

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Média pro *in vitro* kapacitaci spermií  
Bakalářská práce**

**Autor práce:  
Bednářová Petra  
Speciální chovy**

**Vedoucí práce:  
Ing. Filipa Bubeníčková, Ph.D.**

**© 2022 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Média pro *in vitro* kapacitaci spermií" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24.4. 2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Filipě Bubeníčkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

# Média pro *in vitro* kapacitaci

## Souhrn

Tato bakalářská práce shromažďuje dosavadní poznatky o kapacitačních médiích pro *in vitro* kapacitaci spermií, u vybraných hospodářských zvířat. Pro pochopení účinku složek jednotlivých médií byly do této práce zahrnuty poznatky o kapacitačních procesech, které určité látky, jako například bikarbonát nebo vápník stimulují.

Do kapacitačních procesů se zahrnuje například vystavení plazmatického cholesterolu, vlivem aminofosfolipidové reorganizace membrány. Do kapacitačních znaků se zahrnuje také aktivace proteinkinázy A, která má za následek spuštění dalších signálních drah, které mohou vést k fosforylaci proteinů, jejich tyrosinových residuí proteinů, které by mohlo vést k akrozomální reakci a oplodnění oocyty. K dalším účinkům proteinkinázy A, se řadí změna polymerizace aktinu, která je nezbytná pro penetraci oocyty. Aktivovaná proteinkináza A také ovlivňuje některé kinázy a chaperony, které jsou odpovědné za akrozomální reakci. Ke kapacitačním změnám je nutná i iniciace hyperaktivní motility, která napomáhá utvářet sílu potřebnou pro penetraci oocyty. Hyperaktivní motilita je také regulována proteinkinázou A, a stejně jako kapacitační změny v hlavičce spermií, byla iniciována vápníkem a bikarbonátem.

V případě *in vivo* kapacitace, spermie utvářejí ve vejcovodu rezervoár a jsou vystavovány tekutinám vejcovodu. Tyto tekutiny mají různou hodnotu pH, energetického substrátu, v závislosti na živočišném druhu. Také se v tekutině vyskytuje již zmíněný bikarbonát a akceptor cholesterolu HDL (lipoprotein o vysoké hustotě).

Oproti tomu, kapacitace *in vitro* zahrnuje variabilitu kapacitačních médií v závislosti na druhu zvířete. U býčích (*Taurus*) a kančích (*Sus*) spermií bylo osvědčeno již několik modifikovaných médií, avšak hřebčích spermií, například, nebylo prozatím definováno takové kapacitační médium, které by vedlo k následnému úspěšnému oplodnění oocytů.

**Klíčová slova:** kapacitace, média, *in vitro*, spermie, ejakulát

# Media for *in vitro* capacitation

## Summary

This bachelor thesis congregates existing knowledge about capacitive media for *in vitro* capacitation of sperm in selected livestock. To understand the effect of the components of individual media, knowledge about capacitation processes that stimulate certain substances, such as bicarbonate or calcium, was included in this work.

Capacitation processes include, for example, exposure to plasma cholesterol due to aminophospholipid membrane reorganization. Capacitatory traits also include protein kinase A activation, which results in the triggering of other signaling pathways that can lead to phosphorylation of proteins, their tyrosine residues, which could lead to an acrosomal response and oocyte fertilization. Other effects of protein kinase A include the change in actin polymerization that is necessary for oocyte penetration. Activated protein kinase A also affects some kinases and chaperones that are responsible for the acrosomal response. Capacitive changes also require the initiation of hyperactive motility, which helps build the force needed for oocyte penetration. Hyperactive motility is also regulated by protein kinase A, and like capacitive changes in the sperm head, it was initiated by calcium and bicarbonate.

In the case of *in vivo* capacitation, sperm form a reservoir in the fallopian tube and are exposed to fallopian tube fluids. These fluids have different pH values, the energy substrate, depending on the animal species. The aforementioned bicarbonate and cholesterol acceptor HDL (high density lipoprotein) are also present in the fluid.

In contrast, *in vitro* capacitation involves the variability of capacitation media depending on the species of animal. Several modified media have been proven in bull and boar sperm, but stallion sperm, for example, have not yet been defined as a capacitive medium that would lead to subsequent successful fertilization of oocytes.

**Keywords:** capacitation, media, *in vitro*, sperm, ejaculate

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Morfologie spermií</b>	<b>3</b>
<b>3.2</b>	<b>Kapacitace spermií</b>	<b>4</b>
3.2.1	Signální dráha proteinkinázy A	5
3.2.1.1	Fosorylace proteinů	5
3.2.1.2	Změna polymerizace aktinu	6
3.2.1.3	Reorganizace aminofosfolipidů	7
3.2.1.4	Lipidové rafty a SNARE proteiny	8
3.2.1.5	Dráhy pro interakci se zona pellucida	9
3.2.2	Změna polarizace membrány	10
3.2.2.1	Chlorový kanál	10
3.2.2.2	Vápenaté kanály	10
3.2.2.3	Sodíkové kanály	11
3.2.2.4	Kanál Slo (Ksper)	11
3.2.3	Hyperaktivní motilita	11
3.2.3.1	Vápník (Ca <sup>2+</sup> )	12
3.2.3.2	Signální dráha proteinkinázy A	12
3.2.3.3	Signální dráhy kalmodulinu	13
3.2.3.4	Kanály regulující hyperaktivní motilitu	14
3.2.4	Energetické substráty kapacitace	15
3.2.5	Reaktivní formy kyslíku	16
<b>3.3</b>	<b>In vivo kapacitace</b>	<b>17</b>
3.3.1	Kapacitační složky <i>in vivo</i>	18
<b>3.4</b>	<b>In vitro kapacitace</b>	<b>19</b>
<b>3.5</b>	<b>Média pro in vitro kapacitace spermií</b>	<b>19</b>
3.5.1	Složky pro kapacitační média u býka	19
3.5.1.1	Bikarbonát a BSA	20
3.5.1.2	Ionofor Ca A23187	21
3.5.1.3	pH	21
3.5.1.4	Heparin	21
3.5.1.5	Oviduktální (vejcovodová) tekutina	23
3.5.1.6	Lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL)	23

3.5.1.7	Progesteron .....	24
3.5.1.8	Složky podporující hyperaktivní motilitu .....	24
3.5.1.9	Antioxidanty.....	24
3.5.2	Složky pro kapacitační média u kance .....	25
3.5.2.1	Kerbs-Ringer bikarbonátový roztok.....	25
3.5.2.2	Heparin .....	26
3.5.2.3	Cl <sup>-</sup> .....	27
3.5.2.4	Progesteron .....	27
3.5.2.5	Antioxidant .....	27
3.5.2.6	Koncentrace spermií.....	27
3.5.3	Složky pro kapacitační média u hřebce .....	28
3.5.3.1	Bikarbonát, vápník, BSA.....	28
3.5.3.2	Ph .....	29
3.5.3.3	Heparin .....	29
3.5.3.4	Prokain .....	29
3.5.3.5	Energetický substrát .....	30
3.5.3.6	Progesteron .....	30
<b>4</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>32</b>

# 1 Úvod

Kapacitace představuje soubor fyziologických změn ve spermiích, které jsou vyvolány prostředím samičího reprodukčního traktu. I když je kapacitace známa více jak 50 let, tento proces není stále zcela pochopen (Salicioni et al. 2007). Při kapacitačním procesu jsou pozorovány změny, které byly indukovány přítomností bikarbonátu a vápníku (Visconti et al. 1995) a akceptoru cholesterolu (Bailey 2010). Aktivuje se proteinkináza A, která dále iniciuje fosforylaci proteinů (Visconti et al. 1995). Fosforylace proteinů a jejich následná redistribuce, pravděpodobně také přispívá k akrozomální reakci (Tardif et al. 2001). Pomocí aktivity proteinkinázy A, nastává změna polymerizace aktinu (Cohen et al. 2004), který je přítomen v plazmatické membráně (Cooper 2000). Jedna z popisovaných kapacitačních změn je expozici plazmatického cholesterolu, zapříčiněnou reorganizací aminofosfolipidů (Bailey 2010). V neposlední řadě, účinkem proteinkinázy A, je působení na různé signální dráhy, které se poté uplatňují při akrozomální reakci (Awda et al. 2010). S kapacitací je taktéž spojována hyperpolarizace plazmatické membrány, jejíž úloha při kapacitaci nebyla zcela definována (Hernández-González et al. 2007). Pro dosažení fertilizační schopnosti, musí kromě kapacitačních změn v hlavičkové části, spermie také disponovat hyperaktivní motilitou, která je definována jako zvýšení asymetrie pohybu bičíku (Quill et al. 2003). I v případě hyperaktivní motility, byla nutná přítomnost bikarbonátu a vápníku (Litvin et al. 2003). Pro získání energie využívá spermie různé mechanismy, skrze různé energetické substráty (Cooper 2000). Energie je při tom využívána převážně pro pohyb spermií (Williams et al. 2001). Jedním z mechanismů je oxidativní fosforylace, která probíhá v mitochondriích (Cooper 2000), avšak zde se tvoří i reaktivní formy kyslíku (Aitken 2017). Tyto reaktivní formy kyslíku poškozují spermie určitých druhů, ale například u hřebčích spermií je výskyt do značné míry označován za fyziologický (Gibb et al. 2014)

Prostředí *in vivo* kapacitace zahrnuje utváření vejcovodového rezervoáru (Hung a Suarez 2010). A oproti *in vitro* kapacitaci, která je zprostředkována jednotným médiem, *in vivo* kapacitace je regulována postupně vystavenými tekutinami, které se vylučují v různých segmentech samičího traktu (Gutiérrez et al. 1993). Ovidukální tekutiny obsahují různé komponenty, které indukují kapacitaci spermií. Hodnoty se lišily dle živočišného druhu. Podstatnou složkou vejcovodové tekutiny se prokázalo například pH (Hugentobler et al. 2004), energetický substrát (Hugentobler et al. 2007), bikarbonátu (Harrison a Gadella 2005), nebo HDL (lipoprotein o vysoké hustotě), který zřejmě slouží jako akceptor pro cholesterol (Ehrenwald et al. 1990).

Výběr látky pro kapacitační médium, společně se stanovením její koncentrace a stanovením doby expozice spermií v té určité látce, hraje důležitou roli pro procesy spojené s *in vitro* fertilizací (Goel et al. 2016). Většinou kapacitační média obsahují alespoň jednu ze základních složek pro kapacitaci, jako je vápník, bikarbonát nebo bovinní sérový albumin (Tsai et al. 2007). To však přímo nesplňuje *in vitro* kapacitace u hřebčích spermií, které na rozdíl od jiných živočišných druhů, nemají přesně definované kapacitační médium, účinné pro kapacitační proces a následné oplození vajíčka při *in vitro* fertilizaci (IVF) (Leemans et al. 2016).



## **2 Cíl práce**

Cílem této práce je popsat zásadní složky pro *in vitro* kapacitaci spermií u vybraných druhů hospodářských zvířat. Porovnávání různých médií je postavené na dosud popsaných mechanismů kapacitace spermií.

### 3 Literární rešerše

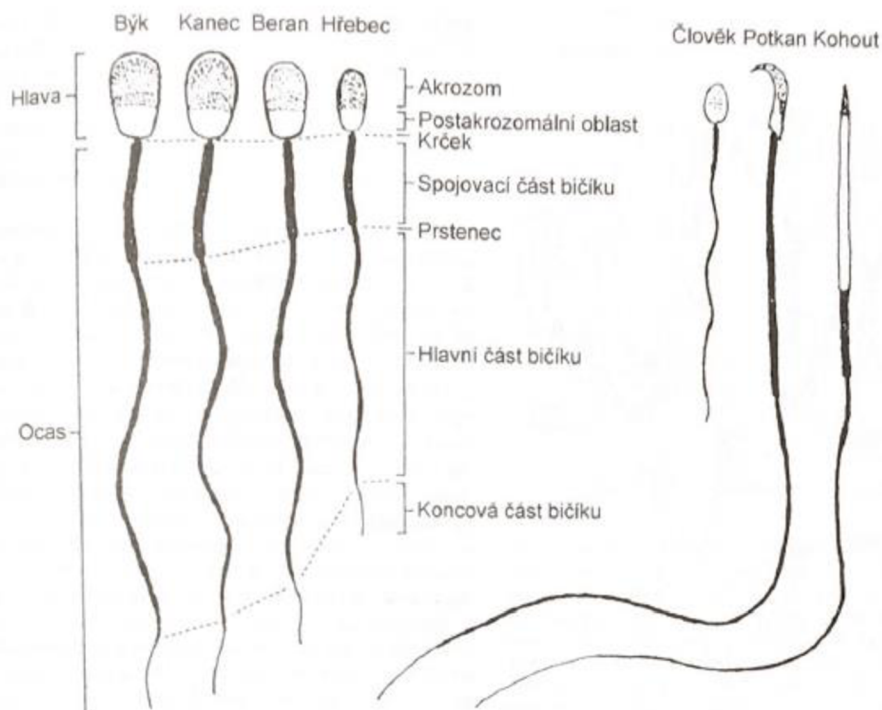
#### 3.1 Morfologie spermií

Spermie se, jako buňka) obvykle rozděluje do dvou morfologických a funkčních oblastí. Hlavička, která obsahuje kondenzované haploidní jádro a ocas, který zprostředkovává pohyb buňky, za účelem se dostat k vajíčku (oocyt), a následně buňce napomáhá se dostat skrze obaly oocytu (Alberts et al. 2002).

Na hlavičce spermií u většiny druhů přiléhá k přednímu konci jaderného obalu specializovaný sekreční váček, označen jako akrozomální váček, který obsahuje hydrolytické enzymy. Tyto enzymy napomáhají spermii proniknout do vnějšího obalu vajíčka. Když se spermie dotkne vajíčka, obsah vezikuly se uvolní exocytózou, také zvanou jako akrozomální reakce (Alberts et al. 2002).

Pohyblivý ocas spermie je dlouhý bičík, jehož centrální axonéma, vycházející z bazálního tělíska, které je umístěného těsně za jádrem. Axonéma se skládá ze dvou centrálních singletových mikrotubulů obklopených devíti rovnoměrně rozmístěnými dublety mikrotubulů. Tato hustá vlákna jsou tuhá a nekontrakční. Není známo, jakou roli mají v aktivním ohýbání bičíku, které je způsobeno klouzáním sousedních dubletů mikrotubulů. Bičíkový pohyb je řízen motorickými proteiny dyneinu, které využívají energii hydrolyzy ATP (adenosintrifosfát) k posunutí mikrotubulů (Alberts et al. 2002).

ATP je produkováno v mitochondriích, které jsou umístěné v přední části ocasu označované jako krček (Alberts et al. 2002).



Popis a porovnání morfologických částí spermií u různých živočišných druhů (Reece 2011)

## 3.2 Kapacitace spermií

Kapacitace je souhrnný název, označující veškeré fyziologické změny ve spermii, které jsou vyvolávány v prostředí samičího reprodukčního traktu (Salicioni et al. 2007). Změny zahrnují řadu sekvenčních a paralelních procesů (Visconti 2009). I když je kapacitace známa více jak 50 let, tento proces není stále plně pochopen (Salicioni et al. 2007).

Chang (1951) učinil experiment, který obnášel vpravení ejakulovaných králíčích (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*) spermií do horní části vejcovodů králic, v různých časových intervalech závislých na období říje. Na základě experimentu prokázal, že spermie svou fertilizační schopnost získávají po určité době, v prostředí samičího reprodukčního traktu. V těchto podmínkách, závislých na čase, podstupují spermie fyziologickou změnu (Chang 1951). Tyto výsledky korelovaly se závěrem vyplývajícím z práce Austina (1951), ve které se předpokládalo, že studované krysí (*Rattus rattus*) a králíčí spermie musí projít určitou formou přípravy nebo kapacitace. Což by spermii umožnilo penetrovat zonu pellucidu. Předpokládá se, že kapacitační proces probíhá v přirozeném prostředí a situaci, ve vejcovodu (Austin 1951).

Kapacitační proces rozdělil Visconti (2009) na dvě hypotetické fáze, které označil jako rychlé a pomalé události, ať už při podmínkách *in vivo*, nebo *in vitro*. Výsledkem rychlých událostí je iniciace motility spermií, která nastává po kontaktu s izotonickým roztokem obsahující bikarbonát ( $\text{HCO}_3^-$ ) a vápenaté kationty ( $\text{Ca}^{2+}$ ). V pozdější fázi, se začínají projevovat pomalé události, díky kterým získává spermie hyperaktivní motilitu a je připravena podstoupit akrozomální reakci. Jak pomalé, tak rychlé procesy jsou centrálně regulovány signální dráhou proteinkinázy A (Visconti 2009).

Během kapacitace nastávají zásadní změny v oblasti hlavičky spermie, které jsou vyvolané prostředím samičího pohlavního ústrojí. Vlivem bikarbonátu, který je u samic přítomen v mnohem vyšší koncentraci, v porovnání s koncentrací v nadvarleti (Harrison a Gadella 2005), nastávají kapacitační změny. Jako je iniciace signálních kaskád, skrze počáteční aktivaci proteinkinázy A. Do myší spermie, se bikarbonát dostává skrze sodíkově – bikarbonátový kotransportér (Demarco et al. 2003). Po vstupu do spermie, bikarbonát iniciuje aktivitu enzymu proteinkinázy A. Proteinkináza svou fosforylační aktivitou, společně s intracelulárním vápníkem, řídí další kroky potřebné pro kapacitaci (Visconti et al. 1995). U býčích spermií se předpokládalo, že vzestup intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  spojené s kapacitací býčího spermatu byl alespoň částečně regulován  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPázou (Fraser et al. 1995).

