

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Detekce spermadhesinu AWN v ejakulátu hřebců**

**Diplomová práce**

**Bc. Lucie Beranová**

**Reprodukční biotechnologie**

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

**Konzultant: RNDr. Pavla Postlerová Ph.D.**

**© 2021 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Detekce spermadhesinu AWN u ejakulátu hřebců" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí práce Ing. Filipě Bubeníčkové Ph.D. za pomoc při tvorbě literární rešerše, ale také při praktické části diplomové práce a zajištění potřebných vzorků pro práci. Také děkuji za časté konzultace a opravy práce.

Dále bych ráda poděkovala RNDr. Pavle Postlerové Ph.D. za pomoc a vedení při práci v laboratoři, při vyhodnocování výsledků a psaní metodiky práce.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině a příteli za podporu, toleranci a pomoc při korekturách práce. A nejen při tvorbě diplomové práce, ale také po dobu celého studia.

## Detekce spermadhesinu AWN v ejakulátu hřebců

Ejakulát hřebce je tvořen dvěma složkami a to buněčné a tekuté. Buněčnou složku představují spermie, které nesou genetickou informaci jedince a mají za úkol proniknout do oocyty. Jsou složeny z hlavičky, krčku a bičíku. Celý povrch spermie je pokryt plasmatickou membránou, pod kterou se na vrcholu hlavičky nachází akrozom. Akrozom je tvořen vnější a vnitřní membránou a mezi nimi jsou enzymy zajišťující akrozomální reakci, nutnou pro spojení oocyty se spermií. Spojovací část bičíku obsahuje 60 mitochondrií, které zajišťují energii pro pohyb bičíku. Pohyb také zajišťuje uspořádání mikrotubulů v bičíku.

Tekutou složkou ejakulátu tvoří semenná plazma, která má za úkol zajistit výživu, transport a ochranu spermií při průchodu samčím i samičím reprodukčním traktem. Také dodává spermiím látky nutné pro zajištění úspěšné fertilizace. Semenná plazma je produkována nadvarlaty a přídatnými pohlavními žlázami, které u hřebce nalezneme v plném počtu (ampule chámovodu, semenné vajíčky, prostata, bulbouretrální žlázy). Jedná se o tekutinu tvořenou směsí bílkovin, iontů, volných aminokyselin, sacharidů, lipidů, polyaminů, prostaglandinů a steroidních hormonů.

Zásadní roli v semenné plazmě mají proteiny. Díky svým vazebným vlastnostem se významně zapojují do fertilizačního procesu a zajišťují nezbytné kroky vedoucí k úspěšnému oplození oocyty. Proteiny semenné plazmy jsou děleny do tří základních skupin: Fn-2, CRISP a spermadhesiny. Do Fn-2 skupiny patří nejvíce zastoupené proteiny v hřebčí semenné plazmě a to proteiny HSP-1 a HSP-2.

Tato práce se blíže zaměřuje na proteinovou skupinu spermadhesinů a konkrétně protein HSP-7. Tento hřebčí protein je homologní s kančím spermadhesinem AWN. Liší se od sebe ve svém uspořádání pouze třemi aminokyselinami a také lokalizací na spermiích. Kančí protein AWN je lokalizován po celé akrozomální čepičce, kdežto u hřebců je protein lokalizován v ekvatoriálním segmentu hlavičky spermie. Tato skutečnost byla praktickou částí práce potvrzena s využitím detekce proteinu na hřebčích spermiích pomocí protilátky proti kančímu AWN imunofluorescenční mikroskopií. Následně byla dále přítomnost a kvantifikace proteinu AWN hodnocena imunodetekcí jak na vzorcích hřebčích spermií, tak v semenné plazmě.

Z výsledků imunofluorescenční mikroskopie vyplývá jasná lokalizace spermadhesinu v ekvatoriálním segmentu hřebčích spermií, ovšem je zde patrná variabilita množství detekovaného proteinu mezi jednotlivými hřebci. Spermií bez detekovaného proteinu bylo více u vzorků, které prošly krokonzervací, v porovnání s nativními vzorky, avšak tyto rozdíly nebyly statisticky významné. Mezi jednotlivými kategoriemi spermií, byla také prokázána korelace mezi kategorií spermií se signálem protilátky proti AWN a zároveň funkčním akrozomem a mezi kategorií spermií s pozitivním signálem protilátky proti AWN a bez funkčního akrozomu. Z výsledků imunodetekce je patrný rozdíl mezi množstvím proteinů získaných ze spermií a ze semenné plazmy. U jednotlivého hřebce, u kterého bylo detekováno

velké množství proteinu AWN v semenné plazmě bylo zaznamenáno zároveň úměrně nižší množství detekované na spermích a opačně.

**Klíčová slova:** spermie, spermadhesiny, proteiny, ejakulát, hřebeč

# Detection of spermadhesin AWN in stallion ejaculate

The ejaculate of the stallion consists of two components, cellular and liquid. The cellular component is sperm, which carry the genetic information of an individual and have the task of penetrating the oocyte. They consist of a head, neck, and a flagellum. The entire surface of the sperm is covered with a plasma membrane, under which there is an acrosome at the top of the head. The acrosome is made up of an outer and an inner membrane, and between them are enzymes that provide the acrosomal reaction needed to connect the oocyte with the sperm. The connecting part of the flagellum contains 60 mitochondria, which provide energy for the movement of the flagellum. The movement also ensures the arrangement of the microtubules in the flagellum.

The liquid component of ejaculate consists of seminal plasma, which has the task of providing nutrition, transport, and protection of sperm during passage through the male and female reproductive tracts. It also supplies sperm with the substances necessary to ensure successful fertilization. Seminal plasma is produced by the epididymis and accessory gonads, which can be found in the stallion in full numbers (ampoules of the vas deferens, seminal vesicles, prostate, bulbourethral glands). It is a fluid made up of a mixture of proteins, ions, free amino acids, carbohydrates, lipids, polyamines, prostaglandins, and steroid hormones.

Proteins play a crucial role in seminal plasma. Thanks to their binding properties, they are significantly involved in the fertilization process and provide the necessary steps leading to successful fertilization of the oocyte. Seminal plasma proteins are divided into three basic groups: Fn-2, CRISP and spermadhesins. The Fn-2 group includes the most abundant proteins in stallion seminal plasma, namely the HSP-1 and HSP-2 proteins.

This work focuses on the protein group of spermadhesins, more specifically the HSP-7 protein. This stallion protein is homologous to the boar spermadhesin AWN. They differ in their arrangement only by three amino acids and, also by their localization on sperm. Boar AWN protein is located throughout the acrosomal cap, whereas in stallions the protein is in the equatorial segment of the sperm head. This fact was confirmed by the practical part of the work using the detection of protein in stallion sperm using anti-boar antibody AWN by immunofluorescence microscopy. Subsequently, the presence and quantification of AWN protein was further evaluated by immunodetection on both stallion sperm and seminal plasma samples.

The results of immunofluorescence microscopy show a clear localization of spermadhesin in the equatorial segment of stallion sperm, but there is a noticeable variability in the amount of detected protein between individual stallions. There was more sperm without a detected protein in the samples that underwent cryo-conservation compared to the native samples, but these differences were not statistically significant. Between the categories of sperm, a correlation was also demonstrated between the category of sperm with an anti-AWN antibody signal and a functional acrosome and between the category of sperm with a positive

anti-AWN signal and without a functional acrosome. The results of immunodetection show a difference between the number of proteins obtained from sperm and from seminal plasma. In an individual stallion in which a large amount of AWN protein was detected in seminal plasma, a proportionally lower amount detected in sperm was recorded at the same time, and vice versa.

**Keywords:** sperm, spermadhesins, proteins, ejaculate, stallion

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>- 2 -</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>3.1 Ejakulát hřebce</b> .....	<b>- 3 -</b>
3.1.1 Spermie.....	- 4 -
<b>3.2 Přídavné pohlavní žlázy</b> .....	<b>- 8 -</b>
<b>3.3 Semenná plazma</b> .....	<b>- 10 -</b>
3.3.1 Proteiny semenné plazmy.....	- 12 -
3.3.2 Proteiny semenné plazmy hřebců.....	- 13 -
3.3.2.1 Fn-2.....	- 14 -
3.3.2.2 CRISP.....	- 15 -
3.3.2.3 Spermadhesiny.....	- 16 -
<b>4 Metodika</b> .....	<b>- 19 -</b>
<b>4.1 Použité vzorky</b> .....	<b>- 19 -</b>
<b>4.2 Imunofluorescenční mikroskopie</b> .....	<b>- 21 -</b>
<b>4.3 Western blot imunodetekce</b> .....	<b>- 23 -</b>
4.3.1 Příprava vzorků.....	- 23 -
4.3.2 Elektroforéza.....	- 23 -
4.3.3 Elektropřenos proteinů z gelu na membránu.....	- 24 -
4.3.4 Inkubace s protilátkami.....	- 24 -
4.3.5 Detekce.....	- 25 -
<b>5 Výsledky</b> .....	<b>- 26 -</b>
<b>5.1 Imunofluorescenční mikroskopie</b> .....	<b>- 26 -</b>
<b>5.2 Western blot imunodetekce</b> .....	<b>- 35 -</b>
<b>6 Diskuze</b> .....	<b>- 40 -</b>
<b>7 Závěr</b> .....	<b>- 44 -</b>
<b>8 Literatura</b> .....	<b>- 45 -</b>



# 1 Úvod

Ejakulát všech savců se skládá ze dvou frakcí, ze samotných spermií (buněčná frakce) a semenné plazmy (tekutá frakce). Obě části ejakulátu jsou v hojné míře podrobně zkoumány pro přesnější pochopení reprodukčních procesů. Velký důraz je kladen na identifikaci látek přítomných v ejakulátu a jejich lokalizace, ale také na porozumění jejich funkcí a výskyt u jednotlivých druhů samců. Mezi jednotlivými druhy zvířat je zkoumána homologie přítomných složek ejakulátu, stejně tak i s lidským semenem. Všechny tyto poznatky posouvají reprodukční technologie dále a usnadňují reprodukci.

Spermie jsou produktem samčích pohlavních žláz (varlat), jsou produkovány od puberty za správné hormonální stimulace. Samčí reprodukční trakt zahrnuje také přídatné pohlavní žlázy a nadvarlata, které jsou odpovědné za tvorbu semenné plazmy. Mezi tyto žlázy patří ampule chámovodu, semenné vajíčky, prostata a bulbouretrální žlázy. U hřebců se vyskytují všechny, ovšem jiné druhy zvířat nemusí mít kompletní sestavu všech přídatných pohlavních žláz, které se také mohou lišit tvarem a velikostí. Vyprodukovaná semenná plazma bývá bílé barvy, bez výrazného zápachu a příměsí. Jedná se o směs bílkovin, iontů, volných aminokyselin, sacharidů, lipidů, polyaminů, prostaglandinů a steroidních hormonů. Tato kombinace látek má za úkol výživu spermií, jejich ochranu a transport samčím a samičím reprodukčním traktem. Složky semenné plazmy se uplatňují v procesu kapacity, při tvorbě ovidukálního rezervoáru, brání předčasné akrozomální reakci a účastní se dalších procesů nezbytných pro oplození.

Podstatnou součástí semenné plazmy jsou proteiny v ní obsažené. Mezi proteiny semenné plazmy patří hormony, enzymy, růstové faktory, prostaglandiny, glykoproteiny a inhibitory proteináz. Všechny proteiny díky svým vlastnostem ovlivňují procesy vedoucí k úspěšné fertilizaci, podstatná část z nich díky své schopnosti vázat se na spermie. Proteiny semenné plazmy se dělí do tří skupin: Fn-2, CRISP a spermadhesiny. Jedním ze skupiny spermadhesinů je u hřebců protein HSP-7, který je homologní s proteinem AWN obsaženým v kančí semenné plazmě. U kanců se tento protein zapojuje především do procesu kapacity. Díky blízké homologii proteinu HSP-7 semenné plazmy hřebců s proteinem AWN kanců je předpoklad, že pomocí protilátky proti kančímu AWN je možnost detekovat a lokalizovat i protein AWN u hřebců.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem práce je detekovat přítomnost spermadhesinu AWN v ejakulátu hřebců na základě hypotézy, že vzhledem k vysoké homologii kančího a hřebčího AWN spermadhesinu bude protilátka proti kančímu AWN rozpoznávat také AWN protein v hřebčích spermiích a semenné plazmě.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Ejakulát hřebce

Ejakulát hřebce je složen ze dvou složek, a to tekutiny (produkty přídatných pohlavních žláz a tekutiny z nadvarlete) a buněčné části (spermii) (Reece 2011). Objem ejakulátu jedné ejakulace je variabilní, průměrně je uváděn objem 100 ml, ovšem maximálně až 250ml (Morel 2008).

Pro úspěšnou ejakulaci je nutná dostatečná erekce. Která je zajištěna zvýšeným přítokem a sníženým odtokem krve z topořivých těles (Reece 2011). Dochází k naplnění houbovitého a kavernózního tělesa pyje. K erekci je potřeba i stimulace vnějšími vlivy, například přítomnost říjící klisny (McDonnell 1992). U hřebce je pro plnou erekci žaludu nutné zavedení do vagíny. A to z důvodu stlačení předkožky proti vulvě, tím je žilný odtok z žaludu směřován do předkožky. U hřebce je penis při erekci více zvětšený než u ostatních zvířat. Při dostatečné stimulaci dochází k vyslání signálu z reflexního centra v páteřní míše (Reece 2011), kdy erekce je ovlivňována parasymptikem a ejakulace sympatikem. Samotné ejakulaci předchází uniknutí malého množství tekutiny z prostaty a výronu (McDonnell 1992), kdy jsou spermie spolu s tekutinou nadvarlete a semennou plazmou transportován do močové trubice. Poté dochází k posunu pomocí reflexní peristaltiky a pomoci stahu svalů hladké svaloviny močové trubice (Reece 2011).

Celý objem ejakulátu se skládá z několika rozdílných frakcí, jejich složení se liší díky různému obsahu tekutin z přídatných pohlavních žláz a koncentraci spermií (Akçay et al. 2006). Základně se ejakulát hřebce dá rozdělit na tři frakce: předpermatickou, spermatickou a postpermatickou (Oliveira et al. 2020). Frakce se liší především obsahem spermií a látek produkovaných přídatnými pohlavními žlázami, které uvolňují svůj obsah v určitých momentech ejakulace (Kareskoski & Katila 2008).

Předpermiová frakce odchází první a z jejího vzhledu je možné určit možná onemocnění reprodukčních cest samce. Pokud je kontaminována krví, hnísem atd. a penis je v pořádku, pravděpodobně má hřelec jiný zdravotní problém (Oliveira et al. 2020). Jejím úkolem je především neutralizace a vyčištění samčích i samičích pohlavních cest. Je tvořena především výměškem bulbouretrální žlázy (Loomis 2016).

Spermatická frakce je tvořena především spermii a tekutinou z nadvarlete a ampulí chámovodu. Poslední postpermatickou frakci tvoří především tekutina ze semenných váčků (Oliveira et al. 2020) a prostaty (Loomis 2016). Ejakulace hřebce probíhá v 6 až 9 vlnách kontrakcí močové trubice, doprovázené charakteristickými frikčními pohyby. Kdy první tři kontrakce obsahují většinu spermií. Jedná se tedy o frakci bohatou na spermie (spermatickou) a pro další užití zásadní. Dále koncentrace a objem spermií klesá (Katila & Kareskoski 2006).

### 3.1.1 Spermie

Spermie je samčí gameta, tedy pohlavní buňka se sníženým počtem chromozomů na polovinu (haploidní buňka). Vzniká procesem spermatogeneze ve varlatech. Vývoj spermie začíná ve fázi spermatogonie (diploidní buňka) a postupnými mitotickými a meiotickými děleními přechází do spermatidy (haploidní buňka). Poté ještě ve varleti dojde k vytvoření bičíku a tvorbě nepohyblivé spermie. Spermie s potenciálem dozrát jsou vyplavovány do nadvarlete, kde prochází první fází zrání. Získávají schopnost pohybovat se a oplozovací schopnost (Reece 2011). Spermie, které odejdou z varlat, jsou tedy vysoce diferenciované haploidní buňky, které ovšem zatím nemají schopnost interakce s ovulovaným oocytem. Musí projít všemi po sobě přesně určenými pochody souhrnně nazvanými post – testikulární maturace. Tyto změny prodělávají jak v nadvarleti, tak i po ejakulaci. Jak bylo zmíněno výše, první dozrání přichází v nadvarleti, druhé v samičím pohlavním traktu (Töpfer-Petersen et al. 2005). Spermie jsou po prvním zrání shromažďovány a uchovávány v ocasu nadvarlete až do ejakulace. Jednotlivé druhy zvířat mají morfologicky odlišné spermie (například tvar hlavičky), v důsledku rozdílného uspořádání samčího i samičího pohlavního aparátu (Reece 2011).

Zralá funkční spermie se dle stavby dá rozdělit na tři části: hlavička nesoucí DNA, střední část zajišťující zdroj energie pro pohyb díky mitochondriím a bičík, který se podílí na pohybu spermie (obrázek č. 1) (Gadella et al. 2001). V rámci vývoje spermie ztrácí velkou část organel, které původně obsahovala. Také musí kvůli schopnosti oplození projít procesem kapacitace, který probíhá až v samičím reprodukčním traktu (Töpfer-Petersen et al. 2005).

#### **Plazmatická membrána**

Plazmatická membrána (PM) pokrývá celý povrch buňky, určuje tvar a velikost buňky, i přes to, že je celkem pružná (Reece 2011). Jako u somatických buněk je tvořena převážně lipidovou dvojvrstvou, u hřebce složenou z fosfolipidů (57 %), cholesterolu (37 %) a glykolipidů (6 %). Ve všech jejích částech je také odlišné složení lipidů (Gadella et al. 2001). Poměr fosfolipidů a cholesterolu určuje fluiditu membrány, čím více cholesterolu tím je fluidita membrány nižší. Cholesterol také pomáhá k udržení struktury membrány (Amann & Graham 2011), a jeho vysoké procento v membráně může souviset i s rychlostí kapacitace, kdy musí být cholesterol vyčerpán ven, aby proces kapacitace mohl proběhnout. Při kapacitaci v samičím pohlavním traktu se mění uspořádání jednotlivých lipidů a do membrány jsou začleněny i látky pocházející z tohoto prostředí (Gadella et al. 2001). Mění se molární poměr cholesterolu a fosfolipidů, čímž je změněna fluidita membrány (Calvete et al. 1999).

Glykolipidy jsou v membráně zastoupeny především seminolipidem, který je běžný i u jiných druhů zvířat a vyskytuje se pouze ve spermích a ve Schwannových buňkách (Gadella et al. 2001).

PM pokrývá celou spermii ovšem v různých částech má rozdílné vlastnosti. Což může být způsobeno různým rozmístěním integrálních membránových proteinů po celé ploše hlavičky, ale i zbytku spermie (Gadella et al. 2001).

