

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Ovlivnění mrazitelnosti ejakulátu hřebců s využitím  
přídatku semenné plazmy a jejích proteinů**

doktorská disertační práce

Autor práce: Ing. Filipa Bubeníčková

Školitel: doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Postlerová Pavla, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou disertační práci „Ovlivnění mrazitelnosti ejakulátu hřebců s využitím přídatku semenné plazmy a jejích proteinů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího 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 disertační práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D., která převzala pozici vedoucí mé práce a umožnila tak její řádné dokončení a také doc. MVDr. Radkovi Rajmonovi, Ph.D. za přátelské vedení v počátcích mého doktorského studia. Největší poděkování patří doc. Ing. Jířímu Šichtařovi, Ph.D. a RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za jejich čas, vstřícný přístup, rady a připomínky, které mi během celého studia poskytovali. Dále děkuji Ing. Ondrovi Šimoníkovi, Ph.D. za významnou pomoc při přípravě manuskriptů. Ráda bych také poděkovala členům Katedry veterinárních disciplín, se kterými jsem měla tu čest spolupracovat a také nadaci “Nadání Josefa, Marie a Zdeňky Hlávkových” za poskytnutí nadačního příspěvku, který mi umožnil zúčastnit se mezinárodní konference The European Society for Domestic Animals, Córdoba, Španělsko, 2018. V neposlední řadě poděkování patří mým blízkým za podporu během celého studia.

# Ovlivnění mrazitelnosti ejakulátu hřebců s využitím přídavku semenné plazmy a jejích proteinů

## Abstrakt

Inseminace mraženou inseminační dávkou patří k nejpoužívanějším metodám asistované reprodukce koní. Kryokonzervace u hřebců a kvalita rozmrazené inseminační dávky je stále problematická. Neexistuje selekce samců na kvalitu ejakulátu a mezi jednotlivými hřebci se vyskytuje značná variabilita v tom, jakou si jejich semeno udržuje fertilizační schopnost po zmrazení a rozmrazení. Ejakulát navíc není homogenní směsí spermií a skládá se z různých subpopulací, jejichž poměr a typ není konzistentní. Znalost typu a složení jednotlivých subpopulací spermií v ejakulátu je možným nástrojem, který pomůže predikovat fertilizační potenciál i mrazitelnost konkrétního samce. Tím pádem znalosti o heterogenitě ejakulátu mohou napomáhat k výběru vhodných metod asistované reprodukce a následně vést k vyšší oplozovací schopnosti a mít tak vliv na ekonomickou složku chovu koní.

Při standardní výrobě mražených inseminačních dávek je semenná plazma (SP) odstraněna a nahrazena ředidlem, čímž dochází k výraznému snížení obsahu proteinů SP. Semenná plazma, jako přirozené prostředí pro spermie, obsahuje řadu složek důležitých pro dozrávání spermií a úspěšné oplození oocyty. Proteiny SP fungují jako regulátoři v mnoha fázích zrání spermií a následné fertilizace, díky schopnosti vázat různé ligandy. Mimo jiné jsou proteiny SP zapojeny do přestavby povrchu spermií, ke kterému dochází během transportu spermií skrze samčí i samičí pohlavní trakt a dále přispívají k počátečním a zásadním krokům oplození, např. vytvoření rezervoáru spermií v oviduktu, modulaci kapacitace, akrozomální reakce a interakce gamet. Vliv SP a různých proteinových frakcí SP na mrazitelnost spermií byl pozorován u býků a kanců a zdá se, že semenná plazma obsahuje proteiny jak s negativním, tak i pozitivním vlivem na spermie. Separace a identifikace proteinů SP s ochrannými vlastnostmi může vést k zefektivnění procesu kryokonzervace úpravou složení ředidel, čímž se mnohem lépe zachová fertilizační potenciál kryokonzervovaných spermií hřebců. Podle dostupných zdrojů je hypotézou, že SP od dobře mrazitelných hřebců zlepšuje funkční parametry kryokonzervovaných spermií hřebců, kteří jsou klasifikováni jako špatně mrazitelní.

Pomocí klastrové analýzy hodnot kinematických parametrů rozmrazených spermií byly prokázány významné rozdíly mezi rozložením subpopulací spermií mezi dobře a špatně mrazitelnými hřebci. Experimentálně byl potvrzen pozitivní vliv přídavku SP na některé kinematické parametry spermií špatně mrazitelných hřebců a také na distribuci spermií

do subpopulací. Aby se eliminovala variabilita ve složení SP a její možné negativní vlivy, bylo dalším krokem přidání specifických proteinových frakcí SP ke spermii hřebců před zmrazením. Byl prokázán na koncentraci závislý vliv proteinových frakcí na hřebčí spermie po rozmrazení a to především na kinematické parametry spermii, na rozložení subpopulací a dále také na stav akrozomu.

Bylo by užitečné stanovit úrovně vybraných složek SP jako součást šlechtitelské zkoušky hřebců s jinak nevysvětlitelnou neplodností nebo subfertilitou. SP ovlivňuje životnost spermii a zvláště u hřebců produkujících sperma s omezenou tolerancí ke skladování, lze zlepšit kvalitu spermatu modifikací postupů jejich zpracování. V současné době se zdá, že dostupné znalosti o účincích obsahu SP na spermie při konzervaci a na plodnost jsou nejednotné a někdy i konfliktní. To lze považovat za silnou motivaci k dalšímu výzkumu v této oblasti.

**Klíčová slova: hřebec, kryokonzervace, mrazitelnost, subpopulace, semenná plazma, proteiny semenné plazmy**

# **Effect of the addition of seminal plasma and its proteins on stallion ejaculate freezability**

## **Abstract**

Artificial insemination with frozen dose is one of the most widely used methods of assisted reproduction in horses. Achieving successful cryopreservation of spermatozoa is still a challenge as there are considerable differences between sperm freezability due to stallions individuality. In addition, ejaculate is not a homogeneous mixture of sperm and consists of different subpopulations whose ratio and type are not consistent. Knowledge of the type and composition of individual sperm subpopulations in ejaculate is a possible tool that will help predict the fertilization potential and freezability of a particular male. Thus, knowledge of the heterogeneity of ejaculate can help to select appropriate methods of assisted reproduction and subsequently lead to higher fertilization ability and thus have an impact on the economics of horse breeding.

In standard frozen insemination dose production, seminal plasma (SP) is removed and replaced with extender, which results in a significant reduction in SP protein content. Seminal plasma is a natural environment for spermatozoa and contains a number of components important for normal fertilization. SP proteins act as regulators in many phases of sperm maturation and subsequent fertilization, due to the ability to bind different ligands. Among other things, they are involved in sperm surface remodeling that occurs during sperm transport through the male and female reproductive tracts. During the sperm maturation process, the spermatozoa acquire the ability to fertilize the oocyte. SP proteins contribute to the initial and fundamental steps of fertilization, such as the formation of a sperm reservoir in the oviduct, modulation of capacitation, acrosomal reaction, and gametes interaction.

The effect of SP and various protein fractions of SP on sperm freezability was observed in bulls and boars, and the seminal plasma appears to contain components with negative and also positive effect. Separation and identification of SP proteins with protective properties can lead to more effective cryopreservation by adjusting the diluent composition, thus maintaining the fertilization potential of cryopreserved stallion sperm. One hypothesis, according to the available information, is that SP from good-freezing stallions improves the parameters of cryopreserved sperm from stallions that are poor-freezers.

Using cluster analysis of the values of the kinematic parameters of frozen-thawed stallion sperm were demonstrated significant differences in the distribution of sperm subpopulations between good and poor freezers. The positive effect of SP addition on some motility parameters of poorly freezing stallions and also on the distribution of sperm into subpopulations was

experimentally confirmed. The next step was to add specific SP protein fractions to stallion sperm before freezing to eliminate SP composition variability and its possible negative effects. The concentration-dependent effect of protein fractions on stallion sperm after thawing was demonstrated, especially on the kinematic parameters of sperm, on the distribution of subpopulations and also on the acrosomal integrity.

It would be useful to determine the levels of selected components of SP as part of a breeding test for stallions with otherwise unexplained infertility or subfertility. SP affects sperm viability, and especially in stallions producing sperm with limited storage tolerance, sperm quality can be improved by modifying existing protocols for sperm cryopreservation. At present, the available knowledge on the effects of SP content on sperm and fertility appears to be inconsistent and sometimes conflicting. This can be considered as a strong motivation for further research in this area.