Jedním ze zásadních kroků pro kapacitaci myších (*Mus musculus*) spermií je fosforylace proteinů. Ta je zprostředkována, přímo nebo nepřímo, zmíněnou proteinkinázou A (Visconti et al. 1995). Signální kaskáda, vyvolaná proteinkinázou A, vedla ke změně polymerizaci aktinu u býka (Cohen et al. 2004). Změna polymerizace aktinu je nezbytná pro pronikání spermií do vajíček. Byla pozorována během kapacitace u kančích spermií (Castellani-Ceresa et al. 1993).

Dalším důležitým účinkem je, například reorganizace aminofosfolipidů v membráně. Následkem reorganizace je expozice membránového cholesterolu, který je následně odstraněn z membrány pomocí cholesterolového akceptoru. Tím se zajistí jeden z raných kroků kapacitace, membránová fluidita. Ta zajistí přesun lipidových raftů, obsahují proteiny, nezbytné pro interakci s oocytem. Redistribucí raftů se tak usnadní interakce mezi spermii a oocytem (Bailey 2010).

V neposlední řadě, proteinkináza A interaguje s různými dráhami, proteiny a chaperony, které jsou odpovědné za navázání zony pellucidy a následné akrozomální exocytóze (Awda et al. 2010). V této podkapitole jsou shrnuty pouze signální dráhy, které iniciují proces kapacitace.

### 3.2.1 Signální dráha proteinkinázy A

Jeden ze zásadních účinků bikarbonátu klíčových pro kapacitaci spermií, je stimulace syntézy druhého posla cAMP (cyklický adenosin 3,5 monofosfát) přímou aktivací enzymu sAC (rozpustná adenylyncykláza). Tento účinek byl pozorován u myších a krysích spermií (Chen et al. 2000). Práce Bucka et al. (1999), přinesla výsledky svědčící o výskytu enzymu sAC u myších, krysích a lidských spermií. Enzym se zdá být odlišný od savčího enzymu tmAC (transmembránová adenylyncykláza). Jeho přítomnost, v rámci spermie, se zdá být druhově specifická (Buck et al. 1999). U myši spermie byl navrhnout mechanismus, díky kterému se předpokládá, že vysoké hladiny cAMP zapříčiní aktivaci enzymu proteinkinázy A. Za vhodných podmínek a změnách vlastností membrány, dochází ke změně metabolismu cAMP, v důsledku přítomnosti  $\text{HCO}_3^-$  – společně s  $\text{Ca}^{2+}$ . Aktivace sAC nastává za přítomnosti vápenatých kationtů a bikarbonátu, a to buď společným působením, nebo účinkem samostatného iontu. Tím dochází k elevaci hladiny intracelulárního cAMP. Tato hladina může být regulována hydrolýzou jedné nebo více nukleotidových enzymů fosfodiesteráz (PDE), která je stimulována  $\text{Ca}^{2+}$ . Vysoké hladiny cAMP zapříčiní aktivaci proteinkinázy A (Visconti et al. 1995).

#### 3.2.1.1 Fosorylace proteinů

Fosorylace proteinů je jeden z hlavních mechanismů kontroly buněčné aktivity v závislosti na změnách podmínek prostředí. Jedná se o posttranslační modifikaci proteinů, zprostředkovanou aktivitou proteinkináz (Berruti 1994). Proteinkinázy fosorylují své cíle, jež mění svou funkci vlivem modulace zprostředkovanou fosorylací. Proteinkinázy lze rozdělit do dvou kategorií. První kategorií je hlavní typ proteinkináz. Skupina enzymů katalyzující adici fosfátové skupiny na aminokyseliny serin anebo threonin. Do hlavního typu patří camp závislá proteinkináza A. Dále se k nim řadí kinázy kalcium-kalmodulin-regulované a proteinkinázy fosfolipidem aktivované. Druhá kategorie jsou kinázy, které fosorylují tyrozinová rezidua (zbytcích) proteinů, tyrozinové proteinkinázy. Opačný účinek mají fosfatázy s cílem defosorylovat určité molekuly, čímž se podílí na regulaci řízení procesu fosorylace (Tardif et al. 2001).

Proteinkináza A, u myších spermií, pravděpodobně svou aktivitou stimuluje spermatické tyrozin kinázy a také se zde nevylučuje, že by mohla inaktivovat fosfatázu. Výsledkem aktivity proteinkázy A, je zvýšená tyrozinová fosorylace proteinů (Visconti et al. 1995).

Z proteinů, které byly fosorylované na tyrozinových zbytcích, byl popsán například protein p32, přítomný ve spermiích kanců. Před kapacitačním procesem se protein vyskytoval v cytosolu a po dokončení se vykytoval v membráně. Zároveň byl identifikován enzym, o relativní molekulové hmotnosti ( $M_r$ ) 32 000, s aktivitou charakteristickou pro tyrozin kinázu (Tardif et al. 2001). Navazující práce Bailey et al. (2005), která nejen, že potvrdila translokaci

proteinu p32 do plazmatické membrány během kapacitace, zároveň upřesnila, že p32 není konečným bodem kapacitace. Předběžné výsledky práce přinesly bližší charakteristiku enzymu – kinázy Mr 32 000 (původně označována jako TK- 32). Předpokládá se, že by se mohlo jednat o mitogenem aktivovanou proteinkinázu (MAPK) (Bailey et al. 2005).

U býčích spermií taktéž byla potvrzena fosforylace proteinů a na základě výsledků se podpořila hypotéza, že kapacitace spermií je zprostředkována signální cestou obsahující cross – talk, vzájemný vliv, mezi signální dráhou cAMP/PKA a tyrozinkinázy/fosfotázy (Galantino-Homer et al. 1997). Stejně tak u hřebčích spermií byly prokázány výsledky nasvědčující zprostředkování kapacitace signální dráhou cAMP/PKA s následným účinkem tyrozinkináz (Pommer et al. 2003).

Během kapacitace byla, nepřímou imunolokalizací u kančích spermií, pozorována redistribuce fosforylovaných proteinů na tyrozinu do střední části akrozomální oblasti. Tento pozorovaný výsledek dokazuje, že fosforylace se podílí nejen na procesu kapacitace, ale i na akrozomální reakci. Výsledky také naznačují, že proteiny fosforylované na tyrozinu se během kapacitace spojí s vnější membránou v akrozomální oblasti (Tardif et al. 2001).

### 3.2.1.2 Změna polymerizace aktinu

Aktin je hlavním cytoskeletálním proteinem u většiny buněk. Jeho úlohou je vytvářet aktinová vlákna pomocí polymerizace. Při reverzibilním procesu polymerizace aktinu se monomery spojují s konci aktinových vláken a disociují z nich. V buňce jsou aktinová vlákna organizována do struktur vyššího řádu, tvořících svazky nebo trojrozměrné sítě. Sestavování a rozkládání aktinových vláken, jejich zasíťování do svazků a sítí a jejich asociace s jinými buněčnými strukturami, jako je plazmatická membrána, jsou regulovány řadou aktin-vazebných proteinů. Aktinová vlákna jsou zvláště hojná pod plazmatickou membránou, kde tvoří síť s úlohou poskytovat mechanickou podporu, určovat tvar buňky a umožňovat pohyb buněčného povrchu (Cooper 2000).

Změna polymerizace aktinu byla popsána u hlaviček býčích spermií. Předpokládá se, že proteinkináza A, společně s proteinkinázou C, stimuluje polymerizaci aktinu ve dvou nezávislých cestách. u jedné dráhy je aktivita proteinkinázy C podmíněná inhibicí proteinkinázy A. U této dráhy se však předpokládá, že nastává za nefyziologických podmínek. U druhé cesty je tak fyziologicky nezbytná aktivní forma proteinkinázy A, vedoucí ke kapacitaci spermií. Svým účinkem zabraňuje předčasnou aktivaci proteinkinázy C, ohrožující kapacitační proces (Cohen et al. 2004).

U tohoto navrhovaného mechanismu se u býčích spermií navrhl i proces s možností částečné deaktivace proteinkinázy A na konci kapacitačního procesu. Tím, že je deaktivována proteinkináza A je možnost aktivace fosfolipázy C, vedoucí k aktivaci proteinkinázy C, což má za následek akrozomální reakci ve správný čas (Cohen et al.2004).

V případě hřebčích spermií byla popsána aktivace fosfolipázy C pomocí extracelulárního progesteronu navazujícího se na svůj receptor. Tím aktivuje proteintyrozinkinázový receptor, který je spojený s fosfolipázou C. Aktivovaná fosfolipáza C štěpí fosfatidylinositol 4,5,- biofosfát (PIP2) na inositoltrifosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG), který aktivuje proteinkinázu C a přemístí ji na plazmatickou membránu. Proteinkináza C

otevřít napětově závislé vápníkové kanály v plazmatické membráně, což vede k přílivu extracelulárního vápníku. Nárůst vápníku v buňce vede k akrozomální exocytóze. (Rathi et al. 2003).

U myších spermii byla fosfolipáza C aktivována pomocí extracelulárního epidermálního růstového faktoru navázaného na receptor. Vazba na receptor spermii způsobuje autofosforylaci receptorů. To vede k rychlému nárůstu F aktinu v oblasti mezi plazmatickou membránou a vnitřní akrozomální membránou. Aktivované receptory fosforylují fosfolipázu C, čímž umožní enzymu, navázanému na membránu, vázat se na F – aktin. Tento krok umožní fosfolipáze C, přenesené z cytosolu, udržet se na membráně. Při kontaktu s oocytem, se naváže na zonu pellucidu pomocí receptorů na hlavičkové oblasti. Aktivace receptorů způsobí počáteční, avšak relativně malé zvýšení hladiny intracelulárního vápníku. Následně vápník aktivuje fosfolipázu C. Nastává hydrolýza membránových lipidů a výsledkem hydrolýzy je zvýšení rozpustnosti membrány. Hydrolýzou iniciovanou fosfolipázou C se zapříčiní uvolnění proteinů z membrány, oddělující aktin. Následně je opět zvýšená hladina vnitrobuněčného vápníku. Poté aktivuje proteiny štěpící aktin. Aktivací dochází k disperzi F-aktinové sítě, vyskytující se mezi plazmatickou membránou a akrozomální membránou. Tyto dvě membrány jsou pak schopné vzájemného kontaktu, umožňující membránovou fúzi. Isoforma fosfolipázy C hydrolyzuje fosfatinositol-4,-5bifosfát (PIP), čímž utváří dva druhé posly závislé na Ca<sup>2+</sup>, diacylglycerol (DAG) a inositol (1,4,5) trifosfát(IP<sub>3</sub>)(Tomes et al.1996).

### 3.2.1.3 Reorganizace aminofosfolipidů

Fyziologická hladina bikarbonátu vyvolává změny v architektuře plazmatické membrány (Harrison a Gadella 2005). Obdobně jako u somatických buněk, jsou lipidy plazmatické membrány ejakulovaných kančích spermii distribuovány asymetricky. Distribuce aminofosfolipidů (fosfatidylserin – PS, fosfatidylethanolamin – PE) je popisovaná ve větší míře na vnitřním listu membrány, zatímco fosfolipidy obsahující fosfocholin se vyskytují ve vnějším listu membrány (fosfatidylcholin – PC, sfingomyelin – SM) (Gadella et al. 1999).

Udržování asymetrie, pomocí aminofosfolipidové translokace zahrnující ATP a thiol závislé mechanismy, je pravděpodobně řízené aktivitou aminofosfolipidové translokázy. Tento enzym, známý též jako flipáza, zodpovídá za přenos PS a PE z vnějšího listu membrány do vnitřního listu. Flopáza má stejnou funkci pro fosfolipidy, akorát opačným směrem, distribuce z vnitřního listu do vnější (Gadella a Harrison 2000).

Gadella a Harrison (2002) prokázali, že za přítomnosti bikarbonátu nastává expozice PE a PS na vnější list membrány, u živých kančích spermii s neporušeným akrozomem. Taktéž dokázali, že kolaps asymetrie neboli vyrovnání fosfolipidů mezi dvěma listy membrány, může být řízen signální dráhou pro cAMP závislou proteinovou fosforylaci. Předpokládá se, že by se mohla aktivovat aminofosfolipidová skrambláza (Gadella a Harrison 2002), umožňující pohyb všech čtyř druhů fosfolipidů oběma směry přes lipidovou dvojvrstvu (Gadella a Harrison 2000). Díky tomuto enzymu se přesunují aminofosfolipidy na vnější list membrány (Gadella a Harrion 2002). U kančích spermii, s nízkou hladinou cholesterolu, se bikarbonát ukázal jako nezbytný pro laterální redistribuci cholesterolu. Redistribuce zapříčiní lepší dostupnost cholesterolu pro jeho akceptor (například albumin) (Flesch et al. 2001).

Tato redistribuce se zdá být regulována shodnou signální dráhou, popsanou u kolapsu asymetrie aminofosfolipidů. Avšak, redistribuce cholesterolu je oproti expozici aminofosfolipidů, značně pomalejší. Předpokládá se, že redistribuce cholesterolu je následný proces aminofosfolipidové expozice. Soubor těchto změn, se jeví jako primární děje ve vývoji fuzogenního potenciálu, čímž je umožněno spermiím podstoupit akrozomální reakci (Gadella a Harrison 2002).

Ovšem jiné výsledky přinesla studie u hřebčích (*Equus ferus f. caballus*) spermií. Ukázala, že remodelace a destabilizace membrány nastává bez významných strukturálních změn ve složení membránových lipidů. U většiny životaschopných spermií, která vykazovala zvýšenou membránovou fluiditu indukovanou bikarbonátem, byla expozice PE sotva pozorovatelná (méně než 5 %). Remodelaci membrány také nedoprovázel charakteristický odtok (efflux) cholesterolu (Maitan et al. 2021).

#### 3.2.1.4 Lipidové rafty a SNARE proteiny

Fluidita membrány umožní lipidovým raftům se přesunout, aby se mohla uskutečnit interakce s oocytem (Bailey 2010). Lipidové rafty se charakterizují jako platformy pro signalizační zóna pellucida receptory (van Gestel et al. 2005). Zóna pellucida je obal oocyty, který slouží jako bariéra proti oplození. V zóně pellucidě se nacházejí proteiny, které řídí akrozomální reakci (Alberts et al. 2002). U kančích spermií se ukázalo, že shlukování těchto platform (mikrodomén), které obsahují proteiny vázající zónu pellucidu, vedlo ke zvýšení koncentrace těchto receptorů. Tím se posílila schopnost spermií vázat se na oocyty. Byly identifikovány dva raftové proteiny, caveolin-1 a flotillin-1. Proteiny se redistribuovaly do horní části hlavičky, za přítomnosti bikarbonátu v médiu, indukující kapacitační změny. Extrakce cholesterolu (efflux), zprostředkovaná albuminem, neměla žádný vliv na raftové uskupení. Odstranění cholesterolu bylo pozorováno v oblasti, kde se rafty nevyskytovaly. Což dokazuje, že indukovaný efflux cholesterolu, může podpořit shluknutí mikrodomén (van Gestel et al. 2005). Také u myších spermií byla reorganizace membránových mikrodomén, spojena s kapacitací. Byla označena jako klíčový krok pro akrozomální exocytózu (Thaler et al. 2006). Avšak ve studii Watanabe a Kondoh (2011) výsledky ukázaly, že k pohybu lipidového raftu dochází při akrozomální reakci (Watanabe a Kondoh 2011).

U kančích spermiích byla popsána přítomnost SNARE proteinů. Konkrétně t-SNARE syntaxin1 a 2, a v-SNARE VAMP. Odhaduje se, že SNARE proteiny jsou spojené s lipidovými rafty dvěma možnými způsoby. Buď za pomoci zachycení syntaxinem, nebo přímou modelací, která poté zajistí začlenění mezi rafty. Během kapacitace probíhala distribuce nejdůležitějších proteinů t-SNARE i komplementárního v-SNARE VAMP. Oba proteiny byly nalezeny převážně v plazmatické membráně. Přidání bikarbonátu a akceptoru cholesterolu BSA (bovinní sérový albumin) zapříčinilo relokizaci SNARE proteinů z rozptýleného rozložení po celé hlavičce, na homogennější distribuci omezenou na horní část hlavičky spermie. Redistribuce byla tedy lokalizována přesně v místě, které odpovídá místu vazby spermie na zónu pellucidu a následné indukci akrozomální exocytózy (Tsai et al. 2007).

Další studie zabývající se SNARE proteiny kančích spermií demonstrovala dynamickou interakci, mezi různými trimerními komplexy SNARE a komplexem 2, při

kapacitaci a akrozomální exocytóze. Výsledky naznačovaly interakci závislou na bikarbonátu mezi komplexem 1/2 a komplexem SNARE (syntaxin 3/SNAP 23/VAMP 2). Když byla akrozomální exocytóza vyvolána ionoforem  $\text{Ca}^{2+}$ , komplexin 2 se disocioval od komplexu SNARE. Jedná se tedy o sestavení fúzního komplexu, který provází  $\text{Ca}^{2+}$  závislou akrozomální exocytózu (Tsai et al. 2012).

