

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Kapacitace hřebčích spermií**

**Bakalářská práce**

**autor práce: Diana Řeháková**

**Chov koní**

**školitel: Ing. Filipa Bubeníčková, Ph.D.**

© 2022 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Kapacitace hřebčích 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 neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22. dubna 2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala především Ing. Filipě Bubeníčkové, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, za veškeré rady, poskytnuté materiály a za trpělivost. Také bych chtěla poděkovat mé rodině a kamarádům za psychickou podporu a motivaci v celém studiu.

# Kapacitace hřebčích spermíí

## Souhrn

Spermie jsou samčí pohlavní buňky, které se tvoří v semenotvorných kanálcích varlat. Spermie během svého života procházejí několika známými i neznámými maturačními změnami v dějích zvaných kapacitace a akrozomální reakce v prostředí samičího reprodukčního traktu. Schopnost oplodnění vyžaduje dvě fáze zrání spermíí. První se vyskytuje v nadvarleti, kde dochází k fyziologickým změnám v obsahu lipidů a proteinů v membráně spermíí. Po zrání v nadvarleti vyžaduje spermie další povrchové úpravy, ke kterým dochází uvnitř samičího pohlavního traktu, konkrétně ve vejcovodu.

Po ejakulaci během průchodu samičím pohlavním traktem dochází ke zrácímu procesu zvanému kapacitace. Kapacitace spermíí je uspořádaná sekvence procesů, které představují dynamické děje nezbytné pro oplodnění oocytů *in vivo* nebo *in vitro*. Během kapacitace dochází k biochemickým i fyziologickým změnám, které souvisí s hyperaktivací pohybu spermie umožňující spermíím vázat se a pronikat do zona pellucida a následně fúzovat s oocytem. Tyto změny spolu s následnou akrozomovou reakcí jsou nezbytné pro proniknutí do zona pellucida, a také pro spojení se s plazmatickou membránou oocytů.

*In vivo* kapacitace nastává v samičím reprodukčním traktu, což je prostředí, které vhodně reguluje interakce mezi gametami a podporuje oplodnění. Po uložení ejakulátu do dělohy je životaschopná populace spermíí transportována do místa oplodnění ve vejcovodu. V čase ovulace se spermie navázané na epitel vejcovodů aktivují a následně uvolní z epitelu vejcovodů, aby se setkaly se zralým oocytem.

*In vitro* kapacitaci lze napodobit pomocí inkubace spermíí v nádobě v definovaných médiích za správných podmínek. Spermie hřebců se sice dokážou *in vitro* vázat na zona pellucida, bohužel ale nedokážou iniciovat některou reakci v blízkosti oocytu a nemohou tedy pronikat do perivitellinního prostoru. Selhání penetrace spermíí nejspíše souvisí s nepřítomností optimalizovaného média pro oplodnění *in vitro* obsahující molekuly nezbytné pro podporu kapacitace spermíí hřebců. Neuspokojivé výsledky *in vitro* fertilizace u koní jsou s největší pravděpodobností způsobeny nedostatečnou kapacitací spermíí v důsledku chybějícího optimálního kapacitačního média pro hřebce.

**Klíčová slova:** kapacitace, akrozomální reakce, spermie, ejakulát, hřebec



# Capacitation of stallion spermatozoa

## Summary

Sperm are male sex cells that form in the seminiferous tubules of the testes. Sperm undergo several known and unknown maturational changes during their lifetime in processes called capacitation and acrosomal reactions in the environment of the female reproductive tract. The ability to fertilize requires two stages of sperm maturation. The first occurs in the epididymis, where physiological changes in the lipid and protein content of sperm occur. After maturation in the epididymis, sperm require further surface modifications that occur within the female reproductive tract, specifically in the fallopian tube.

After ejaculation, during passage through the female genital tract, a maturation process called capacitation occurs. Sperm capacitation is an ordered sequence of processes that represent the dynamic events necessary for fertilization of oocytes *in vivo* or *in vitro*. During capacitation, biochemical and physiological changes occur that are related to the hyperactivation of sperm movement allowing sperm to bind and penetrate the zona pellucida and subsequently fuse with the oocyte. These changes, together with the subsequent acrosome reaction, are necessary for penetration of the zona pellucida and also for fusion with the oocyte plasma membrane.

*In vivo* capacitation provides the female reproductive tract, an environment that appropriately regulates gamete interactions and promotes fertilization. Once the ejaculate is placed in the uterus, a viable sperm population is transported to the site of fertilization in the fallopian tube. At the time of ovulation, sperm attached to the fallopian tube epithelium are activated and subsequently released from the fallopian tube epithelium to meet the mature oocyte.

*In vitro* capacitation can be mimicked by incubating sperm in a container in defined media under the correct conditions. Although stallion spermatozoa can bind to the zona pellucida *in vitro*, unfortunately they cannot initiate some reactions in the vicinity of the oocyte and thus cannot penetrate the perivitelline space. The failure of sperm penetration is probably related to the absence of an optimized medium for *in vitro* fertilization containing molecules necessary to promote sperm capacitation in stallions. Failure of equine *in vitro* fertilization is most likely due to the inability to bind to the zona pellucida due to lack of capacitation.

**Keywords:** capacitation, acrosome reaction, sperm, ejaculate, stallion

# Obsah

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Úvod .....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>2 Cíl práce.....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>3 Literární rešerše.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>3.1 Anatomie reprodukční soustavy hřebců .....</b>                             | <b>9</b>  |
| 3.1.1 Primární pohlavní orgány .....  | 9         |
| 3.1.2 Sekundární pohlavní orgány .....  | 9         |
| 3.1.3 Přídavné pohlavní orgány .....  | 10        |
| <b>3.2 Spermie .....</b>  | <b>11</b> |
| 3.2.1 Stavba spermií .....  | 11        |
| 3.2.2 Spermatogeneze .....  | 13        |
| 3.2.3 Maturace spermií .....  | 14        |
| 3.2.4 Vazba spermií na vejcovod.....  | 14        |
| <b>3.3 Kapacitace spermií hřebce .....</b>  | <b>16</b> |
| 3.3.1 Základy procesu kapacitace .....  | 16        |
| 3.3.2 Kapacitace <i>in vivo</i> .....   | 17        |
| 3.3.3 Transport spermií přes děložní lumen .....                                  | 20        |
| 3.3.4 Transport přes uterotubální spojení .....                                   | 21        |
| 3.3.5 Prostředí kapacitace .....  | 21        |
| 3.3.6 Akrozomální reakce u hřebce .....   | 22        |
| 3.3.7 Kapacitace <i>in vitro</i> .....  | 23        |
| <b>3.4 Porovnání kapacitace u hřebců s jinými druhy hospodářských zvířat ....</b> | <b>24</b> |
| 3.4.1 Kapacitace u býků.....  | 24        |
| 3.4.2 Kapacitace u kanců .....  | 25        |
| <b>4 Závěr .....</b>  | <b>27</b> |
| <b>5 Literatura.....</b>  | <b>28</b> |

# 1 Úvod

Kapacitace je velice důležitý proces zrání, který spermie podstupují po ejakulaci během jejich průchodu samičím pohlavním traktem. Tyto biochemické změny umožňují spermii vázat se a pronikat do zona pellucida a následně fúzovat s oocytom. Plazmatická membrána spermie fúzuje s vnější akrozomální membránou, což má za následek exocytickou událost známou jako akrozomová reakce, která zahrnuje uvolnění lytických enzymů, které lokálně rozpouštějí zona pellucida (Leemans et al. 2019). Kapacitace také zahrnuje změny v pohyblivosti spermií, známé jako hyperaktivace, kdy spermie změni charakter svého pohybu. Spermie se pohybují rychleji do kruhu, což pomáhá spermii odpoutat se z ovidukálního rezervoáru a proniknout tak do zona pellucida (Yanagimachi 1994). Kapacitace vede k akrozomálním změnám potřebným pro penetraci spermií do vajíčka, a zároveň brání předčasné aktivaci akrozomu, dokud spermie nedosáhnou místa oplodnění a nedostanou se do kontaktu s vajíčkem (Mckinnon 2011).

Ke kapacitaci může dojít *in vivo*, během průchodu samičím pohlavním traktem nebo *in vitro*, během inkubace spermií za správných podmínek (Cheng 1998). U koní je proces kapacitace oproti jiným druhům popsán velmi zřídka. Konvenční *in vitro* fertilizace není při práci s koňskými gametami velice účinné. Na celém světě se narodila pouze 2 hříbata pocházející z *in vitro* oplození, obě před více než 25 lety. Úspěch těchto dvou případů byl připočten ko-inkubaci *in vitro* oocytů s hřebčími spermii ošetřenými iontoforem vápenatým. Dodnes probíhá společná inkubace zralých oocytů s kapacitovanými spermii, což je standartní metoda pro produkující embrya *in vitro* u několika jiných druhů (Leemans et al. 2016). U koní ale stále konvenční *in vitro* fertilizace nefunguje, a proto nejdou zavést například některé biotechnologické metody reprodukce jako je *in vitro* fertilizace. O procesu kapacitace se ví mnohem více u jiných druhů například u kance nebo býka. Tyto poznatky o jiných druzích nám mohou pomoci i v reprodukci u koní.

## **2 Cíl práce**

Cílem práce bylo sestavit literární rešerši na téma kapacitace spermií hřebců.

## **3 Literární rešerše**

### **3.1 Anatomie reprodukční soustavy hřebců**

Funkční anatomie reprodukční soustavy hřebců se skládá z primárních, sekundárních, a navíc z přídatných pohlavních orgánů. Mezi primární orgány patří dvě varlata, která mají exokrinní a endokrinní funkci a šourek, který je zodpovědný za ochranu varlat a má termoregulační funkci. Sekundárními orgány jsou nadvarlata, odvodné žíly, močová trubice a penis. Pokud jde o přídatné pohlavní orgány, jedná se o semenné váčky, bulbouretrální žlázy, prostatu a ampule chámovodu (Abdel-baky et al. 2020).

#### **3.1.1 Primární pohlavní orgány**

Primárními orgány jsou varlata, která jsou zodpovědná za produkci spermií (tento proces se nazývá spermatogeneze) a samčího pohlavního hormonu testosteronu. Ten podporuje vývoj přídatných pohlavních žláz, vede k vytváření sekundárních sexuálních znaků a podmiňuje chování samců jako je páření, ale také má vliv na tělesný růst (Abdel-baky et al. 2020). Testosteron, produkováný Leydigovými buňkami, přechází navázáním na protein vázající androgen do sousedních Sertoliho buněk, kde působí. Sertoliho buňky jsou řízeny jak folikostimulačním hormonem FSH, tak i testosteronem. Je známo, že FSH spouští proces spermatogeneze, rozvíjí spermatogonie na sekundární spermatocyty. Testosteron poté dokončuje jejich vývoj ze sekundárních spermatocytů na spermie připravené k průchodu do nadvarlete ke zrání (Morel et al. 2008).