Proteiny mohou být navázané jak na vnější tak vnitřní stranu lipidové dvojvrstvy, také mohou být do membrány částečně nebo zcela zabudované (Reece 2011). Proteiny zabudované v lipidové dvojvrstvě mohou tvořit domény, také fungují jako povrchové receptory. Povrch PM se může měnit i navázáním dalších periferních proteinů, které jsou k povrchu přitahovány díky bočním řetězcům integrovaných proteinů a jejich zápornému náboji. Bílkovinná část představuje přibližně 50 % celkové hmotnosti PM (Amann & Graham 2011). Také proces chlazení (mražení) může mít za následek změnu uskupení navázaných fosfolipidů a tím negativně ovlivnit funkce membrány (Patel et al. 2016).

### **Hlavička**

Hlavička spermie se dá rozdělit na akrosomální oblast, ekvatoriální segment, post-akrosomální oblast a spojovací část. V místě spojovací části je ukotvena plazmatická membrána k jadernému obalu a pevně odděluje hlavičku a krček (Varner & Johnson 2007). Spermie má v hlavičce kromě plazmatické membrány další dvě membrány. Tedy akrosomální membránu (vnější a vnitřní) a vnitřní jadernou membránu (Morel 2008). Tvar hlavičky je eliptický, dorzoventrálně zploštělý a v zadní části zesílený (Varner & Johnson 2007). Ovšem i v rámci ejakulátu jednoho hřebce je značná diference ve tvaru hlavičky, který může být protáhlejší, kratší i delší. Normální spermie se tedy určují individuálně u každého hřebce (Brito 2007). Tvar hlavičky je dán změnami v průběhu spermiogeneze, kdy dochází ke změnám na cytoskeletu (Varner & Johnson 2007).

### **Jádro**

Jádro zabírá většinu prostoru hlavičky spermie, obsahuje zásadní DNA informaci. Chromatin je zde obsažen ve vysoce kondenzovaném stavu, spolu s ním jsou zde také malé jaderné vakuoly. Vakuoly vznikly pravděpodobně při kondenzaci chromatinu jako defekty (Brito 2007). DNA je chráněna dvouvrstvou jadernou membránou, které ovšem na většině míst chybí póry (oblast pod akrozomem a post-akrosomální oblastí) (Varner & Johnson 2007). Konec jádra tvoří bazální deska, díky které je hlavička připojena ke krčku. Jasnou hranici také vyznačuje „posterior ring“, což je prstenec vytvořený na spodní straně hlavičky (Brito 2007).

### **Akrozom**

V hlavičce spermie se pod plazmatickou membránou nachází akrozom, který pokrývá 2/3 jádra z rostrální strany a na jádře spermie tvoří čepičku. Akrozom je obklopen membránou, která je tvořena vnější a vnitřní akrosomální membránou (Varner & Johnson 2007), tato oblast membrán se také nazývá anteriorní (Austin & Bishop 1958). Membrány se spojují v ekvatoriálním segmentu hlavičky (Varner & Johanson 2007).

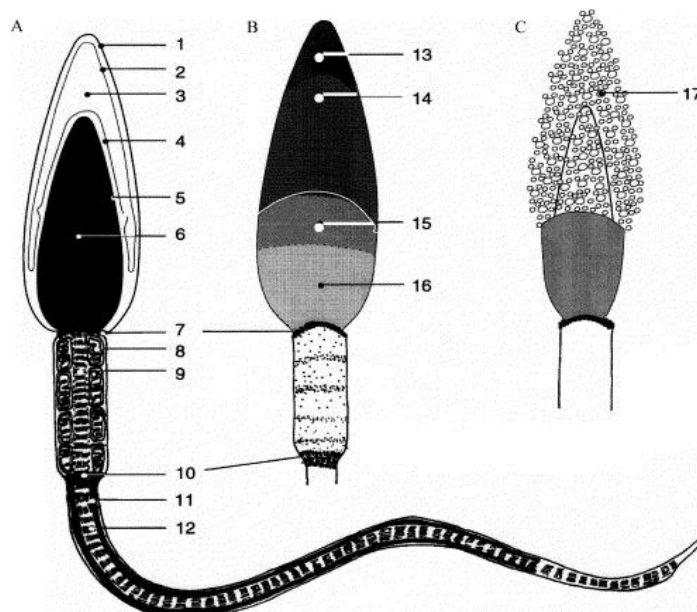
Tvorba akrozomu probíhá v semenotvorných kanálcích spojením váčků z Golgiho aparátu (Varner & Johnson 2007). Akrozom a jeho funkci můžeme přirovnat k obdobné organelle lysozomu. Obsahuje základní enzymy, které hrají roli při akrozomální reakci. Například esterázy, proteázy a kyselé fosfatázy (Tang et al. 1982).

Zásadní úloha akrozomu a jeho enzymů přichází při spojení oocyty se spermii, kdy proteinové receptory přítomné na zoně pellucidě oocyty a hydrolytické enzymy akrozomu spermii zajišťují její adhezi a penetraci skrz zona pellucida. Vnější akrozomální membrána se spojí s plazmatickou membránou spermie a vytváří hybridní váčky a póry, čímž se obsah akrozomu uvolní (Varner & Johnson 2007). Předčasné fúzi těchto membrán zabraňuje přítomnost aktinu v meziprostoru membrán, u kterého musí dojít před fúzí k depolarizaci (Amann & Graham 2011). Uvolnění akrozomálních váčků je nutné pro rozpuštění zony pellucidy a možnost průchodu spermie. Výraznou roli má na vzniku váčků také vlna vápníku, která přichází po kontaktu spermie s oocytem a nastartuje fúzi membrán (Gadella et al. 2001).

Celý tento proces je souhrnně nazýván akrozomová reakce (Gadella et al. 2001). Ekvatoriální segment se do akrozomální reakce nezapojuje, nejsou zde ani přítomné enzymy (Amann & Graham 2011). V důsledku tohoto procesu se na povrch dostává vnitřní akrozomová membrána a tvoří sekundární spojení se zónou pellucidou a proniká jí. Po průniku se spermie váže na oolemu, spermie se na oocyt váže bokem a po úplném začlenění do oocyty je iniciován blok polyspermie (zonální reakce) (Gadella et al. 2001).

### **Krček**

Krček spermie je primárně „capitulum“, tvořen proximální a distální centriolou a segmentovanými chordami. Capitulum funguje jako komunikační prostředek mezi hlavičkou a bičíkem (Varner & Johnson 2007).



Obrázek č. 1: Stavba spermie (Gadella et al. 2001) Schématická stavba hřebčí spermie. Panel A: řez spermii. Panel B: podjednotky plazmatické membrány hlavičky spermie (pohled na povrch). Panel C: akrozomální reakce. Plné čáry představují membránové dvojvrstvy: (1) plazmatická membrána; (2) vnější akrozomální membrána; (3) akrozomová tekutina; (4) vnitřní akrozomová membrána; (5) jaderný obal; (6) jádro; (7) jaderný kruh; (8) mitochondrie; (9) proximální část bičíku (střední část); (10) fibrózní prstenec; (11) distální část bičíku (hlavní a koncová část); (12) vláknitý list; (13) apikální část; (14) pre-ekvatoriální oblast; (15) ekvatoriální segment; (16) post-ekvatoriální segment; (17) smíšené vezikuly během akrozomální reakce fúzí plazmatické membrány s vnější akrozomální membránou.

## Bičík

Bičík je na hlavičku napojen přes implantační jamku, která se nachází v oblasti krčku a často je postavena excentricky. Základem spojovací části bičíku a celé jeho délky je axonema. Jedná se o útvar uprostřed celé struktury tvořený 9 dublety mikrotubulů uspořádaných okolo centrálního páru mikrotubulů (vzorec 9 + 2, toto uspořádání nalezneme v celé živočišné říši) (Brito 2007). Mikrotubuly jsou tvořeny především proteiny z rodiny tubulinů (Varner & Johnson 2007). Každý dublet je tvořen dvěma podjednotkami. První (podjednotka A) tvoří úplný válec a má na sobě dvě krátká ramena dyneinu a směřuje k dalšímu dubletu. Druhá (podjednotka B) je napojena na první a je tedy pouze do tvaru C, nikoli do tvaru válce. Se středovým párem je každý dublet spojen krátkým můstkem (Brito 2007). Podjednotka A má také kromě vnějších dyneinových ramen vnitřní, která mají ATP aktivitu a generují sílu potřebnou pro pohyb bičíku. Pohyb je vytvářen v důsledku spojování a odpojování sousedních A a B podjednotek (Varner & Johnson 2007).

V další vrstvě je okolo každého dubletu vrstva hustých vnějších vláken, která jsou uspořádána do tvarů okvětních lístků (Brito 2007). Vlákna pravděpodobně dodávají bičíku pružnost při ohýbání a jsou ukotvena v segmentovaných chordách (Varner & Johnson 2007).

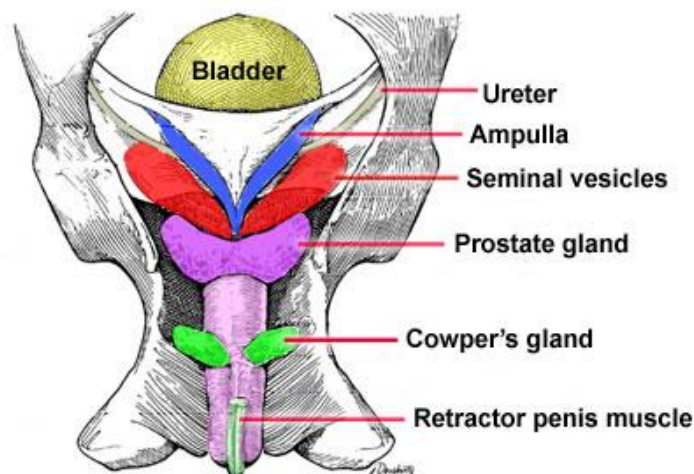
Ve střední části bičíku je 60 mitochondrii, poskládaných do pravotočivé spirály, která je ukončena tzv. Jensenovým prstencem. Místo kde začínají mitochondrie je začátek střední části bičíku a od Jensenova prstence pokračuje hlavní část bičíku. Postupem do hlavní části bičíku spermie se zužují a mizí hustá vlákna. Zůstává axonema, která je ukončena několik mikrometrů před koncem bičíku. Dále je pevnost bičíku vyztužena ventrálním a dorsálním vláknem (Brito 2007).

Pevnost a pružnost je také podpořena vláknitým pláštěm, který se skládá ze dvou podélných vláknitých struktur, které jsou na spoustě míst spojeny můstky. Tyto můstky hrají významnou roli také při buněčné signalizaci. Celý bičík spermie je stejně jako hlavička na povrchu pokryt plazmatickou membránou (Varner & Johnson 2007).

### 3.2 Přídavné pohlavní žlázy

Přídavné pohlavní žlázy produkují sekrety dohromady tvořící semennou plazmu (SP), která po smísení se spermii tvoří ejakulát. U hřebců najdeme čtyři přídavné pohlavní žlázy. A to ampule chámovodu, semenné vāčky (u ostatních druhů nazývané měchýřkovité žlázy), prostatu a bulbouretrální žlázy (Cowperovy žlázy) (Reece 2011).

Produkce sekretů se přímou úměrou odráží na objemu ejakulátu jedince, u hřebce 50 – 150 ml (Nickel et al. 1979). Ne všechny druhy hospodářských zvířat mají všechny přídavné pohlavní žlázy a jednotlivé žlázy se liší i svou velikostí. U hřebce mají přídavné pohlavní žlázy specifické uspořádání oproti dalším druhům hospodářských zvířat (obrázek č. 2). Tyto rozdíly mají vliv na objem i na složení semenné plazmy (Reece 2011). Další vliv na množství SP a koncentraci spermií v ní u různých druhů hospodářských zvířat má způsob a místo deponace spermií v samičím reprodukčním traktu, u koní vzhledem k sezónnosti také roční



období (Maxvell et al. 2007).

Obrázek č. 2: Nákres pozice jednotlivých přídavných pohlavních žláz ([http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/equine/male\\_anatomy/pelvic2.html](http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/equine/male_anatomy/pelvic2.html))



## **Ampule chámovodu**

Ampule jsou zvětšením trubic chámovodu v distálním úseku. Pravděpodobně zde dochází k ukládání spermií před ejakulací a posunu do močové trubice v průběhu ejakulace (Nickel et al. 1979). Oproti ostatním druhům hospodářských zvířat mají hřebci poměrně velké ampule, které obsahují rozdílné množství nažloutlé krémové tekutiny. Ampule produkují několik různých látek, například ergothionein, který funguje jako antioxidant (Morel 2008). Sektery ampulí chámovodu při ejakulaci odchází spolu se spermiemi ve spermatiké frakci ejakulátu (Rodríguez-Martínez et al. 2011). Také jsou v ampulích chámovodu produkovány proteiny Fn-2 typu, hlavně tedy malé proteiny HSP-1 a HSP-2 (Ekhlesi-Hundrieser et al. 2005a).

## **Semenné vácčky**

Semenné vácčky jsou párové žlázy (Reece 2011) tvořeny svalovinou a pokryty silnou sliznicí. Mají hruškovitý tvar a velikost cca 10 – 15 cm na délku a 3 – 6 cm v průměru (Nickel et al. 1979). Produktem semenných vácčků je průhledná až mírně neprůhledná vazká tekutina (Weber & Woods 1993). Sektery semenných vácčků jsou deponovány do pánevní části močové trubice (Reece 2011) až po skončení sekrece prostaty (Weber et Woods 1993). Semenné vácčky produkují také proteiny vázající heparin, které mají efekt při modulaci plazmatické membrány (Harshan et al. 2006). Je zde produkován i protein z rodiny CRISP a to konkrétně CRISP-2 (Töpfer-Petersen et al. 2005).

U přežvýkavců představuje produkt semenných vácčků hlavní část ejakulátu a je hlavním zdrojem proteinů modifikujících membránu spermií, především proteiny býčí SP (BSP), které spadají do skupiny Fn-2 proteinů. Mimo tyto proteiny semenné vácčky produkují také spermadhesiny, které jsou důležité u koní a prasat (Maxvell et al. 2007).

## **Prostata**

Jediná přídatná pohlavní žláza, kterou mají všechny druhy zvířat je prostata (Reece 2011). U hřebců má dva nodulární laloky spojené středovou částí a obsahuje jen malé množství tekutiny (Morel 2008). Pojivovou tkání je prostata spojena se semennými vácčky, proto je těžké rektálně žlázy nahmatat a oddělit (Nickel et al. 1979). Sekrece prostaty probíhá v průběhu první a poslední kontrakce močové trubice. Sekrety jsou alkalické a obsahují hodně proteinů, citrátové kyseliny a zinku (Morel 2008). Také se zde vyskytují volné aminokyseliny, pravděpodobně díky kombinaci působení proteáz a transmitáz (Maxvell et al. 2007).

## **Bulbouretrání žlázy**

Bulbouretrální žlázy jsou párové, nachází se nejkaudálněji ze všech přídatných pohlavních žláz (Reece 2011) a mají kulovitý tvar (Nickel et al. 1979). Sekrety bulbouretrálních žláz odchází při ejakulaci první, ještě před spermiemi (Rodríguez-Martínez et al. 2011) a nepředstavují příliš velkou část ejakulátu (Amann 2011). Mají za úkol vyčistit močovou trubici a také mohou fungovat jako lubrikant (Morel 2008). Pokud sekrety

bulbouretrálních žláz zůstávají dlouho spolu s dalšími frakcemi ejakulátu, mohou způsobit jeho koagulaci (Rodríguez-Martínez et al. 2011). U kanců a mužů má hlavní roli při gelovatění spermatu sialoprotein produkovaný bulbouretrální žlázou (Maxvell et al. 2007).

### 3.3 Semenná plazma

Semenná plazma (SP) je tekutina zajišťující transport, výživu a ochranu spermií v samčí močové trubici a samičím pohlavním traktu. Chrání spermie především před změnami pH, osmotického tlaku a oxidací (Reece 2011). SP je produkována nadvarlaty a přídatnými pohlavními žlázami (Töpfer-Petersen et al. 2005). Dříve se předpokládalo, že jde o filtrát krve, který má za účel zadržet spermie déle v samičím reprodukčním traktu (Maxvell et al. 2007).

Semenná plazma je tekutina složená ze směsi bílkovin, iontů, volných aminokyselin, sacharidů, lipidů, polyaminů, prostaglandinů a steroidních hormonů (Katila & Kareskoski 2006). SP také částečně upravuje imunitní odpověď dělohy, mírní její reakce (Töpfer-Petersen et al. 2005). Kombinace všech složek SP zajišťuje podporu přežití spermií v samičích pohlavních cestách a také kompetenci spermií pro kontakt s ovulovaným oocytem (Töpfer-Petersen et al. 2005). Na druhou stranu byl u několika skupin látek pocházejících ze SP (u různých druhů) potvrzen negativní vliv na fertilitu. Jsou to například lidský antifertilní faktor nebo králičí akrosom stabilizující faktor (Bardon et al. 1999).

Faktory pocházející se SP, které se během ejakulace naváží na spermie, ovlivňují dobu kapacity a hrají velmi důležitou roli při procesu oplození. Jedná se především o membránové váčky (vezikuly), pocházející z přídatných pohlavních žláz. Tyto vezikuly obsahují dekapacitační faktory, které oddalují proces kapacity do správné chvíle. Tuto funkci vykonávají pomocí potlačení signálu ke kapacitaci, případně maskováním vazebných míst zona pellucida oocytu. Pro uskutečnění kapacity je tedy nutné jejich částečné odstranění přirozeně, případně i uměle. Proti dekapacitačním faktorům jsou v samičím pohlavním ústrojí faktory podporující kapacitaci, které obsahují lipoproteiny s vysokou hustotou, glukosaminy (Maxvell et al. 2007).

Část SP pocházející z nadvarlat (epididymu) podporuje spermie v oplozovacích schopnostech, které jsou poté utlumeny dekapacitačními faktory. Přesun spermií nadvarletem trvá okolo 10 dní. Dochází zde především ke strukturálním změnám plazmatické membrány, díky působení organických a anorganických složek epididymální plazmy. Proteiny pocházející z nadvarlete dodávají spermiím schopnost pohybu a oplození, ale také ochranu před bakteriemi (Maxvell et al. 2007).

Prostaglandiny v SP byly původně spojovány především s prostatou, ovšem produkovány jsou i dalšími tkáněmi pohlavního traktu, například semennými váčky nebo vaječníky (Euler 1983). Vznikají jako deriváty kyseliny arachidonové. V semenné plazmě pomáhají prostaglandiny oplození především dvěma způsoby. Reagují s hlenem sliznice děložního krčku a usnadňují spermiím průchod. Také pravděpodobně způsobují zpětné kontrakce hladké svaloviny samičího pohlavního traktu pro posun spermií k vaječníku (Reece

2011). Ovšem nelze umělým zvýšením jejich hladiny zvýšit oplozovací schopnost spermií, případně pravděpodobnost oplození (Maxvell et al. 2007).