**Keywords: stallion, cryopreservation, freezability, subpopulation, seminal plasma, seminal plasma proteins**

# Obsah

<b>1 Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2 Kryokonzervace a výroba mražené inseminační dávky</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Hodnocení po rozmrazení</b>	<b>5</b>
2.3.1 Motilita	6
2.3.1.1 CASA - computer asisted sperm analyzis	6
2.3.1.2 Subpopulace	7
<b>2.3 Vliv mražení a ředidel s kryoprotektanty na spermie</b>	<b>9</b>
<b>2.4 Vliv semenné plazmy na spermie během kryokonzervace</b>	<b>10</b>
<b>3 Semenná plazma</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Minerální látky SP</b>	<b>11</b>
3.1.1 Ionty sodíku, draslíku a chloridy	11
3.1.2 Ionty vápníku, hořčíku a fosfát	12
3.1.3 Ionty zinku, mědi a železa	12
<b>3.2 Sacharidy a lipidy SP</b>	<b>13</b>
<b>3.3 Bílkoviny v SP</b>	<b>13</b>
3.3.1 Enzymy SP	13
<b>4 Hlavní proteiny SP</b>	<b>14</b>
<b>4.1 Fn-2 proteiny</b>	<b>15</b>
<b>4.2 CRISP proteiny</b>	<b>16</b>
<b>4.3 Spermadhesiny</b>	<b>16</b>
<b>4.4 Funkce a vazebná aktivita proteinů SP</b>	<b>17</b>
4.4.1 Sacharidové interakce proteinů SP	18
4.4.2 Interakce proteinů SP s fosfolipidy	18
4.4.3 Interakce proteinů SP se zinkem	19
<b>4.5 Proteiny SP různých druhů savců</b>	<b>19</b>
4.5.1 Proteiny kančí SP	20
4.5.2 Proteiny SP býků	21
<b>4.6 Proteiny SP hřebců</b>	<b>22</b>
4.6.1 Homologie proteinů SP hřebců s jinými druhy	23
<b>4.7 Role SP a jejich proteinů při kryokonzervaci</b>	<b>24</b>
4.7.1 Využití celé semenné plazmy	25
4.7.2 Použití proteinových frakcí a proteinů SP	26
<b>5 Cíle a hypotézy</b>	<b>28</b>
<b>6 Materiál a metody</b>	<b>29</b>
6.1 Experiment I	29



6.2 Experiment II	31
6.3 Experiment III	33
<b>7 Výsledky a diskuze</b>	<b>36</b>
7.1 Výsledky experiment I	36
7.2 Diskuze experiment I	42
7.3 Výsledky experiment II	45
7.4 Diskuze experiment II	50
7.5 Výsledky experiment III	53
7.6 Diskuze experiment III	65
<b>8 Závěry</b>	<b>72</b>
<b>9 Literatura</b>	<b>75</b>

# 1 Úvod

Inseminace mraženou inseminační dávkou patří k nejpoužívanějším metodám asistované reprodukce koní. I přesto, že se neustále vylepšují techniky kryokonzervace hřebčího ejakulátu, se vyskytují výrazné rozdíly v úspěšnosti použití této metody. Základem úspěchu je správná příprava inseminační dávky z kvalitního ejakulátu. Existuje velké množství hřebců, jejichž ejakulát nelze uspokojivě mrazit. Hlavním problémem je variabilita mezi jednotlivými hřebci. Hřebce vzhledem k jejich mrazitelnosti můžeme dělit na dobře a špatně mrazitelné. Tito hřebci se liší v kvalitě a senzitivitě spermií, navíc ejakulát není homogenní směsí spermií a skládá se z různých typů subpopulací. Predikovat fertilizační potenciál i mrazitelnost konkrétního samce by mohla pomoci znalost typu a složení jednotlivých subpopulací spermií v ejakulátu, což může vést k zefektivnění metod asistované reprodukce a ovlivnit tak ekonomickou složku chovu koní. Zatím ale není jasné, jakými typy a poměry subpopulací se od sebe odlišují hřebci charakterizovaní jako dobře a jako špatně mrazitelní.

Velkým tématem je možná úprava existujících protokolů na přípravu kryokonzervovaných inseminačních dávek, aby byla zlepšena kvalita a mrazitelnost hřebčího spermatu. Například krokem centrifugace ejakulátu je výrazně snížen obsah semenné plazmy a jejích komponent. Semenná plazma (SP) je přirozeným prostředím pro spermie a obsahuje řadu složek důležitých pro normální oplození. Polypeptidy a proteiny fungují jako regulátoři v mnoha fázích tohoto procesu díky schopnosti vázat různé ligandy. Proteiny SP jsou sekreční proteiny pocházející převážně z nadvarlat a přídatných pohlavních žláz. Jsou mimo jiné zapojeny do přestavby povrchu spermií, ke kterému dochází během transportu spermií skrze samčí i samičí pohlavní trakt. Během procesu dozrávání spermií, získají spermie schopnost oplození oocyt. Ukázalo se, že proteiny SP přispívají k počátečním a zásadním krokům oplození, např. vytvoření rezervoáru spermií v oviduktu, modulaci kapacitace, akrozomální reakce a interakce gamet. Hlavní proteiny SP hřebců jsou rozděleny do tří rodin proteinů. Proteiny s fibronektinovou doménou (Fn-2) jsou charakterizovány dvěma nebo čtyřmi tandemově uspořádanými moduly Fn-2 a podílejí se na modulaci kapacitace spermií. V samčím pohlavním traktu se vyskytuje několik sekrečních proteinů bohatých na cystein (CRISP), které jsou zapojeny do různých funkcí souvisejících s fúzí spermie a oocytu. Třetí rodinou proteinů jsou spermadhesiny, které mají schopnost vazby na sacharidy a *zona pellucida*, což naznačuje, že hrají úlohu při rozpoznávání gamet, tvorbě rezervoáru spermií a slouží jako dekapacitační faktory.

Obsah některých proteinů SP je v korelaci s ukazateli oplozovací schopnosti spermií. Měření obsahu některých proteinů SP může být použito pro stanovení vhodnosti semene ke konzervaci. Pro dosažení uspokojivé kvality spermií po kryokonzervaci je možné upravit stávající protokoly na přípravu mražené inseminační dávky, kdy je obsah proteinů SP výrazně snížen odstředěním SP před ředěním ejakulátu a samotnou kryokonzervací.

## 2 Kryokonzervace a výroba mražené inseminační dávky

Kryokonzervace semene je velmi důležitá pro chovatele i vědce, jelikož umožňuje dlouhodobé uchovávání spermií od vynikajících hřebců a také rozeslání inseminačních dávek (ID) po celém světě (Morel 2003; Brinsko et al. 2011). Metodologické kroky při konzervaci semene mohou narušit stabilitu a funkce spermií, především ovlivňují plazmatickou membránu, což může vyústit v omezené oplozovací schopnosti spermií (Maxwell & Johnson 1999). Proto jsou jednotlivé kroky kryokonzervace zásadní pro přípravu kvalitní ID. Problémem u hřebců je vysoce nejednotná kvalita ejakulátu, protože ne od každého lze semeno uspokojivě mrazit. Hřebci vykazují vysoký stupeň individuality, odhaduje se, že přibližně 20 % hřebců produkuje sperma, které se mrazí dobře, 60 % spermatu se mrazí přijatelně a 20 % špatně (Sieme 2011a).

K dispozici je mnoho protokolů pro úspěšnou kryokonzervaci hřebčího spermatu lišící se mezi jednotlivými laboratořemi, mimo jiné v počtu specifických komponent přidávaných během procesu. Základní kroky společné pro většinu technik kryokonzervace jsou: odběr ejakulátu a jeho zhodnocení, naředění spermatu vhodným ředidlem, odstranění většiny semenné plazmy centrifugací, resuspenzace spermií v ředidle s kryoprotektantem, balení ředěného semene do pejet, zmrazení v parách tekutého dusíku a skladování v tekutém dusíku při teplotě  $-196^{\circ}\text{C}$  (Loomis & Graham 2008).

**Odběr ejakulátu** probíhá v reprodukčních centrech od hřebců, kteří prošli výběrem a vyhovují předepsaným zdravotním podmínkám. Odběr se provádí do různých typů umělých vagín (Brinsko et al. 2011). Odběr může být frakcionovaný do zkráceného, tzv. otevřeného typu umělé pochvy, který je také nejčastějším způsobem, případně odběr celého ejakulátu do uzavřeného systému se zabudovaným sběračem. Při použití umělé pochvy se nechá hřelec skákat na fantom nebo na klidnou klisnu (Pycock 1997). Frakcionovaný odběr zvyšuje koncentraci spermií a také snižuje podíl semenné plazmy v ejakulátu. Přímo při odběru, nebo okamžitě po něm by mělo být sperma přefiltrováno pro odstranění gelu a cizích nečistot. Následně se stanoví a zaznamená objem, barva a koncentrace spermií. Pro zachování maximální životnosti spermií musí být sperma během několika minut po odběru naředěno vhodným ředidlem (1:1 až 1:2). Po naředění se mikroskopicky stanovuje motilita a procento pohyblivých spermií (Brinsko et al. 2011).

K **předředění spermatu** předehřátým ředidlem by mělo dojít v ideálním případě během 2-5 minut po odběru (Brinsko et al. 2011). První ředění je prováděno například základním ředidlem s odtučněným sušeným mlékem a glukózou (Kenney) nebo chemicky definovaným médiem, jako je INRA 96 (IMV, Francie). Sperma se obvykle zředí v minimálním poměru 1:1

nebo na předem stanovenou konečnou koncentraci 50 až 100 milionů spermií v 1 ml (Loomis & Graham 2008).

Hřebčí sperma má v porovnání s býčím relativně nízkou koncentraci spermií. Z tohoto důvodu je nezbytné spermie před finálním ředěním **koncentrovat**, aby bylo možné adekvátní naředění, balení do nízkoobjemových pejet a poskytnutí dostatečného objemu pro inseminaci. Nejběžnější metodou koncentrace spermií je centrifugace. Koncentrovaná suspenze spermií se po odstranění semenné plazmy ředí na požadovanou konečnou koncentraci (Graham 1996; Loomis 2001; Loomis & Graham 2008). K mražení je nejčastěji používána obdoba ředidel pro chlazené sperma s přidáním kryoprotektantu, např. glycerolu (Morel 2003).