Každé varle je zavěšeno v šourku semenným provazcem v tříselné oblasti, který se táhne od břicha k jeho úponu na varle. Varle hřebce je ve svislé poloze obvykle vejčitého tvaru, jeho velikost je důležitá při hodnocení plemenného hřebce. Čím větší varlata jsou, tím jsou výkonnější pro velkou produkci a skladování spermií (Abdel-baky et al. 2020). Varlata mohou vážit 300-350 g na pár. Jejich velikost roste alometricky s obecným tělesným růstem až do dosažení konečné tělesné velikosti, přibližně do 5 let věku (Morel et al. 2008).

Šourek je mírně převislý vak vysunuté kůže zavěšený mezi stehny, ve kterém jsou uložena varlata. Teplota varlat v šourku činí 33 °C. Funkcí šourku je zajištění nižší než tělesné teploty pro správný vývoj spermií. Je rozdělen do dvou šourkových komor, zvenku rozdělený šourkovými kožními švy a zevnitř vazivovou přepážkou (Abdel-baky et al. 2020). Šourek se skládá z několika vrstev. Vrchní vrstva kůže obsahuje několik rozptýlených chloupků, pod ní se nachází jemná elastická tkáň, která reaguje na změny vnější teploty. Vnitřní vrstva je tenká obsahující velké množství mazových a potních žláz, které pomáhají varlatům s termoregulací (Abdel-baky et al. 2020).

#### **3.1.2 Sekundární pohlavní orgány**

Nadvarle se skládá z hlavy, těla a ocasu. Funguje jako skladovací prostor a místo konečného dozrávání spermií před ejakulací (Abdel-baky et al. 2020).

Hlava nadvarlete je rozšířená a pevně připojená k hlavovému konci varlete. Skládá se z 15-20 lalůčků, které se skládají z kliček odvodných kanálků varlete. Tělo nadvarlete se připojuje na hlavu a má tvar protáhlého úzkého oblouku, volně připojeného k varleti. Před

koncem ocasu varlete se tělo nadvarlete rozšiřuje a přechází v ocas nadvarlete. Ocas nadvarlete má zaoblený kuželovitý tvar a o 2-3 cm přesahuje ocasní konec varlete (Marvan et al. 2017). Ocas nadvarlete je rezervoárem zralých spermií, kde jsou drženy v metabolickém klidovém stavu, aby se zabránilo předčasné aktivaci. U hřebce má odhadovanou kapacitu pro uložení dostatečného množství spermií pro 10 ejakulátů (Sostaric et al. 2008). Životaschopnost spermií v ocasu nadvarlete se po 24 hodinách při 22 °C prudce snižuje, ale dobré výsledky viability byly hlášeny pro spermie nadvarlete hřebců po dobu až 96 hodin, pokud jsou varlata udržovány při teplotě 4 °C (James et al. 2002).

Penis hřebce se skládá ze tří částí. Z kořene, který spojuje penis s pánví dvěma silnými vazy a párem svalů. Z těla, které je hlavní částí a z žaludu, což je citlivý volný konec penisu (Abdel-baky et al. 2020). V klidové poloze je penis zatažený, a tudíž chráněný v předkožce. V této poloze jej drží svaly, včetně zatahovacího svalu. Penis hřebce je svými dvěma kořeny připevněn ke spodní části pánevní kosti ischiocarvenózními svaly. Zde ve svém počátku je penis také držen v poloze závěsným vazem připevněným k pánvi. Topořivě těleso je největší část penisu. Je obsaženo v obalu varlete, fibro-elastickém pouzdru, který udržuje integritu penisu, ale stále umožňuje zdvojnásobení velikosti pozorované při erekci. Podél spodní části penisu je sval zatahovač, jehož kontrakce vrací penis do předkožky (Morel et al. 2008). Délka penisu u hřebce je 50-60 cm. Při plné erekci se penis může až zdvojnásobit na 80-90 cm na délku a 10 cm na šířku. Při ejakulaci se velikost žaludu ztrojnásobí, čímž dojde k otevření děložního čípku, aby se umožnilo ukládání spermií přímo do dělohy, může také hrát roli v prevenci počátečního úniku spermatu z klisny (Abdel-baky et al. 2020).

### 3.1.3 Přídavné pohlavní orgány

Samci většiny druhů mají řadu přídavných žláz, přičemž relativní velikost žláz odráží relativní důležitost jejich sekretů v semenné plazmě. Semenná plazma je hlavní tekutá frakce spermatu. Semenná plazma je důležitou součástí pro dopravu spermatu ke klisně a zajišťuje konečné zrání. Hlavní funkcí této plazmy je poskytování energie, ochrana před změnami osmotického tlaku, pH a před oxidací (Morel et al. 2008).

Vedlejší pohlavní žlázy, párové semenné vázky nebo také vezikulární žlázy, jsou laločnaté žlázy umístěné na obou stranách močového měchýře a jsou asi 16-20 cm dlouhé. Jsou laločnaté a svým vnějším vzhledem připomínají velké vlašské ořechy. Vylučují velké množství semenné plazmy s vysokou koncentrací draslíku, kyseliny citrónové a gelu. Jejich funkce, a tedy i objem sekrece, závisí na koncentraci cirkulujícího testosteronu (Morel et al. 2008).

Prostata se skládá ze dvou pyramidálních laloků. U dospělého hřebce je každý lalok téměř 4 až 6 cm široký a 2 až 4 cm tlustý. Prostata je laločnatá žláza umístěná na kraniálním konci močové trubice, obepínající ji ze všech stran. Sekrece prostaty u hřebce jsou zásadité a mají vysoký obsah bílkovin, kyseliny citronové a zinku. Tato tekutina pomáhá při čištění močové trubice pro průchod spermií během ejakulace (Little & Woods 1987).

Bulbouretrální žlázy nebo Cowpersovy žlázy jsou dvě vejčité žlázy umístěny nejbližší ke kořenu penisu. Jsou téměř 3 až 4 cm dlouhé a 2 až 3 cm široké ležící na obou stranách močové trubice v blízkosti ischiálního oblouku. Tyto žlázy produkují pre-ejakulační čiré, řídké a vodnaté tekutiny, které obsahují pufrý, živiny a stabilizátory pro spermie. Jejich sekrece může také působit jako lubrikant usnadňující průchod spermií (Little & Woods 1987).

Ampulové žlázy jsou párové výběžky chámovodu v místě, kde se setkávají s močovou trubicí. Tyto žlázy významně přispívají jak k pre-spermatickým frakcím, tak k frakcím bohatým na spermie. Jejich sekrety mají vysoký obsah ergothioninu a antioxidačního činidla, které působí na vyčistění produktů metabolismu spermií (Morel et al. 2008).

## 3.2 Spermie

### 3.2.1 Stavba spermií

Spermie jsou samčí pohlavní buňky, které se tvoří v semenotvorných kanálcích varlat. Tyto tubuly obsahují komplexní řadu vyvíjejících se zárodečných buněk, které nakonec tvoří samčí gamety. Plně zformovaná spermie je podlouhlá buňka, která se skládá z hlavičky, obsahující jádro a z bičíku obsahující aparát nezbytný pro motilitu buněk. Celá spermie je pokryta plazmatickou membránou. Krček spojuje hlavičku spermie s jejím bičíkem, který je rozdělen na střední, hlavní a koncovou část (Mckinnon 2011).

Spermie jsou velmi zvláštní buňky, protože během svého života procházejí několika důležitými kroky zrání, které jsou výsledkem jejich interakce s různými prostředími, kterými migrují a různými funkcemi, které plní. V nadvarletí získávají spermie motilitu a fertilitu působením sekretů epiteliálních buněk a složek luminálních tekutin. Při ejakulaci se stávají pohyblivými a jsou ovlivňovány složkami semenné plazmy, i když ještě nejsou schopné oplodnit oocyt (de Lamirande et al. 1997).

Hlavička spermie je převážně tvořena jaderným materiálem, který obsahuje haploidní počet chromozomů (Morel et al. 2008). Jádro obsahuje genetický materiál ve formě vysoce kondenzované DNA (Brito 2007). Je pokryto redukováným jaderným obalem, ze kterého byly během spermiogeneze odstraněny komplexy jaderných pórů (Sutovsky & Manandhar 2006).

Hlavička spermie má dvojitou membránu (vnější buněčnou membránu a vnitřní jadernou membránu s výjimkou oblasti akrozomu v horní části hlavy, kde je další akrozomová membrána). Důležitost akrozomální membrány se ukáže, když se uvažuje o oplodnění. Je zodpovědná za rozpad buněčné membrány a jaderné membrány spermií při oplodnění, což umožňuje fúzi samčího a samičího jádra (Morel et al. 2008). Hlavička spermie hřebce je oválně protáhlá, přední třetina je nejširší. Hlavička je poměrně plochá a podélný řez má přibližně eliptický tvar s poněkud silnějším koncem (Brito 2007).

Krček spermie je krátký spojovací segment mezi hlavou a ocasem. Krček obsahuje spojovací kus proximálních centriol a několik malých mitochondrií. Spojovací kus obsahuje segmentované sloupce, které jsou tvořeny z vláknitého proteinu a každý sloupec je v krčkové oblasti srostlý se začátkem jednoho z devíti vláken (Brito 2007).

Bičík hřebčí spermie je 50-70  $\mu\text{m}$  dlouhý a představuje pohybové ústrojí spermie. Bičík je spojen s hlavičkou centriolovou částí. Bičík je tvořen spojovacím oddílem, hlavním oddílem a koncovým oddílem (Mckinnon 2011).

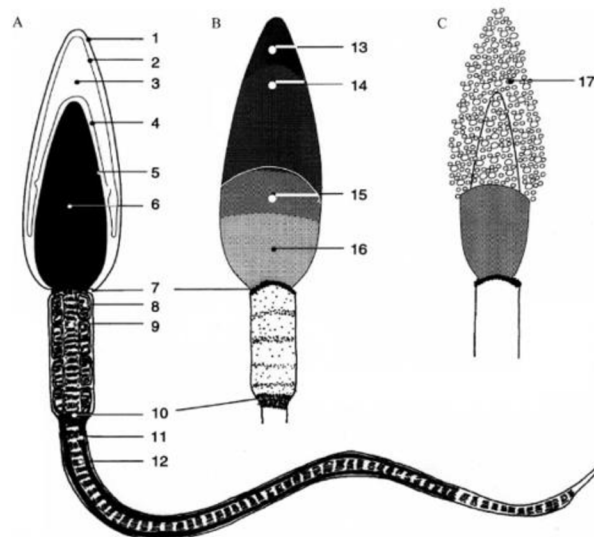
Akrozom je dvoustěnná struktura umístěna mezi plazmatickou membránou a přední částí hlavičky spermie (Mckinnon 2011). Akrozom pokrývá přední část hlavičky spermie a obsahuje hydrolytické enzymy, které se uvolňují, aby spermie pronikly do oocytu. Kromě toho se předpokládá, že proteázy a hydrolázy obsažené v akrozomu hrají roli v penetraci komplexu oocytárního kumulu kromě zona pellucida (Orsolini et al. 2021).