Složení iontového prostředí SP je také velice podstatné. Především koncentrace sodíku, draslíku, vápníku, hořčíku a chloridu (Pesch et al. 2006). Koncentrace iontů se v rámci frakcí ejakulátu liší, například chlorid je nejvíce zastoupen v prespermiové a postspermiové frakci (Kareskoski et al. 2005). Volný ionizovaný vápník v SP může ve velkých koncentracích vyvolávat akrosomální reakci. U koní se vápník vyskytuje ve velké míře právě v ionizovaném stavu, a to 60–75 % z celkového objemu, u mužů jsou to pouze 4 %. Na hladinu ionizovaného vápníku má vliv koncentrace zinku. Fyziologické hodnoty zinku totiž zabráňují nadměrnému přílivu ionizovaného vápníku a tím způsobenou předčasnou akrosomální reakci. Hřebčí spermie mají pravděpodobně oproti jiným druhům vyšší odolnost vůči vysokým hladinám ionizovanému vápníku, jelikož jsou u nich hladiny ionizovaného vápníku přirozeně vyšší (Pesch et al. 2006). Jeho koncentrace jsou vyšší především ve frakcích bohatých na spermie a stejně také koncentrace hořčíku a anorganického fosfátu (Kareskoski et al. 2005).

Iontové složení SP může mít také vliv na motilitu spermií. Snížená pohyblivost spermií může být mimo jiné zapříčiněna zvýšenou koncentrací měděných iontů v SP. Ovšem nedostatek mědi je také rizikový, jelikož je měď nezbytná pro spoustu enzymů. V semenné plazmě se také vyskytuje v nízkých koncentracích železo (Pesch et al. 2006), které spermie chrání před peroxidací lipidů (Kwenang et al. 1987). U hřebců je předpoklad spojitosti nepohyblivosti spermii s koncentrací enzymu asparátaminotransferázy (AST). Pokud je snížena hladina AST, případně poškozená membrána pro průchod AST, dochází k zablokování tvorby adenosintrifosfátu (ATP) (Pesch et al. 2006), který je nepostradatelným zdrojem energie (Reece 2011).

Důležitým enzymem ovlivňujícím celkový metabolismus spermií je laktátdehydrogenáza (LDH). Je zde patrná korelace mezi pohyblivými, živými spermii a koncentrací LDH (Pesch et al. 2006).

Koncentrace většiny enzymů, železa a zinku jsou nejvíce ovlivněny produkcí varlat a nadvarlat. Naopak koncentrace vápníku a mědi jsou ovlivňovány funkcí přídatných pohlavních žláz (Pesch et al. 2006).

Obsah sacharidů v semenné plazmě je u hřebce nižší než například u býka. Nejvíce je v hřebčí SP zastoupen inositol, dále galaktóza, glukóza a glycerol. Ve stopovém množství je zde zastoupena i fruktóza (Baronos 1971). Fruktóza je výhodným energetickým zdrojem, jelikož vstupuje do buněk pasivním transportem (Reece 2011). Sacharidová část glykoproteinů SP navázaných na spermii má roli při vazbě mezi oocytem a spermii, případně při vazbě na vejcovod nebo Sertoliho buňky. Galaktóza inhibuje adhezi hřebčích spermií k vejcovodu a tvorbu rezervoáru (Sabeur & Ball 2007). Pokud jde o lipidovou složku je u hřebců nejvíce zastoupen cholesterol, dále zde najdeme také fosfolipidy a sfingomyeliny (Parks & Lynch 1992).

Nejdůležitější komponentou SP jsou pravděpodobně bílkoviny, které se váží na spermie, vejcovod a účastní se fertilizačních procesů (Katila & Kareskoski 2006). Proteiny a glykoproteiny pocházející ze semenné plazmy zajišťují společnou reakci remodelaci membrány spermií, která je nezbytně nutná pro úspěšný proces oplození. Bílkoviny SP ovlivňují kapacitaci, mohou ji v určité konfiguraci zabraňovat (dekapacitační faktory), nebo naopak podporovat (stimulační faktory) (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Dekapacitační faktory jsou na spermie navázané až při ejakulaci, jelikož epididymální spermie, které nepřišli do kontaktu se SP, mohou oplodnit vajíčko *in vitro*. Kdežto čerstvě ejakulované spermie ihned po odběru nikoli. Na kapacitaci a primární vazbě gamet se mimo jiné faktory podílejí proteiny SP z rodiny spermadhesinů. Spermadhesiny, jakožto proteiny vázají sacharidy a heparin, se v průběhu ejakulace váží na celý povrch spermií a jsou součástí kapacitačních faktorů. Kapacitační efekt související s vazbou heparinu je u koní mírnější, nežli u skotu. I u dalších druhů zvířat se fyziologické účinky heparinu liší (Calvete et al. 1997). Heparin patří mezi glykosaminglykany pocházející ze samičího reprodukčního traktu a hraje významnou roli při kapacitaci a akrozomální reakci. Heparin se na spermiích váže na Hep+ (heparin binding proteins) proteiny pocházející ze SP (Kumar et al. 2008).

Interakce proteinů a ligandů jsou pro celý proces fertilizace velice důležité, slouží jako regulační mechanismy. Proteiny se váží na povrch spermií při ejakulaci a zajišťují tak remodelaci membrány, díky čemuž dochází k přesně určenému sledu událostí nezbytných pro oplození. Konkrétně jsou to: vazba spermií na buňky vejcovodu, kapacitační proces, rozpoznávání gamet, primární a sekundární vazba spermií na oocyt, akrozomální reakce a průnik skrz zona pellucida a fúze gamet (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Ejakulát, který je skladován chlazený či mražený vykazuje výrazně lepší motilní vlastnosti pokud je obsah semenné plazmy snížen pod 5 %. Také je lepší integrita DNA u vzorků se sníženým či úplně odstraněným obsahem semenné plazmy. Pochopitelně zde hraje roli individualita jedince. Ovšem u špatně mrazitelných hřebců je vhodné odstraňovat semennou plazmu, pro udržení oplozovacích vlastností kryokonzervovaných spermií (Kareskoski & Katila 2008).

### 3.3.1 Proteiny semenné plazmy

Bílkoviny semenné plazmy mohou být různé (Bardon et al. 1999). V SP jsou proteiny zastoupeny hormony, enzymy, růstovými faktory proteinů, glykoproteiny a inhibitory proteináz (Töpfer-Petersen et al. 2005). U různých druhů kopytníků mají proteiny SP shodný původ, avšak jejich obsah se liší. Rozdílný obsah jednotlivých proteinů v SP nemusí být pouze v důsledku odlišné exprese genů pro jejich tvorbu, ale také složením a velikostí přídatných pohlavních žláz. Také je mezi jednotlivými druhy hospodářských zvířat rozdíl v objemu a koncentraci ejakulátu a jeho depozici při páření, což může mít za následek rozdíly v reprodukčních procesech jednotlivých druhů (Druart et al. 2013).

Součástí SP je důležitá skupina proteinů BSP (binder of sperm protein), která zajišťuje vazbu proteinů na membránu spermií (Druart et al. 2013). BSP se váží na fosfolipidy

plazmatické membrány spermií a odčerpávají cholesterol, což je důležité pro přípravu spermií na oplození (Harshan et al. 2006, Maxvel et al. 2007). Díky sníženému obsahu cholesterolu dochází k destabilizaci membrány spermií a je tak možná kapacitace spermií (Harshan et al. 2006). Proteiny SP je možné rozdělit dle schopnosti vazby na heparin, na heparin vázající (Hep+) a heparin nevážící (Hep-) (Calvete et al. 1995b). Do Hep- frakce semenné plazmy patří například  $\beta$ - mikroseminalprotein produkovaný prostatou, ovšem díky celkově vysoké koncentraci v prostatě ho můžeme najít i v Hep+ frakci (Maňásková et al. 2002).

Při vazbě oocytu a spermie jsou dále významné například proteiny lektiny vázající galaktózu. Tyto proteiny jsou lokalizovány jako receptory ve varlatech a spermiích. Na spermiích hrají zásadní roli při rozpoznávání gamet a buněčné signalizaci (Sabeur & Ball 2007). Primární vazba spermií a oocytů je tvořena lektiny, které jsou umístěny na povrchu spermie a zonou pellucidou na oocytu, která je tvořena glykokonjugáty extracelulární glykoproteinové matrix (Reiner et al. 1997). A takto navázané lektiny tvoří asi 60 % z celkového obsahu všech lektinů v SP. Jedná se o lektiny závislé na vápníku (typ C) (Sabeur & Ball 2007).

U různých druhů bylo definováno několik skupin proteinů, které významně podporují oplozovací schopnost spermií (Bardon et al. 1999), jelikož proteiny a glykoproteiny pocházející ze SP zajišťují v rámci post-testikulárních změn remodelaci povrchu spermií (Töpfer-Petersen et al. 2005). Díky tomu proteiny SP zajišťují interakci spermií s epitelem vejcovodu a s oocytem (Druart et al. 2013). U kanců se jedná především o spermadhesiny a proteiny vázající heparin, tyto proteiny jsou také u býků, kde se nachází i proteiny podporující superaktivaci spermií (Bardon et al. 1999).

### **3.3.2 Proteiny semenné plazmy hřebců**

U hřebců se obsah proteinů v SP pohybuje okolo 10 mg/ml, což je v porovnání s jinými druhy hospodářských zvířat (20 – 60 mg/ml) poměrně málo. Hřebčí proteiny SP často vytvářejí multiproteinové agregáty o hmotnosti až 800 kDa. Tyto agregáty mohou tvořit až 70 % všech proteinů v SP hřebců. Předpokládá se, že největší vliv na plodnost mají proteiny o hmotnosti 13 – 122 kDa (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Hlavní proteiny hřebčí semenné plazmy jsou označovány zkratkou HSP-1 až HSP-8 (horse seminal plasma protein). Číslo jim byla udělena dle pozice genu na chromozomu, podle kterého jsou dané proteiny exprimovány (Calvete et al. 1994, Töpfer-Petersen et al. 2005) a jedná se o proteiny nízké molekulové hmotnosti 14 – 30 kDa (Calvete et al. 1994). V SP se vyskytují v podobě hetero-oligomeru, což znamená zvýšení molekulové hmotnosti na 90 kDa (Calvete et al. 1997). V SP dalších druhů hospodářských zvířat se vyskytují homologní proteiny k hřebčím proteinům HSP (Calvete et al. 1994).

Všechny hlavní proteiny hřebčí SP kromě HSP-4 jsou schopny vázat se na spermie, při ejakulaci jsou tedy periferně navázány na spermiích (Calvete et al. 1994) a většina z nich také vykazuje schopnost vazby na heparin a fosforylcholin (Calvete et al. 1997). Vazebné schopnosti proteinů jsou hledisko, kterému se u klasifikace proteinů jiných hospodářských

druhů přikládá velký význam (Töpfer-Petersen et al. 2005). Díky navázanému heparinu dochází k zásadní modulaci membrány spermií nutné k oplození oocyty a také heparin podporuje motilitu spermií. Heparin je vázán na membránu spermií pomocí BSP (Harshan et al. 2006). Produkci heparinu zajišťuje epitel samičího reprodukčního traktu (Calvete et al. 1996). Proteiny s navázaným heparinem dosahují 90 kDa molekulární hmotnosti. Proteiny, které heparin neváží, se chovají jako monomery (Calvete et al. 1995a). Heparin vázající proteiny jsou hojně zastoupeny na povrchu ejakulovaných spermií, na rozdíl od epididymálních, zde jich je navázáno minimum (Harshan et al. 2006). Vazba na heparin je výrazně závislá na agregaci proteinů, nejvhodnější jsou oligomerní agregáty (Töpfer-Petersen et al. 2005). Schopnost navázat heparin je také nepřímo ovlivněna stupněm glykosilace (Calvete et al. 1997). V samičím reprodukčním traktu jsou také mimo heparin další glukosaminglykany ve vysokých koncentracích především v období říje. Což zajišťuje rychlejší kapacitaci a akrozomální reakci (Sabeur & Ball 2007).

Hlavní proteiny SP se kromě schopnosti vazby na heparin dále dělí podle vazby na kolagen. Glykosilované proteiny HSP-1 a HSP-2 se na kolagen váží, naopak od neglykosilovaných. Ovšem při vazbě na kolagen není důležitá agregace proteinů (Calvete et al. 1995a).

Proteiny hřebčí SP se dělí do tří hlavních skupin, a to Fn-2 proteiny, CRISP a spermadhesiny (Töpfer-Petersen et al. 2005). CRISP a Fn-2 proteiny se vyskytují u většiny savčích druhů, zatímco spermadhesiny jsou více zastoupeny především u tří druhů kopytníků (prasata, skot a koně) (Ekhlashi-Hundrieser et al. 2005a).

### **3.3.2.1 Fn-2**

Proteiny patřící do rodiny Fn-2 jsou charakteristické především dvěma nebo čtyřmi tandemově uspořádanými jednotkami fibronektinu typu 2 (Fn-2). Tento typ je také jinak označován jako doména BB (Töpfer-Petersen et al. 2005). U hřebců se vyskytují menší i větší verze proteinů, velikost je dělena mimo jiné dle počtu fibronektinových domén (Ekhlashi-Hundrieser et al. 2005a).

Proteiny Fn-2 jsou zapojeny především do procesu kapacitace, tedy remodelují spermie a interagují s fosfolipidy plazmatické membrány spermií (Töpfer-Petersen et al. 2005). Proteiny jsou na spermie vázány především v postakrozomální oblasti a spojovací části (Ekhlashi-Hundrieser et al. 2005a). Vazbu Fn-2 proteinů ke spermii zajišťuje specifická interakce s cholinovými lipidy plazmatické membrány (Töpfer-Petersen et al. 2005). Vazebná místa pro cholin obou jednotek Fn-2 jsou lokalizována na stejné straně molekuly BB domény (Ekhlashi-Hundrieser et al. 2005a). Tento princip byl poprvé mapován u skotu (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Protein PDC-109, který u skotu odpovídá za vznik oviduktálního rezerváru, patří do skupiny Fn-2 proteinů (Calvete et al. 1995a). Tento protein tvoří různé glykoformy s identickými polypeptidickými řetězci (Ekhlashi-Hundrieser et al. 2005a). PDC-109 je nejhojnějším proteinem býčí SP, jeho koncentrace dosahuje 15 až 20 mg/ml (Calvete et al.

1999). Jeho schopnost vázat heparin může napomáhat hyperaktivaci spermií, případně kapacitaci (Calvete et al. 1995a). Také vykazuje schopnost vazby na fosforylcholin, díky které se může vyskytovat jako homodimer. Tvorba oligomerních struktur je pravděpodobně závislá na vazbě na fosforylcholin (Calvete et al. 1997). Býčí protein PDC-109 je homologní s Fn-2 proteiny beranů a kozlů (Maxvell et al. 2007) a také s hřebčími proteiny semenné plazmy HSP-1/2 (Sabeur & Ball 2007).

Fn-2 proteiny jsou u hřebců exprimovány v různých částech samčího pohlavního traktu. Proteiny větší velikosti (např. EQ-12) v těle a ocasu nadvarlete, naopak menší proteiny jako HSP-1 a HSP-2 v ampuli chámovodu (Töpfer-Petersen et al. 2005, Ekhlesi-Hundrieser et al. 2005a). Tyto malé proteiny, se při průchodu nadvarletem naváží na povrch spermií (Töpfer-Petersen et al. 2005). Dříve byl předpoklad navazování Fn-2 proteinů až při ejakulaci, ovšem díky výskytu části transkriptů HSP-1 v nadvarletí, může docházet k navázání proteinů na spermie již v ocasu nadvarlete. Proteiny větší velikosti jsou na spermie navázány dále i při ejakulaci. Vazba proteinů na spermie přetrvává i při průchodu samičími pohlavními cestami a účastní se prvních kroků fertilizace. Ovšem interakce mezi proteiny a spermii je u hřebců slabší nežli u skotu (Ekhlesi-Hundrieser et al. 2005a).

Do této skupiny se řadí nejvíce zastoupené proteiny hřebčí SP. Jedná se o proteiny HSP-1 a HSP-2. Tyto proteiny tvoří 70 – 80 % celkového objemu proteinů hřebčí SP (Töpfer-Petersen et al. 2005). Protein HSP-1 je tvořen 121 aminokyselinami, má čtyři glykosilační místa a v SP se vyskytuje jak volně, tak i vázaný na heparin. Na navázání HSP-1 na heparin má pravděpodobně vliv glykosilace, která moduluje jeho agregační stav. Heparin vázající a nevazující proteiny jsou rozdílné pouze v obsahu sacharidů, kdy proteiny vázající heparin jsou bohatší na sacharidy (Calvete et al. 1995). Protein HSP-2 se primárním složením liší od HSP-1 pouze chybějící 14 aminokyselinovou sekvencí na N-konci molekuly a je glykosylován v menší míře než-li HSP-1. Tyto proteiny spolu tvoří heterodimer HSP-1/2 (Kumar & Swamy 2016).

### **3.3.2.2 CRISP**

Pro CRISP (cystein rich secretory proteins) proteiny je hlavní charakteristikou bohatost na cystein. CRISP obsahují 16 neměnných cysteinových zbytků a jejich postavení je pevně dáno. Objevují se u rozsáhlé řady druhů a nejen v samčích pohlavních cestách. Na spermii tyto proteiny nalezneme navázané v ekvatoriální a post-akrozomální oblasti a také na střední části bičíku. Jejich exprese je pod vlivem androgenu (Töpfer-Petersen et al. 2005).

U hřebců je nejvíce zastoupen protein CRISP3, který je tvořen hlavně v ampuli chámovodu. Další CRISP proteiny jsou produkovány jinými žlázami, například CRISP1 v nadvarletí, CRISP2 ve varlatech, nadvarlatech i semenných váčcích (Töpfer-Petersen et al. 2005).

Promýváním je možné odstranit velkou část navázaných CRISP, ovšem určitý počet zůstává pevně připojen. Toto množství proteinů přímo koreluje s plodností hřebce (Töpfer-Petersen et al. 2005). CRISP proteiny mají vliv na většinu dějů v rámci spermiogeneze, ale i

na všechny děje související s vývojem spermií (Maxvell et al. 2007). Také modulují imunitní odpověď reprodukčního traktu samice a blokují samičí iontové kanály (Töpfer-Petersen et al. 2005). Při fertilizaci samotné se CRISP proteiny účastní především fúze gamet (Cuasnicú et al. 2001).

### 3.3.2.3 Spermadhesiny

Dle sekvence aminokyselin patří spermadhesiny (AQN, AWN, PSP, DQH) do rozsáhlé rodiny proteinů (Jonáková et al. 2000). Tyto proteiny mají nízkou molekulovou hmotnost, u prasat 12 – 16 kDa (Reiner et al. 1997) a sekvence aminokyselin je u všech spermadhesinů z 40 – 60 % shodná (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002). Při fertilizaci hrají různé spermadhesiny rozdílné role (Jonáková et al. 2000). Účastní se kapacitace, tvorby oviduktálního rezervoáru (Töpfer-Petersen et al. 2005) díky vazbě na sacharidy a zona pellucida (Jonáková et al. 2000), a také interakce gamet a imunitního rozpoznávání dělohou (Dostálová et al. 1995). Spermadhesiny reagují také s zona pellucida a deriváty heparinu (Jonáková et al. 1998).