### 3.2.1.5 Dráhy pro interakci se zona pellucida

U myši spermie byla popsána kaskáda MAPK (mitogenem aktivovaná proteinkináza), jenž je součástí signalizačního mechanismu, který řídí kapacitaci. Jelikož byl pozorováno zvýšení fosforylace zkoumaných proteinů, které korelovalo s dosažením kapacitačního stavu (Nixon et al. 2010).

Povrchová exprese fosforylovaného tyrosinu byla detekována pouze na hlavičkách životaschopných spermií. Byl tedy potvrzen třístupňový jádrový systém signálních molekul MAPK dráhy, MAPK extracelulárním signálem regulované kinázy (ERK1/2), kináza MAPK (MAP2K, MEK1/2) a kináza kináza MAPK (MAP3K, REF1). Po inhibici klíčových prvků v této kaskádě byla zjištěna významně zeslabená vazba spermie na zonu pellucidu. Tyto výsledky jsou interpretovány jako možný nepřímý důkaz pro důležitost aktivace MAPK pro interakci se zónou pellucidou (Nixon et al. 2010).

Předpokládá se, že dráhy proteinkinázy A a proteinkinázy C mohou interagovat s členy signální dráhy ERK. Fosforylované formy prvků dráhy ERK byly charakterizovány také u kančích spermií, přičemž ERK1/2 byla označena za prvek významně spojen s kapacitací indukovanou fosforylací tyrosinu (Awda et al. 2010).

Při kapacitaci byla také pozorována fosforylace molekulárního chaperonu Hsp-90 u lidských, myších a krysích spermií (Ecroyd et al. 2003). Aktivovaná proteinkináza A aktivuje cílové proteiny, jako je molekulární chaperon Hsp90 (protein tepelného šoku 90). Aktivovaný protein a jeho specifický ko-chaperon Cdc37 (buněčného dělení 37) tvoří proteinový komplex s kinázou ERK1/2. Tento komplex stabilizuje ERK1/2 a udržuje jeho fosforylovaný stav. Hsp90 a Cdc37 tvoří proteinový komplex také s p38, díky čemuž se udržuje p38 v nefosforylovaném stavu. To je příhodné pro kapacitovaný stav, jelikož fosforylovaný p38 inhibuje hyperaktivaci lidských spermií (Sun et al. 2021). U myších spermií byl lokalizován další fosforylovaný chaperon Hsp60 a endoplasmin. Mohou se podílet na interakci zprostředkovaných receptorem. Je možné, že před kapacitací není receptorový komplex pro zónu pellucidu vystaven na povrchu spermie. Po změně architektury membrány ve shodě s aktivací molekulárních chaperonů se můžou usnadnit konformační změny, díky kterým dojde k vystavení receptorového komplexu. Fosforylace tyrozinových zbytků mění hydrofobní zbytek na hydrofilní. Taková změna může představovat možný mechanismus pro reorientaci komplexu v membráně vedoucí k povrchové expozici receptoru. Chaperony Hsp60 a ERp99 mohou být přítomné na cytoplazmatické straně membrány, v čerstvě kapacitované spermii. V průběhu kapacitace, dochází k jejich tyrozinové fosforylaci na vnitřní straně membrány. To aktivuje receptorový komplex a nastávají konformační změny. Změny zahrnují vystavení chaperonů a ZP vazebné molekuly na buněčný povrch hlavičky spermií.



Receptorový komplex zona pellucida zahrnuje molekulu vázající ZP a také dva chaperony (Asquith et al. 2004).

### 3.2.2 Změna polarizace membrány

Kapacitace je úzce spojena s hyperpolarizací plazmatické membrány, jejíž úloha při kapacitaci nebyla zcela definována (Hernández-González et al. 2007). Hyperpolarizace je pozorována jako zvýšení intracelulárního záporného náboje ve srovnání s extracelulárním prostředím. (Demarco et al. 2003).

Bikarbonát u myších spermií, získaných z ocasu nadvarlete, indukovala hyperpolarizaci membrány. Při odtoku cholesterolu a přítomnosti bikarbonátu mohou mít přímé a nepřímé vlivy na řízení událostí vedoucích k hyperpolarizaci. Jelikož bikarbonát je záporně nabitý, hodnotilo se přímé působení bikarbonátu na membránový potenciál. Oproti dalším aniontům (Cl, I, Br, NO<sub>3</sub>) vyvolal bikarbonát hyperpolarizaci 15 ± 3 mV v populaci spermií (Demarco et al. 2003). Kromě bikarbonátu se účastní na změně polarizace membrány iontové kanály (Hernández-González et al. 2007).

#### 3.2.2.1 Chlorový kanál

Transmembránový regulátor vodivosti (CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) se řadí mezi Cl – kanály, jehož aktivita je regulována cestou cAMP zahrnující PKA fosforylaci. Byly popsány u myších spermií na krčkové části spermií, kde byl též lokalizován epiteliální sodíkový kanál (EnaC). I když v této studii nebyla popsána interakce, na základě shodného výskytu na spermiích, byla navržena hypotéza inhibice ENaC aktivovaným CFTR, která zapříčiní hyperpolarizaci membrány. Odhadovaná aktivace CFTR je způsobena během kapacitace, po počáteční elevaci hladiny cAMP. To mohlo iniciovat další Cl – influx (vtok do buňky), prostřednictvím jiných transportérů. Toto intracelulární zvýšení Cl – může společně s HCO<sub>3</sub>, zvýšit cAMP a tím usnadnit kapacitaci (Hernández-González et al. 2007).

#### 3.2.2.2 Vápenaté kanály

Na myších spermiích byly popsány nízko napěťové kanály vápníkových kationtů subtypu T, které jsou aktivovány zónou pellucidou. Aktivace je charakteristická pro tento subtyp prostřednictvím nízkých depolarizací s prahovou hodnotou. T kanály by zapříčinily influx, pomocí indukce zóny pellucidy, který vede k akrozomální reakci (Arnoult et al. 1996). ZP3 se prokazatelně zapojuje do influxu vápníku při akrozomální reakci. Možný mechanismus je závislý na stavu membránového potenciálu. Depolarizace membrány u myších spermií, které neprošly procesem kapacitace, s následnou závislou inaktivací nízko napěťově řízené kanály vápníku, díky čemuž se zabrání předčasným dějům spojeným s akrozomální reakcí, až do ukončení kapacitačního procesu. V tu chvíli nastává hyperpolarizace membrány a může tedy přijít interakce skrze ZP3 – závislou aktivaci (Arnoult et al. 1999).

Během kapacitace, u lidských spermií, bylo vyhodnoceno, že vlivem zvýšení intracelulárního pH, alkalizací, se stimuloval influx vápníku vyvolaný depolarizací (ze – 71

mV na  $-30$  mV, mV – membránový potenciál). To může do značné míry objasnit stimulaci napěťově řízených kanálů vápníku během kapacitace. Pozorovaná alkalizace byla dostačující k téměř 30 % stimulace influxu vápníku, indukovaného depolarizací (González-Martínez et al. 2002).

### 3.2.2.3 Sodíkové kanály

Uzavření sodíkových kanálů během kapacitace je spojeno s hyperpolarizací spermie. Při inkubaci myších spermií byla inhibovaná depolarizace. Depolarizace indukována  $\text{Na}^+$ , byla též pozorována při nízkém extracelulárním pH (6,8). Tato inhibice depolarizace nebyla pozorována u populace nekapacitovaných spermií. Předpokládá se, že inhibice epiteliálních sodíkových kanálů je zprostředkována pomocí zvýšení koncentrace cAMP. Inhibice influxu  $\text{Na}^+$  poté podporuje hyperpolarizaci membrány (Hernández-González et al. 2006).

Inhibici napěťově řízených sodíkových kanálů, u lidských spermií, byly lokalizovány jak na bičíku, tak i na krčku, a i na různých částech hlavičky. I v případě tohoto typu kanálů se spekuluje, že by hrály důležitější roli u nekapacitovaných spermií. Při kapacitaci by pak jejich inhibice taktéž vyvolala hyperpolarizaci. Zároveň aktivace napěťově řízených sodíkových kanálů způsobila zvýšení progresivní motility, závislé na koncentraci a na čase (Pinto et al. 2009).

### 3.2.2.4 Kanál Slo (Ksper)

Slo3 je draslíkový kanál jehož exprese byla hojně exprimována u spermií savců. Je řízen jedinečným typem regulace jak intracelulárním pH a, tak membránovým napětím. Kanál mSlo3 je specificky řízen unikátní kombinací napěťové závislosti a citlivosti na pH (Schreiber et al. 1998). Pomocí průtokové cytometrie byla prokázána další složka u lidských spermií, ovlivňující hyperpolarizaci. Dále se ukazuje, že tento proces je závislý na propustnosti  $\text{K}^+$ , kdy se ukázaly alespoň dva  $\text{K}^+$  kanály. Jeden z nich je pravděpodobně Slo1, jenž se účastní hyperpolarizace spermií spojené s kapacitací. Také Slo3 kanál se prokázal jako aktivní při spuštění signalizační kaskády zapojené do kapacitací indukovanou hyperpolarizací. Tato hyperpolarizace korelovala se zvýšením koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  a zvýšením intracelulárního pH, což jsou charakteristické parametry kapacitace (López-González et al. 2014).

### 3.2.3 Hyperaktivní motilita

Zvýšení asymetrie pohybu bičíku (hyperaktivní motilita) je nezbytná pro oplodnění oocyty, jelikož spermie při penetraci musí vynaložit patřičnou „sílu“, kterou by se standardní motilitou (hybnost) nemohla vytvořit. I za předpokladu, že by spermie splňovala kapacitační stav, bez hyperaktivní motility by nebylo možné oplození. Pro tento děj je potřebná přítomnost vápníku (Quill et al. 2003) bikarbonátu a aktivitu signálních drah a kanálů (Litvin et al. 2003).

Hyperaktivní motilita spermií je charakterizována jako vysoká amplituda ohybu bičíku s asymetrickým bitím (Marquez a Suarez 2007).

Motilitu bičíků řídí proteinový fosforylační/defosforylační systém, který je regulován enzymy cAMP – dependentí proteinkinázou (fosforylace) a fosfatáza (defosforylace)

účinkující na proteiny bičíku. Tento mechanismus byl objeven u spermií ježovek (*Pseudocentrotus depressus*, *Hemicentrotus pulcherrimus*, a *Anthocidaris crassispinu*) (Murofushi et al. 1986).

### 3.2.3.1 Vápník (Ca<sup>2+</sup>)

V krčku býčích spermií byly popsány zásobárny (rezervoár) vápníku. Tyto zásobárny by mohly být odvozeny od RNE (redundant nuclear envelope, nadbytečný jaderný obal), což jsou organely ohraničené membránou. Tyto zásobárny jsou odpovědné za uvolňování intracelulárního vápníku pro zahájení hyperaktivní motility. Axonema je tímto přímo ovlivněna nezávisle na vliv mitochondrií. Hypoteticky se předpokládá, že uvolněním vápníku dochází ke stimulaci mitochondrií, které vede ke zvýšení tvorby ATP. Tato studie byla zaměřena především na stav při vyvolání hyperaktivní motility. Pro udržení hyperaktivního stavu se předpokládá, že je vyžadován influx vápníku nebo případnou aktivaci mitochondrií (Ho a Suarez. 2003).

Role vápníku v regulaci hyperaktivované motility je iniciace asymetrického ohýbání, nebo umožnění zvýšeného ohýbání na jedné straně bičíku. Asymetrický pohyb bičíku a ostřejší ohyby jsou možné za přítomnosti ATP. (Ho et al. 2002).

Mezi Ca<sup>2+</sup> a bikarbonátem byl popsán synergický vztah pro indukci aktivity sAC. Bikarbonát indukuje sAC enzymatickou reakci s maximální rychlostí, zatímco Ca<sup>2+</sup> přímo zvyšuje afinitu sAC k jeho substrátu ATP – MG<sup>2+</sup> (Litvin et al. 2003).

### 3.2.3.2 Signální dráha proteinkinázy A

Hyperaktivace pomocí vápenatých iontů u kančích spermií byla popsána jako závislá na fosforylaci tyrozinových zbytků, indukovaných proteinkinázou A (Harayama et al. 2012).

Reaktivace motility spermií byla pozorována za přítomnosti cAMP závislé proteinkinázy, avšak další výsledky naznačovaly, že kináza se samotná nepodílela na reaktivaci. Proto byla navržena kombinace, vedoucí k reaktivaci, působením cAMP-závislé proteinkinázy společně s fosfatázou. Fosfatáza zapříčinila pokles ATPázové aktivity. Cíle fosfatázy se zdají být buď to proteiny nebo část molekuly dyneinu. Proteiny nepřímo regulují funkci dyneinové ATPázy, čímž se reguluje bičíková hybnost a část molekuly dyneinu řídí pouze pohybově spojenou hydrolýzu ATP. Výsledky také prokázaly fosforylaci některých proteinů, nezbytnou pro pohyb bičíku. Jeden z proteinů se odhaduje, že by mohl být faktor vázající se na axonemu (Murofushi et al. 1986).

Carrera et al. (1994) popsal u myších spermií specifický protein p82 (protein Mr 82 000), který má regionální homologii ke proteinu kotvící kinázu A (AKAP). Jedná se o polypeptidy, odpovědné za ukotvení proteinkinázy A do cytoskeletu. Lokalizace proteinu 82 000 Mr (p82) byla popsána ve fibrózní pochvě hlavního segmentu bičíku spermie (Carrera et al 1994).

Homologický protein AKAP82 a pro-AKAP82 (polypeptidový prekurzor) objevil Carrera et al. (1996) v lidských spermiích. Zároveň popsal změny spojené s hyperaktivní motilitou. Inkubované spermie, ve vhodných podmínkách pro kapacitační proces, vykazovaly

zvýšenou fosforylací popsaných proteinů. Po dramatickém zvýšení fosforylace následně zůstala konstantní. Což naznačuje, že se fosforylované proteiny podílejí na nereverzibilních pochodech spojených s aktivací hyperaktivní motility (Carrera et al. 1996).

Vijayaraghavan et al. (1997) identifikoval izoformy proteinkinázy A a AKAP u spermií býka, člověka a opice (*Rhesus*). Výsledky této studie také ukázaly, že ukotvení podjednotky proteinkinázy A RII je nezávislé na katalytické aktivitě proteinkinázy A. Také se ukázalo, že interakce podjednotky (RII) s AKAP, nezávisle na katalytické aktivitě proteinkinázy A, je klíčovým regulátorem motility. Tedy že aktivita proteinkinázy není tak nezbytná jeho interakce RII podjednotky s AKAP (Vijayaraghavan et al. 1997).

Mannowetz et al. (2012) navrhl u myších spermií sled mechanismů posilující bičíkový rytmus pohybu, s následnou aktivací proteinkinázy A. Vstup glukózy do buňky je zprostředkován pomocí transportéru glukózy (GLUT). Laktát společně s protony, opouští intracelulární prostor, skrz monokarboxylátové transportéry (MCT). Tím stoupá intracelulární pH a zintenzivní se glykolytický proces. Transport GLUT a MCT je obousměrný. Produkt glykolýzy, pyruvát, je poté metabolizován během mitochondriálního citrátového cyklu za vzniku CO<sub>2</sub>, následně CO<sub>2</sub> je hydratován intracelulární karbonickou anhydrázou na bikarbonát. Poté se již může aktivovat dráha proteinkinázy A, která se podílí na zvýšené frekvenci ohybu bičíku (Mannowetz et al. 2012).

### 3.2.3.3 Signální dráhy kalmodulinu

Odstraněním proteinu kalmodulinu z axonemy, u spermií ježovky (*Lytechinus pictus*) v přítomnosti milimolárního Ca<sup>2+</sup> byl indukován potenciální symetrický stav. Stav byl zvrácen přidáním exogenního kalmodulinu pro získání asymetrického ohybu (Brokaw a Nagayama 1985).

U izolovaných bičíků spermií psů, kanců a ježovky (*Strongylocentrotus purpuratus*), obsahovaly aktivní fosfatázu závislou na Ca<sup>2+</sup>. U kančích spermií byla aktivita specifické fosfatázy vyšší, oproti nízké aktivitě u psích spermií. Jedná se o jediný enzym, který katalyzuje proteinovou defosforylací v závislosti na Ca<sup>2+</sup>. Výsledky prokázaly významnou roli této fosfatázy při regulaci motility (Tash et al. 1988).

U lidských spermií byly popsány kinázy regulované vápníkem a kalmodulinem, známé jako podrodina kalmodulin kináz. Jedná se o serin/threoninové kinázy, do kterých se řadí kinázy CaMK I, II a IV. (Marín-Briggiler et al. 2005). Tato dráha byla u myších spermií lokalizována v hlavní části bičíku, ve fibrózní pochvě. Kalmodulin se také vyskytoval v hlavové části spermie. Pozorování poskytlo možný mechanismus, pro motilitu spermií, spřažený s vápníkem. Může se jednat o dvě oddělené dráhy iniciované s vápenatým iontem. Jedna dráha byla nezávislá na kalmodulinu, dráha zahrnující proteinkinázu A. Druhá dráha pak zahrnuje účinek kalmodulinu. Výsledky ukázaly schopnost kompenzovat ztrátu funkce kalmodulin dráhy a obnovit motilitu, za předpokladu, že budou přítomny metabolické substráty, jako je pyruvát a laktát. Avšak při opačné situaci, kdy byla aktivovaná pouze kalmodulinová dráha, byly spermie bez náznaku pohybu (Schlingmann et al. 2007). Signální dráhy těchto kináz, které vedou k hyperaktivaci, byly přítomné také u býčích spermií. Ukázalo se, že navazující cíle dráhy zahrnující vápník, kalmodulin a CaMKII umožňují

zvýšení klouzání miktorubulů na jedné straně axonemy. Složky této dráhy tak mohou být soustředěny na jedné straně bičíku (Ignotz et al.2005).