**Ředidla** pro mražení ID musí obsahovat energetické a proteinové zdroje pro metabolismus spermií, lipoproteiny (např. mléko, vaječný žloutek nebo jejich kombinaci) stabilizující membránu při změnách teploty, antibiotika k inhibici růstu a množení bakterií, pufrы k vyvážení pH a osmotického tlaku, elektrolyty, antioxidanty a kryoprotektanty (Barbas & Mascarenhas 2009; Brinsko et al. 2011; Sieme 2011b). Cukry jako glukóza, sacharóza, manóza, laktóza, přítomné samostatně nebo v kombinaci dodávají spermiím energii, působí jako kryoprotektivní činitele neprostupující membránou spermie a jsou hlavní rozpuštěnou látkou poskytující osmotickou rovnováhu roztoku. Lipidy a lipoproteiny především z vaječného žloutku se těsně spojují s povrchem plazmatické membrány a mohou podpořit ochranu spermií při mražení a rozmrazování. Různé kryoprotektanty (glycerol, methylformamid, dimethylformamid nebo dimethylsulfoxid (DMSO), ethylenglykol a propylenglykol) mohou být použity jednotlivě, nebo v kombinaci (Loomis & Graham 2008; Brinsko et al. 2011).

Důležitým krokem výroby mražené inseminační dávky je i volba obalu. Nejvyužívanějším **obalem**, díky snadné identifikaci a skladování, jsou dnes polypropylenové nebo polyvinylchloridové trubičky - pejety (Amann & Pickett 1987). V koňské reprodukci se používají 0,5 ml, výjimečně 0,25 ml pejety, jejichž poměr mezi povrchem a objemem umožňuje rovnoměrné chlazení, zmrazení a rozmrazení (Love et al. 1989; Sieme 2011a). K plnění pejet se používají automatizovaná nebo poloautomatizovaná plnicí zařízení využívající k jejich naplnění podtlak a zároveň je i automaticky utěsňují. Každá dávka musí být jasně označena: jméno a identifikační číslo hřebce, jméno nebo registrační číslo reprodukčního centra a datum odběru (Brinsko et al. 2011; Sieme 2011a).

**K mražení ID** se používají páry kapalného dusíku v aktivně nebo pasivně kontrolovaném mrazícím přístroji. Balené sperma je horizontálně umístěno do dusíkatých par ve stanovené výšce (1-4 cm) nad hladinou kapalného dusíku (Loomis & Squires 2005; Brinsko et al. 2011). Jestliže proces mražení spermie nepoškodí, následným skladováním v kapalném dusíku není

ovlivněna jejich integrita, jelikož metabolická aktivita při této teplotě je zanedbatelná. Buňky jsou při teplotě  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  ve stavu anabiózy s maximálním omezením všech životních funkcí. Pejety jsou ponořeny do kapalného dusíku ve speciálních tancích. 0,5 ml pejety se umísťují do plastových goblet, které jsou zavěšeny na jednotlivých závěsech (Brinsko et al. 2011).

## 2.1 Hodnocení po rozmrazení

Inseminační dávky se po vyjmutí z kapalného dusíku rozmrazují většinou ve vodní lázni při teplotě  $37\text{-}39\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Graham 2011). Teplota i délka rozmrazování je obecně dána objemem použitého obalu a dávky. 0,5 ml pejety lze rozmrazit při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  za 30 sekund (Sieme 2011a; Brinsko et al. 2011; Lorenzoni et al. 2011). Někteří autoři preferují rozmrazování při vyšších teplotách po zkrácenou dobu, např.  $40\text{ }^{\circ}\text{C} / 15\text{ s}$  (Sieme 2011a) nebo  $46\text{ }^{\circ}\text{C} / 20\text{ s}$  (Brinsko et al. 2011). Velkoobjemové pejety 4-5 ml se rozmrazují po dobu 40-42 sekund při teplotě lázně  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Brinsko et al. 2011), popř. při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 1 minuty (Saragusty et al. 2007).

Kryokonzervace u hřebců a kvalita rozmrazené inseminační dávky je problematická, na rozdíl od býků neexistuje selekce samců na kvalitu ejakulátu a mezi jednotlivými hřebci se vyskytuje značná variabilita v tom, jakou si jejich semeno udržuje fertilizační schopnost po zmrazení a rozmrazení (Ortega-Ferrusola et al. 2009; Sichtar et al. 2017). Obecně se uvádí, že 20 – 50% hřebců produkuje ejakulát, který nelze uspokojivě mrazit (Loomis 2001; Loomis & Graham 2008). Je tedy důležité posoudit kvalitu inseminační dávky po rozmrazení a případně upravit protokol pro konkrétního hřebce.

Po rozmrazení jsou hodnoceny parametry semene subjektivními či objektivními metodami (Graham 2011). Kvantitativně je hodnocena koncentrace spermií v rozmraženém ejakulátu za pomoci hemocytometru nebo spektrofotometru. U zmrazené ID určené ke komerčnímu využití musí deklarovaný objem obsahovat minimálně 200 mil. progresivně pohyblivých spermií a nejméně 30 % spermií po 30 minutách inkubace při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  by mělo být progresivně pohyblivých (Loomis 2011). Minimální hodnoty motility se mezi jednotlivými centry liší, pohybují se v rozmezí 25-40 %, nejčastěji 30-35 % (Sieme 2011a). Kvalitativně je hodnocena především pohyblivost (motilita), životaschopnost (viabilita) a morfologie. Dalšími testy, kterými lze hodnotit kvalitu spermií, jsou například stanovení integrity plazmatické membrány, status akrozomální membrány, kapacitační stav či integrita DNA a mitochondriální aktivita. Tyto podrobnější metody nacházejí uplatnění převážně ve výzkumu, komplexněji

vyhodnotí kvalitu ejakulátu a vliv změn v metodice přípravy kryokonzervované inseminační dávky.

### **2.3.1 Motilita**

Jedním z nejvyžívanějších testů hodnotících potenciální fertilizační schopnost semene je stanovení úrovně motility, což je v podstatě manifestace strukturální a funkční kompetence spermií (Kumi-Diaka 1993). Stanovením úrovně motility jsme schopni zjistit procento celkově a progresivně pohyblivých spermií a díky této informaci odhadnout fertilizační potenciál dané inseminační dávky a úspěšnost kryokonzervačního procesu. Hřebci se na základě celkové nebo progresivní motility spermií po rozmrazení rozdělují na dobře a špatně mrazitelné, jejich fertilizační potenciál je tudíž po rozmrazení odlišný.

#### **2.3.1.1 CASA - computer asisted sperm analyzis**

Kontrola kvality ejakulátu před a po rozmrazení se většinou provádí subjektivně, zejména na základě odhadu poměru pohyblivých spermií pod mikroskopem, protože motilita spermií se považuje za úzce související s plodností (Puglisi et al. 2012). Avšak výsledky tohoto odhadu mohou být ovlivněny lidským faktorem, může tak být do výsledků zanesena chyba v podobě zaujatosti a nepřesnosti (Amann & Waberski 2014). V porovnání se subjektivním hodnocením motility, počítačem řízená analýza spermií (CASA) automaticky vyhodnocuje větší množství spermií, a navíc v kratším čase (Verstegen et al. 2002; Kathiravan et al. 2011). CASA představuje praktický nástroj, který byl vyvinut na začátku 80. let a jehož cílem je poskytnout objektivnější analýzu motility spermií rekonstrukcí jejich trajektorií. CASA zařadí spermie podle hodnot kinematických parametrů do různých kategorií a poskytuje tak další podrobnosti o pohybu spermií pro hodnocení kvality ejakulátu a případnou predikci plodnosti (Simonik et al. 2015). Kathiravan et al. (2011) uvádí, že tento systém analýzy motility spermií lze považovat za účinnější, přesnější a důvěryhodnější nástroj pro hodnocení plodnosti než subjektivní hodnocení, navíc jsou získané výsledky více objektivní a měření jednoduše opakovatelné.

Systém CASA je založen na získávání po sobě jdoucích snímků z mikroskopu pomocí jednoduché čipové kamery (Quintero-Moreno et al. 2003). Obraz je následně převeden na černobílé rozlišení, exportován do počítače a vyhodnocen specifickým softwarem, který je schopen tyto obrazy analyzovat (Mortimer 2000). Získaná data jsou následně matematicky zpracována a trajektorie jsou definovány v číselné podobě. Výsledky této operace se vygenerují

jako řada parametrů, které přesně definují pohyb každé spermie (Quintero-Moreno et al. 2003). Analýza motility systémem CASA je částečně automatizovaná, systém vyhodnocuje pohybové vlastnosti spermií a poskytuje škálu kinematických parametrů popsanych Mortimerem (2000), uvedené v tabulce 1. Tyto ukazatele mají vysokou informativní hodnotu charakterizující fyziologický stav spermií a jejich možnou fertilizační schopnost (Farrell et al. 1998, Kathiravan et al. 2011).