Charakteristický pro spermadhesiny je počet aminokyselin (110 – 130) a CUB doména (Töpfer-Petersen et al. 2005, Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002), která je složena z přibližně sta aminokyselin a její struktura je založena na antiparalelním  $\beta$ -hřebenu (Varela et al. 1997). CUB doména je ukotvena dvěma disulfidickými můstky a postranními čtyřmi cysteinovými zbytky (Töpfer-Petersen et al. 2005, Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002), které jsou následně schopné vazby například na plazmatickou membránu. Specifické vazby spermadhesinů se sacharidy jsou možné právě díky CUB doméně (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002).

Mezi spermadhesiny patří tzv. stabilizační proteiny (dekapacitační faktory), které pochází ze semenných váčků (Maxvell et al. 2007). Vazba stabilizačních proteinů na plazmatickou membránu spermií probíhá přes dvě vrstvy. První vrstvou jsou monomerní formy proteinů AWN-1 a AQN-3, navázané přes fosfolipidy. Na první vrstvu se dále naváží agregované formy stejných proteinů, která plní stabilizační funkci (Caballero et al. 2008). Tyto procesy probíhají při ejakulaci a zabraňují předčasné kapacitaci a oplození (Maxvell et al. 2007). Spermadhesin AQN-1 sprostředkovává vazbu na stěnu vejcovodu a tvorbu oviduktálního rezervoáru, tím také oddaluje proces kapacitace a oplození (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005b).

Dle Töpfer-Petersena et al. (2005) se spermadhesiny vyskytují především u samců kopytníků. Z dosud prozkoumaných hřebčích spermadhesinů bylo zjištěno, že jsou nejvíce příbuzné s kančími (Maňásková et al. 2002). U prasat jsou tyto proteiny nejvíce prozkoumané a mají dobře popsané aminokyselinové sekvence (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002).

Spermadhesiny jsou schopné tvořit vazby s heparinem (Maxvell et al. 2007), proteinázami, fosfolipidy a glykany (Maňásková et al. 2002). Důležitá je hlavně schopnost vazby na sacharidové struktury, díky rozpoznávání galaktózy v komplexech sacharidů (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002). Všechny tyto vazebné vlastnosti závisí na stupni glykosilace proteinů (Jonáková et al. 1998). Stupeň glykosilace také zapříčiňuje, že se spermadhesiny při



detekci ukazují v několika izoformách, ovšem všechny izoformy mají stejnou N-koncovou sekvenci aminokyselin (Jonáková et al. 1998). Spermadhesiny v agregovaných formách mají také schopnost vázat se na cholesterol, mohou se stát také akceptory cholesterolu a tím pomoci odtoku cholesterolu při kapacitaci (Caballero et al. 2008).

U prasat se hlavní spermadhesiny (PSP-1, PSP-2) neváží přímo na spermie, ale nejdříve vytváří dimer, na který už se nemůže navázat heparin a tento dimer je následně navázán na spermii. Naopak proteiny AWN a AQN-1, AQN-2 se na spermie váží a zapojují se do procesů fertilizace (Jonáková et al. 2000). AWN, AQN-1 a AQN-2 se v SP vyskytují v 90 % v agregátech o velikosti 50 kDa a pouze 10 % jako monomery, případně dimery. Tyto agregáty proteinu AQN-3 působí na spermie jako inhibitory motility (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002).

Agregované i monomerní verze AQN-1 se účastní především tvorby oviduktální rezervoáru a tím také ovlivňují dobu kapacitace. Po začátku kapacitačního procesu se koncentrace AQN-1 snižuje, s čím se snižuje i schopnost spermií vázat se na stěnu oviduktu. Díky tomu jsou spermie uvolňovány z rezervoáru (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005b).

U kanců patří spermadhesiny mezi proteiny vázající sacharidy (Maxvell et al. 2007, Sabeur & Ball 2007) a nejdominantnějšími jsou proteiny AQN-1 a AWN (Sabeur & Ball 2007). Lektin AQN-1 je receptorem vejcovodu pro tvorbu oviduktálního rezervoáru a má velkou škálu navazujících sacharidů, kdežto AWN váže pouze galaktózu (Sabeur & Ball 2007).

Kančí spermadhesiny vyskytující se v heterodimeru PSP-1 a PSP-2 podporují životaschopnost spermií, integritu akrozomu a tím zabraňují penetraci zona pellucida (Maxvell et al. 2007). Také mohou ovlivňovat imunitní odezvu samičích lymfocytů a tím upravovat imunitní odpověď (Leshin et al. 1998). Celkově pokud jsou spermie nad akrozomem pokryty heterodimery PSP-1 a PSP-2 jsou schopné déle přežít (Caballero et al. 2005). Podjednotka PSP-2 je také schopná vázat se přímo na zona pellucida a tím zabraňovat penetraci (Calvete et al. 1995c). Kdežto pokud se jedná o heterodimer PSP-1/PSP-2 vazba není možná (Jonáková et al. 2000).

Strukturou jsou proteiny PSP podobné lidskému glykodelinu, který má imunosupresivní účinky. Což je zajištěno terminálními syalovanými strukturami. Spermadhesiny se nevyskytují pouze jako heterodimery, ale také jako homodimery například SFP (bovinní spermadhesin). Tvorba dimerů je pravděpodobně specifická pro jednotlivé spermadhesiny (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002).

### **3.3.2.3.1 Protein AWN**

Protein AWN pochází z rozsáhlé rodiny spermadhesinů, u kanců patří do frakce heparin vázajících proteinů (Hep+) semenné plazmy, spolu s DQH a AQN (Jonáková et al. 1998). Protein AWN je u kanců produkován hlavně semennými váčky a v nadvarleti (Töpfer-Petersen et al. 2005). Je nejvíce prozkoumávaným spermadhesinem (Reiner et al. 1997) a jediným spermadhesinem lokalizovaným na epididymálních spermích (Ekhlasi-Hundrieser et

al. 2002). V hřebčí SP má protein AWN přibližnou molekulovou hmotnost 14 kDa (Reiner et al. 1997). Za fyziologických podmínek se AWN častěji vyskytuje v agregované formě, čímž jsou ovlivněny i vazebné schopnosti AWN. Agregované formy interagují s cholesterolem, tím se účastní kapacitace kančích spermií. Navazují na sebe uvolněný cholesterol (Jonáková et al. 2000).

Koňským analogem pro AWN je protein HSP-7, který má ve skladbě aminokyselin pouze tři změny oproti kančímu AWN a stejně jako AWN se váže na sacharidy (Töpfer-Petersen et al. 2005), konkrétně na galaktózu (Sebauer & Ball 2007). Rozdílem mezi AWN a HSP-7 je jejich výskyt. HSP-7 se vyskytuje již na spermatogoniích a spermiích odebraných z varlat, na rozdíl od kančích spermií. Dále je rozdílná také jeho koncentrace na různých formách spermií. Ejakulované hřebčí spermie mají koncentraci AWN mnohem vyšší nežli hřebčí epididymální spermie a lokalizace proteinu u hřebců je především v ekvatoriálním segmentu (Töpfer-Petersen et al. 2005). Koncentrace hřebčího AWN je také rozdílná v průběhu nadvarlete, směrem od hlavy k ocasu koncentrace klesá (Reiner et al. 1997). Nejmenší koncentrace proteinu v semenné plazmě hřebce, kterou přispívá nadvarle je v ocasu nadvarlete, což může být zapříčiněno nízkou produkcí proteinů nadvarletem v kombinaci s navazováním již vytvořených proteinů na povrch spermií (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005a).

Kančí spermie mají spermadhesin AWN lokalizovaný po celé akrozomální čepičce spermie, kdežto u hřebce se nachází výhradně v ekvatoriálním segmentu. Charakter jakým se protein AWN váže na povrch spermie, může mít za následek jeho fosforyletanolaminová vazba (Reiner et al. 1997).

Množství navázaného AWN se průchodem samičím reprodukčním traktem snižuje, část může být vstřebána epitelem samičích reprodukčních cest. Také je možné množství proteinu na povrchu spermie odmyt pomocí Percollového gradientu. Zbylé menší množství, které zůstane navázané na spermiích, podporuje teorii, že se protein AWN účastní primární vazby na zona pellucida (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002). Díky úzkému spojení s fosfolipidy plazmatické membrány spermií, je možné fungování AWN jako receptoru pro zona pellucida (Jansen et al. 2001).

K příbuznosti kančího AWN a hřebčího analogu HSP-7 přispívá i fakt, že protilátka rozpoznávající kančí AWN reaguje také s hřebčím HSP-7 (Calvete et al. 1994, Reiner et al. 1997). Což vyplývá i z 98 % shody sekvence aminokyselin (Reiner et al. 1997). Toto ukazuje nejen na strukturní, ale i imunologickou příbuznost proteinů (Calvete et al. 1995a).

## 4 Metodika

### 4.1 Použité vzorky

Pro tuto práci byly využity dvě sady vzorků hřebčích ejakulátů. První sada (A) se skládala z 10 vzorků kryokonzervovaných hřebčích ejakulátů (tabulka č. 1). Druhou sadu vzorků (B) tvořilo 6 vzorků nativních hřebčích ejakulátů (tabulka č. 2). Všichni hřebci použítí v této práci byli v době odběru zdraví a zařazení do reprodukce.

Tabulka č. 1: První sada (A) kryokonzervovaných dávek využitých pro tuto práci.

<b>Vzorek</b>	<b>Místo odběru</b>	<b>Datum odběru</b>
<b>1A</b>	Mnětice	09/2007
<b>2A</b>	Písek	03/2018
<b>3A</b>	Písek	08/2018
<b>4A</b>	Písek	04/2018
<b>5A</b>	Písek	08/2018
<b>6A</b>	Písek	10/2018
<b>7A</b>	Písek	08/2018
<b>8A</b>	Mnětice	09/2007
<b>9A</b>	Písek	10/2018
<b>10A</b>	Mnětice	09/2007

Tabulka č. 2: Druhá sada (B) nativních vzorků využitých pro tuto práci.

Vzorek	Místo odběru	Datum odběru
<b>1B</b>	Písek	02/2021
<b>2B</b>	Písek	02/2021
<b>3B</b>	Písek	02/2021
<b>4B</b>	Písek	02/2021
<b>5B</b>	Písek	02/2021
<b>6B</b>	Písek	02/2021

### Odběr a zpracování ejakulátu

Ejakulát byl odebrán od všech hřebců standardizovaným způsobem pomocí umělé vagíny otevřeného (Krakowského) typu v místnosti k tomu určené. Ihned po odběru byl ejakulát zhodnocen (motilita, koncentrace, objem) a zpracován.

Sada vzorků A byla po odběru naředěna mléčným ředidlem a centrifugována při 650 g po dobu 15 minut. Následně byly spermie bez supernatantu naředěny laktózo-žloutkovým ředidlem a naplněny do tub o objemu 5 ml (1A, 8A, 10A), případně pejet o objemu 0,5 ml. Připravené vzorky byly ekvilibrovány při 5°C po dobu 2 hodin a poté horizontálním mrazením zamrazeny nad parami tekutého dusíku. Rozmrazení proběhlo standardizovaným způsobem po vyjmutí z tekutého dusíku ve vodní lázni o teplotě 37°C po dobu 30 – 60 sekund. Dále následovala centrifugace pro oddělení supernatantu. Získané pelety spermií se dále naředili PBS(phosphate-buffered saline; Sigma-Aldrich, USA, Thermo Scientific, USA) a pomocí vlhké fixace se připravily preparáty na sklíčka. Na mikroskopická sklíčka byly blocker fixem nakreslena dvě kolečka, do každého kolečka bylo napipetováno 20 µl suspenze spermií a 50 µl vymrazené směsi acetonu a metanolu (1:1). Takto byla sklíčka ponechána po dobu 5 minut a následně jemně opláchnuta PBS a oschlá uložena do lednice (5°C) pro další zpracování. Zároveň byly od každého vzorku po promytí PBS uloženy pelety spermií na Western blot imunodetekci. Pelety spermií byly uloženy do hlubokomrazicího boxu (-80°C) do dalšího zpracování.

Sada vzorků B byla ihned po odběru centrifugována při 300 g po dobu 10 minut a následně byly odděleny spermie a semenná plazma. Spermie byly dále dvakrát promyty v PBS v objemu 15 ml (centrifugace při 300 g po dobu 10 minut). Pomocí vlhké fixace byly připraveny preparáty spermií na sklíčka stejným postupem, jako v případě sady A. Stejně tak byly uloženy pelety spermií pro Western blot, jako v případě sady A. Získaná semenná plazma byla centrifugována při 10 000 g po dobu 10 minut pro úplné odstranění buněčných elementů, čistá semenná plazma byla uložena po 1 ml do mikrozkuumavek eppendorf.

Připravené vzorky semenné plazmy byly uloženy do hlubokomrazicího boxu (-80°C) do dalšího zpracování.

Tabulka č. 3: Uvedeno využití jednotlivých vzorků sady A.

	<b>1A</b>	<b>2A</b>	<b>3A</b>	<b>4A</b>	<b>5A</b>	<b>6A</b>	<b>7A</b>	<b>8A</b>	<b>9A</b>	<b>10A</b>
<b>IF</b>	ne	ano	ano	ano	ne	ne	ne	ne	ne	ne
<b>WB</b>	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano

IF – imunofluorescenční mikroskopie, WB – western blot imunodetekce.

Tabulka č. 4: Uvedeno využití jednotlivých vzorků sady B.

	<b>1B</b>	<b>2B</b>	<b>3B</b>	<b>4B</b>	<b>5B</b>	<b>6B</b>
<b>IF</b>	ano	ano	ano	ano	ano	ano
<b>WB</b>	ano	ano	ano	ano	ano	ano

IF – imunofluorescenční mikroskopie, WB – western blot imunodetekce.

## 4.2 Imunofluorescenční mikroskopie

Pomocí imunofluorescenční mikroskopie byla provedena detekce proteinu AWN na hřebčích ejakulovaných a kryokonzervovaných spermích.

### Příprava vzorků

Spermie byly na mikroskopických sklíčkách fixovány vymraženým roztokem acetonu a metanolu (1:1), následně uloženy v chladničce (5°C). Prvním krokem přípravy vzorků na imunofluorescenci byla blokáce 150 µl roztokem Super Block (blokační činidlo v PBS) (phosphate-buffered saline; Sigma-Aldrich, USA, Thermo Scientific, USA). Inkubace probíhala po dobu 30 minut při laboratorní teplotě v předem připravené vlhké komůrce.

Po uplynutí inkubační doby byly preparáty vyjmuty z vlhké komůrky, opláchnuty PBS a poté osušeny. Dalším krokem byla inkubace s primární polyklonální králičí protilátkou proti AWN spermadhesinu (anti-BHB7; Jonáková et al., 1998). Protilátka byla ředěna v PBS v poměru 1:100. Pipetováno bylo do pravého kolečka 100 µl ředěné protilátky a do levého kolečka 100 µl PBS pro negativní kontrolu. Dále byly preparáty ponechány přes noc inkubovat s protilátkou ve vlhké komůrce v lednici (5°C).

Následující den byly preparáty omyty PBS a osušeny. Poté byla aplikována sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům (anti-rabbit) konjugovaná s Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen, USA). Při manipulaci se sekundární protilátkou bylo dbáno na tmavé prostředí. Ředění sekundární protilátky bylo 1:300 v PBS. Takto připravený roztok byl napipetován po 100 µl na všechna kolečka, preparáty byly inkubovány ve vlhké komůrce a 5°C po dobu 1 hodiny.

Po inkubaci se sekundární protilátkou byly preparáty opět omyty PBS a osušeny. Následujícím krokem bylo barvení akrozomů spermií pomocí lektinu PNA konjugovaným s rhodaminem (Rhodamin Peanut Agglutinin, Vector Laboratories, USA) ředěným PBS v poměru 1:1000. Do každého kolečka bylo napipetováno 100 µl a preparáty byly uloženy do vlhké komůrky při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Při manipulaci s roztokem PNA bylo dbáno na tmavé prostředí.

Po 30 minutách byly preparáty promyty PBS a destilovanou vodou a poté osušeny. Nakonec byly preparáty převrstveny 5 µl montovacího média VectaShield s DAPI (Antifade Mounting Medium, Vector Laboratories, USA) pro barvení jaderné DNA spermií. Po aplikaci byla na každý preparát umístěna krycí sklíčka a zafixována. Preparáty byly na 10 minut umístěny do tmy a poté následovalo hodnocení pomocí fluorescenčního mikroskopu (Eclipse E600, Nikon, Tokyo, Japan). Dokumentace proběhla pomocí kamery (Digital Sight DS-Fi 1, Nikon, Japan) a programu NIS Elements. Bylo hodnoceno minimálně 200 spermií na vzorek při 40x zvětšení.

### **Detekce vzorků**

Spermie byly v průběhu hodnocení rozděleny v první části na 3 kategorie. Hlediskem pro dělení spermií do kategorií byla síla signálu protilátky proti AWN: spermie se silným signálem proteinu AWN, spermie se slabým signálem proteinu AWN a bez signálu proteinu AWN. Ve druhé části byly hlediskem hodnocení kategorií spermií signál protilátky proti proteinu AWN a zároveň signál akrozomu spermie značený pomocí PNA. Kategorie byly následující spermie se signálem AWN, ale bez signálu PNA, spermie se signálem AWN a zároveň signálem PNA a spermie bez signálu AWN a zároveň bez signálu PNA.

### **Statistické hodnocení**

Získaná data byla statisticky zpracována v programu Statistika (ver. 12, StatSoft, CZ) a dále v programu Microsoft Excel. Jelikož nebyl dostatek dat pro parametrické testování, byl v programu Statistika použit neparametrický Mann – Whitneyův U test. Tento test bývá využíván pro hodnocení nepárových pokusů dvou různých výběrových souborů. V této práci byl Mann – Whitneyův U test využit k vyhodnocení statistické hypotézy, zda je mezi kryokonzervovanými a nativními vzorky hřebčích spermií statisticky významný rozdíl v zastoupení sledovaných kategorií spermií. Pro druhou část vyhodnocování byla v programu Statistika využita korelace. Korelace udává, zda je mezi proměnnými možná závislost. Statistické hodnocení v programu Excel bylo využito na výpočet průměrného zastoupení jednotlivých kategorií spermií a jejich grafické zpracování.

## 4.3 Western blot imunodetekce

### 4.3.1 Příprava vzorků

Hřebčí semenná plazma (SP) byla po vyjmutí z hlubokomrazicího boxu centrifugována 10 minut při 10 000 x g ve 4°C. Bylo odebráno 100 µl SP a přidáno 600 µl vymraženého acetonu. Vzorky byly ponechány 1 hodinu na ledu. Poté byly centrifugovány 5 minut při 5000 x g ve 4°C. Supernatant byl pečlivě odstraněn a k peletce vysrážených proteinů bylo přidáno 100 µl neredukujícího vzorkového pufru o složení 4,2 ml H<sub>2</sub>O, 1 ml 0,5 M Tris.HCl pH 6,8, 0,8 ml glycerol, 1,6 ml 10 % SDS, 0,4 ml 0,05 % bromfenolové modře. Vysrážené proteiny SP byly dobře rozpuštěny a povařeny při 100°C po dobu 5 minut v termální třepačce.