Plazmatická membrána spermie hraje kritickou roli v regulaci interakce spermie s vajíčkem. Během spermatogeneze je plazmatická membrána spermie a mnohé z jejích dalších struktur přizpůsobena její roli během transportu samičím pohlavním traktem a interakci s oocytem. Plazmatická membrána spermie vstupující do nadvarlete však ještě není zcela zralá a během průchodu přes nadvarle se plazmatická membrána významně mění uvolněním, modifikací a absorbcí proteinů a lipidů (Gadella et al. 2001). Ve skutečnosti je plazmatická membrána místem nejvýraznějších změn během zrání v nadvarleti. Je dobře známo, že plazmatická membrána spermií má schopnost absorbovat různé látky ze svého prostředí. Některé z nich pocházejí ze semenotvorného tubulu, nadvarlete a chámovodu (Yanagimachi 1981).

Vnější plazmatická membrána může být rozdělena na akrozomální, postakrozomální, oblast krčku, střední část a hlavní část. Každá oblast membrány může být charakterizována fosfolipidovou dvojrstvou heterogenně exprimovaných lipidů, proteinů, sacharidů a cholesterolu, která se primárně vytváří během spermatogeneze. Povrch buňky je navíc pokryt glykokalyxem, sítí glykoproteinů a glykolipidů, které jsou připojené k matrici oligosacharidů a polygosacharidů, o kterých je známo, že napomáhají správné funkci spermií, a také pomáhají při přežití v průchodu samičím reprodukčním traktem (Orsolini et al. 2021).

Existují značné rozdíly ve složení lipidů plazmatické membrány spermií u různých druhů savců. Také ale existuje obecné podobnost. Například plazmatická membrána kančích spermií obsahuje přibližně 67 % fosfolipidů, 25 % neutrálních lipidů a 8 % glykolipidů (Vos et al. 1994). Spermie hřebce se ale liší především relativně vysokým obsahem cholesterolu. Membrána spermií hřebce obsahuje přibližně 57 % fosfolipidů, 37 % cholesterolu a 6 % glykolipidů (Gadella et al. 2001). Hřebčí a další savčí spermie sdílejí tu vlastnost, že fosfoethanolaminglyceridy a fosfocholinglyceridy obsahují téměř výhradně 22:5 nebo 22:6 mastných kyselin, což je pro spermie zcela unikátní (Vos et al. 1994).





Obr. 1. Schematické znázornění spermii hřebce. Panel A: řez spermii. Panel B: subdomény plazmatické membrány hlavičky spermie (povrchový pohled). Panel C: Akrozomová reakce. Plné čáry představují membránové dvojvrstvy: (1) plazmatická membrána; (2) vnější akrozomální membrána; (3) akrozomová tekutina; (4) vnitřní akrozomální membrána; (5) jaderný obal; (6) jádro; (7) jaderný kruh; (8) mitochondrie; (9) proximální část bičíku (střední část); (10) prstencový prstenec; (11) distální část bičíku (hlavní a koncové části); (12) vláknité pouzdro; (13) apikální subdoména; (14) pre-ekvatoriální subdoména; (15) ekvatoriální subdoména; (16) post-ekvatoriální subdoména; (17) smíšené vezikuly vzniklé během akrozomové reakce fúzí plazmatické membrány s vnější akrozomální membránou. Gadella et al. 2001/Animal Reproduction Science 68:249-265

### 3.2.2 Spermatogeneze

Spermatogeneze je přísně kontrolovaný molekulární a buněčný proces, který spočívá v množení a proliferaci spermatogonických kmenových buněk, rekombinaci genetického materiálu během meiotického dělení spermatocytů a diferenciaci a zrání spermatid na testikulární spermie (Lüpold et al. 2011).

V procesu spermatogeneze se buňky replikují a dozrávají z diploidních zárodečných buněk nazývaných spermatogonie na haploidní, zralé spermie. Každý den se produkují miliardy spermii (16 milionů spermii na gram tkáně varlat hřebce za den) v dlouhých svinutých kanálcích, zvaných semenotvorné tubuly, které obsahují spermatogenní epitel a Sertoliho buňky (Card 2005). Semenné tubuly tvoří více než 70 % objemu koňských varlat (Johnson et al. 1997). Spermie začínají jako nedostatečně vyvinuté zárodečné buňky nebo spermatogonie připojené ke stěně semenotvorných kanáleků, a pak se procesem spermatogeneze progresivně vyvinou ve zralé spermie (Morel et al. 2008).

Průřezy semenotvorných kanáleků odhalují přilehlé buňky, které produkují spermie cyklickým způsobem opakující se přibližně každých 12 dní u hřebce, což způsobuje stálou produkci spermii. Semenotvorný tubul je rozdělen na bazální a adluminární vrstvu, která je plně obklopená bazální laminou. Leydigovy buňky, které jsou stimulovány luteinizací (hormon LH), produkující pohlavní hormony včetně testosteronu, jsou klíčem k regulaci spermatogeneze, a také zodpovědné za samčí fenotyp (Orsolini et al. 2021). Spermatocytogeneze trvá u hřebců

19,4 dne, meióza 19,4 dne a spermiogeneze 18,6 dne (Brito 2007). Celý proces spermatogeneze u hřebce trvá přibližně 57 dní (Orsolini et al. 2021).

Normální spermatogeneze u savců závisí na udržování optimální teploty varlat o 3-5 °C nižší, než je tělesná teplota. Zvýšená teplota varlat může způsobit vznik testikulární hypoxie s následnými škodlivými účinky na produkci a kvalitu spermií. Abnormální spermatogeneze vzniká v důsledku mnoha faktorů včetně onemocnění, podvýživy, endokrinologických poruch, genetických defektů a environmentálních rizik (Brito 2007).

### 3.2.3 Maturace spermií

Maturace spermií zahrnuje procesy zrání, ke kterým dochází při průchodu spermie nadvarletem a dále spermie procházejí několika známými i neznámými sekvenčními maturačními změnami v dějích zvaných kapacitace a akrozomální reakce v prostředí samičího reprodukčního traktu (Hafez et al. 2000).

Schopnost oplodnění spermií vyžaduje dvě fáze zrání spermií. První se vyskytuje v nadvarletí, kde dochází k fyziologickým změnám v obsahu lipidů a proteinů ve spermiích. Mezi hlavní složky, které tvoří epididymální prostředí, patří několik proteinů jako je osteopontin, manosidáza, galaktosidáza, laktoferin a klusterin (Cunha et al. 2017).

V nadvarletí spermie dosáhnou schopnosti progresivní motility, což zahrnuje změny ve flexibilitě a vzorcích pohybu jejich bičíků. Rychlá progresse dopředu se objevuje nejprve u několika spermií uprostřed těla nadvarlete a stává se převládajícím vzorem motility u spermií z ocasu nadvarlete a chámovodu. K těmto změnám dochází během deseti až patnácti denního transportu přes nadvarle (Mckinnon 2011). Tyto faktory spojené s diferencovaným prostředím nadvarlete zajišťují zrání spermií, zachování životaschopnosti spermií a zachování fertilizační kapacity po dobu několika týdnů. Po zrání nadvarlete vyžaduje spermie další povrchové úpravy, ke kterým dochází uvnitř samičího pohlavního traktu, konkrétně ve vejcovodu (Cunha et al. 2017).

### 3.2.4 Vazba spermií na vejcovod

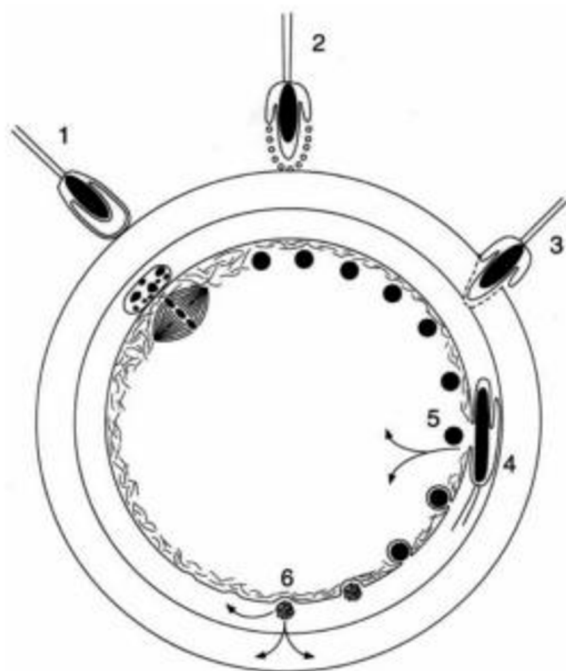
*In vivo* vazba spermií na epitelální buňky v istmu neboli v kaudální části vejcovodu, je pravděpodobně nezbytná pro získávání a ukládání životaschopných a potencionálních, nekapacitovaných spermií před oplodněním, aby se vytvořil rezervoár spermatu (Suarez 2002).

Vazba spermií na epitel vejcovodu byla pozorována a dokumentována *in vivo* a *in vitro* u několika různých druhů a může být zodpovědná za vytvoření rezervoáru spermatu v šíji vejcovodu. Zdá se, že istmický rezervoár zpomaluje transport spermií do ampule, dokud nenastane ovulace (Lefebvre et al. 1995). Vazba spermie na vejcovod podporuje prodloužení doby životaschopnosti inseminovaných spermií. To je důležité, protože doba inseminace a ovulace nejsou u savců synchronizovány. Spermie je třeba udržovat a vyživovat, aby se překlenulo časové období mezi uložením spermií v samičím traktu a ovulací. Vazba na epitel vejcovodů prodloužuje životnost spermií, což vede k životaschopné populaci spermií v době ovulace. Kromě toho vazba spermie na vejcovod v istmickém místě zajišťuje selekci vysoce kvalitní populace spermií (Boilard et al. 2002). Tyto spermie mají schopnost vázat se na epitel a lze je nalézt v kryptách vejcovodů, zatímco spermie se změněnou membránou a špatnou životaschopností se nacházejí v lumen vejcovodu (Teijeiro & Marini 2012).

Když se blíží čas ovulace, uvolňuje se z rezervoáru spermií přísně regulovaný malý počet spermií, což pomáhá předcházet polyspermickému oplodnění. Uvolnění příliš velkého množství spermií by predisponovalo k polyspermii, zatímco příliš málo spermií může vést k selhání fertilizace (Hunter 2012). K uvolňování spermií z vejcovodu přispívá mnoho procesů souvisejících s kapacitací jako je nástup hyperaktivované motility. Předpokládá se, že hyperaktivovaná motilita je potlačena u spermií vázaných v rezervoáru spermatu. Jiné procesy související s kapacitací jsou také potlačeny, aby se zabránilo polyspermickému oplodnění (Hung & Suarez 2010).

U klisen byla D-galaktóza dříve uváděna jako klíčová molekula pro usnadnění vazby spermie na vejcovod, na základě studií využívajících diferencovaný model monovrstvy buněk epitelu vejcovodů. Proteiny vázající galaktózu skutečně byly izolované z plazmatické membrány koňských spermií (Sabeur et al. 2007).

Zatímco vazba spermie na vejcovod jasně hraje roli při oplodnění, tato fyzická interakce s epitelem může být povinná pouze v preovulačním období (Leemans et al. 2016). Když jsou spermie transportovány do vejcovodu během periovulačního období (tj. pokud je inseminace provedena po ovulaci), jsou tyto gamety okamžitě v kontaktu s induktory kapacity. Vazba spermií na povrch vejcovodů tedy není nutná. To naznačuje, že sekrece vejcovodů, vylučované primárně ampulárním epitelem, mohou být stejně nebo více relevantní pro indukci kapacity u hřebčích spermií než vazba spermie na vejcovod (Maitan et al. 2021).