### 3.2.3.4 Kanály regulující hyperaktivní motilitu

#### Catsper kanály

Proteiny rodiny CatSper jsou charakterizovány jako vápníkové kanály, které jsou exprimované výhradně v membránách bičíku myších spermií. CatSper1 je napětově řízený kánál nezbytný pro depolarizaci vyvolaný vstup  $\text{Ca}^{2+}$  do bičíku, který je spojen s hyperaktivní motilitou bičíku. Avšak, nebyl podstatný pro cAMP signální dráhu, která vede k fosforylaci. Předpokládá se se, že influx vápníku řídí CatSper1 buď sám, nebo společně s dalšími membránovými proteiny, jako například CatSper2 nebo jiný protein rodiny CatSper (Carlson et al 2003). Quill et al (2003) popsal ztrátu hyperaktivní motility v případě, že byly poškozeny oba kanály, CatSper1 a 2, což poukazuje na možnou sdílenou funkci. Také potvrdil důležitost kanálu Catsper2 poškozením tohoto kanálu a zvýšenou viskozitou média bylo reflektováno absencí hyperaktivní motility. Na základě výsledků pak navrhl hypotetický model pro zahájení hyperaktivace spermií pohyblivost. Nedefinované ženské faktory jsou navrženy ke spuštění signalizačního mechanismu, který otevře CatSper a umožní vstup vápníku do bičíku spermií. Vápník pak interaguje se složkami axonemy a výsledkem je změna bičíkového rytmu ze symetrické formy na asymetrickou. Potvrdil také závislost na elevaci intracelulárního pH (alkalizaci) (Quill et al. 2003).

Lidský CatSper je silně potencován progesteronem a vybranými prostaglandiny, a to za využití různých vazebných míst k aktivaci, neúčinkují pomocí G-proteinů, proteinových kináz nebo skrze druhé posly. Je tedy možné, že receptory pro progesteron nebo prostaglandiny jsou lokalizovány přímo v komplexu CatSper. Stejně jako Catsper, je progesteronem vyvolaný vápenatý tok silně podporován intracelulární alkalizací. Zajímavé je, že lidský CatSper může být dále potencován prostaglandiny, ale zřejmě prostřednictvím jiného vazebného místa, než je místo progesteronu (Lishko et al. 2011).

#### Hv1 kanál

Hv1 je kanál vodíkových protonů, popsáný u lidských spermií, který se nachází v hlavní části bičíku). Je pravděpodobně odpovědný za řízení aktivity CatSper kanálů, a tedy i intracelulární koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ . Protože je Hv1 specificky lokalizován v hlavní části bičíku spermie, má dobré postavení, aby reguloval pH v bičíku spermie (Lishko et al. 2011). Kanál se nepodílí na influxu vápníku vyvolaném progesteronem nebo prostaglandiny (Lishko 2011). Očekává se, že po otevření Hv1 kanálu nastane intracelulární alkalizace, vyrovnáním kyselého intracelulárního pH spermií (6,0–6,5) s alkalickým extracelulárním prostředím. Navíc se předpokládá, že by u lidských spermií měl být přítomen opačný mechanismus, který aktivně pumpuje vodíkové protony zpět do buňky, proti koncentračnímu gradientu, k podpoře nízkého intracelulárního pH, alkalizace, které se běžně pozoruje v klidovém stavu spermie.

U myších spermií se vyhodnotilo, že protonovou extruzi zprostředkovává jiný mechanismus, než je kanál Hv1 (Lishko et al. 2010).

### 3.2.4 Energetické substráty kapacity

Spermie může získávat energii, v podobě adenosintrifosfátu (ATP) pomocí glykolýzy u které je využíván substrát glukóza. Anebo pomocí oxidativní fosforylace, využívající substrát laktát a pyruvát. Oxidativní fosforylace probíhá v mitochondriích, za přítomnosti kyslíku, oproti procesu glykolýzy (Cooper 2000). Energie je převážně využívána pro motilitu spermií (Williams et al. 2001).

U hřebčích spermií se prokázala produkce ATP především skrz oxidativní fosforylaci k získání energie potřebnou pro motilitu spermií. Při inhibování glykolýzy pomocí specifického inhibitoru nebo byly spermie vystavené mediu bez glukózy a pyruvátu. Inhibice měla za následek dramatický pokles rychlosti pohybu a byly též pozorovány změny v procentu progresivní pohyblivosti. I když nebyla přítomna glukóza ani pyruvát nemělo to žádný vliv na stav ATP, i v případě, kdy došlo k ovlivnění motility a rychlosti spermií po třech hodinách inkubace (Plaza Davila et al. 2015).

Oproti tomu, u myších spermií v přítomnosti substrátů, laktát a pyruvát, nebyla motilita udržována, když nebyla glykolytická dráha funkční. Glykolýza by u myší měla hrát hlavní roli při dodávání ATP pro motilitu spermií. I když glykolýza není tak vysoce účinná, oproti mitochondriálnímu dýchacímu řetězci, zdá se, že hraje hlavní roli pro zajišťování energie v celém ocasu myší spermie (Mukai et al. 2004).

Lidské spermie taktéž vyžadovaly přítomnost glukózy či jiného sacharidu (fruktóza), který lze glykolýzovat, čímž se zvýší produkce ATP a tím i pohyblivost spermií. Oproti tomu, na akrozomální reakci a kapacitaci se neprokázal zásadní požadavek pro jakýkoliv jiný produkt metabolismu glukózy. Stejně jako u myších spermií, i při dostatečné koncentraci laktátu a pyruvátu pro podporu mitochondriálního dýchacího řetězce, nebylo v tomto případě dostatečné pro udržení motility. Předpokladem se zdá být přítomnost glukózy jako substrát, který se zdá být potřebný pro podporu motility a hyperaktivní motility, avšak v případě kapacity u lidských spermií, se nezdá, že by glykolýza měla zásadní roli, kromě poskytování ATP (Williams et al 2001).

V případě býčích spermií studie prokázala, že motilita je závislá na mitochondriální produkci ATP. Regulace probíhá skrze mitochondriální dráhu proteinkinázy A. V reakci na metabolicky generovaný bikarbonát. Mitochondriální aktivita spermií, nikoli však glykolytická aktivita, závisí na bikarbonátu, která aktivuje mitochondriální proteinkináza A systém, vedoucí k aktivaci oxidativní fosforylace a produkci ATP. Buněčné hladiny ATP, produkovány mitochondriemi nebo skrze glykolýzu, byly na obdobné úrovni. Předpokládá se tedy, že každý systém může poskytnout dostatek ATP pro podporu motility. V závislosti na přítomnosti dostatku kyslíku a bikarbonátu je vysoká mitochondriální aktivita patrná, při dostatku glukózy je zřejmá glykolytická aktivita. To značí, že mohou být přítomny dva alternativní systémy produkující ATP. Za fyziologických podmínek může být jeden systém nahrazen druhým aktivním systémem (Mizrahi a Breitbart 2014).

### 3.2.5 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) představují metabolity kyslíku, jako je superoxidový aniont ( $O_2^-$ ), hydroxylový radikál (OH $\cdot$ ) a peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ). ROS také zahrnuje molekuly odvozené z reakce uhlíkově centrovaných radikálů s kyslíkem, například peroxylové radikály (ROO $\cdot$ ), alkoxylové radikály (RO $\cdot$ ) a organické hydroperoxydy (ROOH). ROS může také obsahovat další silné oxidanty, jako je peroxydusitan (ONOO $^-$ ) nebo kyselina chlorná (HOCl), stejně jako biologicky aktivní volné radikály dusíku, oxid dusnatý ( $\cdot$ NO). V této kategorii molekul sídlí volné radikály, což jsou atomy nebo molekuly, které obsahují jeden nebo více nepárových elektronů. Tyto molekuly mají značnou reaktivitu se širokým spektrem buněčných cílů, jako jsou sacharidy, lipidy, proteiny nebo nukleové kyseliny. Tato vlastnost je kritická pro definování patologické aktivity radikálů obecně. Nejběžnější ROS jsou  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  (Aitken 2017).

Mitochondriální produkce ROS je řízena oxidačním stresem v samočinném redoxním cyklu. Biochemický základ této cyklické aktivity zahrnuje schopnost ROS spouštět kaskády peroxidace lipidů, které končí tvorbou malomolekulárních aldehydů (například akrolein, malondialdehyd a 4-hydroxynonenal) (Aitken 2017).

Gibb et al. (2014) porovnával ve své práci hřebčí a lidské spermie, v závislosti na vnějších podmínkách. Spermie obou druhů byly inkubovány v anaerobním a aerobním prostředí. Hřebčí spermie vykazovaly narušenou schopnost motility, pokud byly inkubovány v prostředí anaerobním. Což značí závislost hřebčích spermií na mitochondriální oxidativní fosforylaci, pro získání ATP. Zároveň byla také pozorována vysoká produkce ROS, která však byla hodnocena jako fyziologická. Zdrojem ROS je mitochondriální elektronový transportní řetězec, ze kterého uniká superoxid při procesu oxidativní fosforylace. Zvýšení ROS bylo pozorováno v pozitivním vztahu s rychlostí pohybu spermie. Také zvýšení ROS korelovalo s peroxidací lipidů. V opačném případě, prostředí bohaté na kyslík se prokázalo jako velmi škodlivé v případě lidských spermií. Tento výsledek zdůrazňuje též vysokou náchylnost lidských spermií na toxické účinky kyslíku, a tedy citlivé na oxidativní stres. Zajímavým výsledkem této studie byla nižší vitalita hřebčích spermií, hodnoceny jako koncepčně schopný. Vykazovaly vyšší poškození, vyvolané ROS než u spermií, které byly hodnoceny jako nekoncepční. Proto se předpokládá, že během skladování a přepravy *in vitro*, se vzorky z plodnějších hřebců vyčerpávají ve vyšší míře, v důsledku vyšší metabolické aktivity. Tím buňky podlehly rychlému zániku právě v důsledku nahromadění metabolických vedlejších produktů, jako jsou ROS a cytotoxické lipidové aldehydy (Gibb et al. 2014).

Vyšší odolnost hřebčích spermií, Gibb et al. (2014) přisuzoval také vysoké aktivitě seminálního enzymu katalázy (Gibb et al. 2014).

Inkubací býčích spermií v přítomnosti a nepřítomnosti katalázy potvrdila, že vyšší procento pohyblivosti vykazovaly spermie v přítomnosti katalázy, a to po 15 dnech ve žloutkovém mediu při teplotě 5 °C. Dle výsledků kataláza nevstupuje do buňky, proto se předpokládá, že její funkce v mediu spočívala odstraněním peroxidu vodíku. Kataláza u býků byla zhruba 25 % koncentrovanější, v porovnání s beraním vzorkem, kde byla koncentrace katalázy v průměru 12 mcg/ml. Průměrná hodnota katalázy, přítomná v kančím ejakulátu byla extrémně nízká, dosahovala hodnoty 0,2 mcg/ml, což je hodnota, která je pod citlivostí metody. Koncentrace katalázy v ejakulátu králíků vykazovala vysoký stupeň podobnosti

v závislosti na příbuznosti jedinců. Tento výsledek naznačuje, že tento parametr může být částečně ovlivněn dědičností (Foote 1962).

### 3.3 *In vivo* kapacitace

Spermie musí projít velkou vzdáleností, aby se dostaly do místa určeného ve vejcovodu, kde dochází k oplození. Když spermie vstupují a prochází vejcovodem, jsou podrobeny selektivním procesům k odstranění těch, které nemají fertilizační schopnost. Uterotubulární spojení slouží jako úsek pro selekci spermií. Umožňuje tak prostup spermií dále do vejcovodu jen pro ty, které vykazují progresivní pohyb a exprimovaly specifické proteiny. Ve zúženém úseku vejcovodu (*isthmus*) (Hung a Suarez 2010), přesněji v kaudálním části, se spermie vážou na buňky řasinkového epitelu (Töpfer-Petersen et al. 2002).

V tomto rezervoáru setrvávají až do ovulace (Hung a Suarez 2010), uvolnění oocytu z vaječníku (Alberts et al. 2002), do té doby jsou stále životaschopné (Hung a Suarez 2010), dochází zde k modulaci sub-populace spermií, která iniciuje kapacitační proces a pravděpodobně předchází akrozomální reakci (Ghersevich et al. 2015). Tvorba rezervoáru, v této části vejcovodu, je rozšířeným jevem mezi savci, včetně hospodářských zvířat (Suarez 2002).

U býka byl navržen možný proces vazby spermií na epitel vejcovodu skrze protein seminální plazmy PDC-109, který je přichycen na plazmatickou membránu spermie. Po odstranění složek semenné plazmy v reprodukčním traktu krávy, se PDC-109 váže na fukosylované molekuly epitelu vejcovodu. Po kapacitačním procesu se PDC-109 protein ztrácí z povrchu membrány spermie a tím se spermie může oddělit od buněk vejcovodu. K oddělení od epitelu vejcovodu také dopomáhá spermii hyperaktivní motilita. (Suarez 2002)

Zásadní roli, pro regulaci vazby mezi vejcovodem a spermií, mají zřejmě samičí steroidní hormony progesteron a 17  $\beta$ -estradiol. Jak se ukázalo u býčího *in vitro* modelu, progesteron iniciuje uvolňování spermií z rezervoáru a tím se vyselektuje sub – populace, která prošla kapacitací a je schopna oplození oocytu. Oproti tomu, 17  $\beta$ -estradiol má inhibiční účinek na uvolnění (Lamy et al. 2017).

Po uvolnění z rezervoáru, mohou spermie dále procházet do rozšířeného úseku vejcovodu (*ampula*), kde jsou spermie dále směřované k oocytu a následně dochází k oplodnění (Hung a Suarez 2010)

Vazba hřebčích spermií na buňky vejcovodu se zdá být složitější. Studie v *in vitro* prostředí ukázalo, že hřebčí spermie, vázané na vejcovod, vykazovaly vyšší míru intracelulárních alkalizace a fosforylace tyrozinových reziduí než nevázané spermie. Zpočátku se předpokládalo, že interakce mezi spermiemi a vejcovodem *in vitro* bylo nutné aktivovat intracelulárně kapacitační procesy. Nicméně se ukázalo, že spouštění kapacitace spermií, které byly navázané na explantát vejcovodu, je spíše kvůli uvolnění faktorů podporující kapacitační procesy. Tyto faktory se uvolňují ze sekrečních buněk vejcovodu. Celkově výsledky naznačují, že expozice tekutin vejcovodu, vylučované primárně ampulárním epitelem, může být významnější pro indukci kapacitace u hřebčích spermií než vazba spermie na vejcovod. Proto bylo navrženo, že *in vivo* vazba spermií na vejcovod a vytvoření rezervoáru vejcovodů spermatu spíše fakultativní než povinné a v závislosti na



estrálním cyklu. Pokud nekapacitované spermie dorazí v časném předovulačním období do vejcovodu, dojde k navázání významné populaci spermií. Spermie se navážou na epitel ve zúžené části vejcovodu a vytvoří rezervoár. Tyto spermie budou uloženy ve vejcovodu, dokud nejsou kapacitační induktory přítomné, tedy těsně před ovulací. Jestliže nekapacitované spermie dorazí do vejcovodu v době periovulačního období, tyto buňky okamžitě přicházejí do kontaktu s tekutinami vejcovodu, které obsahují kapacitační induktory pro kapacitaci, a tím spermie a ztrácí afinitu k navázání se na vejcovod (Leemans et al. 2016).

Dalším aspektem fyziologie koňských vejcovodů, důležitým pro kapacitaci, je acidobazická rovnováha. V případě *in vitro* prostředí, se prokázalo, že spermie hřebců vykazují fosforylaci tyrozinových residuí, když byly navázané na epiteliální buňky vejcovodu. Epiteliální buňky obsahují alkalická sekreční granula, která po navázání spermie vytvoří lokální navýšení pH (Leemans et al. 2016).

### 3.3.1 Kapacitační složky *in vivo*

Oproti *in vitro* kapacitaci, která je zprostředkována jednotným médiem, *in vivo* kapacitace je regulována postupně vystavenými tekutinami, které se vylučují v různých segmentech samičího traktu (Gutiérrez et al. 1993).

Výsledky studie zaměřené na kravské vejcovodové tekutiny a folikulární tekutiny, poukázaly možný vliv na kapacitační proces v *in vivo* prostředí. Folikulární tekutina, získaná z vaječnicků, je známá jako bohatý zdroj glykosaminoglykanů a proteinů. Její účinek na kapacitaci se v prostředí *in vitro* prokázal jako účinný pro iniciaci kapacitačních změn a vyvolání akrozomální reakce, dokonce v kratším časovém úseku než vejcovodová tekutina. Oproti folikulární tekutině, vejcovodová tekutina obsahuje relativně nízkou koncentraci proteinů i glykosaminoglykanů. Nicméně i tato tekutina je stejně účinná pro iniciaci kapacitačního procesu a udržení motility spermií. Zároveň se také ukázal rozdíl v rychlosti iniciace kapacitace vejcovodovou tekutinou v závislosti na fázi estrálního cyklu samice. Ovšem ve vejcovodové tekutině, z každé fáze estrálního cyklu, byla celková koncentrace glykosaminoglykanů shodná. Souhrnně tyto výsledky ukázaly, že tekutiny, které se mohou vyskytovat ve vejcovodu, mohou obsahovat různé kapacitační složky, podílející se na kapacitačních mechanismech (McNutt a Killian 1991).