Vzorky hřebčích spermií (peleta o objemu 50 µl obsahující asi 5 x 10<sup>7</sup> buněk) byly smíchány s neredukujícím vzorkovým pufrem v poměru 1:2. Vzorky byly udržovány na ledu po dobu 30 minut. V průběhu této doby několikrát došlo k jejich promíchání na vortexu. Poté byly vzorky povařeny při 100°C po dobu 5 minut. Následně proběhla centrifugace po dobu 2 minut při teplotě 4°C a 10 000 g. Posledním krokem přípravy vzorků bylo odebrání supernatantu po centrifugaci do nových zkumavek.

### 4.3.2 Elektroforéza

Prvním krokem celého postupu byla příprava a sestavení aparatury pro tvorbu separačního polyakrylamidového gelu a temperace chemikálií uchovávaných v chladu na laboratorní teplotu (30 % akrylamid, APS). Hustota gelu pro elektroforézu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS) podle Laemmliho (1970) byla zvolena 15 %, kvůli předpokládané velikosti detekovaného proteinu. Množství roztoku bylo definováno na přípravu 2 gelů, tedy konkrétně 2,5 ml H<sub>2</sub>O, 2,5 ml pufru B (Resolving Gel Buffer B, Bio-Rad, USA), 5 ml 30 % roztoku akrylamidu (ACRYLAMIDE/bis-ACRYLAMIDE, Bio-Rad, USA), 100 µl 10 % SDS (Sigma-Aldrich, USA), 70 µl APS (10 % roztok persíranu amonného) a 4,5 µl tetramethylethylenediamine (GE Healthcare, Švédsko). Poslední dvě složky roztoku pro přípravu gelu byly přidány těsně před aplikací roztoku mezi elektroforetická skla, který byl na závěr překryt destilovanou vodou.

Po ztuhnutí separačního gelu (asi po 30 minutách) byla slita destilovaná voda a navrstven roztok 4 % zaostřovací gelu. Zaostřovací gel byl připraven z 1,52 ml H<sub>2</sub>O, 625 µl pufru C (Sticking Gel Buffer C, Bio-Rad, USA), 325 µl 30 % akrylamidu (ACRYLAMIDE/bis-ACRYLAMIDE, Bio-Rad, USA), 25 µl 10 % SDS, 3,8 µl tetramethylethylenediamine (GE Healthcare, Švédsko) a 50 µl 10 % APS. Gel byl opět opatrně napipetován mezi skla na již zatuhlý separační gel a byl do něho umístěn hřeben tvořící jamky pro vzorky.

Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byla přemístěna skla do aparatury pro elektroforézu. Celá nádoba na elektroforézu byla naplněna do stanovené míry elektrodovým pufrem (15 g Tris, 72 g glycinu a 5 g SDS rozpuštěno v 1 l destilované vody, pracovní roztok ředěn 1:4

v destilované H<sub>2</sub>O) a byly vyjmuty hřebeny. Poté byly jednotlivé vzorky semenné plazmy (po 5 µl) a extraktu spermií (po 10 µl) spolu s 3 µl proteinových hmotnostních standardů (Precision Plus Protein Dual Color Standards, BioI-Rad, USA) napipetovány pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky do jednotlivých jamek v zaostřovacím gelu. Po dokončení aplikace byla elektroforéza spuštěna a probíhala přibližně 30 minut při konstantním napětí 80 V. Po uplynutí této doby byla hodnota změněna na 150 V a dále probíhala elektroforéza za těchto podmínek asi 1 hodinu.

### **4.3.3 Elektropřenos proteinů z gelu na membránu**

Po skončení elektroforézy následoval elektropřenos proteinů z gelu na nitrocelulóзовou (NC) membránu. Byla připravena kazeta, 2 houbičky, 4 výstřižky chromatografického papíru Whatman (8,5 x 10 cm), 1 NC membrána a gel po elektroforéze. Kromě gelu bylo vše předem namočeno na 15 minut do připraveného transferového pufru (3,03 g Tris, 14,4 g glycin rozpuštěno v 200 ml destilované H<sub>2</sub>O, přidáno 200 ml, metanolu a doplněno do 1 l destilovanou H<sub>2</sub>O). Poté bylo vše v daném pořadí naskládáno do kazety (černá strana kazety, houbička, 2x chromatografický papír Whatman, gel, NC membrána, 2x chromatografický papír Whatman, houbička, červená strana kazety) a uloženo do aparatury a zalito transferovým pufrem. Celá aparaturu byla dále vložena do nádoby naplněné ledem pro chlazení.

Proces byl zahájen zapojením zdroje a nastavením konstantního elektrického proudu na 500 mA. Po 1 – 1,5 hodině byl proces ukončen, kazeta vyjmuta, rozebrána a membrána vyndána. Membrána byla opláchnuta v destilované vodě a následně obarvena Ponceau (Sigma-Aldrich, USA) po dobu 60s pro průkaz přítomnosti přenesených proteinů. Dále následoval oplach roztokem PBS s 0,1 % Tween 20 (PBS-T) pro odbarvení membrány.

### **4.3.4 Inkubace s protilátkami**

Poté co byla membrána omyta po barvení Ponceau, byla na 1 hodinu umístěna do předem připraveného roztoku 5 % mléka (Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad, USA) v PBS.

Dalším krokem byla inkubace s primární protilátkou proti Awn spermadhesinu (anti-BHB7; Jonáková et al. 2000), protilátka byla ředěna v PBS v poměru 1:1000. Inkubace probíhala přes noc při teplotě 4°C.

Další den byla membrána promývána v PBS-T po dobu 30 minut za mírného třepání. Promývací roztok byl vyměněn 3x. V průběhu této doby byla vyředěna sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (Goat anti-Rabbit HRP, Bio-rad, USA) v poměru 1:3000 v PBS a připravena na inkubaci. Po posledním promytí byla membrána inkubována se sekundární protilátkou 1 hodinu, opět za mírného třepání. Následně opět probíhalo promývání membrány v PBS-T po 5 minutách v 5 opakováních.



#### 4.3.5 Detekce

Pro imunodetekci NC membrán s proteiny byl využit přístroj Azure c300 Gel Imaging System (Azure Biosystems, Dublin, California, USA) a dvousložkový chemiluminiscenční substrát (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo SCIENTIFIC, USA), který byl předem připraven v poměru 1:1 a aplikován na membránu přímo v přístroji.

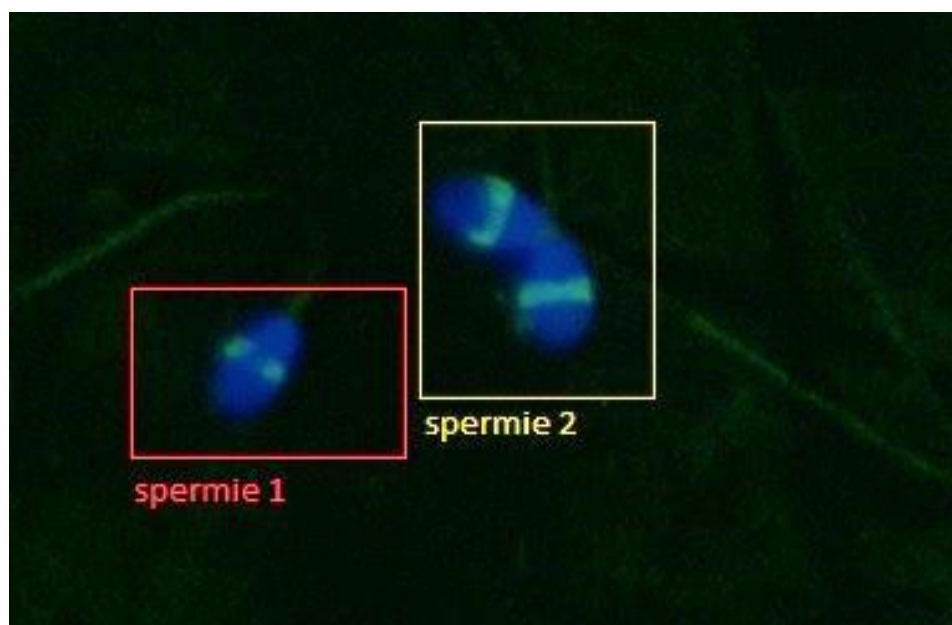
Po provedení detekce byly membrány promyty PBS-T a pomocí roztoku Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo SCIENTIFIC, USA) byly odmyty navázané protilátky. Následně byly membrány využity pro detekci tubulinu (Monoclonal Anti- $\alpha$ -Tubulin antibody produced in mouse, SIGMA, USA), jakožto referenčního proteinu pro hodnocení celkové proteinové nanášky ve vzorku.

Ke kvatifikování množství detekovaného proteinu na membránách získaných v programu Azure byl využit program Image Studio Digits verze 4.0 C-Digit Scanner. A pro další zpracování a vizualizování dat byl využit Microsoft Excel a GraphPad Prism 5 Software.

## 5 Výsledky

### 5.1 Imunofluorescenční mikroskopie

V rámci imunofluorescenční detekce bylo z každého vzorku spočítáno minimálně 200 spermií s pozitivně označeným jádrem pomocí signálu DAPI. Pro vyhodnocení rozdílu v zastoupení signálu protilátky proti AWN mezi sadou kryokonzervovaných (A) a nativních (B) spermií, byly definovány 3 kategorie spermií: spermie pozitivní slabým signálem, spermie pozitivní silným signálem (obrázek č. 3) a spermie bez signálu protilátky proti AWN (obrázek č. 4B – žlutý kruh). Ze získaných hodnot byla vypočítána procentuální zastoupení pro jednotlivé kategorie spermií. Tato data jsou uvedena v tabulce č. 5 a zobrazena na grafu č. 1.



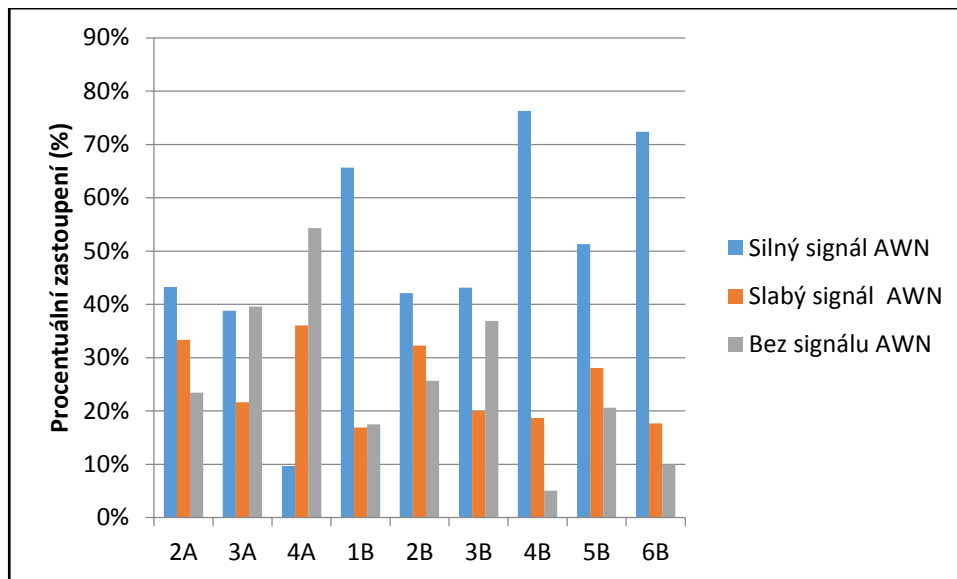
Obrázek č. 3: Definice silného a slabého signálu protilátky proti AWN na spermiích s obarveným jádrem pomocí DAPI. Spermie 1 – slabý signál, spermie 2 – silný signál.

Při vyhodnocování byl signál protilátky proti AWN rozdělen na slabý a silný. Silný signál (obrázek č. 3 – spermie 2) je jasný, výrazný a je detekován v celé délce ekvatoriálního segmentu, popřípadě ve formě dvou signálů v ekvatoriálním segmentu, s ohledem na hladinu zobrazení a postavení hlavičky spermie. Slabý signál (obrázek č. 3 – spermie 1) je zobrazen slabší reakcí fluorescenčně značené protilátky pod mikroskopem, případně je mírně rozptýlen v ekvatoriálním segmentu.

Tabulka č. 5: Procentuální zastoupení kategorií spermií rozdělených dle intenzity signálu protilátky proti proteinu AWN v kryokonzervovaných (A) a nativních (B) vzorcích hřebčích spermií.

Vzorek	ID	Silný signál AWN	Slabý signál AWN	Bez signálu AWN
<b>2A</b>	A	43,24 %	33,33 %	23,42 %
<b>3A</b>	A	38,83 %	21,61 %	39,56 %
<b>4A</b>	A	9,68 %	36,02 %	54,30 %
<b>1B</b>	B	65,66 %	16,87 %	17,47 %
<b>2B</b>	B	42,11 %	32,24 %	25,66 %
<b>3B</b>	B	43,13 %	20,00 %	36,88 %
<b>4B</b>	B	76,27 %	18,67 %	5,06 %
<b>5B</b>	B	51,32 %	28,04 %	20,63 %
<b>6B</b>	B	72,40 %	17,65 %	9,95 %

ID = inseminační dávka, A = kryokonzervované spermie, B = nativní spermie, silný signál AWN = procentuální zastoupení spermií s pozitivním silným signálem protilátky proti AWN, slabý signál AWN = procentuální zastoupení spermií s pozitivním slabým signálem protilátky proti AWN, bez signálu AWN = procentuální zastoupení spermií bez signálu protilátky proti AWN.



Graf č. 1: Procentuální zastoupení jednotlivých kategorií spermií u konkrétních vzorků rozdělených dle síly signálu protilátky proti proteinu AWN v kryokonzervovaných (A) a nativních (B) vzorcích hřebčích spermií. A = kryokonzervované spermie, B = nativní spermie, silný signál AWN = procentuální zastoupení spermií s pozitivním silným signálem protilátky proti AWN, slabý signál AWN = procentuální zastoupení spermií s pozitivním slabým signálem protilátky proti AWN, bez signálu AWN = procentuální zastoupení spermií bez signálu protilátky proti AWN.

Na grafu č. 1 je zobrazeno procentuální zastoupení 3 kategorií hřebčích spermií u jednotlivých vzorků ze skupiny kryokonzervovaných (A) a nativních (B). Jednotlivé vzorky se od sebe viditelně liší, ovšem není zde patrný žádný významný trend v zastoupení jednotlivých kategorií spermií. Většina vzorků ze sady B (nativní ejakulát) má vyšší zastoupení spermií se silným signálem, a naopak nižší zastoupení spermií bez signálu protilátky proti AWN, oproti vzorkům sady A (kryokonzervované). U vzorků ze skupiny A je navíc okometricky více zastoupena kategorie spermií se slabým signálem protilátky proti AWN, oproti vzorkům ze skupiny B. Vzorky 3A a 4A mají nejvíce zastoupenou kategorii spermií bez signálu protilátky proti AWN v rámci obou skupin. Zároveň vzorek 4A má nejméně zastoupenou kategorii silného signálu protilátky proti proteinu AWN ze všech vzorků. Ze skupiny B naopak dominují vzorky 1B, 4B, 5B, 6B v zastoupení kategorie silného signálu protilátky proti AWN a zároveň mají nejnižší zastoupení kategorie bez signálu.

Vzhledem k nízkému množství dat, které znemožňuje parametrické testování, byl zvolen pro statistické vyhodnocení procentuálního zastoupení kategorií spermií dělených dle signálu protilátky proti AWN Mann – Whitneyův U test (tabulka č. 6). Ten udává nulovou hypotézu, tedy že přítomnost proteinu AWN není rozdílná mezi soubory A (kryokonzervované spermie) a B (nativní spermie). Výpočet vycházel z procentuálního zastoupení jednotlivých kategorií spermií ve vzorcích ze skupin A a B.

Tabulka č. 6: Statistická analýza hodnot vedených v tabulce č.5 v programu Statistika 12 s využitím Mann – Whitneyova U testu.

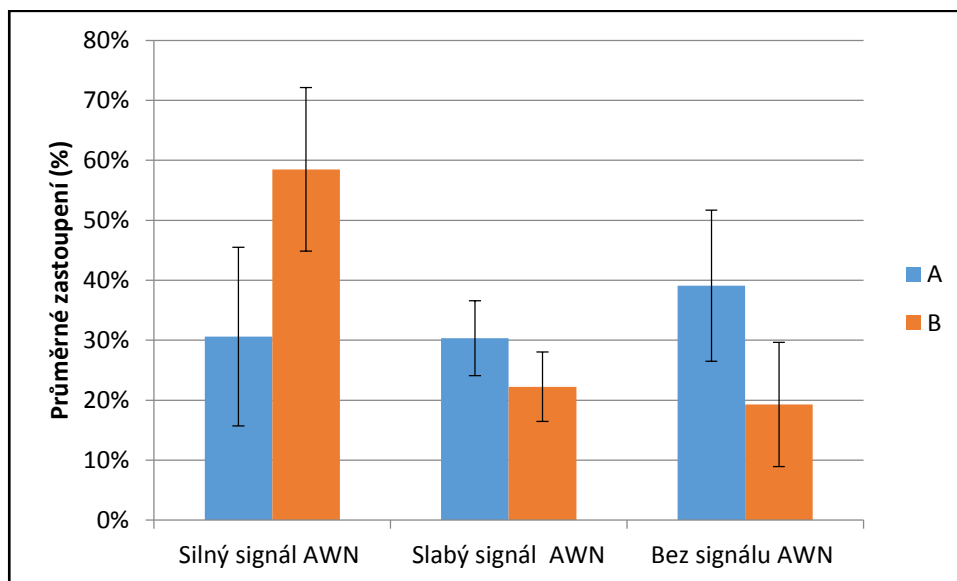
Proměnná	Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost)					
	Dle proměn. ID					
	Označené testy jsou významné na hladině $p < 0,05000$					
	Sčet poč. A	Sčet poč. B	U	Z	p-hodn.	Z upravené
Silný signál AWN	8,00000	37,00000	2,000000	-1,67829	0,093291	-1,67829
Slabý signál AWN	22,00000	23,00000	2,000000	1,67829	0,093291	1,67829
Bez signálu AWN	22,00000	23,00000	2,000000	1,67829	0,093291	1,67829

Proměnná	Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost)			
	Dle proměn. ID			
	Označené testy jsou významné na hladině $p < 0,05000$			
	p-hodn.	N platn. A	N platn. B	2*1str. přesné p
Silný signál AWN	0,093291	3	6	0,095238
Slabý signál AWN	0,093291	3	6	0,095238
Bez signálu AWN	0,093291	3	6	0,095238

ID = inseminační dávka, A = kryokonzervované spermie, B = nativní spermie, silný signál AWN = procentuální zastoupení spermií s pozitivním silným signálem protilátky proti AWN, slabý signál AWN = procentuální zastoupení spermií s pozitivním slabým signálem protilátky proti AWN, bez signálu AWN = procentuální zastoupení spermií bez signálu protilátky proti AWN.