Obr. 2. Schematické znázornění sekvence interakcí mezi samčí a samičí gametou potřebných pro oplodnění: (1) vazba spermie na ZP s její apikální subdoménou; (2) akrozomová reakce, mnohočetná fúze vnější akrozomální membrány s apikální a preekvatoriální plazmatickou membránou; (3) pronikání spermatu přes ZP; (4) vazba spermií a fúze s oolemou (fertilizace) jsou výlučné události ekvatoriální plazmatické membrány; (5) aktivace oocyty cytosolickými faktory a rychlým blokem polyspermie; (6) sekrece korových granulí (kortikální reakce) způsobující definitivní (pomalý) blok polyspermie.

Gadella et al. 2001/Animal Reproduction Science 68:249-265

### 3.3 Kapacitace spermií hřebce

#### 3.3.1 Základy procesu kapacitace

Kapacitace spermií je uspořádaná sekvence procesů na spermiích u všech savců, včetně koní (Yanagimachi 1994). Jde obecně o aktivační proces, který spermie podstoupí po ejakulaci, během průchodu samičím reprodukčním traktem, konkrétně v istmické oblasti vejcovodu (Mckinnon 2011). Část kapacitace zahrnuje odstranění nebo změnu komponent plazmatické membrány, do čehož se zapojují látky pocházející z epididymální tekutiny nebo semenné plazmy. Změny metabolismu spermií a biochemie se také vyskytují během procesu kapacitace. Jedním z výsledků kapacitace je zvýšení propustnosti membrány pro vápník, což umožňuje rychlý pohyb vápníku do spermií. Tento přítok vápníku je nutný pro fúzi plazmatické membrány a vnější akrozomální membrány, která iniciuje akrozomální reakci savčích spermií (Yanagimachi & Usui 1974). Vápník vstupuje do spermií dvoufázovým způsobem, s počátečním malým zvýšením intracelulárního vápníku během kapacitace, po kterém následuje mnohem větší zvýšení intracelulárního vápníku, ke kterému dochází v době akrozomové reakce (Florman 1994).

Spermie jsou ejakulovány do dělohy a transportovány na utero-tubální spojení. Poté je vytvořen rezervoár nekapacitovaných spermií vazbou na epitelální buňky vejcovodů. Před

ovulací oocyty spermie prochází kapacitací, tím je aktivován hyperaktivní pohyb a spermie jsou uvolňovány z rezervoáru dále do vejcovodu. Uvolněné spermie se setkají se zralým oocytem. Všechny tyto procesy jsou zahájeny poté, co se spermie dostaly do kontaktu s epiteliálními buňkami a sekrety vejcovodů stimulovanými periovulačním stádiem. Kapacitace je reverzibilní jev, což znamená, že po ošetření kapacitovaných spermií specifickými látkami nebo biologickými tekutinami jako například semenná plazma, dochází k takzvané dekapacitaci, což je inhibice potřebná k tomu, aby spermie pokračovali v inkubaci nebo delším pobytu v samičím pohlavním traktu a později podstoupili „rekapacitaci“ (Bedford & Chang 1962).

Ke kapacitaci může dojít buď *in vivo*, během průchodu spermií samičím pohlavním traktem nebo *in vitro*, během inkubace promytých spermií za správných podmínek (Cheng et al. 1998). Např. sérový albumin je jednou z klíčových složek pro správnou kapacitaci spermií savců. Kapacitace je doprovázena buněčnými i molekulárními změnami včetně zvýšené tyrosinové fosforylace proteinů spermií a rozvojem hyperaktivované motility spermií. Oba tyto procesy vyžadují extracelulární vápník, ale jak vápník vstupuje do spermií během kapacitace, není dobře známo (Xia & Ren 2009).

### 3.3.2 Kapacitace *in vivo*

*In vivo* spermie procházejí samičím reprodukčním traktem a zejména lumen vejcovodu je prostředí, které vhodně reguluje interakce mezi gametami a podporuje oplodnění. Identifikace faktorů z vejcovodu podporujících oplodnění by byla velkým přínosem pro vývoj prostředí pro oplodnění koní *in vitro* (Maitan et al. 2021). Kůň je rozdílný od prasete a jiných velkých domácích druhů v několika ohledech. Estrus trvá 5-7 dní a k oplození může dojít až 6 dní po páření. Požadavek na přežití spermií v samičím reprodukčním traktu je proto delší než u jiných druhů. Byla prokázána interakce mezi koňskými spermii a homologními monovrstvami buněk vejcovodu v kultivaci. Za těchto podmínek vykazují připojené spermie prodlouženou motilitu a životaschopnost, zatímco uvolněné spermie vykazují změny podobné kapacitaci a přilnou zona pellucida (Thomas et al 1994).

U mnoha druhů bylo prokázáno, že spermie musí podstoupit proces kapacitace, což je předpokladem pro průběh většiny případů oplodnění (Meyers 2001). Po uložení ejakulátu, buď do pochvy, děložního čípku (např. u prasat) nebo dělohy (např. u koní), je životaschopná populace spermií transportována přes dělohu do místa oplodnění ve vejcovodu. Rezervoár spermií, který podporuje fyzickou interakci mezi spermii a povrchem epitelu vejcovodů, je vytvořen v kaudálním istmu. Když se blíží ovulace, spermie navázané na epitel vejcovodů se aktivují nebo zkapacitují a následně se uvolní z epitelu vejcovodů, aby se setkaly se zralým oocytem (Maitan et al. 2021).

Plazmatická membrána spermií, životně důležitá složka během častých dějů při oplodnění, podléhá rozsáhlým biochemickým změnám při tranzitu spermií z proximální do distální oblasti nadvarlete. Kromě dozrávání spermií v nadvarletí musí savčí spermie mezi pářením a oplodněním podstoupit během pobytu v samičím pohlavním traktu řadu biochemických a funkčních modifikací, které jsou obecně označovány jako kapacitace (Tulsiani et al. 1997). Tento proces zahrnuje primárně modifikace membrány, včetně změn ve složení lipidů, vlastností povrchů, tekutosti, propustnosti vápníku a koncentrací cholesterolu (Odeh et al. 2003). Odstranění proteinů spojených se spermii a cholesterolu spouští základní

strukturální membránové modifikace u mnoha druhů, které vedou k akrozomové reakci (Kurz et al. 2005).

Během kapacitace se metabolismus spermií zvyšuje a vzory pohybu spermií se mění z přímočaré progresse do hyperaktivované motility, ve které spermie vykazují hvězdicový nebo osmičkový typ pohybu (Graham 1996). Mezi další změny patří penetrace kumulu, vazba a penetrace zona pellucida, akrozomová reakce a fúze s oocytem. Všechny tyto události zahrnují plazmatickou membránu spermie (Rahul et al. 2001).

Tyto změny spolu s následnou akrozomovou reakcí jsou nezbytné pro navázání a proniknutí do zona pellucida a poté na spojení se s plazmatickou membránou oocytů. Kapacitace je tedy kritická událost v procesu oplodnění. Kapacitace také zahrnuje změny v pohyblivosti spermií, známé jako hyperaktivace, o kterých se předpokládá, že pomáhají postupu spermií nahoru vejcovodem tím, že umožní spermii vzdálit se od epitelu vejcovodu a poskytují potřebný tah k proniknutí do zona pellucida (Rahul et al. 2001).

Hyperaktivace se jeví jako podstatná událost kapacitace (de Lamirande et al. 1997). Hyperaktivace je pohybový vzorec pozorovaný u spermií v místě a čase oplodnění u savců. Ta může být rozhodující pro úspěch oplodnění, protože zvyšuje schopnost spermií oddělit se od stěny vejcovodu, pohybovat se kolem v labyrintovém lumen vejcovodu, aby pronikly slizničními látkami a konečně mohly proniknout do zona pellucida. Pohyb hyperaktivovaného spermatozoa se za různých fyzikálních podmínek a u různých druhů může lišit, ale v zásadě zahrnuje zvýšení amplitudy pohybu bičíku a asymetrii rytmu (Tulsiani et al. 1997).

Pravděpodobně existuje signál ve vejcovodu k zahájení hyperaktivace ve správný čas, žádný však dosud nebyl identifikován. Existují důkazy, že zdroj signálu je folikulární tekutina, ale je známo, že spermie se dříve hyperaktivují a poté se uvolní tekutina do vejcovodu (Ho & Suarez 2001).

Změna sacharidového profilu povrchu spermií je jednou z klíčových molekulárních událostí v procesu oplodnění. Kyselina sialová je nejvzdálenější monosacharid, který uzavírá většinu glukanů na povrchu membrány spermií v nadvarletí (Young et al. 1986). Kyselina sialová, která obvykle zaujímá koncovou pozici řetězců savčích spermií, má důležité funkce při oplodnění. Po kapacitaci *in vitro* existují na hlavičce spermie dva hlavní vazebné vzorce. U některých spermií sialylace existuje na ekvatoriálním segmentu a zadní hlavičce, zatímco u jiných spermií dochází k sialylaci v akrozomální oblasti a ekvatoriálním segmentu. Analýza průtokovou cytometrií naznačila, že úroveň sialylace na membráně kančího spermatu po kapacitaci klesá (Wang et al. 2018).

### **Role cholesterolu**

Cholesterol je nezbytnou molekulou v buněčných membránách, ale příliš mnoho cholesterolu může být toxické. Proto si savčí buňky vyvinuly složité mechanismy k odstranění přebytečného cholesterolu (Juhl & Wüstner 2022).

Snížení cholesterolu v plazmatické membráně je úzce spojeno s kapacitací. Nízká hladina odtoku cholesterolu zvyšuje kapacitaci a indukuje fosforylaci dvou proteinů bez ovlivnění životaschopnosti spermií (Shadan et al. 2004). Klíčovou rolí membránového cholesterolu v kapacitačních jevech byl přenos lipidů z membránových váček do spermií, který je účinně dekapacitoval. Později se ukázalo, že exogenně přidané sterolsulfáty měly podobné

účinky (Davis 1979). To naznačuje, že hovězí sérový albumin (BSA) v kapacitačním médiu *in vitro* má schopnost odstraňovat cholesterol z membrány, a že *in vivo* by tuto roli plnily proteiny vázající steroly přítomné v tekutinách dělohy a vejcovodů (například lipoproteiny s vysokou hustotou) (Shadan et al. 2004). Inkubace spermií v médiu obsahující hovězí sérový albumin vede k uvolnění významného množství cholesterolu ve srovnání s médiem bez BSA. Uvolňování cholesterolu je spojené s aktivací signální transdukční dráhy zahrnující protein kinázu A, a tyrosin kinázové systémy, což vede k fosforylaci a kapacitaci proteinového tyrosinu (Osheroff et al. 1999).