**Tabulka 1:** *Základní parametry motility CASA.*

<b>PMOT</b> [%]	<b>procento progresivně pohyblivých spermií</b>
<b>TMOT</b> [%]	<b>procento celkově motilních spermií</b>
<b>VCL</b> [μm/s]	<b>rychlost po skutečné dráze</b>
<b>VSL</b> [μm/s]	<b>rychlost po napřimené dráze</b>
<b>VAP</b> [μm/s]	<b>rychlost po průměrné dráze</b>
<b>LIN</b> [%]	<b>linearita; průměrná hodnota poměru VSL/VCL</b>
<b>STR</b> [%]	<b>přímost; poměr VSL/VAP</b>
<b>ALH</b> [μm]	<b>amplituda laterálního vybočení hlavičky; oscilace hlavičky od napřimené trajektorie spermie, odvozeno z VCL a VAP</b>
<b>BCF</b> [Hz]	<b>frekvence křížení; frekvence, se kterou hlavička spermie protíná průměrnou dráhu</b>
<b>WOB</b> [%]	<b>kmitání; stupeň oscilace skutečné dráhy kolem její napřimené trajektorie, poměr VAP/VCL</b>

### 2.3.1.2 Subpopulace

Pokud máme k dispozici počítačem asistovanou analýzu spermií (CASA) má tento systém schopnost detekovat změny v pohybu spermií více objektivně (Verstegen et al. 2002) a jednotlivé kinematické parametry mohou charakterizovat motilitu spermií velmi detailně (Simonik et al. 2015). Avšak stanovení pouze průměrných hodnot kinematických parametrů



může vést k zavádějícím výsledkům. Vzhledem k heterogenitě ejakulátu je proto vhodné zaměřit se na hodnocení zastoupení různých subpopulací spermií.

U více druhů savců bylo zjištěno, že ejakulát není homogenní směs spermií, ale je složen z několika subpopulací (Martinez et al. 2006). Poměr a typ subpopulací spermií není konzistentní a je ovlivněn mnoha fyziologickými faktory a stejně tak reprodukčními technologiemi (Martinez-Pastor et al. 2008; Martinez-Pastor et al. 2011). Poměr subpopulací spermií v ejakulátu se liší mezi jednotlivými hřebci a také mezi čerstvým a rozmrazeným semenem (Ortega-Ferrusola et al. 2009). Znalost typu a složení jednotlivých subpopulací spermií v ejakulátu je možným nástrojem, který může pomoci predikovat fertilizační potenciál i mrazitelnost konkrétního samce (Ortega-Ferrusola et al. 2009; Ferraz et al. 2014).

Pro rozdělení spermií do subpopulací je nutné využít vhodných statistických metod, např. klastrovou analýzu (Martinez-Pastor et al. 2011). Klastrová analýza zpracovává hlavní kinematické parametry, které charakterizují pohyb jednotlivé spermie a na základě těchto hodnot je automaticky seskupuje do subpopulací. Případně je možné nadefinovat vybraný počet subpopulací, se kterými chceme pracovat. I když už je známou skutečností, že je vhodné hodnotit ejakulát ve vztahu k zastoupeným subpopulacím spermií, nejsou prozatím stanovena žádná pravidla pro rozdělení spermií do subpopulací ani počet subpopulací pro jednotlivé druhy zvířat (Simonik et al. 2015).

Na základě klastrové analýzy jsou spermie rozděleny do tzv. klastrů. Jednotlivé klastry jsou charakterizovány kinematickými parametry, jejichž hodnoty definují jednotlivé subpopulace. V ejakulátu hřebců se většinou uvádí výskyt 3-4 subpopulací spermií (Ortega-Ferrusola et al. 2009; Martinez-Pastor et al. 2011), například rychlá, pomalá, přímá a nepřímá (Quintero-Moreno et al. 2003; Ortega-Ferrusola et al. 2009; Martinez-Pastor et al. 2011). Otázkou je, zda počet subpopulací ovlivní výsledné hodnocení daného ejakulátu či zda vyšší množství subpopulací poskytuje detailnější výsledek. Holt & Van Look (2004) prokázali různou fertilizační schopnost spermií u samců s podobnou celkovou motilitou, ale s různým zastoupením subpopulací v ejakulátu. Výskyt určitých typů subpopulací je spojován s kvalitou ejakulátu (Quintero-Moreno et al. 2003; Ortega-Ferrusola et al. 2009; Martinez-Pastor et al. 2011) a fertilizačním potenciálem spermií u býků po rozmrazení (Ferraz et al. 2014). Znalosti o heterogenitě ejakulátu mohou napomáhat k lepší predikci fertility samců, k výběru vhodných metod asistované reprodukce a následně vést k vyšší oplozovací schopnosti a tím pádem mít vliv na ekonomickou složku chovu koní (Curry 2000; Quintero-Moreno et al. 2003).

### 2.3 Vliv mražení a ředidel s kryoprotektanty na spermie

Poměrně vysoké procento spermií utrpí během zmrazování ireverzibilní poškození. Funkční poruchy jsou zapříčiněny odchylkami ve vlastnostech membránových lipidů, narušením cytoskeletu a změnami jaderné skladby, což je důsledek citlivosti spermií na změny teploty, vliv osmotických a oxidačních stresorů a vnitřních toxických vlastností přidaných kryoprotektantů (Brinsko et al. 2011). Poškození buněk během mražení a rozmrazování nastává kolem teploty 0 °C, která vyvolává chladový šok, extracelulární a hlavně intracelulární tvorbu ledu (Mazur 1985). Poškození spermií může způsobit dehydratace vlivem zamrznutí tekutiny okolo buněk včetně zvýšené koncentrace solí a narušení membrány v důsledku bobtnání a smršťování (Hammerstedt et al. 1990) a také osmotické změny v průběhu přidávání a odstraňování kryoprotektantu. U většiny buněk je příčinou smrti během mražení a rozmrazování tvorba intracelulárního ledu a poškození membrány (Amann & Pickett 1987; Hammerstedt et al. 1990; Meryman 2007)

Zmrzne-li čistá voda, vytváří krystalickou strukturu. Pokud jsou v roztoku přítomny soli a cukry, v bodu mrazu dojde ke krystalizaci čisté vody a vzniklé krystaly jsou od sebe navzájem odděleny kanály nezamrzlé vody obsahující všechny soli a cukry. K tomu, aby buňka přežila kryokonzervaci, musí být v těchto nezamrzlých kanálech. Při klesající teplotě je stále více vody z nezamrzlých kanálků odebráno do rostoucích ledových krystalů a zbývající nezamrzlá tekutina se stává hypertonická (Hammerstedt et al. 1990). Pokud teplota dále klesá, zbývající tekutina v nezamrzlých kanálcích vitrifikuje. Ve vitrifikovaném stavu v -196 °C v podstatě dochází k zastavení metabolismu buněk a ty v tomto stavu mohou zůstat životaschopné po mnoho let. Přidáním rozpuštěných látek do vody se snižuje teplota bodu mrazu. Zatímco čistá voda mrzne při 0 °C, fyziologický roztok zamrzá při -0,6 °C. Přidáním více látek se teplota zamrznutí dále snižuje. Pokud je přidána kapalina, např. kryoprotektant ethylenglykol, glycerol nebo methylformamid, bod tuhnutí se také snižuje, protože tyto látky zůstávají nezmražené i při nízkých teplotách, a tak zvětšují objem nezamrzlých kanálků mezi ledovými krystaly. Takovéto sloučeniny zvýší celkový objem nezamrzlých kanálků a snižují koncentraci solí, čímž omezují jejich škodlivé účinky (Amann & Graham 2011).

Ke kryokonzervačnímu ředidlu jsou tedy přidávány látky, které mohou zabránit mechanickému poškození spermií během procesu mražení. Další možností, jak získat co nejkvalitnější inseminační dávku, je ovlivnění obsahu přirozené složky ejakulátu - semenné plazmy.

## 2.4 Vliv semenné plazmy na spermie během kryokonzervace

Řada výzkumů ukázala, že semenná plazma (SP) má škodlivý vliv na spermie hřebců při jejich skladování. Když se poměr SP sníží na přibližně  $\leq 5\%$ , spermie jsou schopny udržet žádoucí motilitu ve srovnání se vzorky obsahujícími vyšší poměr SP (10-30%), jak během chlazeného skladování, tak při kryokonzervaci (Braun et al. 1994; Alghamdi et al. 2002). Motilita spermií a integrita DNA jsou také lepší s úplným odstraněním SP v porovnání se vzorky s větším obsahem SP (Love et al. 2005). Účinky SP se však liší mezi jednotlivými hřebci (Aurich et al. 1996; Akcay et al. 2006; Katila & Kareskoski 2006). Zdá se, že určitá přítomnost SP je nezbytná pro skladování spermatu a jeho fertilitu, ale je výhodné odstranit většinu SP odstředěním před uskladněním alespoň u hřebců, jejichž ejakuláty mají špatnou toleranci vůči chlazení a skladování (Brinsko et al. 2000).

Na druhou stranu odstranění, nebo výrazné naředění SP během procesu kryokonzervace, anebo také sexace spermií navozuje poškození spermií (Caballero et al. 2008). Zvláště, když vysoké ředění spermatu způsobuje odstranění části proteinů, přírodních antioxidantů a iontů, které jsou zásadní pro zachování integrity a funkcí plazmatické membrány. Což vede ke zhoršení kvality spermatu a může ztížit proces fertilizace (Maxwell & Johnson 1999).