U prasnice byla prokázána naopak inhibiční modulace pomocí periovulační vejcovodové tekutiny, která může zabránit kapacitaci spermií snížením aktivity proteinkinázy a tím tak snížit fosforylaci tyrozinu ve spermiích. I když přesný mechanismus účinku této vejcovodové tekutiny není v této studii popsán, alespoň se navrhuje pár mechanismů, na které tento účinek cílí. Faktory v této tekutině mohly například snížit vstup bikarbonátu, pomocí regulace bikarbonátového kanálu a tím syntézy cAMP. Nebo může účinek vejcovodové tekutiny aktivovat fosfodiesterázy či některé fosfatázy (Zapata-Carmona et al. 2020).

Ve vejcovodové tekutině krávy byly definovány koncentrace glukózy v rozmezí od 1,87 do 3,17 mM, koncentrace laktátu v rozmezí od 5,35 do 6,66 mM a koncentrace pyruvátu ve vejcovodu se pohybovaly od 0,09 až 0,12 mM (Hugentobler et al. 2007). U kobyly byla koncentrace glukózy stanovena v závislosti na období sběru po 2 a 24 hodinách, a porovnávána s obdobím estrálního cyklu. Ve sběru po 2 hodinách byla v estrální vejcovodové

tekutině zhruba 2.84 mg/ 100 ml. Zatímco koncentrace mimo říji byla odhadem 4.76 mg/ 100 ml. U vzorků ze sběru po 24 hodinách se hodnota pohybovala v případě estru 4.32 mg/ 100 ml a v období mimo estrus kolem 5.92 mg/100ml (Campbell et al. 1979). U prasnic zvolili měření koncentrací energetických substrátů ve vejcovodové tekutině, z periovulačního období, která pocházela z ampulárně-istmické oblasti (glukóza 0,2-0,5mmol l(-1), laktát 6,3-6,5mmol l(-1), pyruvát 0,23-0,27 mmol l(-1)) (Nichol et al. 1992).

Další potřebnou složkou byl identifikován ve vejcovodové tekutině u krávy, během folikulární fáze, HDL sloužící zřejmě jako akceptor pro cholesterol ve spermiích býka (Ehrenwald et al. 1990).

pH u kravské vejcovodové tekutiny 7,60 (Hugentobler et al. 2004). pH vejcovodové tekutiny prasnice se mezi druhy liší (v rozmezí 6,83 až 7,35 a 6,7–8,3), v závislosti na fázi estrálního cyklu ovlivněné fází estrálního cyklu (López-Albors et al.2021).

V neposlední řadě byly prokázány ve vejcovodové tekutině krávy volné anionty chloridu, fosfátu a síranu. Z volných kationtů zde byly sodík, vápník, hořčík a draslík (Hugentobler et al. 2007).

V samičím reprodukčním traktu se spermie setkávají se zvýšenou koncentrací bikarbonátu, který je nezbytný pro vyvolání kapacitačních změn (Harrison a Gadella 2005).

### **3.4 *In vitro* kapacitace**

*In vitro* kapacitace je součástí procesu IVF (*in vitro* fertilizace). Fertilizace je multifaktoriální a komplikovaný proces. Zahrnuje interakce vajíčka a spermie, fúzi těchto dvou buněk a iniciaci vývoje embrya. *In vitro* technika, oplodnění mimo reprodukční trakt, je vhodná technika pro reprodukci u ohrožených druhů zvířat nebo u těch se s níženou reprodukční schopností. Pro optimální výsledek oplodnění oocyty, je nutné vybrat vhodné kapacitační médium a dobu inkubace (Rahman et al. 2020).

### **3.5 Média pro *in vitro* kapacitace spermií**

Spermie musí projít procesem, který je závislý na aktivačních faktorech. Jako je bikarbonát, bovinní sérový albumin (BSA) a extracelulární  $Ca^{2+}$ . Výsledkem jsou spermie s hyperaktivní motilitou a reorganizací membrány v hlavičce spermií prochází reorganizací. Tyto změny umožňují spermii proniknout vrstvou buněk obklopující oocyt, navázat se na zonu oocyty a spustit akrozomovou reakci (Tsai et al. 2007). Výběr látky pro médium, společně se stanovením její koncentrace a stanovením doby expozice spermií, hraje důležitou roli pro procesy spojené s *in vitro* fertilizací (Goel et al. 2016).

#### **3.5.1 Složky pro kapacitační média u býka**

Pro úspěšnou *in vitro* kapacitaci býčích spermií bylo popsáno více složek pro kapacitační média. Pro kapacitaci se osvědčil Tyrodův roztok, bez přidaných vápenatých iontů, který také obsahuje bikarbonát a bovinní sérový albumin (BSA) (Ijaz Hunter 1989). Účinek cholesterolového akceptoru BSA, se ukázal jako nahraditelný účinkem polyvinylalkoholu, který však působí rozdílným mechanismem (Parrish et al.1989). Ionofor

vápníku (A23187) se prokázal jako velmi důležitá složka pro iniciaci jak progresivní motility, tak akrozomální reakce (Pereira et al 2000). Úprava pH Tyrodova roztoku taktéž ovlivnila rychlost kapacitace a nástup akrozomální reakce (Ijaz a Hunter 1988). U býčích spermíí byla také popsána *in vitro* kapacitace indukovaná heparinem (Parrish et al. 1988), která je regulována několika dalšími složkami. Jako je typ energetického substrátu (Parrish et. al 1989), L – arginin (Leal et al. 2008) nebo analogy cAMP (Parrish et al. 1994). Heparin také prokázal odlišné působení na kapacitaci býčích spermíí v porovnání s oviduktální (vejcovodovou) tekutinou a se složkou HDL (lipoproteiny s vysokou hustotou). HDL a oviduktální tekutina taktéž iniciují kapacitaci, avšak rozdílným způsobem a s různou účinností (Parrish et. al 1994) (Bergqvist et al. 2006) (Lane et al. 1999). Ze složek pro iniciaci hyperaktivní motility lze vyzdvihnout účinek pH média (Marquez a Suarez 2007) (Ho et al. 2002), prokainem, kofeinem (Marqueza Suarez. 2004) a pentoxifylinem (Barakat et al. 2015). Pro zamezení negativních účinků reaktivních forem kyslíku, se u býka osvědčil antioxidant resveratrol (Tvrdá et al. 2015) a mangan (Bilaspuri et al. 2008).

### 3.5.1.1 Bikarbonát a BSA

Jako jedno z účinných kapacitačních médií, které vyvolalo kapacitaci *in vitro* u býčích ejakulovaných spermíí, byl označen Tyrodův roztok, mimo jiné obsahující BSA a bikarbonát, s pH 7,6 a osmolalitou 308 mOsmol/kg (Ijaz a Hunter 1989)

Inkubace v médiu obsahující BSA, mělo za následek kapacitaci spermíí, a to v závislosti na inkubační době, která byla kolem 2-3 hodin. Toto zjištění bylo vyhodnocené na základě měření fluorescence, použitím spektrofluorometrie a fluorescenční mikroskopie. Hladina fluorescenčního T-HCl (tetracyklin HCL), navázaného na spermie, byla závislá na koncentraci BSA, přítomnosti vápníku a inkubační době. BSA se ukázalo i jako důležitý faktor pro navození akrozomální reakce, z čehož vyplývá, že BSA může napodobovat podmínky *in vivo* (Byrd 1981). (Ijaz a Hunter 1989).

V rámci pokusu změření pH, bylo nutné provést změnu v inkubačním médiu, výměnou akceptoru cholesterolu (BSA) za PVA (polyvinylalkohol). Došlo se k překvapivému závěru, kdy PVA nahradil do určité míry BSA. V případě výsledků akrozomální reakce, byla přítomnost BSA nezbytná. Na základě možného nahrazení BSA byla navržena možnost, že v případě média obohaceného o PVA, se cholesterol nemusí přesouvat do akceptorů, ale možná se může redistribuovat do jiných částí spermie (Parrish et al.1989).

### 3.5.1.2 Ionofor Ca A23187

Spermie inkubované v médiu, obsahující ionofor Ca A23187, BSA a Tyrodův roztok (pH 7,4), vykazovaly v 93 % znaky akrozomální reakce. Ztráta akrozomálních čepiček nastala po 120 minutách inkubace při teplotě 37 °C. Zbýlých 7 % nereagovalo ani po 5 hodinách. Tyto spermie pak byly označené jako mrtvé nebo nepohyblivé. Počáteční pohyblivost ejakulátů byla menší než 25 % a došlo u nich k výraznému nárůstu motility (přes 90 %) po promytí a resuspendování v Tyrodově médiu. Tyto promyté spermie však rychle ztrácely motilitu za přítomnosti ionoforu Ca A23187. (Byrd 1981).

Podobně příznivé výsledky přinesla studie Pereira et al. (2000), která popisuje vyšší procento spermií procházející akrozomální reakcí v přítomnosti ionoforu Ca A23187 (Pereira et al 2000).

### 3.5.1.3 pH

Akrozomální reakce byla u býčích spermií vyvolána po použití média, jehož pH hodnota se pohybovala v hodnotách 7,6, 8,0 a 8,4. Vysoká úspěšnost nebyla popisována v případě promývání spermií v médiu s hodnotou pH 7,2. Čím alkaličtější bylo médium, tím rychlejší bylo dosažení penetrace oocyty. Akrozomální reakce byla v tomto experimentu závislá na inkubační době, kdy delší inkubační doba měla za následek vyšší procento výskytu akrozomální reakce. Jako inkubační médium byl použit Tyrodový roztok prostý od vápenatých kationtů. Promývací roztok byl zvolen fyziologický roztok, který obsahoval (150 mM) NaCl a 0,1 % BSA. Osmolalita obou medií byla 305 mOsmol/kg. Změny pH média tedy ovlivňovaly rychlost kapacitačního procesu. (Ijaz a Hunter 1989).

### 3.5.1.4 Heparin

Býčí spermie, které byly před inkubací s oocytou, vystaveny přítomnosti GAG (glykosaminoglykanu), heparinu, měly největší úspěšnost v oplození oocytů. Tento výsledek se zdál být úspěšnější nežli použití heparinu během IVF, tedy před smícháním s oocytou. Účinky heparinu se tedy uplatňují v průběhu počáteční inkubace a dá se tedy říct, že účinkují na kapacitační proces. Zvýšení koncentrace heparinu také korelovalo se zvýšením procentuálním zastoupením spermií, které reagovaly akrozomální změnou (Parrish et al. 1988).

Byl testován účinek čtyř vybraných glykoaminoglykanů (chlorid sulfát, dermatan sulfát, kyselina hyaluronová a heparin) na rozmražené býčí spermie. Po pěti hodinách inkubace spermií byl popsán pozitivní vliv na *in vitro* fertilizaci. Vyšší procento kapacitovaných spermií nebo spermií vykazujících akrozomální reakci, bylo prokazatelné u vzorků exprimovaných heparinem a kyselinou hyaluronovou. Dále, i fertilizace *in vitro* a vývoj embryí pozitivně ovlivnila přítomnost právě těchto dvou glykoaminoglykanů, v porovnání se vzorky, které byly ošetřené jiným glykoaminoglykanem (Kim et al. 2013).

Při inkubaci ejakulovaných spermií v médiu obsahující heparin, se ukázalo, že oxid dusnatý (NO) se podílí na progresivní motilitě, vitalitě, zachování integrity membrány a mitochondriální aktivitě, skrze oxidační proces NOS / NO (oxid dusnatý syntáza / oxid dusnatý). NO je syntetizován ze substrátu L-argininu působením katalytické aktivity enzymu

NOS (Dixit a Parvizi 2001), při přeměně L – argininu na L – citrulin (Aquiar et al. 2019). Správná koncentrace L-argininu poměrem k NO v kapacitačním médiu může zesilovat účinky heparinu, nebo samostatně působit na zvýšení kvality a počtu kapacitovaných spermií. Přidáním 10 mM L-NAME (N $\omega$ -nitro – l-arginin), došlo k poklesu procenta spermií (77 %) penetrujících oocyty. To by mohl být důsledek poklesu syntézy NO, jelikož L-NAME je inhibitorem NO. V tomto experimentu, přidání 10mM L-NAME po 5 hodinách kultivace bylo pozorováno až 40% snížení mitochondriální aktivity. Přidáním 6 mM L – argininu mělo za následek obnovení mitochondriální aktivity, pouze však 20 %. V této studii L – arginin neprokázal samostatný účinek, ale ukázalo se, že L – arginin lze použít společně s heparinem pro zesílení kapacitačního účinku. L – arginin/NO se podílí na modulaci mitochondriální aktivity během kapacitace (Leal et al. 2008).

Parrish et al. (1989) popsali inhibiční účinek glukózy na heparinem indukovanou kapacitaci. Zdá se, že glukóza a glykolyzovatelné substráty by mohly zapříčinit snížení intracelulárního pH, vlivem jejich metabolismu. Standardní kapacitační médium neobsahovalo glykolytické substráty, obsahovalo pouze laktát a pyruvát. Což zapříčinilo klesající hladinu ATP, během inkubační doby. Přidáním glykolytického substrátu, hladina ATP zůstává zachována a tím se zabrání nebo oddálí kapacitace. Během metabolismu glukózy (glykolýzy) dochází nejen k tvorbě cytoplazmatického ATP, ale jako vedlejší produkt se generují vodíkové protony. Během glykolýzy ve spermii tak pH klesne z 7,4 přibližně na 7,2 během 4hodinové inkubace s glukózou. Když byl v inkubačním médiu přítomen heparin, nedocházelo k inhibici kapacitace. Přidání heparinu může částečně zvrátit účinek glukózy na pH. Odhaduje se, že dlouhodobá inkubace glukózy s heparinem podpoří kapacitační proces a způsobí alkalizaci intracelulárního prostoru, která je s kapacitací spjatá (Parrish et al. 1989).

Nicméně, Galantino – Homer et al. (2004) se domnívají, že glykolyzovatelné monosacharidy, jako je glukóza, oddalují, ale neinhibují kapacitaci spermií. Zpomalení kapacitace se nezdá být iniciována produkcí laktátu z glukózy (Galantino – Homer et al. 2004).

Inhibiční účinek glukózy je možné také zvrátit v závislosti na koncentraci přidaného analogu cAMP (8-bromo-cAMP) nebo přidáním inhibitorů fosfodiesterázy IBMX (isobutylmetylxantin) či kofeinu. To naznačuje, že cAMP hraje důležitou roli v kapacitaci navozené heparinem. Avšak, tyto složky nemohly stimulovat kapacitaci při absenci heparinu. Kapacitace asociovaná účinkem heparinu zahrnuje aktivaci dráhy proteinkinázy A. Vysvětlení, proč analog cAMP samotný neindukuje kapacitaci je, že rozsáhlé signální dráhy, z nichž je cAMP pouze v jedné, je aktivován skrze heparin (Parrish et al. 1994).

Zároveň, Smetanina et al (2019) popsali iniciaci kapacitace přidáním 100  $\mu$ M cAMP analogu dbcAMP (dibutyryl cyklický adenosin monofosfát) a to bez přidaných látek aktivujících kapacitační procesy. dbcAMP byl přidán do média experimentální skupiny spermií. Jeho účinkem dokázal iniciovat kapacitaci u spermií jednoho býka stejně účinně, jako heparinem indukovaná kapacitace, která byla pozorována v kontrolní skupině. Účinek byl také vyšší u množství oplodněných oocytů, vývinu embryí a jejich rychlejší růst, oproti účinkům heparinu (Smetanina et al. 2019).

Vliv heparinu v porovnání s vlivem kofeinu a Ca ionoforu A23187 na akrozomální reakci a progresivní motilitu srovnávala studie Pereira et al. (2000) na rozmražených byčích spermiích. Zatímco nejlepší výsledky pro progresivní motilitu prokázal účinek heparinu (po 30

minutách inkubace), akrozomální reakce byla indukována u větší populace spermií, která byla inkubována s Ca ionoforem A23187 (Pereira et al 2000). Byl zaznamenán i možný synergický účinek heparinu s kofeinem, jehož výsledkem byla indukce, která potom umožnila u rozmražených spermií penetrovat oocyt. (Niwa a Ohgoda 1998)

Možné interakce složek médií popsala studie Breininger et al. (2010) u mražených spermií. Zatímco kapacitace indukovaná bikarbonátem vykazovala především aktivitu proteinkinázy A, v případě iniciace kapacitace kofeinem a heparinem, byla vyžadována účast jak proteinkinázy A, tak i aktivitu proteinkinázy C (PKC) a proteintyrozinkinázy (PTK). Tyto rozdíly naznačují, že elevace cAMP je iniciována různými signálními dráhami, v závislosti na charakteru přítomného kapacitačního induktoru (Breininger 2010).