Jak se efflux cholesterolu spojuje s regulací signálních transdukčních drah není v současnosti jasné. Jednou z možností je, že před kapacitací se cholesterol koncentruje ve specializovaných mikrodoménách plazmatické membrány nebo lipidových raftech. Současné koncepce přisuzují existenci těchto raftů důležité signalizační vlastnosti, které působí tak, že spojují proteinové soubory dohromady. Vezmeme-li toto v úvahu, vyčerpání nebo doplnění cholesterolu v plazmatické membráně bude mít hluboký vliv na chování raftových komplexů (Zajchowski & Robbins, 2002). V somatických buňkách se předpokládá, že odstranění cholesterolu naruší lipidové rafty, a tím aktivuje signální události zahrnující tyrosinkinázy, G proteiny nebo jiné molekuly. Protože aktivace podobných signálních dějů během kapacitace koreluje s odstraňováním cholesterolu z plazmatické membrány, lze předpokládat, že ve spermiích může být cholesterol rovněž koncentrován v lipidových raftech a jeho odtok souvisí se změnami v lipidových raftech spermií (Salicioni et al. 2007).

### **Vliv $Ca^{2+}$**

Vápník je esenciální iont, který reguluje motilitu spermií, kapacitaci a akrozomovou reakci, tři procesy nezbytné pro úspěšné oplodnění (Darszon et al. 2011). Intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$  jsou v buňkách pečlivě regulovány. Plazmatická membrána a subcelulární kompartmenty, jako je akrozom, redundantní nukleární obal a mitochondrie, pevně kontrolují vstup  $Ca^{2+}$ , sekreci a mobilizaci ve spermiích. Podél ocasu spermie, který je dlouhý a úzký, signalizace  $Ca^{2+}$  musí být koordinována vysoce organizovanými molekulami. Aby se umožnilo oplodnění, jsou tyto signalizační molekuly organizovány způsobem, který jim umožňuje regulovat progresivní motilitu a také vývoj asymetrického vzorce pohybu bičíku zvaného hyperaktivovaná motilita během kapacitace spermií. Aby se tedy dosáhlo motility spermií, kapacitace a akrozomové reakce ve správný čas a na správném místě, musí být intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$  přesně regulovány (Finkelstein et al. 2020).

### **Fosforylace proteinů savčích spermií**

Fosforylace proteinů je posttranslační modifikace proteinů, která umožňuje buňce ovládat různé buněčné procesy. V eukaryotických buňkách se většina fosforylace vyskytuje na serinových nebo threoninových zbytcích a v menším množství rozsahu na tyrosinové zbytky. Stav fosforylace fosfoproteinů je řízena aktivitou proteinu kinázy a fosfatázy (Visconti & Kopf 1998). Hlavní tyrosin fosforylované proteiny během průběhu kapacitace a fertilizace jsou lokalizovány v bičíku, i když tyrosin fosforylace méně hojných proteinů může být také přítomna na hlavičce spermie. Spermie navázané na zona pellucida a fúzující s plazmatickou membránou oocytů jsou charakterizovány tyrosinem fosforylovaným bičíkem. Fosforylace proteinu

v bičíku je spojena s hyperaktivovanou motilitou spermií, ale může také regulovat další funkce zapojené do fúze spermie a oocyty (Tardif et al. 2001).

Faktory ovlivňující vzhled fosforylace pravděpodobně pochází z prostředí obklopujícího spermie, ale jejich příjem a zpracování budou pravděpodobně regulovány rozdílně ve specifických krocích uvnitř samičího pohlavního traktu. Jeden z těchto faktorů je glukóza, jejíž metabolické produkty se zřejmě účastní signálních drah podporou přesného nástupu fosforylace tyrosinu ve spermatu vedoucí k úspěšnému oplodnění (Umer & Sakkas 2003).

Fosforylace proteinu tyrosinu se zvyšuje u spermií během kapacitace u řady druhů včetně myši, lidí, skotu a prasat, křečků a koček (Leyton & Saling 1989). Fosforylace proteinu tyrosinu se zdá být nezbytná pro oplození oocyty (Visconti & Kopf 1998).

### 3.3.3 Transport spermií přes děložní lumen

Po ejakulaci nebo inseminaci jsou spermie hřebců transportovány z těla děložního do vejcovodu především v důsledku děložních kontrakcí (pasivní transport spermií), s relativně malým přispěním aktivní motility spermií (Katila 2001). První spermie jsou pozorovány ve vejcovodu do 2 hodin po inseminaci, zatímco největší počet spermií je do vejcovodu transportován 4 hodiny po inseminaci. Pouze malý počet je transportován do vejcovodu (Maitan et al. 2021).

Existuje několik mechanismů, které pomáhají čistit dělohu a eliminovat přebytečné spermie. Za prvé, myometriální kontrakce mechanicky vypuzují spermie děložním krčkem (Katila et al. 2000). Za druhé, asi půl hodiny po inseminaci hraje důležitou roli příliv polymorfonukleráních neutrofilů (PNM) do děložního lumenu při fagocytóze spermií. Tato zánětlivá reakce je škodlivá pro všechny spermie transportované přes děložní lumen. Pouze mrtvé spermie jsou však vysoce citlivé na tuto eliminaci, zatímco životaschopné spermie jsou chráněny před vazbou na polymorfonukleární neutrofilů a tím i před fagocytózou. Faktory semenné plazmy mají v tomto ochranném mechanismu důležité funkce. Například laktoferin zvyšuje mezibuněčnou interakci mezi PNM a spermiemi v děloze (Maitan et al. 2021). Je zajímavé, že cystein, bohatý na sekreční protein, vylučovaný přídatnými pohlavními žlázami do semenné plazmy během ejakulace, vyvolává výrazné snížení vazby mezi životaschopnými spermiemi a PMN (Doty et al. 2011). Životaschopné spermie dorazí do vejcovodu, zatímco PMN fagocytují mrtvé spermie v děloze (Maitan et al. 2021).

Během transportu spermií do vejcovodu je třeba inhibovat nástup kapacitace u životaschopných spermií. Aby se zabránilo předčasné kapacitaci, jsou spermie během a po ejakulaci pokryty dekapacitačními faktory pocházejícími převážně ze semenné plazmy. Kromě toho savčí semenná plazma obsahuje několik populací extracelulárních vezikul vylučovaných epiteliálními buňkami na různých místech samčího reprodukčního traktu, včetně přídatných pohlavních žláz. Například prostasomy, vylučované prostatickým epitelem, pravděpodobně fungují jako dekapacitační faktory u koní, protože prostasomy mají obsah lipidů skládající se hlavně z nasycených mastných kyselin a velké koncentrace cholesterolu a sfingomyelinu (Sostaric et al. 2008).

Vysoký obsah cholesterolu může vést k inhibici změn plazmatické membrány souvisejících s kapacitací a akrozomovou reakcí stabilizací plazmatické membrány spermií, čímž se zabrání předčasné kapacitaci spermií (Sostaric et al. 2008).



U koní, kdy jsou spermie biotechnologicky vloženy přímo do vejcovodu přes infundibulum (rozšířená nálevka vejcovodu), se míra březosti neliší od míry získané po umělé inseminaci do těla dělohy. To naznačuje, že ani děložní tělo, ani šíje vejcovodu nejsou povinným místem, přes které je třeba spermie hřebce transportovat před kapacitací, zatímco lumen ampule obsahuje základní prostředí pro spermie hřebce, aby dosáhly schopnosti podstoupit kapacitaci (Maitan et al. 2021).

### **3.3.4 Transport přes uterotubální spojení**

U klisen jsou do rezervoáru ve vejcovodech vybírány morfologicky normální spermie s progresivní pohyblivostí (Scott et al. 2000). Po transportu dělohou je potřeba spermie hřebce transportovat přes uterotubální spojení, což je uzavřený svalový svěrač, aby se vytvořil rezervoár spermií. Není zatím jisté, zda musí dojít k otevření uterotubálního spojení během preovulačního období, aby spermie vstoupily do vejcovodu. Účinky estrogenů nebo faktorů semenné plazmy jako jsou prostaglandiny, které jsou závislé na fázi estrálního cyklu, mohou hrát roli při vyvolání relaxace uterotubálního spojení (Maitan et al. 2021). Předpokládá se, že během folikulární fáze se toto spojení může otevřít v důsledku účinku estrogenů, zatímco během luteální fáze s dominancí progesteronu zůstává uzavřeno. Transport vyvíjejícího se embrya z ampulárně-isthmické junkce do dělohy 6-6,5 dne po ovulaci, tedy během progesteronem dominované postovulační fáze estrálního cyklu, může poskytnout další pohledy na regulaci otevírání či zavírání uterotubálního spojení (Weber et al. 1996).

### **3.3.5 Prostředí kapacity**

Čerstvě ejakulovaná spermie musí podstoupit proces zrání v samičím reprodukčním traktu, proces nazývaný kapacitace, aby byly tyto gamety připravené k oplodnění oocyty. Nakonec je pouze malá část z celkové populace inseminovaných spermií transportována do místa oplodnění. Na základě studií *in vitro* se předpokládá, že do vejcovodu jsou transportovány pouze spermie s vynikající životaschopností, morfologií a pohyblivostí (Hunter et al. 1987). Interakce mezi vysoce životaschopnými spermii a prostředím vejcovodů za účelem podpory kapacity a fertilizace byla rozsáhle studována u několika savců. Nicméně u klisen nebylo prostředí vejcovodu podrobně popsáno. Lumen ampule vejcovodu avšak obsahuje základní prostředí pro spermie hřebců, aby dosáhly schopnosti kapacity (Maitan et al. 2021).

Samice ovulují v různých časech po začátku říje. Zdá se, že délka života spermií v samičím reprodukčním traktu souvisí s délkou říje. Například sperma koní a prasat mají delší životnost než spermie skotu. Dlouhověkost spermií u koně a prasete zvyšuje pravděpodobnost přítomnosti životaschopných spermií při ovulaci, když inseminace probíhá v dostatečném předstihu. Nízký počet spermií ve vejcovodu není důsledkem pomalého transportu spermií, ale spíše jejich řízeného pohybu do ampule uterotubálním spojením, jakož i jejich pohybu z pochvy a děložního čípku do dělohy a postupného uvolňování z rezervoáru ve vejcovodech. Tento vztah reguluje počet spermií v místě oplodnění (zabraňuje polyspermii) a v rezervoáru spermií, aby bylo zajištěno, že kapacitované spermie budou přítomny až do samotné ovulace (Mckinnon 2011).

### 3.3.6 Akrozomální reakce u hřebce

Akrozomální reakce je exocytární událost zahájená bezprostředně po primární vazbě spermie na oocyt. Plazmatická membrána spermie se na více místech spojí se spodní akrozomální membránou a obsah akrozomu se uvolní. Pokud je však akrozomová reakce zahájena příliš brzy, před navázáním na zona pellucida, dojde ke ztrátě enzymů a spermie již nebudou schopné pronikat do zóny a nebudou tedy schopné oplodnění (Gadella et al. 2001).

Akrozomová reakce je specializovaná událost, která plní dvě funkce. Za prvé, vezikulace plazmatické membrány s vnější akrozomální membránou uvolňující akrozomální enzymy nezbytné pro spermie, které prochází přes vnější obaly oocytu. Za druhé, akrozomová reakce a ztráta akrozomálního obsahu obnaží vnitřní akrozomální membránu a plazmatickou membránu překrývající ekvatoriální segment hlavičky spermie. Je to část spermií, která obsahuje receptory pro oocyt. Proto pouze spermie, které projdou akrozomovou reakcí se správně navážou k oocytu a splynou s ním (Graham 1996).