## 3 Semenná plazma

Tekutá část spermatu, semenná plazma (SP), se skládá ze složité směsi sekretů pocházejících hlavně z nadvarlat a přídatných pohlavních žláz a slouží jako prostředí pro ejakulované spermie (Calvete et al. 1997; Topfer-Petersen et al. 2005). Semenná plazma je komplexní tekutina obsahující anorganické ionty, cukry, organické soli, lipidy, enzymy, prostaglandiny, proteiny a různé další látky (Maxwell & Johnson 1999). Ejakulát hřebce je tvořen šesti až devíti po sobě jdoucími frakcemi spermatu, přičemž přibližně 70% spermií se nachází v prvních třech (Kosiniak 1975). Složení SP se mění mezi frakcemi, jelikož příslušné pohlavní žlázy uvolňují svůj obsah v určitém pořadí. Bulbouretrální tekutina je uvolňována první (předspERMatická frakce) a poté následují tekutiny nadvarlat a ampulí chámovodu ve frakci ejakulátu bohaté na spermie. Sekrece z ampulí chámovodu a z prostaty začíná před začátkem ejakulace a pokračuje sekrecí tekutiny z prostaty během prvních kontrakcí uretry. Sekrece semenných váčků je zahájena po ukončení aktivity prostaty a tvoří poslední frakci (Magistrini et al. 2000).

Savčí spermie se uvolňují z varlat do kanálku nadvarlete jako haploidní, vysoce diferencované buňky, které stále postrádají schopnost interagovat s ovulovaným oocytem.

Schopnost oplodnit vajíčko získávají během složitého, sekvenčně uspořádaného procesu známého jako zrání spermií. Zrání spermií se zahajuje při průchodu nadvarlaty a pokračuje změnami, které probíhají během ejakulace. Druhou sekvencí dozrávání, nazývanou kapacitace, musí spermie podstoupit během průchodu samičím pohlavním traktem. To umožní spermii dosáhnout místa oplodnění včas a interagovat s ovulovaným oocytem. Ve všech těchto procesech se uplatňuje právě semenná plazma, zejména její proteiny (Topfer-Petersen et al. 2005).

Základním rysem procesu dozrávání po opuštění varlat je přestavba povrchu spermií prostřednictvím specifických interakcí proteinů a glykoproteinů, které jsou vylučovány při průchodu samčím pohlavním traktem a které jsou přítomny v SP. Bylo prokázáno, že sekreční proteiny vázající spermie se podílejí na vytvoření rezervoáru spermií v oviduktu (Gwathmey et al. 2006; Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005), a také kontrolují zrání spermií pomocí koordinovaného působení negativních (dekapacitačních) a pozitivních regulačních faktorů (faktory stimulující kapacitaci) (Florman & First 1988; Manjunath & Therien 2002). Dekapacitační faktory obsažené v SP brání předčasné akrozomální reakci a proteiny, které se vážou na povrch spermií, zvyšují fertilizační potenciál (Centurion et al. 2003). Inaktivace nebo odstranění těchto faktorů může ovlivňovat kapacitaci *in vivo* (Calvete et al. 1997). Také jsou nezbytné u událostí vedoucích ke zdárné fertilizaci, např. interakce spermie-zona pellucida a fúze spermie a oocyty (Druart et al. 2013). Expresí těchto funkčně důležitých proteinů odpovídá specifickým oblastem v samčím pohlavním traktu, kde sperma získává plnou fertilizační kompetenci. Navíc se ukázalo, že SP moduluje imunitní odpověď v prostředí dělohy a ovlivňuje transport spermií (Alghamdi et al. 2002). Kombinované účinky složek semenné plazmy tedy podporují přežití spermií v samičím pohlavním traktu a zajišťují, aby funkční kompetentní spermie byla ve správném čase na správném místě.

## **3.1 Minerální látky SP**

### **3.1.1 Ionty sodíku, draslíku a chloridy**

Vnitřní pH spermií, které se mění během kapacitace, je vysoce závislé na pH mimo buňku, protože spermie samy o sobě mají pouze omezené regulační mechanismy (Hamamah & Gatti 1998). Koncentrace sodíku, draslíku a chloridů se významně liší mezi jednotlivými hřebci. Prespermatická frakce obsahuje nejvyšší koncentrace chloridů a poslední část ejakulátu má také vyšší obsah chloridů než spermatická frakce. U sodíku nebo draslíku nejsou žádné rozdíly

v koncentraci mezi frakcemi (Kareskoski et al. 2005). Přidání draslíku k ředidlům zlepšuje motilitu spermií hřebců (Padilla & Foote 1991) a mužů (Karow et al. 1992). Intracelulární koncentrace draslíku jsou vyšší než koncentrace v SP, a proto jsou hladiny draslíku spojovány s koncentrací spermií. U ovcí jsou zvyšující se hladiny draslíku negativně korelovány s progresivní motilitou, naopak je tomu pro sodík a chlorid (Abdel-Rahman et al. 2000).

### **3.1.2 Ionty vápníku, hořčíku a fosfát**

Prespermatická frakce a první frakce bohatá na spermie obsahují nízké hladiny vápníku a hořčíku, zatímco první frakce bohatá na spermie obsahuje vysoké koncentrace fosfátů (Kareskoski et al. 2005). Ve studii Barrier-Battut et al. (2002) změna v koncentracích vápníku a hořčíku v SP hřebce neovlivnila mrazitelnost. U beranů byla nízká progresivní motilita v korelaci se vzrůstajícími hladinami vápníku a sníženou koncentrací hořčíku a fosfátů (Abdel-Rahman et al. 2000). Naproti tomu motilita po rozmrazení semene býků vzrostla, když byl přidán  $MgCl_2$  do kryokonzervačního ředidla (Lapointe et al. 1996), což může naznačovat významné rozdíly mezi druhy. Dalším vysvětlením je, že se vliv iontů na motilitu během skladování může měnit. Vápník je zapojen do mnoha dějů v reprodukčním traktu hřebce i klisny. Spontánní akrozomová reakce je spojována s vyššími koncentracemi iontů vápníku v SP hřebce (Pesch et al. 2006). Extracelulární vápník reguluje kapacitaci spermií (Baker et al. 2004) a hyperaktivaci (Marquez & Suarez 2004), což bylo prokázáno v lidském spermatu.

### **3.1.3 Ionty zinku, mědi a železa**

Koncentrace mědi a zinku, ale nikoliv železa, se v SP hřebců lišily mezi vzorky spermatu dobré a špatné kvality (Pesch et al. 2006). Ve stejné studii byla nalezena významná korelace mezi plodností a koncentrací zinku v létě a na podzim, ale ne na jaře. Ve studii Barrier-Battut et al. (2002) změna v koncentracích mědi a zinku v SP hřebce neovlivnila mrazitelnost semene. Massanyi et al. (2003) zkoumali koncentrace různých stopových prvků v semeni několika živočišných druhů. Hladiny zinku a železa byly pozitivně korelovány s kvalitou spermatu hřebce a býka. Kančí sperma obsahovalo více zinku než sperma od hřebců nebo býků. Koncentrace mědi a železa byly vyšší u semene beranů ve srovnání s hřebci a kanci. Stabilita chromatinu spermií v lidských ejakulátech je závislá na zinku a hladiny zinku mohou ovlivnit míru otěhotnění (Bjorndahl & Kvist 2010). Na druhou stranu, u lidských vzorků semene jsou vysoké hladiny zinku dávány do souvislosti s poklesem progresivní motility (Sorensen et al. 1999).

## 3.2 Sacharidy a lipidy SP

Z volných sacharidů se v SP hřebců nachází inositol a glukóza, dále zanedbatelné množství fruktózy. Hlavním typem vázaného sacharidu v SP hřebců je galaktóza a také se v ní vyskytuje glukóza, manóza a fukóza (Baronos 1971).

Cholesterol je hlavní sterol v membránách spermií kance, býka, hřebce a kohouta, a hlavními fosfolipidy jsou cholin, etanolamin fosfoglyceridy a sfingomyelin (Parks & Lynch 1992). Hřebčí semeno také obsahuje prostasomu podobné částice s charakteristickým lipidovým profilem a vysoké množství cholesterolu a sfingomyelinu (Arienti et al. 1998). Tyto membránové váčky byly nalezeny zejména ve spermatické frakci ejakulátu, ale jejich původ a funkce nejsou známy (Ghaoui et al. 2004).

## 3.3 Bílkoviny v SP

Panel bílkovin identifikovaných v semenné plazmě se pohybuje od různých hormonů, enzymů, inhibitorů proteináz a dalších složek, růstových faktorů, k proteinům a glykoproteinům, které jsou dosud neznámé povahy nebo funkce. Složení a účinky SP na fertilizační schopnost spermií se liší v závislosti na plodnosti jednotlivých zvířat (Brandon et al. 1999).

Efekt proteinů SP je komplexní a není plně znám, existuje vysoká variabilita složení SP mezi druhy, v rámci jednoho druhu mezi jednotlivci i mezi ejakuláty u konkrétního samce (Centurion et al. 2003). Mezi druhové rozdíly ve složení SP jsou způsobené pravděpodobně rozdílnou velikostí i strukturou pohlavních žláz (Druart et al. 2013).