### 3.5.1.5 Oviduktální (vejcovodová) tekutina

Účinky heparinu na kapacitaci byly porovnány s účinkem oviduktální tekutiny. U spermií inkubovaných v médiu obsahujícím heparin, inhiboval kapacitaci protamin-sulfát, ale jen částečně byla pozorována inhibice kapacitace u spermií inkubovaných v oviduktální tekutině. Oproti znatelné elevaci koncentrace cAMP u spermií stimulovaných heparinem, byl v případě oviduktální tekutiny nárůst cAMP nízký, a jen u malé části spermií byla spojena kapacitace s nárůstem cAMP. Glukóza nebo protamin – sulfát inhiboval též kapacitaci indukovanou oviduktální tekutinou. Jedno z možných vysvětlení pro rozdílné hladiny cAMP při kapacitaci ve dvou odlišných mediích, je, že v oviduktální tekutině se vyskytuje kapacitační látka, která působí na jiném principu, než je heparinem indukovaná kapacitace. Nemusí se jednat o molekulu podobnou heparinu. cAMP je tedy nezbytný pro kapacitaci iniciovanou heparinem. Říjová (estrální) oviduktální tekutina a heparin jsou obě vhodné složky pro *in vitro* kapacitaci, ale během kapacitace dochází k rozdílným složitým intracelulárním dějům, v závislosti na přítomnosti jedné nebo druhé složky (Parrish et al. 1994). Bergqvist et al. (2006) popsali vyšší účinnost oviduktální tekutiny, oproti jednotlivým glycosaminoglykanů, na kapacitaci spermií. Výsledky také potvrdily efektivní iniciaci kapacitace pomocí bikarbonátu, který byl schopen, oproti GAG, iniciovat kapacitaci bez albuminu, tedy bez cholesterolového effluxu (Bergqvist et al. 2006).

### 3.5.1.6 Lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL)

Kromě oviduktální tekutiny, byl heparin porovnáván s účinkem HDL, který také indukoval kapacitaci. Zde jsou zohledňovány proteiny seminální plazmy BSP (bovine seminal protein) a jejich účinek na kapacitaci. U heparinem navozené kapacitace působí proteiny BSP vázané na spermie jako heparinové receptory. Heparin by tak mohl interagovat s membránou spermií, prostřednictvím BSP proteinů, za účelem indukce řady intracelulárních procesů zahrnující alkalizaci intracelulárního prostředí, elevaci koncentrace  $Ca^{2+}$  a cAMP. HDL by v *in vivo* prostředí vyvolal ve vaječniku druhý efflux cholesterolu a tím tak iniciovat významné změny na membráně. Tento krok by byl na BSP proteinech nezávislý. HDL vyvolaná kapacitace nezahrnovala kaskádu cAMP, protože nedošlo k významnému zvýšení fosforylace tyrozinových zbytků (Lane et al. 1999).

### 3.5.1.7 Progesteron

V experimentu Thérien et al (2003) se progesteron prokázal, jako iniciátor akrozomální reakce, nikoliv kapacitačního procesu, jelikož neovlivňoval efflux cholesterolu. Ať už byly spermie inkubovány s heparinem, nebo dlouhodobě inkubovány s BSP proteiny, odpověď na progesteron byla identická. Přesto že byly použity různé metody pro vyvolání kapacitačního procesu, progesteron vždy stimuloval akrozomální reakci u kapacitovaných spermií (Thérien et al 2003).

### 3.5.1.8 Složky podporující hyperaktivní motilitu

Stimulace influxu extracelulárního vápníku, který je nezbytný pro hyperaktivní motilitu, byla u býčích spermií iniciována zvýšeným intracelulárním pH. Alkalické K<sup>+</sup> médium zřejmě způsobilo uvolnění intracelulárního Ca<sup>2+</sup> ze zásobárny v krčku, když byl snížený extracelulární vápník v médiu regulován. Následkem byl asymetrický pohyb bičíku. Obdobné pozorování bylo taktéž s přidáním NH<sub>4</sub>Cl (chlorid amonný), avšak dosáhlo se pouze nízkointenzivní hyperaktivace. Ionomycin nestimuloval tak intenzivně hyperaktivaci jako NH<sub>4</sub>Cl, i když stimuloval influx Ca<sup>2+</sup>. Ačkoliv NH<sub>4</sub>Cl nevyvolal přísun extracelulárního vápníku, pro hyperaktivní pohyb stačilo pouhé zvýšení pH v bičíku (Marquez a Suarez 2007).

Nejvhodnější pH pro reaktivaci motility bylo stanoveno hodnotou pohybující se kolem 7,0-8,5 pH (Ho et al. 2002).

Studie Barakat et al. (2015) prokázala pozitivní vliv kofeinu a pentoxifylinu na motilitu mražených spermií, v závislosti na aplikované koncentraci (5mM u kofeinu, u pentoxifylinu 1–5 mM). Studie dále ukázala, že čím nižší koncentrace přidané látky, tím je lepší výsledek pro motilitu, proto doporučují přidávat kofein do media v koncentraci 5mM. V této studii bylo využito univerzální IVF médium obsahující, syntetickou náhradu séra, lidské albuminové sérum, glukózu, sacharózu, laktát sodný, fyziologický roztok solí, glycerol, HEPES, hydrogenuhličitan sodný, penicilin a streptomycin. Kallikrein se ukázal jako nejméně výhodný pro iniciaci motility spermií a byl označen za méně účinný pro *in vitro* (Barakat et al. 2015).

Hyperaktivace vyvolaná prokainem nebo kofeinem je zprostředkována cestou závislou na Ca<sup>2+</sup> signální molekule, ale není závislá na regulaci dráhy proteinkinázy A a fosforylaci tyrosinu. Tyto dráhy, regulující akrozomální citlivost a hyperaktivaci, se rozcházejí působením prokainu nebo kofeinu, nebo že jsou zcela oddělené. Inhibice signální dráhy proteinkinázy A tak nemá vliv na hyperaktivaci stimulovanou prokainem, popřípadě kofeinem. Hyperaktivace je zprostředkována cestou signální dráhy Ca<sup>2+</sup>, která je oddělená nebo odlišná od dráhy spojené se získáním akrozomální reakce (Marquez a Suarez. 2004).

### 3.5.1.9 Antioxidanty

Resveratrol je přírodní polyfenol a fytoestrogen a také chelatační činidlo ROS (reaktivní formy kyslíku). I v případě spermií resveratrol prokázal své významné antioxidační vlastnosti, které mohou zabránit škodlivým účinkům způsobeným ROS. Výsledky ukázaly, že resveratrol je schopen zabránit poklesu vitality spermií a funkční aktivity, které by jinak nastaly v důsledku nadprodukce ROS. Stanovená koncentrace resveratrolu v rozmezí od 25 do

50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), s inkubační dobou 6 hodin, se zdála jako dostatečná k ochraně spermií proti poškození oxidačními procesy *in vitro*, prostřednictvím prevence peroxidace lipidů a zároveň stabilizace enzymatických antioxidantů ve spermii (Tvrdá et al. 2015).

Také mangan, dobře známý antioxidant a silný inhibitor oxidačního stresu, prokázal svou účinnost při *in vitro* kapacitaci.  $\text{Mn}^{2+}$  (60  $\mu\text{M}$ ) chrání býčí spermie proti lipidové peroxidaci a usnadňuje tím tak průběh kapacitace a akrozomální reakce. Hypotetický účinek  $\text{Mn}^{2+}$ , přidáný k býčím spermím, umožní zvýšení intracelulární hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  bez snížení jejich životaschopnosti. Dále má  $\text{Mn}^{2+}$  pozitivní účinky na přežití spermií a podporuje hyperaktivní motilitu během kapacitace a akrozomální reakce. Další možné vysvětlení účinku na kapacitaci spermií a akrozomální reakci, spojené s přítomností  $\text{Mn}^{2+}$ , by mohlo souviset se zvýšením intracelulárního obsahu  $\text{Ca}^{2+}$ . Podle této hypotézy, se kalmomodulinové, nebo kalmomodulinu podobné proteiny, volně vážou buď na plazmatickou membránu či  $\text{Ca}^{2+}$  nebo  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPázu, čímž se reguluje nízká hladina  $\text{Ca}^{2+}$ . Vlivem přítomnosti extracelulárního  $\text{Mn}^{2+}$ , se však stimuluje odstranění kalmomodulinu z jeho receptorů, čímž zvyšuje hladinu  $\text{Ca}^{2+}$ . Zvyšující se intracelulární hladina  $\text{Ca}^{2+}$  vede k vezikulaci akrozomu, tím způsobuje fúzi vnější akrozomální membrány s plazmovou membránou, což vede k akrozomální reakci. Extracelulární přítomnost  $\text{Mn}^{2+}$  také zvyšuje hladinu cAMP stimulací  $\text{Ca}^{2+}$  nebo  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPázy, která vede k aktivaci kalciových kanálů, a tím k ukládání většího množství  $\text{Ca}^{2+}$ . (Bilaspuri a Bansal. 2008).

### 3.5.2 Složky pro kapacitační média u kance

U kance se podobně jako u býka prokázal kapacitační účinek bikarbonátu a vápníku, obsažený v Krebs – Ringer bikarbonátovém roztoku. Avšak potřeba bovinního sérového albumínu (BSA) se prokázala jako méně zásadní pro *in vitro* kapacitaci (Tardif et al. 2003). Také účinek heparinu se u kančí *in vitro* kapacitace prokázal jako účinný, avšak jeho působení je znatelné, pokud jsou přítomné další kapacitační složky jako vápník a bikarbonát (Dapino et al. 2006). U akrozomální reakce byla potřebná extracelulární přítomnost chloridového aniontu ( $\text{Cl}^-$ ) (Melendrez a Meizel 1995). Pozitivní vliv na kapacitační proces u kanců, byl zapříčiněn působením progesteronu, který kapacitaci urychlil (Barboni et al 1995). U rozmražených kančích spermií, byla prokázána ROS (reaktivní formy kyslíku) protektivní funkce resveratrolu. Ten pravděpodobně aktivuje AMPK (5' AMP-aktivovaná proteinkináza). AMPK snižuje produkci ROS a podporuje obranný antioxidační systém spermie (Zhu et al. 2019). Posledním zajímavým faktorem, který má vliv na *in vitro* kapacitaci kančích spermií, je koncentrace spermií. Vyšší koncentrace měla za následek indukci kapacitačních změn, jako je například fosforylace proteinu p32, dezorganizace lipidů v membráně nebo indukce akrozomové reakce (Martín-Hidalgo et al 2022).

#### 3.5.2.1 Kerbs-Ringer bikarbonátový roztok

Je obecně uznáváno, že fosforylace tyrozinových residuí doprovází kapacitaci savčích spermií, nicméně určité aspekty tohoto procesu jsou druhově specifické. Právě cílem studie Tardif et al (2003) bylo vyhodnotit důležitost složek (vápník, bikarbonát a BSA) média na kapacitaci kančích spermií, přesněji důležitost jejich účinku na fosforylační stav proteinu Mr



32 000 (p32) a na aktivitu tyrosin kinázy (TK-32). Hlavní použitá kultivační média byla založena na Krebs-Ringer bikarbonátovém roztoku, které mimo jiné obsahovalo bikarbonát a BSA. Nekapacitační médium mělo obdobné složení jako kapacitační médium, ale postrádalo vápník, hydrogenuhličitan a BSA. Medium mělo stejné pH jako kapacitační médium a sloužilo pro kontrolní populaci spermií. Spermie byly inkubovány při teplotě 39 °C, po dobu až 4,5 hodiny. Vápník (2 mM) byl přidán do média ochuzeného o vápník (kontrolní skupina). Kapacitace spermií byla definována jako schopností spermií podstoupit akrozomální reakci, indukovanou ionoforem Ca A23187. Prokázalo se, že v kapacitačním médiu prostého od Ca<sup>2+</sup>, byla inhibována veškerá aktivita kinázy a fosforylace proteinu p32 byla nízká. Také bikarbonát prokázal svojí důležitou roli v kapacitačních procesech, spojené s aktivitou kinázy TK-32. Avšak ukázalo se, že BSA nebyl nezbytný pro aktivitu kinázy, a tím i pro kapacitační proces. Předpokládá se, že v plazmatické membráně kančích spermií je poměr cholesterolu vůči fosforu (C:P) relativně nízký, proto albuminem zprostředkovaný efflux cholesterolu nemusí být nezbytný během kapacitace u kance (Tardif et al. 2003). Pro bikarbonát byla stanovena nejvhodnější kapacitační koncentrace 15 mmol/l, která je dostatečná k aktivaci kapacitační kaskády spermií, k udržení zvýšeného intracelulárního pH a zvýšení fosforylovaného stavu tyrozinových residuí (Soriano-Úbeda et al. 2019).

Jako možná složka média, která by zapříčinila odtok cholesterolu z membrány, a tím tak iniciovala kapacitační proces, se jevil metyl –  $\beta$  – cyklodextrin, který je znám pro jeho účinek k depleci cholesterolu. Právě jeho účinek byl zkoumán u kančích spermií, které byly porovnávány s psími kmenovými buňkami z ledvin (somatické buňky), jež byly taktéž vystaveny tomuto komponentu. Ukázalo se, že metyl –  $\beta$  – cyklodextrin, kromě žádoucí deplece cholesterolu, vyvolává rozpad membrány u spermií kance. Negativní dopady byly pozorovány již při nízkých koncentracích (>1 mM). Zatímco u somatických buněk se integrita membrány neměnila, i při relativně vysokých hodnotách. Koncentrace metyl –  $\beta$  – cyklodextrinu u spermií také zapříčinila umělé narušení akrozomu. Díky těmto spermicidním účinkům není doporučováno používat pro *in vitro* kapacitaci a fertilizaci tuto složku (van Gestel et al. 2005).

### 3.5.2.2 Heparin

U kančích spermií se také prokázal účinek heparinu, který je přítomen v samičím reprodukčním traktu a jehož vazebná místa byla popsána u kančí spermie většinou v akrozomální oblasti. Opět byly sestaveny média s různou kombinací zastoupení složek jako Ca<sup>2+</sup>, bikarbonát a BSA. V závislosti na vzorku, byl přidán heparin (10 mM). Inkubační doba byla stanovena na 120 minut. Znovu se potvrdilo, že v médiu, které postrádalo bikarbonát a Ca<sup>2+</sup> nevykazovaly spermie kapacitační změny, i když byl přítomen heparin. V nepřítomnosti BSA a přítomnosti vápníku s bikarbonátem v médiu, byla kapacitace indikována, a s přidáním heparinu byly kapacitační projevy zesíleny. Tyto výsledky naznačují, že heparin napomáhá k iniciaci kapacitačního procesu *in vitro*, ale jen v případě přítomnosti kapacitačních složek, jako je vápník a bikarbonát. Heparin se v této studii zřejmě také zapojoval do akrozomální reakce, jelikož procento akrozomální reakce spermií bylo signifikantně vyšší než u všech ostatních médií, které heparin neobsahovala (Dapino et al. 2006).

### 3.5.2.3 Cl<sup>-</sup>

Iniciace akrozomální reakce u kančích spermií vyžadovala extracelulární přítomnost Cl<sup>-</sup>, a zároveň se prokázala přítomností různých kanálů spjatých s Cl<sup>-</sup>. Glycin/Cl<sup>-</sup>, je kanál s glycinovým receptorem, který hraje roli v zónou pellucidou indukované akrozomální reakci. Kapacitované kančí spermie nepodstoupily zónou a progesteronem iniciovanou akrozomální reakci, když byly suspendovány v médiu s deficitem Cl<sup>-</sup>. Aktivace influxu Cl<sup>-</sup> přes glycin/Cl<sup>-</sup> kanál, je umožněno buďto přímou interakcí zóny pellucidy s přímou vazbou na receptor glycin/Cl<sup>-</sup> kanálu, pomocí glykoproteinů zóny pellucidy. Nebo vazbou glykoproteinů zóny pellucidy na jiné receptory spermií a následnou aktivací receptorů kanálů prostřednictvím cross-talk receptorů (Melendrez a Meizel 1995).

### 3.5.2.4 Progesteron

I v případě kančích spermií, se progesteron prokázal jako složka, která účinkuje na kapacitační proces. Svým účinkem kapacitaci urychluje, aniž by přímo ovlivňoval akrozomální reakci. Tento účinek se projevuje poměrně rychle. Spermie vystavené progesteronem již po 30 minutách, vykazovaly větší reaktivitu než kontrolní skupina spermií, která nebyla progesteronem ošetřena. Výhodou inkubace spermií s progesteronem je zachovalý aktivní stav spermie, po celou inkubační dobu. I když po 180 minutách kultivace vzorků, jak inkubovaných s progesteronem, tak bez progesteronu, byl stav v obou vzorcích téměř shodný. Progesteron účinkoval v závislosti na koncentraci. Koncentrace 10 nM stačila k urychlení procesu kapacitace (Barboni et al 1995).

### 3.5.2.5 Antioxidant

U rozmražených kančích spermií, se taktéž prokázal antioxidant resveratrol, jako protektivní látka, která chrání spermie před účinky reaktivních forem kyslíku (ROS). Bylo zjištěno, že přidáním 50 μM resveratrolu významně zlepšilo progresivní motilitu spermií po rozmrazení, integritu membrány, integritu akrozomu a mitochondriální aktivitu. Zatímco účinky hladiny ROS, jako je peroxidace lipidů a apoptóza spermií, byly sníženy za přítomnosti 50 μM resveratrolu. Možný způsob účinku resveratrolu je pravděpodobně aktivace AMPK (5' AMP-aktivovaná proteinkináza), která snižuje produkci ROS a posiluje antioxidační obranný systém spermií (Zhu et al. 2019).