Skutečná akrozomová reakce zahrnuje fúzi plazmatické membrány spermií s vnější akrozomální membránou s následnou rozsáhlou vezikulací přes přední segment akrozomu. To se liší od takzvané falešné akrozomové reakce, ke které dochází během stárnutí nebo degenerace spermií (Mckinnon 2011). Degenerací byly zaznamenány změny akrozomu spojené s nevratným poškozením buněk, smrtí a cytolýzou, což je falešná akrozomová reakce a tyto změny se vyskytují u nepohyblivých spermií (Aalseth & Saacke 1987).

Fúze a vezikulace akrozomu uvolňují hydrolytické enzymy, například hyaluronidázu a akrosin, které se podílejí na penetraci vajíčka (Mckinnon 2011). Funkční význam akrozomové reakce je dvojitý, předpokládá se, že je stěžejní ak pro penetraci spermií do zona pellucida, tak pro fúzi spermií s oolemou neboli s plazmatickou membránou vajíčka (Casey et al. 1993). Fyziologická akrozomová reakce je dobře koordinovaný proces, ke kterému může dojít pouze u živých spermií. Fyziologická akrozomová reakce byla nazvaná „skutečnou akrozomovou reakcí“, zatímco ztráta akrozomů v důsledku degenerativních změn se nazývá „falešná akrozomová reakce“ (Bedford 1970). Při studiích kapacitace a akrozomové reakce může být velmi důležité rozlišování mezi skutečnými a falešnými akrozomovými reakcemi. Toto rozlišení například poskytuje relevantnější koncové hodnocení spermií odebraných ze samičího reprodukčního traktu, srovnání podmínek inkubace *in vitro* nebo hodnocení látek, které modelují indukci akrozomové reakce. Také je toto rozlišení velmi důležité pro aplikované studie, včetně hodnocení technik inkubace a skladování spermií (Casey et al 1993). Vzhledem k tomu, že akrozomová reakce je nutná pro oplodnění a fyziologické akrozomové reakce mohou nastat až po zahájení kapacitace, lze je považovat za informativní koncový marker pro hodnocení funkcí spermií (Meyers 1995). Podle současného názoru kapacitované a akrozom intaktní spermie iniciují vazbu na zona pellucida. Následně je akrozomová reakce indukována jednou z glykoproteinových složek zony pellucidy a spermie, které podstoupí akrozomovou reakci proniknou a nakonec oplodní oocyt (Yanagimachi 1994).

U spermií hřebců je *in vitro* pozorován pouze nízký výskyt (20 %) akrozomových reakcí vázaných na zónu po 1 hodině inkubace s oocyty. Tento nízký výskyt akrozomové reakce u spermií vázaných na zóny může znamenat, že *in vivo* se na indukci akrozomové reakce u těchto spermií podílejí další fyziologické složky. Tato snížená hodnota akrozomové reakce může alespoň částečně vysvětlit špatný výsledek *in vitro* fertilizace u koní (Cheng et al. 1998).

Kromě zona pellucida mohou k indukci akrozomové reakce požadované pro úspěšné oplodnění přispívat různá další biologická činidla přítomná v blízkosti ovulovaného oocyty. Folikulární tekutina je kandidátem, protože při ovulaci je kumulus oocytární komplex a folikulární tekutina transportována současně z folikulu do ampulky vejcovodu, kde dochází k oplodnění (Cheng et al. 1998). Kromě zona pellucida bylo prokázáno, že progesteron vázaný na protein, přítomný v lidské folikulární tekutině, indukuje akrozomovou reakci spermií. Bylo také prokázáno, že volný progesteron je schopen vyvolat akrozomovou reakci jak u hřebců, tak i u jiných druhů (Cheng et al. 1998).

### 3.3.7 Kapacitace *in vitro*

*In vivo* kapacitace je zahájena, když je spermie vystavena prostředí v samičích reprodukčních orgánech, což je děloha a vejcovod, v blízkosti času ovulace. Kapacitaci *in vitro* lze napodobit pomocí inkubace spermií v nádobě obsahující  $\text{HCO}_3$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a albumin, po provedení centrifugace na základě hustoty gradientu k oddělení spermií ze semenné plazmy.  $\text{HCO}_3$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a albumin jsou tři kapacitační faktory, o nichž je známo, že indikují změny spermatu potřebné pro získání potenciálu u mnoha druhů (Leemans et al. 2016). Ke kapacitaci dochází *in vitro* v definovaných médiích, jejich složení je založeno na koncentraci elektrolytů ve vejcovodu (Grasa et al. 2006).

Konvenční *in vitro* fertilizace (IVF) není při práci s koňskými gametami velice účinné. Přestože se spermie hřebců *in vitro* vážou na zona pellucida, tyto gamety nedokážou iniciovat některou reakci v blízkosti oocyty a nemohou tedy proniknout do perivitelinního prostoru. Selhání penetrace spermií s největší pravděpodobností souvisí s nepřítomností optimalizovaného média pro oplodnění *in vitro* obsahující molekuly nezbytné pro podporu kapacitace spermií hřebců (Maitan et al. 2021).

Na celém světě se narodila pouze dvě hříbata pocházející z *in vitro* oplození, obě před více než 25 lety v letech 1990-1991. Úspěch IVF těchto dvou případů byl připočten ko-inkubaci *in vitro* oocytů s hřebčimi spermii ošetřenými ionoforem vápenatým (Leemans et al. 2016).

Více než 25 let probíhá společná inkubace zralých oocytů s kapacitovanými spermii, což je standartní metoda pro produkující embrya *in vitro* u několika druhů. U koní ale stále konvenční IVF nefunguje. Podmínky *in vitro* kapacitace jsou pravděpodobně hlavní překážkou (Leemans et al. 2016).

Přehled publikovaných studií IVF u koní ilustruje neuspokojivé míry úspěšnosti pohybující se v průměru mezi 0-33 %. I při použití ionoforu vápníku, heparinu, proteinů zona pellucida, kofeinu a progesteronu pro spuštění aktivace spermií je míra oplodnění stále velmi nízká. V roce 2009 (McPartlin) byla uvedena velice slibná míra oplodnění (61 %) po společné inkubaci koňských oocytů se spermii hřebců ošetřených prokainem k navození hyperaktivované motility. O sedm let později však tato technika stále nebyla potvrzena zprávami o tvorbě blastocyst nebo narození hříbat. Navíc bylo prokázáno, že prokain ovlivňuje koňské oocyty a indukuje cytokinezi cestou závislou na pH. Teoreticky by překážky pro koňské IVF mohly spočívat na úrovni nedostatečného zrání oocytů nebo neúplné kapacitace spermií (Leemans et al. 2016). V tomto ohledu bylo prokázáno, že zatímco IVF s použitím *in vivo* zralými oocyty nejsou úspěšné, *in vitro* zralé oocyty přenesené do vejcovodu inseminované klisny poskytují podobnou rychlost vývoje embrya jako spontánní ovulace (Hinrichs et al.

2002). Posledně uvedené pozorování potvrzuje, že oocyty jsou schopné zrát *in vitro*, což zase naznačuje, že koňská kapacitační nebo fertilizační média postrádají jeden nebo více faktorů vejcovodu potřebných k tomu, aby spermie pronikly do zona pellucida a vstoupily do oocytu (Dell'Aquila et al. 1996).

Stručně řečeno, selhání koňského IVF je s největší pravděpodobností způsobeno neschopností spermií proniknout do zona pellucida v důsledku nedostatečné aktivace (kapacitace). Naproti tomu konvenční inseminace dosahuje relativně vysoké míry oplodnění. V tomto případě poskytuje vejcovod a jeho sekrece optimální prostředí pro dozrávání a interakci gamet, včetně transportu samčích a samičích gamet do místa oplození, konečného zrání gamet, oplození, časný embryonální vývoj a transport embrya do dělohy (Leamans et al. 2016). Během konvenčního IVF je třeba tyto specifické fyziologické děje stimulovat ve vhodném pořadí (Tremoleda et al. 2003). Bylo testováno několik sloučenin na jejich schopnost indukovat kapacitaci a akrozomální reakci ve spermatu hřebců *in vitro*. Heparin, koňské proteiny zona pellucida, kofein a lysofosfolipidy. Všechny zvyšují procento spermií, které kapacitují a jejich akrozomy zreagují, ale žádný významně nezlepšuje rychlost penetrace oocytů. Na druhé straně ionofor vápníku indukuje změny podobné akrozomové reakci ve spermatu hřebce a usnadňuje penetraci oocytů (Alm et al. 2001). Ve skutečnosti byl ionofor vápníku aktivátorem spermií použitým během produkce pouze dvou zdokumentovaných hříbat *in vitro* fertilizací (Palmer et al. 1991). Další sloučeninou je progesteron, který je přítomen ve folikulární tekutině, a předpokládá se, že se účastní aktivace spermií *in vivo*. Vazba hřebčího spermatu na homologní zona pellucida a následná akrozomová reakce jsou skutečně zesíleny progesteronem v závislosti na dávce (Cheng et al. 1998).

### **3.4 Porovnání kapacitace u hřebců s jinými druhy hospodářských zvířat**

#### **3.4.1 Kapacitace u býků**

Kapacitaci *in vitro* a indukci akrozomové reakce lze provést u býků několika způsoby. Po kapacitaci je jedním primárním signálem, který iniciuje akrozomovou reakci, změna permeability membrány plazmy pro vápník. Proto dvojmocné kationtové ionofory nebo ionomycin, uměle indikují vstup vápníku do spermatu, což vede k reakci akrozomů u býka a hřebce. Ke skutečné akrozomové reakci dochází pouze u živých, membránově neporušených spermií. Je tedy důležité nejen analyzovat viabilitu spermií, ale také současně určit normalitu akrozomu (Landím-Alvarenga et al. 2004).

Obecně se uznává, že inkubace s heparinem je nutná k indukci kapacitace ejakulovaných býčích spermií *in vitro*. Proces kapacitace implikuje mnoho biochemických dějů a je v korelaci s modifikovanou pohyblivostí spermií a fosforylací specifických proteinů na tyrosinových zbytcích. Přítomnost heparinu skutečně značně zvyšuje frekvenci kmitání bičíků býčích spermií a indukuje významné zvýšení amplitudy laterálního pohybu hlavičky ve srovnání se spermiemi inkubovanými bez heparinu. Heparin indukuje fyziologické změny v několika parametrech motility spermií (Chamberland et al. 2001).

Vývoj úspěšných metod *in vitro* fertilizace pro oocyty skotu posunuly skot jako model pro reprodukční technologie. Objev heparinu jako kapacitačního činidla umožnil výzkumníkům nenákladnou a dostupnou zásobu býčích gamet pro experimentování v reprodukčních

biotechnologiích, jako je přenos genů a klonování. Ústřední událostí, kterou savčí spermie musí podstoupit, než bude moci oplodnit oocyt, je kapacitace. Přestože existují metody, které vedou k účinnému oplodnění *in vitro*, stále chybí znalosti o molekulárních mechanismech kapacitace. Zatímco během kapacitace dochází k mnoha událostem, zdá se, že regulace intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  je jednou z nejdůležitějších (Parrish et al. 1999).