### 3.3.1 Enzymy SP

Bylo identifikováno několik enzymů v SP hřebce. Studie se zaměřují na určení původu identifikovaných enzymů v reprodukčních orgánech a souvislost s kvalitou spermatu, ale ve většině případů fyziologická funkce těchto sloučenin zůstává nejasná. U psiho spermatu hladina aktivity kyselé fosfatázy (ACP) odráží funkčnost prostaty (James & Heywood 1979), ale u hřebce byly studie tohoto enzymu doposud omezeny na epididymální tkáň (Lopez et al. 1989). Alkalická fosfatáza (AP) pravděpodobně pochází především z varlat a nadvarlat a tudíž AP a ACP pozitivně korelují s koncentrací spermií a negativně s objemem spermatu (Pesch et al. 2006). U frakcionovaných ejakulátů hřebců byly hladiny ACP nejvyšší v první frakci bohaté na spermie, zatímco nebyly žádné rozdíly v hodnotách AP mezi frakcemi (Kareskoski et al.

2005). AP a možná také ACP mohou být použity k ověření proběhnuté ejakulace a tubulární průchodnosti u hřebců (Turner & McDonnell 2003; Pesch et al. 2006).

Úrovně  $\beta$ -glukuronidázy (BGase) se liší mezi různými frakcemi hřebčího ejakulátu a nejvyšší hodnoty byly nalezeny v první frakci bohaté na spermie (Kareskoski et al. 2005). BGase a N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidáza (NAGáza) ze SP se vážou s vysokou afinitou k povrchu spermií a mohou hrát úlohu při maturaci a změnách na spermiích před oplodněním (Barbieri et al. 1996) a způsobují disperzi buněk *cumulu oophoru* (Rethinaswamy et al. 1994). Bylo prokázáno, že hladiny  $\alpha$ -galaktosidázy,  $\beta$ -galaktosidázy a NAGázy se významně liší mezi neplodnými muži s oligo-asteno-teratozoospermií a fertillní kontrolou (Corrales et al. 2000). Vzhledem k tomu, že tyto glykosidázy pravděpodobně hrají důležitou úlohu během dozrávání spermií a oplodnění, mohou být rozdíly v jejich hladinách spojené s funkčními defekty spermií (Corrales et al. 2002).

Aktivita lipázy byla prokázána v SP hřebců a snižuje motilitu spermií v závislosti na dávce (Carver & Ball 2002). Mezi další studované enzymy v SP hřebců patří karbo-anhydrázové isoenzymy (CA-I, CA-II a CA-III) u kterých se předpokládá, že regulují koncentraci hydrogenuhličitanů a tím i pH semenné plazmy (Asari et al. 1996). Angiotensin-konvertující enzym (ACE) byl nalezen v plazmatických membránách ejakulovaných a epididymálních spermií a v postpubertálních varlatech. Angiotensin II ovlivnil některé parametry motility spermií, jako je průměrná rychlost (VAP) a křivočará rychlost (VCL), ale ne procento pohyblivých spermií (Ball et al. 2003). V práci Pesch et al. (2006) byly měřeny aktivity různých enzymů v SP hřebců a hodnocen jejich vliv na kvalitu spermií. Ze studovaných enzymů korelovala pouze laktátdehydrogenáza s motilitou, počtem spermií a objemem. Aktivita acetylhydrolázy faktoru aktivujícího krevní destičky (PAF) byla také detekována ve spermatu několika savců včetně hřebce. PAF stimuluje motilitu spermií a je zapojen do kapacity a PAF acetylhydroláza je její předpokládaný inhibitor (Hough & Parks 1994).

## 4 Hlavní proteiny SP

Hlavní funkční proteiny SP se dělí do 3 rodin: proteiny s fibronektinovou doménou typu II (Fn2), CRISP (cysteine-rich secretory proteins) a spermadhesiny (Topfer-Petersen et al. 2005).

### 4.1 Fn-2 proteiny

Malé proteiny typu Fn-2 jsou charakteristické dvěma tandemově uspořádanými fibronektinovými doménami typu II. Proteiny typu Fn-2 jsou nejrozšířenějšími proteiny u mnoha druhů, včetně hřebce (Topfer-Petersen et al. 2005). Proteiny typu Fn-2 jsou nejvíce hojné v SP býků (Manjunath et al. 2007), kozlů (Manjunath et al. 2002), bizonů (Boisvert et al. 2004) a také hřebců (Calvete et al. 1995b). Člen této proteinové rodiny je rovněž popsán jako minoritní komponenta semenné plazmy kance (Calvete et al. 1997).

Proteiny typu Fn-2 jsou exprimovány v různých oblastech samčího reprodukčního traktu. Některé dlouhé proteiny typu Fn-2 jsou produkovány v těle a ocasu nadvarlat, zatímco malé Fn-2 proteiny jsou syntetizovány převážně ampulemi chámovodu (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005). Proteiny Fn-2 se těsně spojují se spermií během průchodu epididymem a během ejakulace a jsou přítomné na ejakulovaných spermiích. Navázání k membráně postakrozomálního segmentu a střední části spermie bylo prvně zaznamenáno v těle nadvarlete. Hlavními vlastnostmi proteinů Fn-2 jsou schopnost specificky interagovat s fosfolipidy spermatické membrány a schopnost vázat heparin (Calvete et al. 1997).

Schopnost proteinů typu Fn-2 vázat se na spermie je zprostředkována specifickými interakcemi s cholinovými lipidy plazmatické membrány (Greube et al. 2004; Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005). Po navázání na spermie mají tyto proteiny řadu účinků a mohou ovlivnit změnu specifických membránových vlastností, které mohou předcházet procesu kapacitace indukované heparinem (Manjunath & Therien 2002).

Schopnost vázat heparin závisí na agregačním stavu proteinů. Jen oligomery, ale ne monomery, proteinů Fn-2 typu mají tuto schopnost (Calvete et al. 1999). Heparin se váže na ejakulované spermie a ovlivňuje kapacitaci, tím, že zvyšuje schopnost spermií projít akrozomální reakcí indukovanou *zona pellucida* (ZP) (Florman & First 1988).



## 4.2 CRISP proteiny

CRISP proteiny jsou u hřebců exprimovány v ampulích chámovodu a také po celé délce nadvarlat, ve varlatech a semenných váčcích (Giese et al. 2002). Proteiny CRISP hřebčích spermií se nacházejí v equatoriální a postakrozomální oblasti stejně jako v střední části bičíku. Jejich asociace k povrchu spermií začíná v oblasti těla nadvarlete (Schambony et al. 1998a). CRISP proteiny zůstávají umístěny na spermiích i po *in vitro* kapacitaci a akrozomální reakci (Topfer-Petersen et al. 2005). Volně připojené CRISP proteiny mohou být uvolněny ze spermií promytím pufrům s vysokým obsahem soli. Avšak definovaný počet molekul CRISP zůstává těsně na povrchu spermií. Ukázalo se, že tento počet molekul CRISP přímo koreluje s plodností jednotlivých hřebců (Reineke et al. 1999).

Bylo zjištěno, že různé členové rodiny CRISP jsou zapojeni do rozličných funkcí souvisejících s fúzí spermie a oocyty, vrozenými obrannými mechanismy a zablokováním iontových kanálů. Funkce CRISP proteinů během oplození je nejlépe pochopena u potkanů. CRISP1 (dříve DE-protein) se těsně spojuje s povrchem spermií během průchodu epididymem a migruje do equatoriálního segmentu během kapacitace (Da Ros et al. 2004). Podílí se na fúzi spermií a oocytů prostřednictvím vazebných míst na komplementární místa na povrchu vajíčka (Cuasnicu et al. 2001).

Lze předpokládat, že některé CRISP proteiny mohou hrát roli při oplodnění (fúze spermie a oocyty), zatímco jiné přispívají k roli semenné plazmy v samičím genitálním traktu. Přesná úloha proteinů CRISP v oplození u koní však čeká na další studium.

## 4.3 Spermadhesiny

Spermadhesiny jsou multifunkční proteiny se schopností vázat ligandy - heparin, fosfolipidy, inhibitory proteáz a hydrogenuhličitany, která se mění podle jejich glykosylace a agregačního stavu (Caballero et al. 2008; Topfer-Petersen et al. 2005). Spermadhesiny byly poprvé popsány v kančí SP, kde tvoří hlavní frakci malých proteinů vázajících heparin (Bork & Beckmann 1993). Po vazbě na spermiu se podílejí na vytvoření rezervoáru spermií v samičím pohlavním traktu a kapacitaci a také na interakci spermie a ZP (Topfer-Petersen et al. 2005).

Kančí spermadhesiny jsou sekreční produkty hlavně semenných váčků. Je zajímavé, že protein AWN je secernován v *cauda epididymis* samčího pohlavního traktu a je také exprimován ve vejcovodu samic (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002). Spermadhesiny AWN, AQN-1 a AQN-3 jsou spermie vázající proteiny, které se zdají být zapojeny do sacharidy

zprostředkovaných fází oplodnění. Proteiny typu AQN asociují s povrchem spermií při ejakulaci převážně v akrozomální oblasti hlavičky a pomáhají vytvoření oviduktálního rezervoáru spermií interakcí s glykokonjugáty oviduktálního epitelu (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005). AWN zůstává navázán na peri-akrozomální plazmatickou membránu po transportu samičím pohlavním traktem a kapacitaci *in vivo* a může se účastnit rozpoznávání gamet (Rodriguez-Martinez et al. 1998).