Statistický vliv faktoru A/B na zastoupení jednotlivých kategorií spermií nebyl prokázán ( $p > 0,05$ ). Z výsledků uvedených v tabulce č. 6 tedy vyplývá, že kryokonzervované vzorky se v zastoupení spermií s rozdílným signálem protilátky proti AWN významně neliší od vzorků nativního ejakulátu.

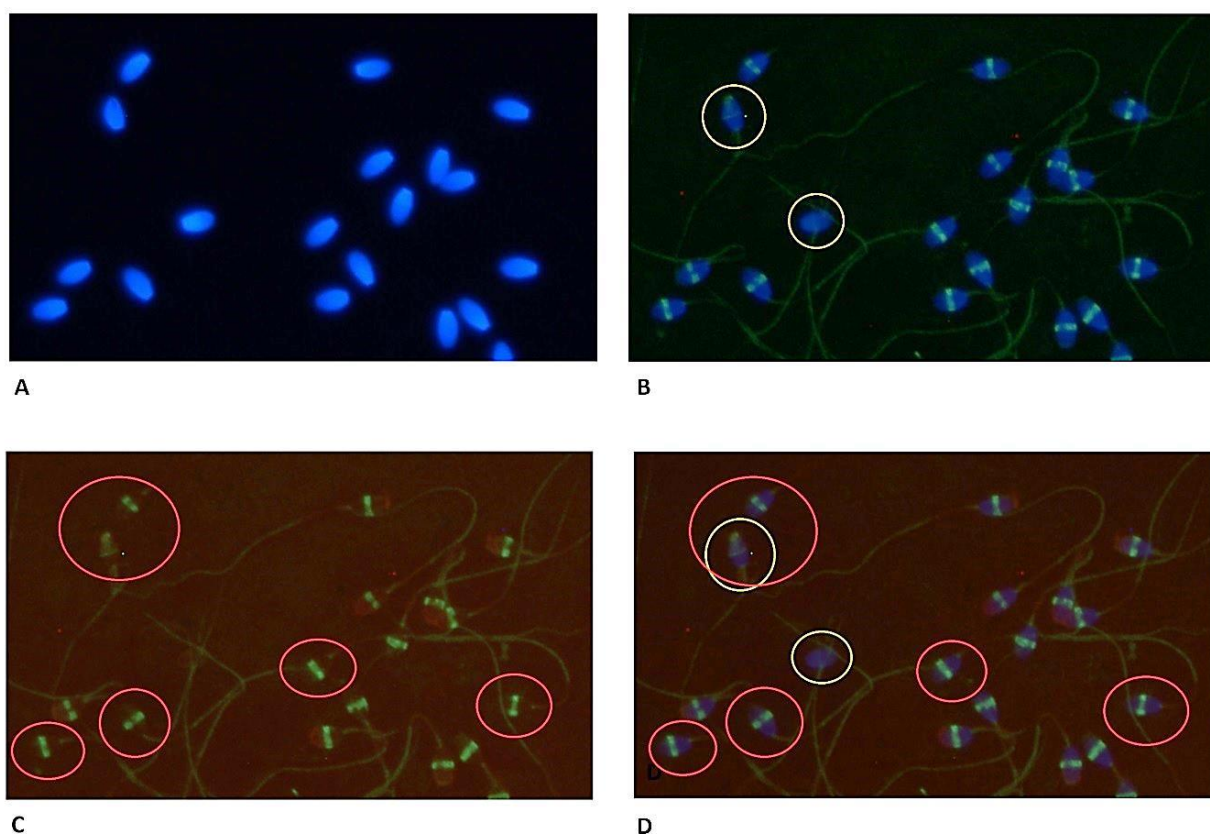
Pro obě skupiny hřebčích spermií (A, B) byly stanoveny průměry jednotlivých kategorií spermií (graf č. 2).



Graf č. 2: Průměrné procentuální zastoupení jednotlivých kategorií spermií rozdělených dle intenzity signálu protilátky proti proteinu AWN v kryokonzervovaných (A) a nativních (B) vzorcích hřebčích spermií. A = kryokonzervované spermie, B = nativní spermie, silný signál AWN = procentuální zastoupení spermií s pozitivním silným signálem protilátky proti AWN, slabý signál AWN = procentuální zastoupení spermií s pozitivním slabým signálem protilátky proti AWN, bez signálu AWN = procentuální zastoupení spermií bez signálu protilátky proti AWN.

Dle grafu č. 2 je patrné, že průměrné procentuální zastoupení spermií se silným signálem AWN je vyšší u skupiny B, tedy u nativních vzorků a zároveň ostatní kategorie spermií jsou ve svém průměrném zastoupení nižší, oproti skupině kryokonzervovaných vzorků (A). Výraznější rozdíly mezi skupinami vzorků kryokonzervovaných a nativních spermií byly zaznamenány v kategorii se silným signálem protilátky proti AWN a v kategorii bez signálu, tyto rozdíly však nebyly statisticky významné ( $p > 0,05$ ).

Další část imunofluorescenčního hodnocení byla zaměřena na přítomnost funkčního akrozomu značeného pomocí PNA a její korelaci se signálem protilátky proti AWN v nativních vzorcích hřebčích spermií (sada B). Byly definovány 3 kategorie spermií (obrázek č. 4): spermie se signálem protilátky proti AWN, ale bez signálu PNA, spermie se signálem protilátky proti AWN a zároveň signálem PNA a spermie bez signálu protilátky proti AWN a zároveň bez signálu PNA. Kategorie spermií bez signálu protilátky proti AWN, ale s přítomným funkčním akrozomem (se signálem PNA) se ve vzorcích nevyskytovala. Procentuální zastoupení těchto kategorií spermií je uvedeno v tabulce č. 7.

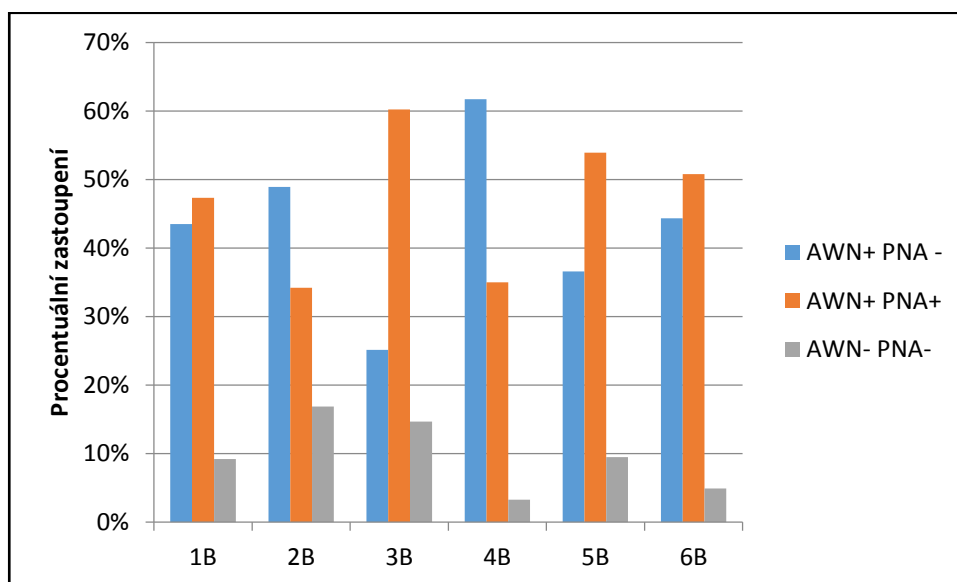


Obrázek č. 4: Definované kategorie spermií na základě signálu protilátky proti proteinu AWN a signálu akrozomu PNA. Spermie zaznamenané ze vzorku 6B pomocí imunofluorescenčního mikroskopu. A – jádra spermií značená pomocí DAPI, B – signál DAPI a protilátky proti proteinu AWN, C – spermie se signálem protilátky proti proteinu AWN a značeným akrozomem pomocí PNA, D – signál DAPI, protilátky proti proteinu AWN a PNA. Žlutá kolečka na fotkách B a D vyznačují spermie bez detekovaného proteinu AWN. Červená kolečka na fotkách C a D ukazují spermie bez obarveného akrozomu, většina z nich má ovšem detekovaný protein AWN i přes nepřítomnost akrozomu.

Tabulka č. 7: Procentuální zastoupení jednotlivých kategorií hřebčích spermií vzhledem k signálu protilátky proti AWN a signálu PNA v sadě vzorků ze skupiny B (nativní).

Vzorky	AWN+ PNA-	AWN+ PNA+	AWN- PNA-
<b>1B</b>	43,49 %	47,30 %	9,21 %
<b>2B</b>	48,92 %	34,20 %	16,88 %
<b>3B</b>	25,12 %	60,20 %	14,68 %
<b>4B</b>	61,73 %	34,98 %	3,29 %
<b>5B</b>	36,59 %	53,90 %	9,51 %
<b>6B</b>	44,32 %	50,78 %	4,90 %

AWN+ PNA- = kategorie spermií se signálem protilátky proti proteinu AWN, bez signálu akrozomu PNA, AWN+ PNA+ = kategorie spermií se signálem protilátky proti proteinu AWN a zároveň se signálem akrozomu PNA, AWN- PNA- = kategorie spermií bez signálu protilátky proti proteinu AWN a zároveň bez signálu akrozomu PNA.



Graf č. 3: Procentuální zastoupení jednotlivých kategorií spermií skupiny B dle signálu AWN a PNA. AWN+ PNA- = kategorie spermií se signálem protilátky proti proteinu AWN, bez signálu akrozomu PNA, AWN+ PNA+ = kategorie spermií se signálem protilátky proti proteinu AWN a zároveň se signálem akrozomu PNA, AWN- PNA- = kategorie spermií bez signálu protilátky proti proteinu AWN a zároveň bez signálu akrozomu PNA.



Z grafu č. 3 je patrné, že nejnižší procentuální zastoupení u všech vzorků dosahovala skupina spermií bez signálu protilátky proti AWN a zároveň bez funkčního akrozomu. Nejnižší procento spermií bez obou signálů vykazuje vzorek 4B, který má zároveň nejvyšší procento spermií s pozitivním signálem protilátky proti AWN, ovšem nikoli pozitivní akrozom. Vyrovnaných hodnot procentuálního zastoupení dosahují kategorie spermií s pozitivním signálem protilátky proti AWN i s pozitivním akrozomem a spermií s pozitivním signálem protilátky proti AWN bez pozitivního akrozomu. Kromě dvou případů má převahu skupina s oběma pozitivními signály.

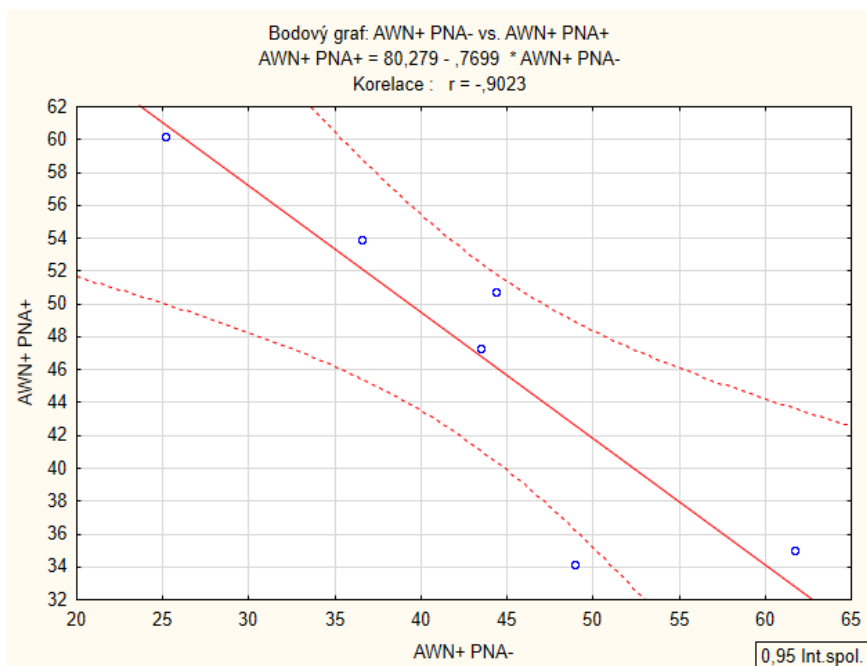
Z hodnot procentuálního zastoupení jednotlivých kategorií spermií rozdělených dle přítomnosti signálů protilátky proti AWN a PNA byla stanovena ve statistickém programu korelace mezi těmito kategoriemi. Výstup programu Statistika 12 je uveden v tabulce č.8.

Tabulka č. 8: Korelace mezi kategoriemi spermií rozdělených dle přítomnosti signálu protilátky proti AWN a signálu PNA.

Proměnná	<b>Korelace. Označené korelace jsou významné na hlad. <math>p &lt; 0,05000</math></b> <b>N=6</b>				
	Průměry	Sm.odch.	AWN+ PNA-	AWN+ PNA+	AWN- PNA-
<b>AWN+ PNA-</b>	43,36167	12,2298	1	<b>-0,90233</b>	-0,53032
<b>AWN+ PNA+</b>	46,89333	10,43533	<b>-0,90233</b>	1	0,113093
<b>AWN- PNA-</b>	9,745	5,30556	-0,53032	0,113093	1

AWN+ PNA- = kategorie spermií se signálem protilátky proti proteinu AWN, bez signálu akrozomu PNA, AWN+ PNA+ = kategorie spermií se signálem protilátky proti proteinu AWN a zároveň se signálem akrozomu PNA, AWN- PNA- = kategorie spermií bez signálu protilátky proti proteinu AWN a zároveň bez signálu akrozomu PNA.

Mezi kategoriemi spermií AWN+ PNA- a AWN+ PNA+ byla zjištěna záporná korelace na hladině významnosti  $p < 0,05$  (tabulka č. 8). Byla tedy potvrzena statisticky průkazná závislost mezi množstvím spermií s pozitivním signálem protilátky proti AWN a funkčním akrozomem a spermií s pozitivním signálem protilátky proti AWN bez funkčního akrozomu, v rámci skupiny nativních vzorků hřebčích spermií. Tato korelace je znázorněna v grafu č. 4. Z tohoto grafu je patrné, že pokud klesá procento spermií v jedné z kategorií, v druhé stoupá a naopak.

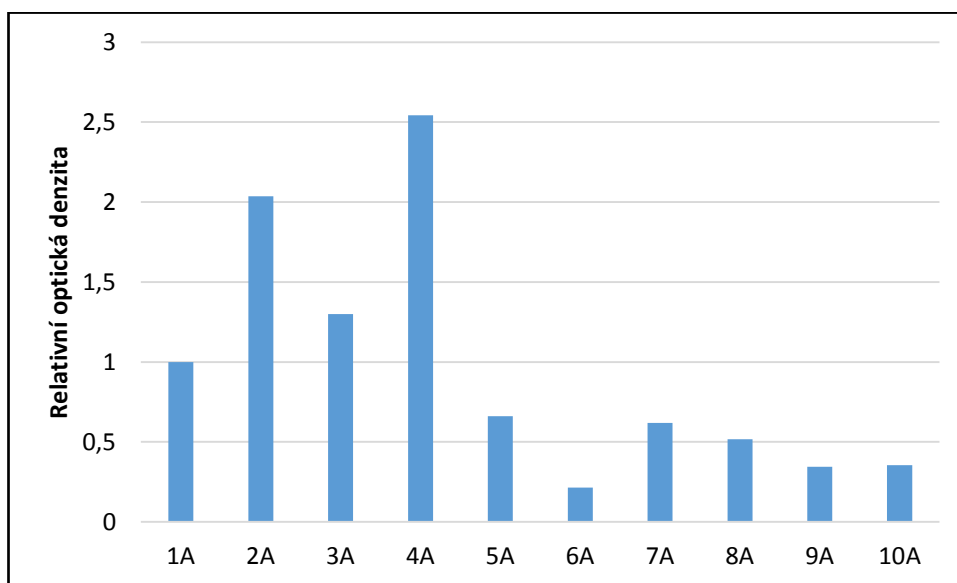


Graf č. 4: Bodový graf korelace mezi AWN+ PNA+ a AWN+ PNA-. Osa X: AWN+ PNA- = kategorie spermií se signálem protilátky proti proteinu AWN, bez signálu akrozomu PNA; osa Y: AWN+ PNA+ = kategorie spermií se signálem protilátky proti proteinu AWN a zároveň se signálem akrozomu PNA.

## 5.2 Western blot imunodetekce

Detekce signálů protilátky proti AWN probíhala na 4 sadách vzorků (membrán) připravených z hřebčích spermií a semenné plazmy. Pro detekci nanášky proteinu byla využita detekce referenčního proteinu tubulinu (část spermií) a barvení membrány pomocí Ponceau (část semenné plazmy). Detekována byla jedna sada vzorků ze sady A (kryokonzervované spermie) a tři sady vzorků ze sady B (nativní spermie a SP). Ve všech sadách byly signály protilátky proti AWN úspěšně detekovány u všech hřebců. Signál z membrán byl určen pomocí programu Image Studio Digits verze 4.0 C-Digit Scanner, a následně spočítán u každého vzorku poměr signálu a velikosti zjišťované plochy detekovaného proteinu. Stejný postup byl při zjištění množství nanášky. Následně byly poměry signál/plocha pro AWN a signál/plocha pro tubulin (Ponceau) opět vyděleny.

Vzorky sady A (kryokonzervované inseminační dávky) byly pro malé množství detekovány pouze v jednom měření, z tohoto důvodu je pro skupinu vzorků A malé množství dat a nelze využít statistického vyhodnocení. Relativní optická denzita pro reakci protilátky proti AWN naměřená u jednotlivých vzorků hřebčích spermií jsou uvedeny v grafu č. 5.