Další faktor ovlivňující kapacitaci je progesteron. Zdá se, že progesteron stimuluje kapacitaci spermií a indukuje akrozomovou reakci u některých druhů. U skotu je nyní dobře známo, že hlavní proteiny semenné plazmy skotu podporují kapacitaci spermií. Progesteron vylučovaný buňkami kumulu a také progesteron obsažený ve folikulární tekutině, indukuje akrozomovou reakci nejen u skotu, ale také například u hřebce či kance (Isabelle et al. 2003). Progesteron obsažený ve vysoké koncentraci během ovulace ve folikulární tekutině, může působit na spermie předtím, než se navážou na zona pellucida. Folikulární tekutina podporuje procesy kapacitace a akrozomové reakce v býčích spermiích (Denisenko et al. 2021).

### 3.4.2 Kapacitace u kanců

Mnoho milionů spermií se ukládá v samičím pohlavním traktu při ejakulaci. Jen několik tisíc těchto spermií vstupuje do vejcovodu, několik se dostane do ampulky v době ovulace a jen jedna spermie oplodní oocyt (Petrunkina et al. 2001). Krátkodobé skladování kančího spermatu *in vitro* po dobu až 72 hodin před inseminací negativně ovlivňuje plodnost, ale to často zůstává při hodnocení kvality spermatu neodhaleno. Jednou z nejdůležitějších funkcí spermií je schopnost vytvářet funkční rezervoár spermií ve vejcovodu (Weberski et al. 2006).

Potřeba zachovat životaschopnost a regulovat kapacitaci spermií mohou být vzájemně související události, protože kapacitační změny zkracují životnost spermií (Petrunkina et al. 2001). Kapacitace lze dosáhnout *in vitro* také inkubací spermií v médiu pro umělé oplodnění, a ne pouze ve specializovaném kapacitačním médiu. Přibývá tedy důkazů, že *in vivo* jsou přinejmenším v poslední fázi přítomny ovariálními faktory, které přímo ovlivňují funkci spermií (Hunter et al. 1998). Přestože systémy *in vitro* postrádají jak lokální regulační funkci epitelu vejcovodu, tak fyzikální bariéry hlenu vejcovodu, umožňují buněčné a molekulární studie dosáhnout a studovat základní principy interakce spermie a vejcovodu (Petrunkina et al. 2001). Studie *in vitro* ukázaly, že interakce mezi kultivovanými buňkami vejcovodu a spermii potlačují a modulují stav proteinu tyrosin membrány spermie (Luño et al. 2013). Adheze mezi spermii a buňkami vejcovodu umožňuje udržení životaschopnosti, motility a fertility spermií, protože vejcovod moduluje a řídí kapacitaci spermií až do doby ovulace (Suarez et al. 1991). Zdá se, že hlavním kritériem pro selektivní vazbu na vejcovod pro zajištění vhodného počtu potencionálně fertálních spermií dostupných pro oplodnění je stav nekapacitní populace spermií. Pro vazbu jsou nezbytné další vlastnosti, jako jsou intaktní akrozomy, vynikající morfologie, normální struktura chromatinu, nízký vnitřní obsah vápníku a snížený membránový protein tyrosin (Ellington et al. 1998).

Ukázalo se, že bikarbonát je klíčový induktor kapacitace a penetrace kančích spermií *in vitro* (Harrison 1996). Bikarbonát indukuje změny v plazmatické membráně kančích spermií závislých na proteinkináze A. Úspěšné *in vitro* oplodnění bylo dosaženo nejen v bikarbonátových *in vitro* laboratořích, ale také v  $\text{CO}_2$  pufrovaných médiích jako je Medium-199 (které původně obsahovalo L-arginin), ale také v doplněném médiu pufrovaném Trisem

bez hydrogenuhličitanů (Abeydeera 2001). Zajímavé je, že i doplnění modifikovaného Média-199 obsahující BSA a L-arginin vede ke zvýšenému výskytu akrozomální reakce kančích spermií, aniž by se snížila jejich životaschopnost (Funahashi 2002). Přítomnost BSA je nezbytná pro vyvolání kapacitace *in vitro* u kančích spermií. Kromě toho není hydrogenuhličitan nezbytný pro spuštění kapacitačního procesu, ale moduluje jeho účinnost. Proto současná práce podporuje, že *in vitro* kapacitace kančích spermií může být dosaženo v médiu bez bikarbonátu, ale ne bez BSA, ačkoli účinnost procesu není optimální v nepřítomnosti bikarbonátu. Tohoto závěru nebylo dosaženo pouze ze změn parametrů funkce spermií souvisejících s kapacitací, jako je porucha membránových lipidů, exocytóza akrozomů a hladiny intracelulárního vápníku, ale také z pozorovaného zvýšení hladiny fosforylace (Chaves et al. 2021). Ve skutečnosti již předchozí práce prokázaly, že *in vitro* kapacitace ve spermatu prasat lze účinně dosáhnout v médiu s BSA, ale bez bikarbonátu. V této souvislosti stojí za zmínku, že tato porovnání se poněkud liší od porovnání s jinými druhy savců, u kterých je bikarbonát považován za nezbytnou složku pro vyvolání kapacitace spermií (Boatman & Robbins 1991).

## 4 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo shrnutí poznatků o kapacitaci hřebčích spermií *in vivo* a *in vitro*. Kapacitace *in vivo* probíhá v samičím reprodukčním traktu, zejména v lumen vejcovodu. Byla prokázána interakce mezi hřebčími spermii a homologními monovrstvami buněk vejcovodu v kultivaci. Za těchto podmínek vykazovaly připojené spermie prodlouženou motilitu a životaschopnost, zatímco uvolněné spermie vykazovaly změny podobné kapacitaci a přilnuly k zona pellucida.

Kapacitaci *in vitro* lze napodobit za pomoci inkubace spermií v nádobě, která obsahuje hydrogenuhličitan, ionizovaný vápník a albumin. O těchto třech kapacitačních faktorech je známo, že indukují změny spermatu potřebné pro získání potenciálu pro kapacitaci.

Bohužel konvenční *in vitro* není při práci s koňskými gametami moc účinné, protože spermie nedokážou iniciovat některou reakci v blízkosti oocyty a nemohou tedy proniknout do perivitellinního prostoru. Faktory iniciace kapacitace a úspěšného oplodnění jsou zatím nedostatečné, a proto IVF u koní nefunguje, je tedy potřeba stálých výzkumů pro hledání té správné cesty. Koňské IVF udává případ pouze dvou narozených hříbat pomocí ko-inkubace *in vitro* oocytů s hřebčími spermii ošetřenými ionoforem vápenatým. Opakované pokusy ale již úspěšné nebyly. Je tedy potřeba dalších výzkumů pro pochopení mechanismů kapacitace hřebčích spermií, aby mohlo být dosaženo úspěšného oplození *in vitro* i u koní, stejně jako tomu je například u býků. Pochopení kapacitačních dějů a látek, které se do něj zapojují by vedlo k výraznému posunu v biotechnologiích koňské reprodukce.

## 5 Literatura

- Aalseth EP, Saacke RG. 1987. Alteration of the anterior acrosome of motile bovine spermatozoa by fructose and hydrogen ion concentration. *J Reprod Fertil* **81**:625-634.
- Abdel-baky A, Abou-hashima A], Ashraf E, Hamdy M, Helmy A. 2020. Functional anatomy of male genital system in Stallion. Faculty of veterinary medicine. Egypt.
- Abeydeera LR. 2001. In vitro fertilization and embryo development in pigs. *Reprod Suppl.* **58**:159-173.
- Alm H, Torner H, Blottner S, Nürnberg G, Kanitz W. 2001. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on *in vitro* fertilization of horse oocytes, *Theriogenology* **56**:817-829.
- Bedford JM, CHang MC. 1962. Removal of decapacitation factor from seminal plasma by high-speed centrifugation. *Am J Physiol.* **202**:179-181.
- Bedford JM. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod Suppl* **2**:128-158.
- Boatman DE, Robbins RS. 1991. Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol Reprod* **44**:806-813.
- Boilard M, Bailey J, Collin S, Dufour M, Sirard MA. 2002. Effect of bovine oviduct epithelial cell apical plasma membranes on sperm function assessed by a novel flow cytometric approach. *Biol Reprod.* **67**:1125-1132.
- Brito LF. 2007. Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice* **6**:249-264.
- Brown DA, London E. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Reviews in Cell and Developmental Biology* **14**:111-136.
- Card C. 2005. Cellular associations and the differential spermogram: Making sense of stallion spermatozoal morphology. *Theriogenology* **64**:668-567.
- Casey PJ, Hillman RB, Robertson KR, Yudin AI, Liu IK, Drobnis EZ. 1993. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J Androl* **14**:289-97.
- Cunha ATM, Faria OAC, Guimarães ALS. 2017. Bovine Sperm Capacitation: Physiological Changes and Evaluations. *SciMedCentral*
- Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Treviño CL. 2011. Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev.* **91**:1305-1355.
- Davis BK, Byrne R, Hungund B. 1979. Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. *Biochim Biophys Acta* **12**:257-266.
- de Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* **3**:175-194.



- Dell'Aquila ME, Fusco S, Lacalandra GM, Maritato F. 1996. *In vitro* maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Animal Reproduction Science* **45**:547-560.
- Denisenko V, Chistyakova I, Volkova N, Volkova L, Iolchiev B, Kuzmina T. 2021. The Modulation of Functional Status of Bovine Spermatozoa by Progesterone. *Animals* **11**:1788.
- Doty A, Bui WC, Benson S, Scoggin KE, Pozor M, Macpherson M, Mutz M, Troedsson MHT. 2011. Equine CRISP3 Modulates Interaction Between Spermatozoa and Polymorphonuclear Neutrophils. *Biology of Reproduction* **85**:157–164.
- Ellington JE, Evenson DP, Fleming JE, Brisbois RS, Hiss GA, Broder SJ, Wright RW Jr. 1998. Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. *Fertil Steril* **69**:643-649.
- Finkelstein M, Etkovitz N, Breitbart H. 2020. Ca<sup>2+</sup> signaling in mammalian spermatozoa. *Molecular and Cellular Endocrinology* 516:0303-7207.
- Florman HM. 1994. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca<sup>2+</sup> are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev Biol* **165**:152-164.
- Funahashi H. 2002. Induction of capacitation and the acrosome reaction of boar spermatozoa by L-arginine and nitric oxide synthesis associated with the anion transport system. *Reproduction Cambridge* 124:857-864.
- Gadella BM, Boerke A. 2016. An update on post-ejaculatory remodeling of the sperm surface before mammalian fertilization. *Theriogenology* 85:113-124.
- Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B. 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science* **68**:249-265.
- Graham JK. 1996. Methods for induction of capacitation and the acrosome reaction of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract* **12**:111-117.
- Grasa P, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. 2006. Signal transduction mechanisms involved in *in vitro* ram sperm capacitation. *Reproduction* **132**:721-732.
- Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in farm animals*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Harrison RA. 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reproduction, Fertility and Development* 8:581-594.
- Hinrichs K, Love CC, Brinsko SP, Choi YH, Varner DD. 2002. *In vitro* Fertilization of *In vitro*-Matured Equine Oocytes: Effect of Maturation Medium, Duration of Maturation, and Sperm Calcium Ionophore Treatment, and Comparison with Rates of Fertilization *In vivo* after Oviductal Transfer. *Biology of Reproduction* **67**:256-262.
- Ho HC, Suarez SS. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* 122:519-526.