### 3.5.2.6 Koncentrace spermií

Také vyšší koncentrace spermií se zdá být klíčová u kančí *in vitro* kapacitace. Když byly spermie inkubovány v množství 100 nebo 200 mil/ml, bylo pozorováno zvýšení tyrozinové fosforylace proteinu p32, ve srovnání s koncentrací inkubovaných spermií při 50 mil/ml. Další změny, které korelovaly se zvýšenou koncentrací inkubovaných spermií, byla pozorována i dezorganizace lipidů v plazmatické membráně, indukce akrozomální reakce a životaschopnost spermií (Martín-Hidalgo et al 2002).

### 3.5.3 Složky pro kapacitační média u hřebce

Na rozdíl od lidí a mnoha jiných druhů, není *in vitro* fertilizace (IVF) s koňskými gametami úspěšná. Zjevná neschopnost hřebčích spermií proniknout do zony pellucidy *in vitro*, je s největší pravděpodobností způsobena neúplnou kapacitací spermií, v důsledku nedostatečně upraveného kapacitačního média (Leemans et al. 2016). Použití standardních kapacitačních složek, jako je bikarbonát, vápník a bovinní sérový albumin (BSA) vedlo k atypickým interakcím mezi jednotlivými účinky složek, které se i, v některých případech, vzájemně inhibovaly (Macías-García et al. 2015). Možná náhrada za BSA se osvědčil polyvinylalkohol, který byl zastoupen v médiu, obsahující modifikovaný Krebs-Ringer roztok (Choi et al. 2003). I když nebyly zatím definovány všechny kapacitační složky v prostředí *in vivo*, v případě *in vitro* se některé kapacitační projevy, jako například fosforylace proteinů, objevovaly v přítomnosti vysokého pH (Leemans et al. 2014) (Leemans et al. 2016). Jako u předešlých vybraných druhů, i u hřebčích spermií heparin napomáhal v kapacitačním procesu, který vedl k akrozomální reakci (Varner et al. 1993). Důležitou složkou kapacitačního média se ukázal být prokain, který vyvolává hyperaktivní motilitu v prostředí, neobsahující extracelulární vápník (Loux et al. 2013). Nicméně, prokain vyvolává pouze změny spojené s hyperaktivní motilitou. Neindukuje fosforylaci proteinů nebo akrozomální reakci, proto v médiu musí být přítomné ještě další složky, které iniciují kapacitační děje (McPartlin et al. 2009). Jako nejdůležitější zdroj energie pro motilitu se zdá být pyruvát a laktát. Oproti tomu glukóza může snižovat mitochondriální funkci (Darr et al. 2016). Stejně jako u předchozích druhů, také u hřebce byl popsán pozitivní vliv progesteronu na kapacitaci spermií *in vitro* (Meyers et al. 1995).

#### 3.5.3.1 Bikarbonát, vápník, BSA

Výsledky studie Macías-García et al. (2015) ukázaly atypické vztahy mezi effluxem cholesterolu, produkcí ROS a fosforylací tyrozinových residuí, při použití běžných kapacitačních složek. U inkubace spermií v přítomnosti vápníku, BSA a bikarbonátu, ať už samostatně nebo v různé kombinaci, se ukázaly různé nežádoucí interakce, které ovlivnily kapacitaci. Bikarbonát vyvolal zvýšení hladiny ROS, která byla ale snížena, když byl přidán vápník nebo BSA. Naopak fosforylace tyrozinových residuí, indukovaná bikarbonátem, byla znatelná i za přítomnosti vápníku nebo BSA. Žádná kombinace těchto komponentů však nebyla spojena s významným effluxem cholesterolu. Naproti tomu, spermie ošetřené methyl- $\beta$ -cyklodextrinem, vykazovaly významné snížení hladiny cholesterolu, ale zas nebyla prokázána zvýšená fosforylace nebo zvýšení ROS. Přítomnost BSA zvýšila vazbu spermií na zonu pellucidu, nezávisle na indukci fosforylace tyrozinu, tvorby ROS či odtoku cholesterolu. To potvrdilo druhovou specifickou kapacitačních podmínek, u hřebčích spermií (Macías-García et al. 2015)

Možná nahradní složka, která by lépe zastoupila funkci BSA, se osvědčil PVA (polyvinylalkohol). Spermie hřebce byly inkubovány v modifikovaném Krebs-Ringer bikarbonátovém médiu (TYH). Takto připravené médium bylo dále modifikováno, doplněné buď o PVA (1 mg/ml) nebo BSA (4 mg/ml). Kapacitace byla indukována 8-bromoadenosin 3',5'-cyklický monofosfátem (8BrcAMP; 0,5 mM), a to buď samostatně, nebo v kombinaci s 0,1  $\mu$ M ionomycinem. Hřebčí spermie byly společně s oocyty inkubovány v médiu TYH/PVA

nebo TYH/BSA po dobu 18 až 20 hodin. Část spermií, která byla inkubována v médiu obsahující 8BrcAMP a ionomycinu a PVA, vykazovala vyšší míru průniku do oocyty (35 %), než v jakémkoliv médiu obsahujícím BSA (5 až 6 %). Také se ukázalo, že PVA byl v každém testovaném systému lepší, než BSA (Choi et al. 2003).

### **3.5.3.2 Ph**

Předpokládá se, že hřebčí kapacitační médium vyžaduje vyšší pH než u jiných druhů savců. Nicméně, ani tyto předpoklady, spojené s vysokým pH, nevyvolaly akrozomální reakci, a tedy neumožnily úspěšné oplodnění (Leemanse et al. 2016). Studie Leemanse et al (2014) prokázala závislost fosforylace tyrozinových residuí na pH média, které se muselo pohybovat kolem 8 pH, a to bez ohledu na přítomnost dalších složek, jako je BSA nebo bikarbonát. Kromě extracelulárního vápníku byl také pozitivně hodnocen přidaný kalmodulin (Leemanse et al. 2014). Navíc se ukázalo, že při vysokém pH, nebyla zvýšená produkce ROS (Macías-García et al. 2015). Vývoj definovaného kapacitačního média pro podporu úspěšného koňského IVF bude zatím záviset na identifikaci necharakterizovaných kapacitačních faktorů, které jsou přítomné ve vejcovodu. Tedy je dále potřeba zkoumat interakce mezi spermií a vejcovodem, včetně kapacitace spermií, fertilizace a rané fáze vývoje embrya. Očekává se, že v budoucnu objasní roli vejcovodové tekutiny, a jejích složek, nové technologie, jako je 3D tisk vejcovodů a mikrofluidní automatizace (Leemans et al. 2016).

### **3.5.3.3 Heparin**

Vzhledem k tomu, že heparin reguluje akrozomovou reakci spermie u jiných druhů, byl proveden experiment pro zkoumání účinku heparinu i u hřebčích spermií. I v případě hřebčích spermií, se heparizované prostředí prokázalo jako schopné, u procentuální části populace spermií, urychlit nástup kapacitace vedoucí k akrozomální reakci (Varner et al. 1993).

### **3.5.3.4 Prokain**

Běžné inkubační složky pro indukci hyperaktivní motility, jako je bikarbonát nebo vápník, se nezdají být dostatečné pro stimulaci hřebčích spermií. Loux et al. (2013) tedy předpokládají, že mechanismus odpovědný za hyperaktivní motilitu spermií tohoto druhu je odlišný, oproti ostatním druhů. Analyzovaný koňský protein – kanál CATSPER1, se ukázal jako druhově specificky odlišný ve své struktuře, přesněji v oblasti senzoru pH. Při vystavení zvýšeného extracelulárního pH, byl vyvolán vzestup intracelulárního vápníku, který byl v rámci experimentu, inhibován známým blokátorem CatSper kanálu. Médium s nedostatkem vápníku a s vysokým pH, indukovalo ztrátu motility. Nicméně spermie ošetřené prokainem s nedostatkem vápníku v médiu, si zachovaly pohyblivost a následně vykazovaly hyperaktivaci, což naznačuje, že prokain nepůsobil otevřením kanálu CatSper. Zdá se, že prokain nepůsobí prostřednictvím CatSper ve spermatu koní, a jeho počáteční hyperaktivační účinek není závislý na influxu vápníku. Což ukazuje že vztah hyperaktivované motility u hřebčích spermií k nárustu intracelulárního vápníku je slabý (Loux et al. 2013).

K úspěšnému umělému oplodnění u koně je nutná jak kapacitace, tak hyperaktivace. Což potvrdily i výsledky studie McPartlin et al. (2009), kde byla zkoumaná kombinace kapacitačního prostředí a prokainu, který indukuje hyperaktivní motilitu. Spermie byly inkubovány v kapacitačních podmínkách, v modifikovaném Whittenovém médiu (MW). Kapacitační podmínky byly dále upraveny přidáním bikarbonátu a BSA. Konečné pH s přidáním HCl bylo sníženo na hodnotu 7,2. Absence prokainu v kapacitačním médiu, vedlo k nulové fertilizaci oocytů klisen (0 z 66 oocytů) při *in vitro* fertilizaci. Na základě těchto výsledků, byl proveden další experiment, při kterém se zkoumal účinek inkubace spermií v nekapacitačním prostředí (neupravené MW, které postrádalo BSA a bikarbonát), s cílem zjistit účinek samotného prokainu v nezávislosti na kapacitačních složkách. Tento vzorek spermií byl porovnáván se vzorkem spermií, které byly inkubovány v kapacitačním médiu (upravené MW) s přidaným prokainem. Inkubací spermií v kapacitačním modifikovaném médiu, které zároveň obsahovalo i prokain, mělo za následek 40 % (2 z 5) oplodněných oocytů. Zatímco spermie inkubované v nekapacitačním prostředí, s obsahem prokainu, byla oplozovací schopnost nulová (0 %, 0 z 5). Vzhledem k tomu, že účinek prokainu nebyl spojován se změnami ve fosforylaci proteinů a ani s indukcí akrozomální exocytózy, je nepravděpodobné, že by prokain usnadnil oplodnění jiným mechanismem než indukcí hyperaktivní motility. Pro *in vitro* fertilizaci u koní, byla tedy nejvýhodnější volba inkubace hřebčích spermií za kapacitačních podmínek a za podmínek indukce hyperaktivní motility, pomocí prokainu (McPartlin et al. 2009).

### 3.5.3.5 Energetický substrát

Spermie hřebců se primárně spoléhají na oxidativní fosforylaci pro produkci ATP, využívaného pro motilitu a metabolismus spermií. Měření byla provedena s různými koncentracemi laktátu, pyruvátu, a glukózy. Přítomnost glukózy v médiu se neukázala jako nutná, pro krátkodobé skladování koňských spermií. Její přítomnost může dokonce vést ke snížení mitochondriální funkce. Výsledky naznačují, že laktát a pyruvát jsou nejdůležitějšími zdroji energie pro motilitu a rychlost spermií hřebců. Také se ukázalo, že řízení metabolismu spermií pomocí média může být technika pro lepší uchování a zvýšení spermatické funkce před inseminací. Navíc, promyté a následně inkubované spermie v médiu, s obsahem pyruvátu nebo laktátu, se ukázalo být prospěšné, pro urychlení mitochondriální funkce vzorků spermií, které byly dříve chlazené nebo zmražené (Darr et al. 2016).

### 3.5.3.6 Progesteron

Také u hřebčích spermií prokázal progesteron svůj účinek v podobě vyššího výskytu akrozomální reakce, oproti spermiím, které nebyly s progesteronem inkubovány (Meyers et al. 1995). Dráha zprostředkovaná účinností progesteronu je nezávislá na přítomnosti bikarbonátu a na dráze proteinkynázy A. Progesteron působí pomocí svého receptoru, který je přítomný na plazmatické membráně (Rathi et al. 2003).

## 4 Závěr

Cílem této práce bylo shrnout poznatky o kapacitačních *in vitro* médií, v závislosti na určitý vybraný živočišný druh. Pro lepší pochopení účinku složek médií, zde byly popsány mechanismy kapacitace, které byly iniciovány účinky bikarbonátu, vápníku a akceptorem cholesterolu. Hlavní kapacitační změny byly popisovány v hlavičkové části spermie a byly doprovázeny popisem hyperaktivní motility, změny polarizace membrány, využití energetického substrátu. V rámci získávání energetického zdroje byl popsán vliv reaktivních forem kyslíku na spermie. Podkapitola “Proteinkináza A“ a “Hyperaktivní motilita“ zahrnuje především vybrané části kináz, které se podílejí na kapacitačním procesu. Bylo tak učiněno z důvodu komplikovaných interakcí dalších signálních drah. Také jsou určité dráhy obecně málo popsány a pochopeny, jelikož je kapacitace stále málo popsána.

Kapacitace v samičím prostředí, *in vivo*, probíhá ve vejcovodu, kde spermie utváří rezervoár. Utváření rezervoáru zajistí spermii životaschopnost do ovulace, kdy se z vaječníku uvolní oocyt. Na kapacitačním procesu se zde podílejí složky, které jsou přítomné v tekutinách vejcovodu.

Kapacitační média se snaží co nejvíce napodobovat složky, které se běžně vyskytují ve vejcovodech samice. Také se však osvědčily složky, které běžně nejsou přítomné v samičím reprodukčním traktu a zřejmě iniciují kapacitaci jiným mechanismem, než je to u běžných složek. U býčích spermií bylo prokázáno široké spektrum různých složek, podporující *in vitro* kapacitaci. U kanců však některé tyto složky neprokázaly vždy stejnou úspěšnost a některé složky, jako je například akceptor cholesterolu BSA, se prokázal jako nepotřebný. Avšak u obou zmíněných druhů se prokázal účinek bikarbonátu a vápníku. Odlišné výsledky byly zjištěny u hřebčích spermií. Pro hřebčí spermie nebylo zatím stanoveno účinné médium, které by podpořilo kapacitační a následný oplozovací proces. Zjištěné nároky na kapacitační složky bylo vysoké pH, oproti ostatním druhům. Jednou z možných kapacitačních složek se prokázal prokain, který však neúčinkuje samostatně na proces spojený s oplodněním. Podílí se především na hyperaktivní motilitě.

## 5 Literatura

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. Garland Science, New York.

Arnoult C, Cardullo RA, Lemos JR, Florman HM. 1996. Activation of mouse sperm T-type Ca<sup>2+</sup> channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(23):13004–13009.

Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM. 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(12):6757–6762.

Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B, Aitken RJ. 2004. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *Journal of cell science* **117**(16):3645–3657.

Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Australian journal of scientific research. Ser.B: Biological sciences* **4**(4):581–596.

Awda BJ, Buhr MM. 2010. Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) pathway and reactive oxygen species regulate tyrosine phosphorylation in capacitating boar spermatozoa. *Biology of reproduction* **83**(5):750–758.

Bailey JL, Tardif S, Dubé C, Beaulieu M, Reyes-Moreno C, Lefièvre L, Leclerc P. 2005. *Use of phosphoproteomics to study tyrosine kinase activity in capacitating boar sperm. Kinase activity and capacitation. Theriogenology* **63**(2):599–614.

Bailey JL. 2010. Factors regulating sperm capacitation. *System biology in reproductive medicine* **56**(5):334–348.

Barakat IA, Danfour MA, Galewan FA, Dkhil MA. 2015. Effect of various concentrations of caffeine, pentoxifylline, and kallikrein on hyperactivation of frozen bovine semen. *BioMed research international* (e948575) DOI: 10.1155/2015/948575

Barboni B, Mattioli M, Seren E. 1995. Influence of progesterone on boar sperm capacitation. *The Journal of endocrinology* **144**(1):13–18.

Bergqvist AS, Ballester J, Johannisson A, Hernandez M, Lundeheim N, Rodríguez-Martínez H. 2006. *In vitro* capacitation of bull spermatozoa by oviductal fluid and its components. *Zygote* (Cambridge, England) **14**(3):259–273.

Berruti G. 1994. Biochemical characterization of the boar sperm 42 kilodalton protein tyrosine kinase: its potential for tyrosine as well as serine phosphorylation towards microtubule-

- associated protein 2 and histone H 2B. *Molecular reproduction and development* **38**(4):386–392.
- Bilaspuri GS, Bansal AK. 2008. Mn<sup>2+</sup>: A potent antioxidant and stimulator of sperm capacitation and acrosome reaction in crossbred cattle bulls. *Archives Animal Breeding* **51**:149–158.
- Brokaw CJ, Nagayama SM. 1985. Modulation of the asymmetry of sea urchin sperm flagellar bending by calmodulin. *The Journal of cell biology* **100**(6):1875–1883.
- Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR. 1999. Cytosolic adenynyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:79–84.
- Byrd W. 1981. *In vitro* capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology* **215**(1):35–46.
- Campbell DL, Douglas LW, Range JC. 1979. Cannulation of the equine oviduct and chemical analysis of oviduct fluid. *Theriogenology* **12**(2):47–59.
- Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B, Garbers DL, Babcock DF. 2003. CatSper1 required for evoked Ca<sup>2+</sup> entry and control of flagellar function in sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(25):14864–14868.
- Carrera A, Gerton GL, Moss SB. 1994. The major fibrous sheath polypeptide of mouse sperm: structural and functional similarities to the A-kinase anchoring proteins. *Developmental biology* **165**(1):272–284.
- Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, Moss, SB. 1996. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Developmental biology* **180**(1):284–296.
- Castellani-Ceresa L, Mattioli M, Radaelli G, Barboni B, Brivio MF. 1993. Actin polymerization in boar spermatozoa: fertilization is reduced with use of cytochalasin D. *Molecular reproduction and development* **36**(2):203–211.
- Cohen G, Rubinstein S, Gur Y, Breitbart H. 2004. Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation. *Developmental biology* **267**(1):230–241.
- Cooper GM. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.