Homologem kančího AWN je hřebčí HSP-7. Jeho sekvence vykazuje záměnu aminokyselin pouze na třech místech (Reinert et al. 1996; Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002). Stejně jako jeho kančí homolog, je hřebčí AWN protein vázající sacharidy. Bylo prokázáno, že se váže na intaktní *zona pellucida*, takže se zřejmě účastní vazby spermie a ZP (Reinert et al. 1996). Hřebčí AWN se nachází již ve varlatech, dále v *rete testis*, *ductus epididymidis* a semenných váčcích. Při průchodu kanálkem epididymu se narůstající množství hřebčího AWN spojuje se spermiemi a objevuje se jako prominentní pás v ekvatoriálním segmentu. Ačkoli je lokalizován na povrchu spermií, jeho proteinová struktura a jeho schopnosti vázat ligandy by naznačovaly úlohu v interakci spermie-ZP (Reinert et al. 1996).

#### **4.4 Funkce a vazebná aktivita proteinů SP**

Pro zlepšení technologických procesů a porozumění mechanismů souvisejících s oplozením oocyty, je zapotřebí se kromě struktury zajímat také o interakce mezi proteiny a ligandy a jakým způsobem tyto interakce ovlivňují jejich funkci (Park et al. 2005). Mezi širokou škálou komponent SP mají peptidy a bílkoviny specifickou úlohu při regulaci procesu oplození. Většina bílkovin nalezených v SP se váže na plazmatickou membránu spermií, pokrývá její povrch, zabraňuje aglutinaci spermií, předčasné akrozomové reakci a fagocytóze buňkami imunitního systému v samičím reprodukčním traktu (Jonakova & Ticha 2004). Proces fertilizace zahrnuje řadu speciálních důležitých a postupných, těsně za sebou koordinovaných reakcí. Asociace proteinů SP s povrchem spermií nastává během ejakulace. Následně interagují se složkami epiteliálních buněk vejcovodu, dojde ke kapacitaci, specifickému rozpoznání gamet, primární a sekundární vazbě spermií na vajíčko, akrozomální reakci, penetraci spermie přes ZP a konečně k fúzi gamet. Všechny reakce jsou charakterizovány přesnými regulačními mechanismy založené na interakcích protein-ligand (Manaskova et al. 2003). Proteiny SP prokazují specifitu k různým ligandům. Kromě interakce s polysacharidy, fosfolipidy, lipoproteiny, bivalentními ionty, proteiny SP rozpoznávají receptory plazmatické membrány spermií a ZP a mohou také vytvářet proteinové komplexy. Agregace a disagregace proteinů SP

je pravděpodobně důležitým fenoménem během procesu oplození. V případě semenné plazmy kance byly sledovány interakce mezi proteiny rodiny spermadhesinů AQN a AWN a DQH, stejně jako mezi proteiny podílející se na tvorbě heterodimeru PSP-I a PSP-II. Proteiny SP vykazující afinitu k fosforylcholinu mohou hrát důležitou roli v daných interakcích (Manaskova et al. 2000).

#### **4.4.1 Sacharidové interakce proteinů SP**

Heparin nebo chondroitin sulfátu podobné glycosaminoglykany (GAG) jsou secernovány ve velkém množství epitelem samičího reprodukčního traktu, převážně ve folikulární fázi estrálního cyklu (Calvete et al. 1996). Během transportu samičím reprodukčním traktem nastávají změny obsahu GAG na plazmatické membráně spermií. Disociace těchto látek z povrchu plazmatické membrány během kapacitace spermií pravděpodobně začíná heparin-dependentním procesem zvýšení  $Ca^{2+}$  iontů v akrozomální matrix. Bylo zjištěno, že heparin vázající proteiny SP po navázání na povrch spermií také přispívají k akrozomální reakci interakcí s heparinu-podobnými GAG ve vejcovodu (Florman & First 1988).

Bylo zjištěno, že proteiny SP, které váží manózu, se účastní vytvoření rezervoáru spermií ve vejcovodu. Fenomén skladování spermií v isthmu oviduktu je spojován se získáváním jejich schopnosti oplození. Po hyperaktivaci spermií dojde k jejich uvolnění a také ke zvýšení koncentrace vápníku v matrix akrozomů (Green et al. 2001). Oviduktální rezervoár spermií je vytvořen až do doby kapacitace, kdy se proteiny spojené s plazmatickou membránou odlučují (Jelinkova et al. 2004).

#### **4.4.2 Interakce proteinů SP s fosfolipidy**

Plazmatická membrána spermií se obaluje proteiny vylučovanými přídatnými pohlavními žlázami během ejakulace a tento proces je realizován mimo jiné kvůli interakci s cholinovými fosfolipidy membrány (Gasset et al. 1997). Více než 60% všech fosfolipidů membrán spermií obsahují fosforylcholin. Fosforylcholin je složka fosfatidylcholinu a společně s fosfatidyletanolaminem představují hlavní fosfolipidové složky membrány spermie (Parks et al. 1987). Bílkoviny, které váží fosfatidylcholin, byly identifikovány u mnoha druhů savců, jako je býk, kanec, křeček, myš i člověk (Leblond et al. 1993). U hřebců a kanců tyto bílkoviny vykazují schopnost vázat také fosforylcholin a heparin. Tyto proteiny jsou strukturálně podobné bovinním proteinům SP (BSP) a mají schopnost tvořit oligomerní struktury, které se v přítomnosti fosforylcholinu rozpadají na homodimery (Calvete et al. 1997).

#### 4.4.3 Interakce proteinů SP se zinkem

Proteiny SP savců ukazují vysokou afinitu k iontům zinku. Tyto ionty mohou být dočasně, nebo trvale vázanou strukturální složkou proteinů SP. Proto se mohou účastnit při tvorbě konečné struktury proteinů nebo být použity jako mobilní regulační prvek mnoha procesů doprovázejících oplození. Ionty zinku se podílejí na intracelulárním mechanismu, který chrání stabilitu chromatinu spermií. Podílejí se na vytváření vazeb typu S-Zn-S ve struktuře protaminů, která stabilizují chromatin. Zachování adekvátní úrovně iontů zinku v chromatinu spermií určuje jeho následnou funkčnost při procesu oplození.  $Zn^{2+}$  je začleněn do jádra při ejakulaci. Jaderný  $Zn^{2+}$  se sdružuje s protaminy a tvoří zinkové můstky stabilizující strukturu chromatinu spermií (Bjorndahl & Kvist 2010; Kerns et al. 2018). Poruchy funkce přídatných pohlavních žláz, které jsou zdrojem proteinů SP tak negativně ovlivňují stabilitu chromatinu, protože normální koncentrace proteinů, které váží ionty zinku, reguluje obsah těchto iontů v chromatinu spermií (Kjellberg et al. 1992).

Tekutina prostaty je tělesná tekutina s nejvyšší koncentrací  $Zn^{2+}$ . Má klíčovou roli v zabránění předčasné kapacitace spermií a významné jsou i její antioxidační aktivity, zatímco nižší koncentrace  $Zn^{2+}$  může být předpokladem úspěšné exocytózy akrozomů. Na bičíku spermií je zinek vázán na proteinu cysteinové skupiny, což chrání bičík před předčasnou oxidací. Během průchodu nadvarletem je  $Zn^{2+}$  selektivně odstraněn z bičíku, což umožňuje oxidaci sulfhydrylových skupin a zpevnění vnějších vláken bičíku pro podporu progresivní motility. Ionty zinku také asociují s membránami spermií, kde interagují s lipoproteiny a tak membránu spermií stabilizují. Aktivní odstranění  $Zn^{2+}$  je předpokladem pro dokončení kapacitace spermií (Kerns et al. 2018). U býků, byly proteiny vázající zinek pozorovány v epididymální tekutině (Henkel et al. 2000).

Proteiny dependentní na zinku, které jsou přítomny v semeni, mohou být klasifikovány jako látky chránící zdroj iontů zinku jejich vázáním a transportem. Narušení syntézy těchto proteinů nebo jejich typické biologické aktivity může vést k fyziologickým dysfunkcím spermií (Bjorndahl & Kvist 2010).

#### 4.5 Proteiny SP různých druhů savců

Podobnosti mezi druhy v obsahu proteinů semenné plazmy nejsou zanedbatelné, hlavně mezi hřebci, býky a kanci nacházíme jisté homologie a znalosti konkrétních proteinů u jiných druhů savců mohou pomoci odhalit funkci homologního proteinu u hřebce. Předpokladem je,

že homologní proteiny rozdílných druhů savců mohou mít podobnou biologickou aktivitu (Calvete et al. 1997).