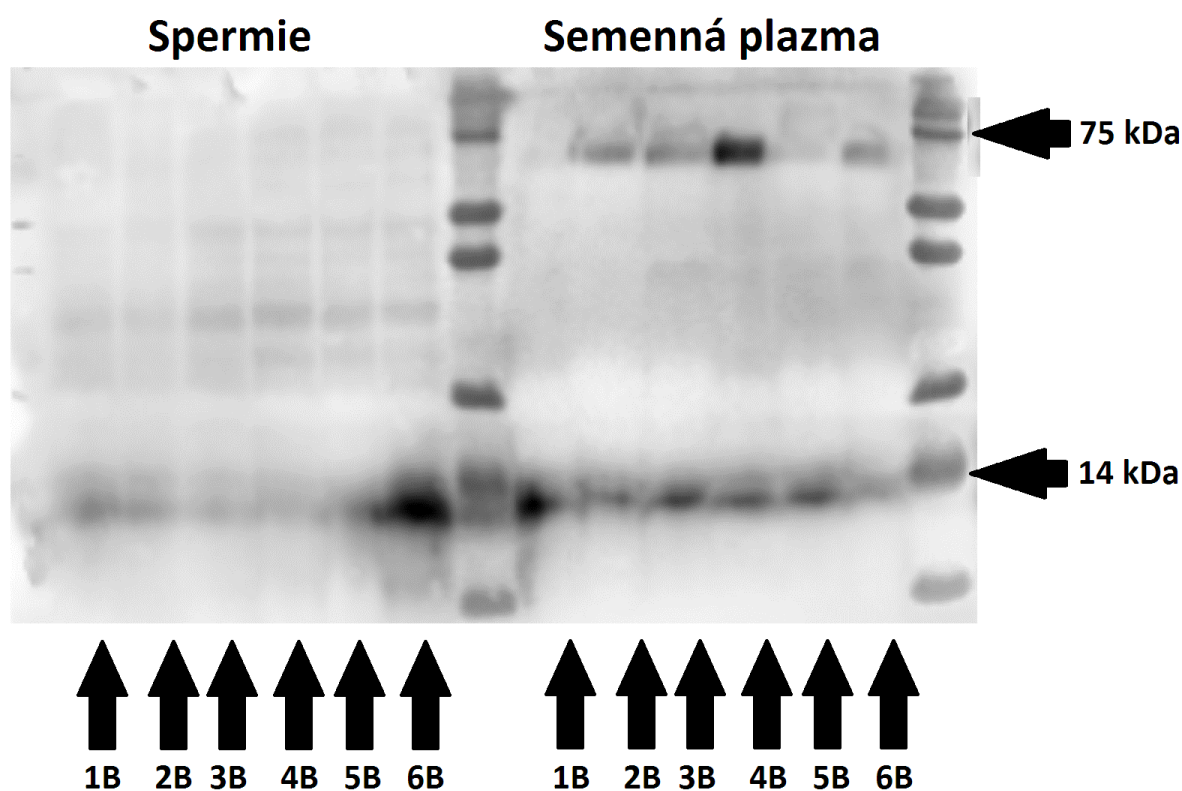


Graf č. 5: Relativní optická denzita vzorků sady A (kryokonzervovaných inseminačních dávkách) určená pro míru signálu protilátky proti proteinu AWN, hodnoty vztahy ke vzorku 1A.

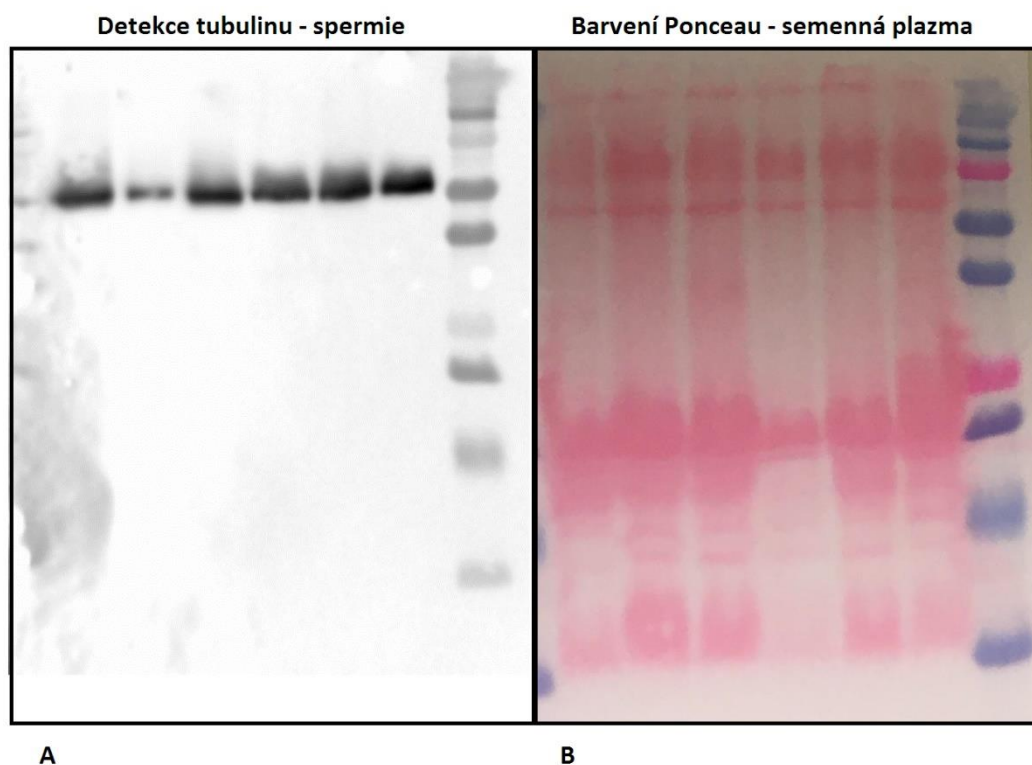
Na grafu č. 5 je patrná individualitu relativní optické denzity míry signálu protilátky proti proteinu AWN mezi jednotlivými vzorky hřebčích kryokonzervovaných spermií. Nicméně mezi vzorky 5A, 7A, 8A, 9A a 10A je zřejmá jistá vyrovnanost hodnot v množství AWN proteinu detekovaného protilátkou. Nejnížší hodnoty dosahuje vzorek 6A, naopak nejvyšší hodnoty dosahuje vzorek 4A.

Pro další hodnocení byly využity vzorky pouze ze sady B (nativní ejakulát). U membrán ze sady hřebců B byly vzorky rozděleny na proteiny pocházející ze spermií a proteiny ze SP a byla provedena 3 opakování. Imunodetekce proteinů je zobrazena na obrázku č. 5 a detekce referenčních hodnot tubulinu v extraktech spermií a celkových proteinů ve vzorcích SP na obrázku č. 6. Detekované proteiny odpovídají předpokládané molekulové hmotnosti 14 kDa. Při detekci byly zjištěny rozdíly v množství proteinu AWN u jednotlivých vzorků mezi spermiemi a semennou plazmou stejného hřebce.

Také se na všech opakováních (membránách) vyskytoval pás proteinů, detekovaný pomocí protilátky proti proteinu AWN v oblasti molekulové hmotnosti 75 kDa, především v části se vzorky proteinůsemenné plazmy (obrázek 5). Tyto oblasti by mohly představovat protein AWN v agregovaných formách s jinými proteiny SP.



Obrázek č. 5: Reprezentativní obrázek imunodetekce proteinu AWN na membráně č. 2 pomocí protilátky. 1B – 6B označení vzorků z tabulky č. 4. Spermie detekované v molekulové hmotnosti 14 kDa.

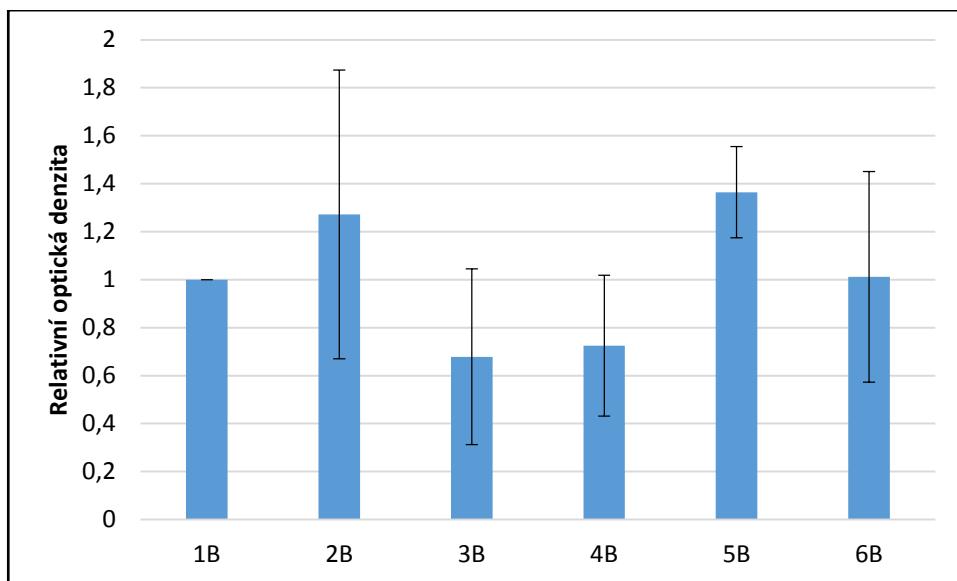


Obrázek č. 6: Membrána č. 2 s detekovaným referenčním proteinem Tubulinem a obarvená pomocí Ponceau. A – část s nanáškou vzorků ze spermií, detekovaných s referenčním proteinem Tubulinem. B – část nanášky vzorků ze semenné plazmy obarvená pomocí Ponceau, pro kvantifikaci nanášky.

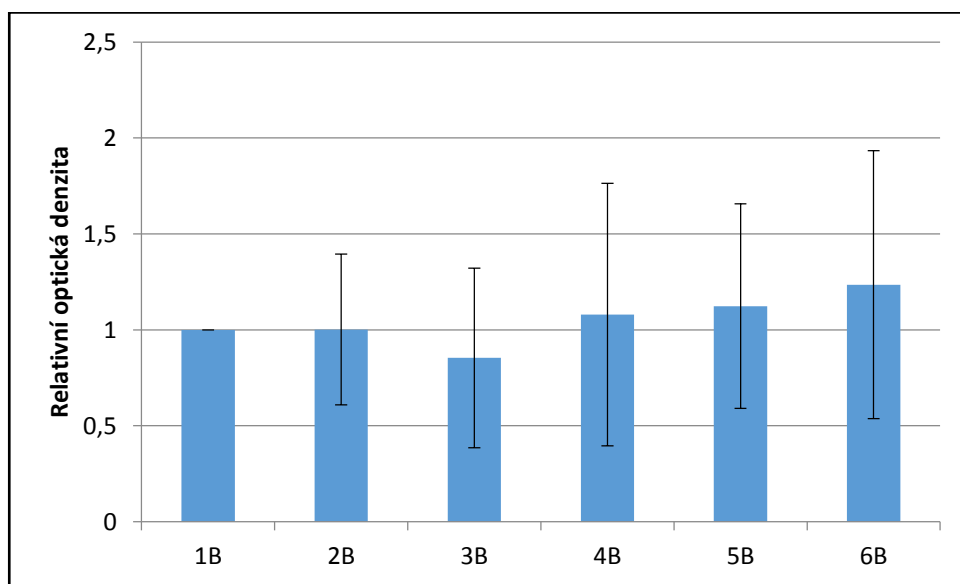
Grafy č. 6 a 7 uvádí průměrné hodnoty relativní optické denzity síly signálu protilátky proti AWN u jednotlivých vzorků. Hodnoty byly stanoveny pomocí denzitometrického měření provedeného ve 3 opakováních. Graf č. 6 zobrazuje vzorky spermií a graf č. 7 vzorky semenné plazmy. Ani v jednom případě není rozdíl mezi jednotlivými hřebci statisticky významný v množství proteinu AWN ( $p > 0,05$ ).

Hodnoty průměrné relativní optické denzity u vzorků spermií i semenné plazmy vykazují mírné rozdíly v rámci skupiny. Ovšem není zde patrný jasný trend v rámci jednotlivých skupin, u skupiny proteinů spermií ani v rámci skupiny proteinu semenné plazmy.

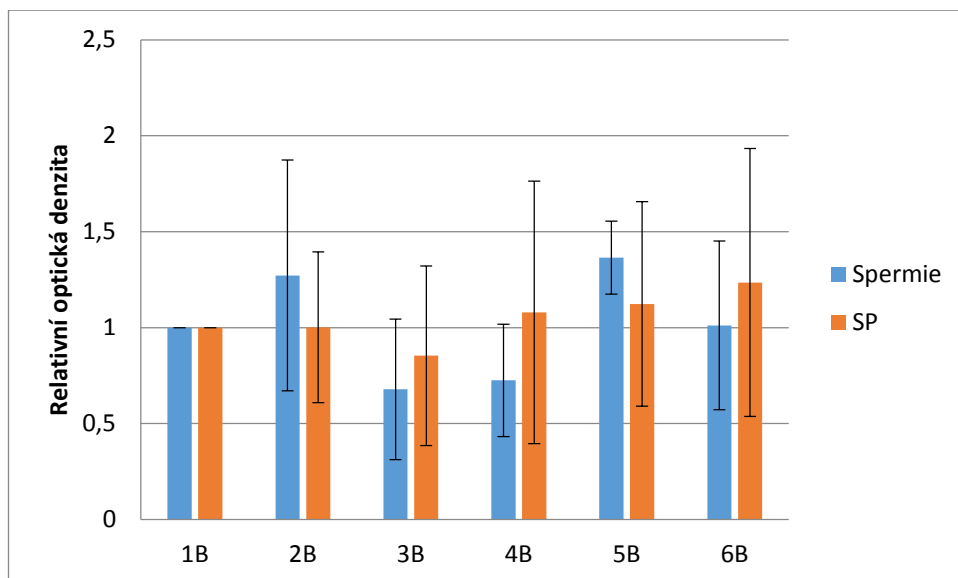
V rámci porovnání jednotlivých vzorků (graf č. 8) můžeme vidět souvislost mezi hodnotou relativní optické denzity v detekci množství AWN u proteinů pocházejících ze spermií a v části proteinů pocházejících ze semenné plazmy. U vzorků 2Ba 5B je viditelně větší množství detekovaného proteinu AWN než ve stejných vzorcích proteinů semenné plazmy. Naopak u vzorků 3B, 4B a 6B je více AWN proteinu v SP než spermiích. Vzhledem k velkému rozptylu hodnot jednotlivých měření tento rozdíl není však statisticky významný.



Graf č. 6: Průměrná relativní optická denzita síly signálu protilátky proti AWN u jednotlivých vzorků spermií skupiny B (nativní inseminační dávka). Výsledky jsou vztaheny k vzorku 1B.



Graf č. 7: Průměrná relativní optická denzita síly signálu protilátky proti AWN u jednotlivých vzorků semenné plazmy skupiny B (nativní inseminační dávka). Výsledky jsou vztaheny k vzorku 1B.



Graf č. 8: Porovnání průměrné relativní optické denzity síly signálu protilátky proti AWN u jednotlivých vzorků spermií a semenné plazmy skupiny B (nativní inseminační dávka). Výsledky jsou vztaženy k vzorku číslo 1B. Spermie = průměrná relativní optická denzita síly protilátky proti AWN u jednotlivých vzorků spermií, SP = průměrná relativní optická denzita síly signálu protilátky proti AWN u jednotlivých vzorků semenné plazmy.

## 6 Diskuze

Cílem této práce bylo pomocí specifické polyklonální protilátky proti kančímu proteinu AWN detekovat homologní hřebčí protein HSP-7 ve vzorcích hřebčího ejakulátu. Hřebčí protein HSP-7 a kančí protein AWN mají z 98 % shodnou aminokyselinovou sekvenci (Reiner et al. 1997) a HSP-7 je schopný vázat se na AWN epitopy (Calvete et al. 1994). Tato schopnost byla prací potvrzena, jelikož protein byl na hřebčích spermiiích i v semenné plazmě hřebců úspěšně značen pomocí zmíněné protilátky proti kančímu proteinu AWN.

V této práci byla detekce hřebčího proteinu AWN provedena pomocí imunofluorescenční mikroskopie a imunodetekce. Protein AWN se na hřebčích spermiiích nachází v ekvatoriálním segmentu hlavičky, na rozdíl od kančích spermiiích, kde se AWN nachází navázan na akrozomu spermie (Reiner et al. 1997). Tato skutečnost byla potvrzena na spermiiích z kryokonzervovaných inseminačních dávek i nativních vzorků pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Nebyly pozorovány spermie s navázaným proteinem AWN v jiné oblasti hlavičky či bičiku spermie. Rozdílná byla síla signálu protilátky proti proteinu AWN, která pravděpodobně vychází z množství navázaného proteinu na konkrétní spermii. Navázání proteinu na plazmatickou membránu v ekvatoriálním segmentu probíhá přes CUB doménu charakteristickou pro spermadhesiny (Töpfer-Petersen et al. 2005, Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002). Na základě výsledků této práce nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi množstvím spermiiích se silným signálem protilátky proti proteinu AWN, slabým signálem protilátky proti proteinu AWN a bez signálu protilátky proti proteinu AWN ve vzorcích kryokonzervovaných a nativních hřebčích spermiiích.

Ovšem i přes to, že nebyl potvrzen statistický rozdíl v zastoupení jednotlivých kategorií spermiiích, bylo zaznamenáno více spermiiích bez signálu protilátky proti proteinu AWN v kryokonzervovaných vzorcích. Dalo by se tedy předpokládat, že kryokonzervace může ovlivnit navazování proteinů na plazmatickou membránu spermiiích. Při mražení spermie prochází významnou změnou teplot, při které je jejich plazmatická membrána výrazně namáhána a může dojít k chladovému šoku (Drobnis et al. 1993). Důsledkem toho dochází ke změnám v lipidové dvojvrstvě, které nejsou při následném rozmražení plně navráceny do původního stavu (Holt & North 1984). Kromě teploty na plazmatickou membránu při procesu chlazení i rozmazování působí měnící se osmotický tlak a možné ledové krystalky vznikající uvnitř buňky mohou membránu nevratně poškodit (Watson 2000). Dalšími možnými důvody pro vysoké množství spermiiích bez navázaného proteinu AWN může být odstranění semenné plazmy před zmrazováním a následné naředění kryokonzervačním ředidlem. Nicméně i v rámci postupu přípravy nativních dávek je SP ihned po odběru odstraněna, rozdíl je tedy primárně v použití ředidla. V rámci ředidel může například negativně působit na spermie použité množství kryoprotektantu glycerolu. Stejně tak mohou vyvolat poškození síly působící na spermie při centrifugaci (Amann & Pickett 1987). Vzhledem k faktorům, které na spermie působí během celého procesu výroby kryokonzervované inseminační dávky, by se dalo předpokládat, že v kryokonzervovaných vzorcích bude navázáno na spermiiích méně proteinu než u nativních vzorků. Také je zde otázka zda při kryokonzervaci nedochází k poškození samotných proteinů, případně porušení vazby mezi plazmatickou membránou



spermií a CUB doménou proteinu. Pro potvrzení, či vyvrácení těchto teorií by bylo potřeba dalších testů u většího množství vzorků.

Dále byla pomocí imunofluorescenční mikroskopie hodnocena přítomnost protilátky proti proteinu AWN a zároveň značený funkční akrozom v sadě nativních vzorků spermií. U našich vzorků se vyskytovaly kategorie spermií se signálem protilátky proti proteinu AWN a zároveň s funkčním akrozomem, spermie se signálem protilátky proti proteinu AWN a bez funkčního akrozomu a dále spermie bez signálu protilátky proti proteinu AWN a bez funkčního akrozomu. Kategorie spermií bez signálu protilátky proti proteinu AWN, ale s funkčním akrozomem se v našich vzorcích nevyskytovala. Dle statistické analýzy byla prokázána korelace mezi spermii s pozitivním signálem protilátky proti AWN a signálem akrozomu a spermii s pozitivním signálem protilátky proti AWN a bez signálu akrozomu. Z čehož vyplývá, že pokud je množství jedné kategorie vysoké, druhá kategorie je úměrně tomu nižší. Množství spermií bez akrozomu v ejakulátu zásadně ovlivní jeho oplozovací schopnost (Dam et al. 2007).