- Darr CR, Varner DD, Teague S, Cortopassi GA, Datta S, Meyers SA. 2016. Lactate and Pyruvate Are Major Sources of Energy for Stallion Sperm with Dose Effects on Mitochondrial Function, Motility, and ROS Production. *Biology of reproduction* **95**(2-34):1-11.
- Demarco IA, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De La Vega-Beltran JL, Hockensmith JW, Kopf GS, Darszon A, Visconti, PE. 2003. Involvement of a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in mouse sperm capacitation. *The Journal of biological chemistry* **278**(9):7001–7009.
- Dixit VD, Parvizi N. 2001. Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal reproduction science* **65**(1-2):1–16.
- Ecroyd H, Jones RC, Aitken RJ. 2003. Tyrosine phosphorylation of HSP-90 during mammalian sperm capacitation. *Biology of reproduction* **69**(6):1801–1807.
- Ehrenwald E, Foote RH, Parks JE. 1990. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Molecular reproduction and development* **25**(2):195–204.
- Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K. 1995. Ca<sup>2+</sup>-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Molecular reproduction and development* **40**(2):233–241.
- Gadella BM, Harrison RA. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development (Cambridge, England)* **127**(11):2407-2420.
- Gadella BM, Harrison RA. 2002. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biology of reproduction* **67**(1):340–350.
- Gadella BM, Miller NG, Colenbrander B, van Golde LM, Harrison RA. 1999. Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. *Molecular reproduction and development* **53**(1):108–125.
- Galantino-Homer HL, Visconti PE, Kopf GS. 1997. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent pathway. *Biology of reproduction* **56**(3):707–719.
- Ghersevich S, Massa E, Zumoffen C. 2015. Oviductal secretion and gamete interaction. *Reproduction (Cambridge, England)* **149**(1):R1–R14.
- Gibb Z, Lambourne SR, Aitken RJ. 2014. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biology of reproduction* **91**(3) (e77) DOI: 10.1095/biolreprod.114.118539.
- Goel P, Goel AK, Bhatia A, Kharche SD. 2016. Effect of capacitating agents on sperm pretreatment during *in vitro* fertilization for blastocyst production in caprines. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **40**(6):803-810.

- González-Martínez MT, Bonilla-Hernández MA, Guzmán-Grenfell AM. 2002. Stimulation of voltage-dependent calcium channels during capacitation and by progesterone in human sperm. *Archives of biochemistry and biophysics* **408**(2):205–210.
- Gutiérrez A, Garde J, García-Artiga C, Vázquez I. 1993. Ram spermatozoa cocultured with epithelial cell monolayers: an *in vitro* model for the study of capacitation and the acrosome reaction. *Molecular reproduction and development* **36**(3):338–345.
- Harayama H, Noda T, Ishikawa S, Shidara O. 2012. Relationship between cyclic AMP-dependent protein tyrosine phosphorylation and extracellular calcium during hyperactivation of boar spermatozoa. *Molecular reproduction and development* **79**(10):727–739.
- Harrison RA, Gadella BM. 2005. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* **63**(2):342–351.
- Hernández-González EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, López-González I, Demarco I, Wertheimer E, Darszon A, Visconti PE. 2006. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *The Journal of biological chemistry* **281**(9):5623–5633.
- Hernández-González EO, Treviño CL, Castellano LE, de la Vega-Beltrán JL, Ocampo AY, Wertheimer E, Visconti PE, Darszon A. 2007. Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation. *The Journal of biological chemistry* **282**(33):24397–24406.
- Ho HC, Granish KA, Suarez SS. 2002. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca<sup>2+</sup> and not cAMP. *Developmental biology* **250**(1):208–217.
- Ho HC, Suarez SS. 2003. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biology of reproduction* **68**(5):1590–1596.
- Hugentobler S, Morris DG, Kane MT, Sreenan JM. 2004. In situ oviduct and uterine pH in cattle. *Theriogenology* **61**(7-8):1419–1427.
- Hugentobler SA, Morris DG, Sreenan JM, Diskin MG. 2007. Ion concentrations in oviduct and uterine fluid and blood serum during the estrous cycle in the bovine. *Theriogenology* **68**(4):538–548.
- Hung PH, Suarez SS. 2010. Regulation of sperm storage and movement in the ruminant oviduct. *Society of Reproduction and Fertility supplement* **67**:257–266.
- Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* **168**(4277):697–698.

- Choi YH, Landim-Alvarenga FC, Seidel GE, Jr., Squires EL. 2003. Effect of capacitation of stallion sperm with polyvinylalcohol or bovine serum albumin on penetration of bovine zona-free or partially zona-removed equine oocytes. *Journal of animal science* **81**(8):2080–2087.
- Ignotz GG, Suarez SS. 2005. Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation in demembrated bovine sperm. *Biology of reproduction* **73**(3):519–526.
- Ijaz A, Hunter AG. 1989. Effect of Washing and Capacitating Media pH on Bull Sperm Motility, Acrosome Integrity, and Ability to Penetrate Zona-Free Hamster Oocytes<sup>1</sup>. *Journal of dairy science* **72**(10):2691–2699.
- Ijaz A, Hunter AG. 1989. Evaluation of calcium-free Tyrode's sperm capacitation medium for use in bovine *in vitro* fertilization. *Journal of dairy science* **72**(12):3280–3285.
- Kim EY, Noh EH, Noh EJ, Park MJ, Park HY, Lee DS, Riu KZ, Park SP. 2013. Effect of Glycosaminoglycans on *In vitro* Fertilizing Ability and *In vitro* Development Potential of Bovine Embryos. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **26**(2):178–188.
- Lamy J, Corbin E, Blache MC, Garanina AS, Uzbekov R, Mermillod P, Saint-Dizier M. 2017. Steroid hormones regulate sperm-oviduct interactions in the bovine. *Reproduction (Cambridge, England)* **154**(4):497–508.
- Lane M, Thérien I, Moreau R, Manjunath P. 1999. Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biology of reproduction* **60**(1):169–175.
- Leemans B, Gadella BM, Sostaric E, Nelis H, Stout TA, Hoogewijs M, Van Soom A. 2014. Oviduct binding and elevated environmental pH induce protein tyrosine phosphorylation in stallion spermatozoa. *Biology of reproduction* **91**(1-13):1-12.
- Leemans B, Gadella BM, Stout TA, De Schauwer C, Nelis H, Hoogewijs M, Van Soom A. 2016. Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. *Reproduction (Cambridge, England)* **152**(6):R233–R245.
- Lishko PV, Botchkina IL, Fedorenko A, Kirichok Y. 2010. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagellar voltage-gated proton channel. *Cell* **140**(3):327–337.
- Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. 2011. Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature* **471**(7338):387–391.
- Litvin TN, Kamenetsky M, Zarifyan A, Buck J, Levin LR. 2003. Kinetic properties of “soluble” adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *The Journal of biological chemistry* **278**(18):15922–15926.

- López-Albors O, Llamas-López PJ, Ortuño JÁ, Latorre R, García-Vázquez FA. 2021. *In vivo* measurement of pH and CO<sub>2</sub> levels in the uterus of sows through the estrous cycle and after insemination. *Scientific reports* 11(1) (e3194) DOI: 10.1038/s41598-021-82620-7.
- López-González I, Torres-Rodríguez P, Sánchez-Carranza O, Solís-López A, Santi CM, Darszon A, Treviño CL. 2014. Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Molecular human reproduction* 20(7):619–629.
- Loux SC, Crawford KR, Ing NH, González-Fernández L, Macías-García B, Love CC, Varner DD, Velez IC, Choi YH, Hinrichs K. 2013. CatSper and the relationship of hyperactivated motility to intracellular calcium and pH kinetics in equine sperm. *Biology of reproduction* 89(5-123):1-15.
- Macías-García B, González-Fernández L, Loux SC, Rocha AM, Guimarães T, Peña FJ, Varner DD, Hinrichs K. 2015. Effect of calcium, bicarbonate, and albumin on capacitation-related events in equine sperm. *Reproduction (Cambridge, England)* 149(1):87–99.
- Maitan PP, Bromfield EG, Hoogendijk R, Leung MR, Zeev-Ben-Mordehai T, van de Lest CH, Jansen J, Leemans B, Guimarães JD, Stout T, Gadella BM, Henning H. 2021. Bicarbonate-Stimulated Membrane Reorganization in Stallion Spermatozoa. *Frontiers in cell and developmental biology* 9 (e772254) DOI: 10.3389/fcell.2021.772254.
- Mannowetz N, Naidoo NM, Choo SA, Smith JF, Lishko PV. 2013. Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa. *eLife* 2 (e01009) 10.7554/eLife.01009.
- Marín-Briggiler CI, Jha KN, Chertihin O, et al. 2005. Evidence of the presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in human sperm and its involvement in motility regulation. *Journal of cell science* 118(9):2013–2022.
- Marquez B, Suarez SS. 2004. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biology of reproduction* 70(6):1626–1633.
- Marquez B, Suarez SS. 2007. Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca<sup>2+</sup> influx. *Biology of reproduction* 76(4):660–665.
- Martín-Hidalgo D, Macías-García B, González-Fernández L. 2022. Influence of different cellular concentrations of boar sperm suspensions on the induction of capacitation and acrosome reaction. *The Journal of reproduction and development* 68(1):68–73.
- McNutt TL, Killian GJ. 1991. Influence of bovine follicular and oviduct fluids on sperm capacitation *in vitro*. *Journal of andrology* 12(4):244–252.
- McPartlin LA, Suarez SS, Czaya CA, Hinrichs K, Bedford-Guaus SJ. 2009. Hyperactivation of stallion sperm is required for successful *in vitro* fertilization of equine oocytes. *Biology of reproduction* 81(1):199–206.

- Melendrez CS, Meizel S. 1995. Studies of porcine and human sperm suggesting a role for a sperm glycine receptor/Cl<sup>-</sup> channel in the zona pellucida-initiated acrosome reaction. *Biology of reproduction* **53**(3):676–683.
- Meyers SA, Overstreet JW, Liu IK, Drobnis EZ. 1995. Capacitation *in vitro* of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males. *Journal of andrology* **16**(1):47–54.
- Mizrahi R, Breitbart H. 2014. Mitochondrial PKA mediates sperm motility. *Biochimica et biophysica acta* **1840**(12):3404–3412.
- Mukai C, Okuno M. 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biology of reproduction* **71**(2):540–547.
- Murofushi H, Ishiguro K, Takahashi D, Ikeda J, Sakai H. 1986. Regulation of sperm flagellar movement by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Cell motility and the cytoskeleton* **6**(2):83–88.
- Nichol R, Hunter RH, Gardner DK, Leese HJ, Cooke GM. 1992. Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. *Journal of reproduction and fertility* **96**(2):699–707.
- Nixon B, Bielanowicz A, Anderson AL, Walsh A, Hall T, Mccloghry A, Aitken RJ. 2010. Elucidation of the signaling pathways that underpin capacitation-associated surface phosphotyrosine expression in mouse spermatozoa. *Journal of cellular physiology* **224**(1):71–83.
- Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of reproduction* **38**(5):1171–1180.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. 1989. Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biology of reproduction* **41**(4):683–699.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Uguz C, First NL. 1994. Differences in the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biology of reproduction* **51**(6):1099–1108.
- Pereira RJTA, Tuli RK, Wallenhorst S, Holtz W. 2000. The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore a 23187 on *in vitro* induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenology* **54**(2):185–192.
- Pinto FM, Ravina CG, Fernández-Sánchez M, Gallardo-Castro M, Cejudo-Román A, Candenas L. 2009. Molecular and functional characterization of voltage-gated sodium channels in human sperm. *Reproductive Biology and Endocrinology* **7** (e71) DOI: 10.1186/1477-7827-7-71.

Plaza Davila M, Martin Muñoz P, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, Balao da Silva CC, Peña FJ. 2015. Inhibition of Mitochondrial Complex I Leads to Decreased Motility and Membrane Integrity Related to Increased Hydrogen Peroxide and Reduced ATP Production, while the Inhibition of Glycolysis Has Less Impact on Sperm Motility. *PloS one*, 10(9) (e0138777) DOI: 10.1371/journal.pone.0138777.

Pommer AC, Rutllant J, Meyers SA. 2003. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biology of reproduction* **68**(4):1208–1214.

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 of the United States of America* **100**(25):14869–14874.

Rahman MM, Rahman M, Juyena NS, Bhuiyan MMU. 2020. Optimization of *in vitro* fertilization technique for oocytes of indigenous zebu cows. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology* **35**:142–148.

Rathi R, Colenbrander B, Stout TA, Bevers MM, Gadella BM. 2003. Progesterone induces acrosome reaction in stallion spermatozoa via a protein tyrosine kinase dependent pathway. *Molecular reproduction and development* **64**(1):120–128.

Reece WO. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat, 2., rozšířené vydání*. Grada. Praha.

Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Society of Reproduction and Fertility supplement* **65**:245–259.

Schlingmann K, Michaut MA, McElwee JL, Wolff CA, Travis AJ, Turner RM. 2007. Calmodulin and CaMKII in the sperm principal piece: evidence for a motility-related calcium/calmodulin pathway. *Journal of Andrology*. **28**(5):706–716.

Schreiber M, Wei A, Yuan A, Gaut J, Saito M, Salkoff L. 1998. Slo3, a novel pH-sensitive K<sup>+</sup> channel from mammalian spermatocytes. *The Journal of biological chemistry* **273**(6):3509–3516.

Soriano-Úbeda C, Romero-Aguirregomezcorta J, Matás C, Visconti PE, García-Vázquez FA. 2019. Manipulation of bicarbonate concentration in sperm capacitation media improves *in vitro* fertilisation output in porcine species. *Journal of animal science and biotechnology* 10 (e19) DOI: 10.1186/s40104-019-0324-y

Suarez SS. 2002. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* **37**(3):140–143.

- Sun P, Wang Y, Gao T, Li K, Zheng D, Liu A, Ni Y. 2021. Hsp90 modulates human sperm capacitation via the Erk1/2 and p38 MAPK signaling pathways. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* 19(1) (e39) DOI: 10.1186/s12958-021-00723-2.
- 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(1):207–213.
- Tardif S, Dubé C, Chevalier S, Bailey JL. 2001. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biology of reproduction* 65(3):784–792.
- Tash JS, Krinks M, Patel J, Means RL, Klee CB, Means AR. 1988. Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *The Journal of cell biology* 106(5):1625–1633.
- Thaler CD, Thomas M, Ramalie JR. 2006. Reorganization of mouse sperm lipid rafts by capacitation. *Molecular reproduction and development* 73(12):1541–1549.
- Töpfer-Petersen E, Wagner A, Friedrich J, Petrunkina A, Ekhlasi-Hundrieser M, Waberski D, Drommer W. 2002. Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. *The Journal of experimental zoology* 292(2):210–215.
- Tsai PS, Brewis IA, van Maaren J, Gadella BM. 2012. Involvement of complexin 2 in docking, locking and unlocking of different SNARE complexes during sperm capacitation and induced acrosomal exocytosis. *PloS one*, 7(3) (e32603) DOI: 10.1371/journal.pone.0032603.
- Tsai PS, De Vries KJ, De Boer-Brouwer M, Garcia-Gil N, van Gestel RA, Colenbrander B, Gadella BM, Van Haefen T. 2007. Syntaxin and VAMP association with lipid rafts depends on cholesterol depletion in capacitating sperm cells. *Molecular membrane biology* 24(4):313–324.
- Tvrda E, Kováčik A, Tušimová E, Massányi P, Lukáč N. 2015. Resveratrol offers protection to oxidative stress induced by ferrous ascorbate in bovine spermatozoa. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering* 50(14):1440–1451.
- van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Helms JB, Brouwers JF, Gadella BM. 2005. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Molecular human reproduction* 11(8):583–590.
- van Gestel RA, Helms JB, Brouwers JF, Gadella BM. 2005. Effects of methyl-beta-cyclodextrin-mediated cholesterol depletion in porcine sperm compared to somatic cells. *Molecular reproduction and development* 72(3):386–395.

- Varner DD, Bowen JA, Johnson L. 1993. Effect of heparin on capacitation/acrosome reaction of equine sperm. *Archives of andrology* **31**(3):199–207.
- Vijayaraghavan S, Goueli SA, Davey MP, Carr DW. (1997). Protein kinase A-anchoring inhibitor peptides arrest mammalian sperm motility. *The Journal of biological chemistry* **272**(8):4747–4752.
- Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development (Cambridge, England)* **121**(4):1139–1150.
- Visconti PE. 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(3):667–668.
- Watanabe H, Kondoh G. 2011. Mouse sperm undergo GPI-anchored protein release associated with lipid raft reorganization and acrosome reaction to acquire fertility. *Journal of cell science* **124**(15):2573–2581.
- Williams AC, Ford WC. 2001. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *Journal of andrology* **22**(4):680–695.
- Zapata-Carmona H, Soriano-Úbeda C, París-Oller E, Matás C. 2020. Periovarian oviductal fluid decreases sperm protein kinase A activity, tyrosine phosphorylation, and *in vitro* fertilization in pig. *Andrology* **8**(3):756–768.
- Zhu Z, Li R, Fan X, Lv Y, Zheng Y, Hoque S, Wu D, Zeng W. 2019. Resveratrol Improves Boar Sperm Quality via 5'AMP-Activated Protein Kinase Activation during Cryopreservation. *Oxidative medicine and cellular longevity* (e5921503) DOI: 10.1155/2019/5921503.