríguez-Gil JE, Del Álamo MM. 2018. Evaluation of sperm motility with CASA-Mot: which factors may influence our measurements?. *Reproduction, Fertility and Development* **30**:789–98.
- Zaneveld LJ, De Jonge CJ. 1991. Mammalian sperm acrosomal enzymes and the acrosome reaction. Pages 63–79 in Dunbar BS, O'Rand MG, editors. *A comparative overview of mammalian fertilization*. Springer, Boston, MA.
- Zimmerman S, Sutovsky P. 2009. The sperm proteasome during sperm capacitation and fertilization. *Journal of reproductive immunology* **83**:19–25.