K poškození, či ztrátě akrozomu může dojít již během spermatogeneze, kde vzniká z Golgiho aparátu poměrně složitým způsobem (Berruti & Palardi 2011). Je tedy možné, že dojde k chybě při jeho tvorbě (Dam et al. 2007). Spermie také mohou přijít o akrozom spontánní předčasnou akrozomální reakcí, která může být ovlivněna například nepřítomností stabilizačního proteinu (Johnson et al. 2007).

Z přítomnosti kategorie spermií se signálem protilátky proti proteinu AWN, ale zároveň bez akrozomu vyplývá, že funkční akrozom není nutný pro navázání proteinu AWN na spermie, což souvisí s jeho lokalizací v ekvatoriálním segmentu.

Předpokládaný výskyt proteinu AWN v hřebčí semenné plazmě byl v molekulové váze 14 kDa (Reiner et al. 1997). V této molekulové váze byl protein pomocí imunodetekce úspěšně detekován jak v semenné plazmě, tak v extraktech spermií, pocházejících z nativních vzorků, i vzorků, které prošly zmražením a následným rozmražením. Molekulová váha detekovaného proteinu byla ve všech opakováních stejná. Ovšem ve vzorcích semenné plazmy byly viditelná detekce proteinů v molekulové hmotnosti 50 kDa. Tato skupina by mohla představovat agregované formy proteinu AWN, případně jeho glykosylované verze. Protein AWN se v agregované formě v kančí SP vyskytuje přirozeně v 90 % (Jonáková et al. 2000). Ovšem jedná se pouze o předpoklad, pro potvrzení by bylo potřeba provést elektroforetické dělení vzorků v nativním stavu.

Pouze jedním opakováním imunodetekce byla hodnocena sada kryokonzervovaných vzorků, kvůli malému množství vzorků ovšem není možné statistické vyhodnocení. Okometricky je z výsledků patrná značná diference mezi jednotlivými silami signálů detekované protilátky proti proteinu AWN. Jelikož obecně je značná část hřebců špatně mrazitelných (20-50 %) vyskytuje se mezi hřebci výrazná individualita ve fertilizační schopnosti jejich mrazených inseminačních dávek (Loomis 2001). Proces kryokonzervace, i přes šetrnou manipulaci se spermii a precizní provedení, způsobuje nenávratné změny

plazmatické membrány. Například mění permeabilitu a lipidové prostředí membrány, ale také mění funkce navázaných proteinů (Watson 2000).

Z výsledků imunodetekce nativních vzorků byl potvrzen výskyt proteinu AWN jak na spermiích hřebců, tak v jejich semenné plazmě. Ovšem v rámci ani jedné skupiny nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi jedinci, nicméně je pro individualitu velký předpoklad. V rámci vzorků použitých v této práci je jistá individualita patrná, ovšem pro potvrzení této teorie by bylo potřeba více vzorků a opakování. Dala by se vyčíst nepatrná souvislost mezi množstvím navázaného proteinu AWN na spermiích a množstvím proteinu AWN obsaženého v semenné plazmě. Vyšší množství navázaného proteinu na hřebcích spermiích bylo spojeno s nižším množstvím proteinu detekovaného v semenné plazmě daného konkrétního jedince a naopak. Tato skutečnost může být zapříčiněna několika faktory, například schopnostmi proteinu AWN navázat se na plazmatickou membránu spermie, poruchami plazmatické membrány, nebo také celkovým množstvím proteinu AWN v ejakulátu u jednotlivých hřebců.

Množství navázaného proteinu AWN na spermiích závisí na jeho schopnosti rozpoznat vazebné místo a na stupni glykosylace (Jonáková et al. 1998). Možnosti navázání proteinu také ovlivňuje schopnost vazby na heparin, který je pro vazbu nutný (Jonáková et al. 2000). Vazebné schopnosti proteinu AWN jsou tedy částečně ovlivněny látkami, se kterými se protein setkává při a po ejakulaci. Nižší procento spermií s navázaným proteinem AWN může být tedy i z důvodu nedostatku funkčního heparinu, který je pro navázání nutný. Schopnost plazmatické membrány vázat proteiny může být ovlivněna mnoha způsoby. Pro proteiny je důležitá struktura, fluidita a modulace membrány. Fluiditu plazmatické membrány zásadně ovlivňuje množství cholesterolu v ní obsažené, ale také mohou mít vliv vnější faktory jako výkyvy teplot (Amann & Graham 2011), třepání a centrifugace, změny osmotického tlaku a další procesy v průběhu manipulace (Watson 2000).

V žádném z námi hodnocených vzorků hřebčích spermií nebylo množství navázaného proteinu AWN nulové. Dle Ekhlasi-Hundrieser et al. (2002) je pravděpodobné, že je nutné určité množství navázaného tohoto proteinu pro primární vazbu spermií na oocyt. Stejně tak může být protein AWN na spermiích receptorem pro *zona pellucida* (Caballero et al. 2008). Dalo by se tedy vyvozovat, že protein AWN se také u hřebců účastní primární vazby. U kanců je protein AWN zapojen také do kapacity spermií a do procesu fertilizace u prasat (Jonáková et al. 2000). Ovšem odlišná lokalizace proteinu AWN u hřebčích spermií v ekvatoriálním segmentu může napovídat o jeho zcela jiné funkci, a to během vazby a fúze s oolemou oocyту (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002).

Jak již bylo zmíněno, byla v této práci zaznamenána jistá souvislost mezi množstvím navázaného proteinu AWN na spermiích a jeho množstvím v semenné plazmě. Což by mohlo mimo vazebné schopnosti proteinu AWN či plazmatické membrány ovlivnit i místo kontaktu a navázání proteinu na spermie. V naší práci bylo využito hřebčího ejakulátu, od kterého byla ihned po odběru odstraněna semenná plazma. Ovšem při *in vivo* oplození semenná plazma zůstává se spermiemi, tím pádem by množství navázaného proteinu mohlo být odlišné při *in vivo* a *in vitro* podmínkách. Podle Töpfer-Petersen et al. (2005) je malá část proteinu na

spermiích navázána již ve fázi spermatogonií, ale větší část proteinu se na spermie naváže až během ejakulace při kontaktu se semennou plazmou. Ovšem dle Reiner et al. (1997) je protein AWN na testikulárních spermiích detekován v oblasti akrozomu a dalším postupem reprodukčním traktem se přesouvá do oblasti ekvatoriálního segmentu, kde se nachází již na epididymálních spermiích. Je otázkou, zda by se množství navázaného proteinu, či jeho lokalizace měnily při vyšší frekvenci odběrů hřebce, případně jak dlouho se ještě protein navazuje a reaguje se spermiemi v samičím reprodukčním traktu při *in vivo* oplození.

## 7 Závěr

Cílem této práce byla detekce spermadhesinu AWN v ejakulátu hřebců, pomocí polyklonální protilátky proti kančímu AWN. Detekce námi zvolenou protilátkou byla úspěšná, námi navržená hypotéza byla tak potvrzena a závěry práce jsou následující:

- Protein AWN se na hřebčích spermiích vyskytuje v ekvatoriálním segmentu hlavičky.
- Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v množství navázaného proteinu mezi kryokonzerovanými a nativními vzorky hřebčích spermií.
- Byla odhalena korelační závislost mezi procentuálním zastoupením spermií s navázaným proteinem AWN a zároveň funkčním akrozomem a procentem spermií s navázaným proteinem AWN bez funkčního akrozomu.
- Navázání proteinu AWN na hřebčích spermiích nebylo ovlivněno přítomností, resp. nepřítomností akrozomu.
- Protein AWN má u hřebců molekulovou váhu 14 kDa.
- Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v množství proteinu AWN v extraktech spermií v rámci jednotlivých hřebců.
- Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v množství proteinu AWN v semenné plazmě jednotlivých hřebců.
- U konkrétních vzorků jednotlivých hřebců byl patrný vztah mezi množstvím navázaného proteinu AWN na spermiích a množstvím volného proteinu AWN v semenné plazmě.

## 8 Literatura

- Akçay E, Reilas T, Andersson M, Katila T. 2006. Effect of seminal plasma fractions on stallion sperm survival after cooled storage. *Journal of Veterinary Medicine Series a-Physiology Pathology Clinical Medicine* 53:481-485.
- Amann, R. P. 2011. Physiology and Endocrinology. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). *Equine Reproduction*. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 881 – 908. ISBN: 9780813819716.
- Amann, R. P., Graham, J. K. 2011. Spermatozoal Function. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. (eds.). *Equine Reproduction*. 2nd ed. Wiley – Blackwell. USA. 1053-1084. ISBN: 9780813819716.
- Amann, R. P., & Pickett, B. W. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of equine veterinary science*, 7(3): 145-173.
- Austin C, Bishop M. 1958. Some features of the acrosome and perforatorium in mammalian spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences* 149:234-240.
- Brandon, C. I., Heusner, G. L., Caudle, A. B., & Fayrer-Hosken, R. A. 1999. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology*, 52(5):863-873.
- Baronos, S. 1971. Seminal carbohydrate in boar and stallion. *Reproduction*, 24(2):303-305.
- Berruti, G., & Paiardi, C. 2011. Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis*, 1(2): 95-98.
- Brito, L. F. 2007. Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6(4):249-264.
- Caballero, I., Vázquez, J. M., Rodríguez-Martínez, H., Gil, M. A., Calvete, J. J., Sanz, L., ... & Martínez, E. A. 2005. Influence of seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin on pig gamete interaction. *Zygote*, 13(1): 11.
- Caballero, I., Vazquez, J. M., Garcia, E. M., Parrilla, I., Roca, J., Calvete, J. J., ... & Martinez, E. A. 2008. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology*, 70(8):1352-1355.

- Calvete, J. J., Nessau, S., Mann, K., Sanz, L., Sieme, H., Klug, E., & Töpfer-Petersen, E. 1994. Isolation and Biochemical characterization of stallion seminal-plasma proteins. *Reproduction in Domestic Animals*, 29(5):411-426.
- Calvete, J. J., Mann, K., Schäfer, W., Sanz, L., Reinert, M., Nessau, S., ... & Töpfer-Petersen, E. 1995a. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin-and gelatin-binding capabilities. *Biochemical Journal*, 310(2):615-622.
- Calvete, J. J., Reinert, M., Sanz, L., & Töpfer-Petersen, E. 1995b. Effect of glycosylation on the heparin-binding capability of boar and stallion seminal plasma proteins. *Journal of Chromatography A*, 711(1):167-173.
- Calvete, J. J., Mann, K., Schäfer, W., Raida, M., Sanz, L., & Töpfer-Petersen, E. 1995c. Boar spermadhesin PSP-II: location of posttranslational modifications, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. *FEBS letters*, 365(2-3): 179-182.
- Calvete, J. J., Dostálová, Z., Sanz, L., Adermann, K., Thole, H. H., & Töpfer-Petersen, E. 1996. Mapping the heparin-binding domain of boar spermadhesins. *FEBS letters*, 379(3):207-211.
- Calvete, J. J., Campanero-Rhodes, M. A., Raida, M., & Sanz, L. 1999. Characterisation of the conformational and quaternary structure-dependent heparin-binding region of bovine seminal plasma protein PDC-109. *FEBS letters*, 444(2-3):260-264.
- Cuasnicú, P. S., Ellerman, D. A., Cohen, D. J., Busso, D., Morgenfeld, M. M., & Da Ros, V. G. 2001. Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. *Archives of medical research*, 32(6):614-618.
- Dam, A. H. D. M., Feenstra, I., Westphal, J. R., Ramos, L., Van Golde, R. J. T., & Kremer, J. A. M. 2007. Globozoospermia revisited. *Human reproduction update*, 13(1): 63-75.
- Dostálová, Z., Calvete, J. J., & Töpfer-Petersen, E. 1995. Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 376(4): 237-242.
- Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchoroguy, T. J., Overstreet, J. W., & Crowe, J. H. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*, 265(4): 432-437.

- Druart, X., Rickard, J. P., Mactier, S., Kohnke, P. L., Kershaw-Young, C. M., Bathgate, R., ... & De Graaf, S. P. 2013. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *Journal of proteomics*, 91:13-22.
- Ekhlesi-Hundrieser, M., Sinowatz, F., De Wilke, I. G., Waberski, D., & Töpfer-Petersen, E. 2002. Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. *Molecular reproduction and development*, 61(1):32-41.
- Ekhlesi-Hundrieser, M., Schäfer, B., Kirchhoff, C., Hess, O., Bellair, S., Müller, P., & Töpfer-Petersen, E. 2005a. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 70(1):45-57.
- Ekhlesi-Hundrieser, M., Gohr, K., Wagner, A., Tsoleva, M., Petrunkina, A., & Töpfer-Petersen, E. 2005b. Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig. *Biology of Reproduction*, 73(3):536-545.
- Euler Von, U. S. 1983. History and development of prostaglandins. *General Pharmacology: The Vascular System*, 14(1):3-6.
- Harshan, H. M., Singh, L. P., Arangasamy, A., Ansari, M. R., & Kumar, S. 2006. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Animal reproduction science*, 93(1-2):124-133.
- Holt, W. V., & North, R. D. 1984. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: Freeze-fracture study. *Journal of Experimental Zoology*, 230(3): 473-483.
- Jansen, S., Ekhlesi-Hundrieser, M., & Töpfer-Petersen, E. 2001. Sperm adhesion molecules: structure and function. *Cells Tissues Organs*, 168(1-2): 82-92.
- Johnson, P. M., Clift, L. E., Andriikova, P., Jursova, M., Flanagan, B. F., Cummerson, J. A., ... & Dvorakova-Hortova, K. 2007. Rapid sperm acrosome reaction in the absence of acrosomal CD46 expression in promiscuous field mice (*Apodemus*). *Reproduction*, 134(6): 739-747.
- Jonáková, V., Kraus, M., Veselský, L., Čechová, D., Bezouška, K., & Ticha, M. 1998. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *Reproduction*, 114(1):25-34.

- Jonáková, V., Maňásková, P., Kraus, M., Liberda, J., & Tichá, M. 2000. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 56(S2):275-277.
- Kareskoski, M., Katila, T. 2008. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Animal reproduction science*, 107(3-4):249-256.
- Kareskoski A.M., Reilas T, Sankari S, Andersson M, Katila T. 2005. Composition of fractionated stallion ejaculates. *Animal Reproduction Science* 89:228-230.
- Katila T, Kareskoski M. 2006. Components of stallion seminal plasma and their influence on spermatozoa. *Pferdeheilkunde* 22:193.
- Kumar, V., Hassan, M. I., Kashav, T., Singh, T. P., & Yadav, S. 2008. Heparin-binding proteins of human seminal plasma: purification and characterization. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 75(12):1767-1774.
- Kumar, C. S., & Swamy, M. J. 2016. HSP-1/2, a major horse seminal plasma protein, acts as a chaperone against oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 473(4):1058-1063.
- Kwenang, A., Kroos, M. J., Koster, J. F., & Van Eijk, H. G. 1987. Iron, ferritin and copper in seminal plasma. *Human Reproduction*, 2(5):387-388.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-685.
- Leshin, L. S., Raj, S. M. P., Smith, C. K., Kwok, S. C. M., Kraeling, R. R., & Li, W. I. 1998. Immunostimulatory effects of pig seminal proteins on pig lymphocytes. *Reproduction*, 114(1): 77-84.
- Loomis, P. R. 2001. The equine frozen semen industry. *Animal reproduction science*, 68(3-4): 191-200.
- Loomis, P.R. 2016. Collecting a fractionated stallion ejaculate. *Select breeders service*. Available from <http://info.selectbreeders.com/blog/collecting-a-fractionated-stallion-ejaculate> (accessed January 2021).



- Maňásková, P., Liberda, J., Tichá, M., & Jonáková, V. 2002. Isolation of non-heparin-binding and heparin-binding proteins of boar prostate. *Journal of Chromatography B*, 770(1-2):137-143.
- Maňásková, P., Balínová, P., Kraus, M., Tichá, M., & Jonáková, V. 2003. Mutual interactions of boar seminal plasma proteins studied by immunological and chromatographic methods. *American Journal of Reproductive Immunology*, 50(5):399-410.
- Maxwell, W. M. C., De Graaf, S. P., Ghaoui, R. E. H., & Evans, G. 2007. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 64:13.
- Morel, M.C.G.D. 2008. *Equine reproductive physiology, breeding and stud management*. CAB International. Cambridge. 378 p. ISBN: 978-1-84593-450-7.
- McDonnell, S. M. 1992. Ejaculation: physiology and dysfunction. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 8(1):57-70.
- Oliveira, S. N., Andrade Jr, L. R., Silva, L. F., Araujo, E. A., Rayashi, R. M., Segabinazzi, L. G., ... & Papa, F. O. 2020. Fractionated semen collection as a tool to rescue fertility in stallions with seminal vesiculitis. *Theriogenology*, 157:110-120.
- Reece, W. O. 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat-2., rozšířené vydání*. Grada Publishing as. 480 p. ISBN: 978-80-247-3282-4.
- Gadella, B. M., Rathi, R., Brouwers, J. F. H. M., Stout, T. A. E., & Colenbrander, B. 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*, 68(3-4):249-265.
- Parks, J. E., & Lynch, D. V. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29(2):255-266.
- Patel, M. K., Cheema, R. S., Bansal, A. K., & Gandotra, V. K. 2016. A 31-kDa seminal plasma heparin-binding protein reduces cold shock stress during cryopreservation of cross-bred cattle bull semen. *Theriogenology*, 86(6):1599-1606.
- Pesch, S., Bergmann, M., & Bostedt, H. 2006. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology*, 66(2):307-313.

- Reinert, M., Calvete, J. J., Sanz, L., & Topfer-Petersen, E. 1997. Immunohistochemical localization in the stallion genital tract, and topography on spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spermadhesin protein family. *Andrologia*, 29(4):179-186.
- Rodríguez-Martínez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L., & Calvete, J. J. 2011. Seminal plasma proteins: what role do they play?. *American journal of reproductive immunology*, 66:11-22.
- Sabeur, K., & Ball, B. A. 2007. Characterization of galactose-binding proteins in equine testis and spermatozoa. *Animal reproduction science*, 101(1-2):74-84.
- Varela, P. F., Romero, A., Sanz, L., Romão, M. J., Töpfer-Petersen, E., & Calvete, J. J. 1997. The 2.4 Å resolution crystal structure of boar seminal plasma PSP-I/PSP-II: a zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. *Journal of molecular biology*, 274(4): 635-649.
- Varner, D. D., & Johnson, L. 2007. From a sperm's eye view-revisiting our perception of this intriguing cell. *AAEP* 53:104-177.
- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60: 481-492.
- Weber, J. A., & Woods, G. L. 1993. Ultrasonographic measurement of stallion accessory sex glands and excurrent ducts during seminal emission and ejaculation. *Biology of reproduction*, 49(2):267-273.
- Tang X, Lalli M, Clermont Y. 1982. A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *American Journal of Anatomy* 163:283-294.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Animal Reproduction Science* 89:159-170.