- Hung PH, Suarez SS. 2010. Regulation of sperm storage and movement in the ruminant oviduct. *Soc Reprod Fertil Suppl* **67**:257-266.
- Hunter RH, Fléchon B, Fléchon JE. 1987. Pre- and peri-ovulatory distribution of viable spermatozoa in the pig oviduct: a scanning electron microscope study. *Tissue Cell* **19**:423-36.
- Hunter RH, Huang WT, Holtz W. 1998. Regional influences of the fallopian tubes on the rate of boar sperm capacitation in surgically inseminated gilts. *Journal of Reproduction and Fertility* **114**:17-23.
- Hunter RH. 2012. Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* **87**:244-255.
- Chamberland A, Fournier V, Tardif S, Sirard MA, Sullivan R, Bailey JL. 2001. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology* **55**:823-835.
- Chaves BR, Pinoti Pavaneli AP, Blanco-Prieto O, Pinart E, Bonet S, Zangeronimo MG, Rodríguez-Gil JE, Yeste M. 2021. Exogenous Albumin Is Crucial for Pig Sperm to Elicit In Vitro Capacitation Whereas Bicarbonate Only Modulates Its Efficiency. *Biology* **26**:1105.
- Cheng FP, Fazeli AR, Voorhout WF, Tremoleda JL, Bevers MM, Colenbrander B. 1998. Progesterone in mare follicular fluid induces the acrosome reaction in stallion spermatozoa and enhances *in vitro* binding to the zona pellucida. *Int J Androl* **21**:57-66.
- Cheng FP, Gadella BM, Voorhout WF, Fazeli A, Bevers MM, Colenbrander B. 1998. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. *Biol Reprod* **59**:733-742.
- Isabelle T, Puttaswamy M. 2003. Effect of Progesterone on Bovine Sperm Capacitation and Acrosome Reaction, *Biology of Reproduction* **69**:1408–1415.
- James AN, Green H, Hoffman S, Landry AM, Paccamonti D, Godke RA. 2002. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4°C for 24, 48, 72 and 96 h. *Theriogenology* **58**:401–404.
- Johnson L, Blanchard TL, Varner DD, Scrutchfield WL. 1997. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology* **48**:1799-1216.
- Juhl AD, Wüstner D. 2022. Pathways and Mechanisms of Cellular Cholesterol Efflux—Insight From Imaging. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **362**.
- Katila T, Sankari S, Mäkelä O. 2000. Transport of spermatozoa in the reproductive tracts of mares. *J Reprod Fertil Suppl* **56**:571-578.
- Katila T. 2001. Sperm–uterine interactions: a review. *Animal Reproduction Science* **68**:267-272.

- Kurz A, Viertel D, Herrmann A, Müller K. 2005. Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction. *Reproduction* **130**:615-626.
- Landim-Alvarenga FC, Alvarenga MA, Leao KM, Papa FO, Medeiros ASL, Gomes GM. 2004. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. *Havemeyer Foundation Monograph Series* 12:74-76.
- Landim-Alvarenga FC, Graham JK, Alvarenga MA, Squires EL. 2018. Calcium influx into equine and bovine spermatozoa during *in vitro* capacitation1. *Animal Reproduction* **1**:96-105.
- Leemans B, Gadella BM, Stout TA, Sostaric E, De Schauwer C, Nelis H, Hoogewijs M, Van Soom A. 2016. Combined albumin and bicarbonate induces head-to-head sperm agglutination which physically prevents equine sperm-oviduct binding. *Reproduction* **151**:313-330.
- Leemans B, Gadella BM, Stout TAE, Schauwer CD, Nelis H, Hoogewijs M, Soom AV. 2016. Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. *Reproduction* **152**:233-245.
- Leemans B, Stout TAE, Schauwer CD, Heras S, Nelis H, Hoogewijs M, Soom AV, Gadella BM. 2019. Update on mammalian sperm capacitation - how much does the horse differ from other species?. *Reproduction* **157**:181-197.
- Lefebvre R, DeMott RR, Suarez SS, Samper JC. 1995. Specific Inhibition of Equine Sperm Binding to Oviductal Epithelium. *Biology of Reproduction* **52**:689-696.
- Leyton L, Saling P. 1989. 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell*. **57**:1123-1130.
- Little TV, Woods GL. 1987. Ultrasonography of accessory sex glands in the stallion. *J Reprod Fertil Suppl* **35**:87-94.
- Luño V, López-Úbeda R, García-Vázquez FA, Gil L, Matás C. 2013. Boar sperm tyrosine phosphorylation patterns in the presence of oviductal epithelial cells: *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* models. *Reproduction* **146**:315-324.
- Lüpold S, Wistuba J, Damm OS, Rivers JW, Birkhead TR. 2011. Sperm competition leads to functional adaptations in avian testes to maximize sperm quantity and quality. *Reproduction* **141**:595-605.
- Maitan P, Bromfield EG, Stout TAE, Gadella BM, Leemans B. 2021. A stallion spermatozoon's journey through the mare's genital tract: *In vivo* and *in vitro* aspects of sperm capacitation. *Animal Reproduction Science* **106848**:037-4320.
- Marvan. 2007. *Morfologie hospodářských zvířat*. 4. vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze v Nakladatelství Brázda.
- Mckinnon AO. 2011. *Equine reproduction*. 2nd ed. Ames: Wiley-Blackwell.

- Meyers SA, Irwin KML, James WO, Erma ZD. 1995. Induction of Acrosome Reactions in Stallion Sperm by Equine Zona Pellucida, Porcine Zona Pellucida, and Progesterone. *Biology of Reproduction* **52**:739–744.
- Meyers SA. 2001. Equine sperm–oocyte interaction: the role of sperm surface hyaluronidase. *Animal Reproduction Science* **68**:291-303.
- Morel D, Mina CG. 2008. Equine reproductive physiology, breeding, and stud management. 3rd ed. Wallingford, Oxfordshire.
- Odeh AL, Dascanio JJ, Caceci T, Eng La. 2003. Effect of platelet-activating factor (PAF) on stallion sperm motility, capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* **126**:605-613.
- Orsolini MF, Meyers SA, Dini P. 2021. An Update on Semen Physiology, Technologies, and Selection Techniques for the Advancement of *In vitro* Equine Embryo Production: Section I. *Animals* **11**:3248.
- Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, Travis AJ, Alvarez J, Kopf GS. 1999. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod.* **5**:1017-1026.
- Palmer E, Bézard J, Magistrini M, Duchamp G. 1991. *In vitro* fertilization in the horse. *Reprod Fertil Suppl* **44**:375-84.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Graham JK. 1999. *In vitro* capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology* **51**:461-572.
- Petrunkina AM, Gehlhaar R, Drommer W, Waberski D, Töpfer-Petersen E. 2001. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium *in vitro*. *Reproduction* **121**:889-896.
- Rahul R, Ben C, Mart MB, Gadella BM. 2001. Evaluation of *In vitro* Capacitation of Stallion Spermatozoa, *Biology of Reproduction* **65**:462–470.
- Sabeur K, Ball BA. 2007. Characterization of galactose-binding proteins in equine testis and spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **101**:74-84.
- 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.
- Scott MA. 2000. A glimpse at sperm function *in vivo*: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Anim Reprod Sci* **2**:337-248.
- Shadan S, James PS, Howes EA, Jones R. 2004. Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol Reprod* **71**:253-265.
- Smith TT. 1998, The Modulation of Sperm Function by the Oviductal Epithelium. *Biology of Reproduction* **58**:1102–1104.

- Sostaric, E, Aalberts, M, Gadella, BM, Stout TAE. 2008. The roles of the epididymis and prostasomes in attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Animal Reproduction Science* **107**:237–248.
- Suarez SS, Katz DF, Owen DH, Andrew JB, Powell RL. 1991. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod* **44**:375-381.
- Suarez SS. 1998. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. *Biology of Reproduction* **58**:1105-1107.
- Suarez SS. 2002. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Domest Anim.* **37**:140-143.
- Sutovsky P, & Manandhar G. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. *The sperm cell: Production, maturation, fertilization, regeneration* 1-30.
- Tardif S, Dubé C, Chevalier S, Bailey JL. 2001. Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod* **65**:784-792.
- Teijeiro JM, Marini PE. 2012. The effect of oviductal deleted in malignant brain tumor 1 over porcine sperm is mediated by a signal transduction pathway that involves pro-AKAP4 phosphorylation. *Reproduction* **143**:773-785.
- Thomas PG, Ball BA, Brinsko SP. 1994. Interaction of equine spermatozoa with oviduct epithelial cell explants is affected by estrous cycle and anatomic origin of explant. *Biol Reprod* **51**:222-228.
- Tremoleda JL, Gadella BM, Stout T, Colenbrander B, Bevers MM. 2003. Evaluation of sperm-oocyte interaction during *in vitro* fertilization in the horse. *In vitro Production of Horse Embryos. Fundamental Aspects* 67-91.
- Tulsiani DR, Yoshida-Komiya H, Araki Y. 1997. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod* **57**:487-494.
- Urner F, Sakkas D. 2003. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction.* **125**:17-26.
- Visconti PE, Kopf GS. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of reproduction*, **59**:1-6.
- Vos JP, Lopes-Cardozo M, Gadella BM. 1994. Metabolic and functional aspects of sulfogalactolipids. *Biochim Biophys Acta* **1211**:125-149.
- Wang Y, Gu Y, Gao H, Gao Y, Shao J, Pang W, Dong W. 2018. Exploring boar sperm sialylation during capacitation using boronic acid-functionalized beads. *Reproduction* **155**:25-36.
- Weber JA, Woods GL, Aguilar JJ. 1996. Location of equine oviductal embryos on Day 5 post ovulation and oviductal transport time of Day 5 embryos autotransferred to the contralateral oviduct. *Theriogenology* **46**:1477-1483.

- Xia J, Ren D. 2009. The BSA-induced Ca<sup>2+</sup> influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent. *Reprod Biol Endocrinol* 27:117-119.
- Yanagimachi R, Usui N. 1974. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res* **89**:161-174.
- Yanagimachi R. 1981. Mechanisms of Fertilization in Mammals. In: Mastroianni, L., Biggers, J.D. (eds) *Fertilization and Embryonic Development In vitro*. Springer, Boston, MA. 81-182.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction* 189-318.
- Young LG, Gould KG, Hinton BT. 1986. Lectin binding sites on the plasma membrane of epididymal and ejaculated chimpanzee sperm. *Gamete Res.* **14**:75-87.
- Zajchowski LD, Robbins SM. 2002. Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *European Journal of Biochemistry* 269:737-752.