#### 4.5.1 Proteiny kančí SP

V kančí SP převažují spermadhesiny, skupina glykoproteinů o velikosti 12-16 kDa. Jedná se o adhezivní bílkoviny, které se vážou na povrch kančích spermií během ejakulace. Bylo charakterizováno spermadhesiny: AQN-1, AQN-2, AQN-3, PSP-I, PSP-II, AWN-1, AWN-2 a jsou produktem především semenných váčků (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002; Calvete et al. 1994; Jonakova et al. 1998; Caballero et al. 2008). Post-translační modifikace, jako je glykosylace, určují rozmanitosti funkčních vlastností kančích spermadhesinů (Calvete et al. 1994). PSP-I a II jsou hlavní proteiny SP (více než 50% všech proteinů), tvoří heparin nevázájící heterodimery glykosylovaných spermadhesinů jejichž aktivita je prozánětlivá a imunostimulační pro modulaci imunitní odpovědi v prostředí dělohy (Centurion et al. 2003). AQN-1, AQN-3, AWN jsou heparin vázájící a vytváří vrstvu pokrývající spermie. Jejich funkcí je stabilizace membrány kryjící akrozomální váček a jsou uvolňovány hlavně během kapacitace. U proteinu AWN se předpokládá, že zprostředkovává interakci se *zona pellucida* (ZP) a fertilizaci (Rodriguez-Martinez et al. 1998; Centurion et al. 2003). AWN je produkován v ocasu nadvarlete, ale také ve vejcovodu u samic (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002). Po ejakulaci se monomer proteinu AWN-1 a AQN-3 specificky váže k fosfolipidům, tvoří první obalující vrstvu interakcí s lipidovou dvouvrstvou spermatické membrány (Dostalova et al. 1995). AWN zůstává připojen k periakrozomální plazmatické membráně spermie i po transportu spermií samičím reprodukčním traktem a kapacitaci *in vivo* a mohl by být zapojen v systému rozpoznání gamet (Rodriguez-Martinez et al. 1998). AWN, AQN-1 a AQN-3 mají afinitu k *zona pellucida* (Jonakova et al. 2000).

Další heparin vázájící spermadhesiny (hlavně AQN-1) a jejich agregované formy pravděpodobně interagují s epitelem oviduktu, takže jsou tyto spermadhesiny zapojeny ve formování oviduktálního rezervoáru spermií. Začátek *in vitro* kapacitace vede k odstranění AQN proteinů z povrchu spermií a k poklesu schopnosti navázat se k oviduktu (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005). Schopnost agregovaných spermadhesinů vázat cholesterol ukazuje, že tyto proteiny se stávají jeho akceptory při uvolňování cholesterolu z plazmatické membrány spermie během kapacitace (Jonakova et al. 2000; Manaskova et al. 2000).

Spermie mohou být pokryty vrstvou agregujících spermadhesinů, které slouží jako faktory stabilizující akrozom (Dostalova et al. 1995). Jakmile se dostane ejakulát do pohlavního traktu samice, nastává masivní invaze leukocytů v děloze, která může být modulována

heterodimery PSP-I/PSP-II a jejich podjednotkami (Rodriguez-Martinez et al. 2005). PSP-I vykazuje schopnost vázat IgG různých živočišných druhů a lidského IgA (Kwok et al. 1993). Tak může fungovat jako imunosupresivním faktor pro ochranu spermatu před imunitní reakcí během transportu v samičím reprodukčním traktu. PSP-I/PSP-II heterodimer je tzv. imunosupresivní faktor kančí SP (ISF –immunosuppressive seminal factor) (Veselsky et al. 2002). Kwok et al. (1993) izolovali PSP-I a PSP-II proteiny ze sekretů semenných váček kanců (Calvete et al. 1997). PSP-I/PSP-II heterodimer se neváže k heparinu, ale vykazuje afinitu ke glykoproteinům ZP a inhibitorům trypsinu. Spermadhesin PSP-I váže mimo jiné endo-  $\beta$ - galaktosidázu, která štěpí protein ZP3 a  $\alpha$ -kasein (Kwok et al. 1993).

#### 4.5.2 Proteiny SP býků

Hlavní proteiny SP býků jsou BSP proteiny s fibronektinovou doménou (Fn-2). Vyznačují se širokým rozsahem molekulových hmotností od 15-17 kDa do 30 kDa a schopností vázat heparin a fosforylcholin (Calvete et al. 1997; Manjunath & Therien 2002). Hlavními zástupci jsou proteiny BSP-A1, BSP-A2 a BSP-A3. BSP-A1 a BSP-A2 jsou glykosylované formy stejného proteinu, jehož primární struktura je identická proteinu PDC-109 (Esch et al. 1983). PDC-109 má vysoký stupeň homologie s BSP-A3. Oba proteiny obsahují 2 tandemově uspořádané homologní domény o přibližně 40 aminokyselinách, které jsou podobné doménám typu II ve fibronektinu (Seidah et al. 1987).

BSP proteiny jsou vylučovány semennými váčky a vážou se na povrch spermií při ejakulaci. Na spermiích se vážou k fosfolipidům (Desnoyers & Manjunath 1992); převážně k fosfatidylcholinu, fosfatidylcholinu plasmalogen a sfingomyelinu. Navázání BSP proteinů k membránovým fosfolipidům může zabránit volnému pohybu fosfolipidů a stabilizovat membránu. Spermií, které jsou pokryté BSP proteiny, mohou být kapacitovány v samičím pohlavním traktu vlivem HDL (high-density lipoprotein). BSP navázané na spermií mohou interagovat s HDL, který může stimulovat odstranění cholesterolu ze spermií v samičím pohlavním traktu (Manjunath & Therien 2002). U býků mohou být spermií kapacitovány také pomocí heparinu. Navázání BSP na membránu spermií zvýší počet vazebných míst pro heparin, heparin se na ně naváže a indukuje tak kapacitaci (Visconti et al. 1998). BSP proteiny interagují s HDL a heparinem a podílí se tak na kapacitaci spermií. Kromě BSP je ale pro kapacitaci nezbytná přítomnost i jiných faktorů ve folikulární nebo ovidukální tekutině (heparin, GAGs nebo HDL), díky nimž se mohou BSP proteiny uplatnit ve správném čase na správném místě (Manjunath & Therien 2002). Proteiny BSP (PDC-109) hrají významnou úlohu při modifikaci lipidů spermií během kapacitace a akrozomální reakce. Dále se proteiny

BSP se schopností vazby na sacharidy účastní tvorby rezervoáru spermií ve vejcovodu. Připojení spermií k epitelu vejcovodu přes proteiny BSP prodlužuje jejich životaschopnost až do kapacitace (Calvete et al. 1999; Suarez & Pacey 2006). BSP proteiny jsou zřejmě zásadní, jelikož epididymální spermie, nevystavené BSP, se k oviduktu vážou velmi špatně. Pokud jsou k epididymálním spermii přidány proteiny, jakékoli ze tří BSP proteinů, jejich schopnost navázat se k epitelu se podstatně zlepšuje (Gwathmey et al. 2006). Také se ukázalo, že proteiny nemusí interagovat mezi sebou, aby došlo k navázání (Ardon & Suarez 2013).

Protein clusterin patří také mezi heparin-vázající proteiny lokalizované jak v semenné plazmě býků, tak na spermii (Howes et al. 1998). Jedná se o epididymální glykoprotein se dvěma heparinovými vazebnými místy ve své struktuře. Je mu připisována úloha v transportu lipidů.

#### **4.6 Proteiny SP hřebců**

Obsah proteinů hřebčí SP je poměrně nízký (10 mg/ml) v porovnání s ostatními savci, kde se pohybuje okolo 20–60 mg/ml (Topfer-Petersen et al. 2005). Hlavní proteiny SP hřebců (HSP-1-8) jsou nízkomolekulární 14-30 kDa a kromě HSP4 mají všechny schopnost vázat se ke spermii (Calvete et al. 1994; Topfer-Petersen et al. 2005), což naznačuje jejich potenciální roli při fertilizaci (Topfer-Petersen et al. 2005). Celková koncentrace proteinů je nejnižší v předsematické frakci a nejvyšší v první části ejakulátu. Hlavní proteiny SP HSP-1, HSP-2 a HSP-4 jsou přítomny ve všech frakcích ejakulátu, množství se významně liší mezi jednotlivými hřebci (Kareskoski et al. 2005).

HSP-1, HSP-2 jsou nejpočetnější proteiny hřebčí SP, dohromady tvoří 70-80% všech proteinů a mají homologní strukturu. Patří do rodiny heparin vázajících proteinů. HSP-1 tvoří asi 12% všech proteinů, které váží heparin a pokrývají hlavičky spermií (Calvete et al. 1994; Topfer-Petersen et al. 2005). Jsou to ke spermii periferně asociované proteiny (Calvete et al. 1994) a mohou hrát roli jako vnější regulační faktory kapacitace. Patří mezi krátké proteiny typu Fn-2 (Calvete et al. 1995b; Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005) a jsou ortology (mají stejný původ - vyvinuly se ze společného genu) hlavních heparin vázajících proteinů SP býků (BSP), které se uplatňují v časných krocích fertilizace (Topfer-Petersen et al. 2005). Proteiny typu Fn-2 jsou přítomny v průběhu celého pohlavního traktu hřebců. Většina malých proteinů s pouze dvěma Fn moduly (HSP-1 a HSP-2) je sekretována v ampulích chámovodu (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2005).

HSP-3 je členem rodiny proteinů bohatých na cystein – CRISP (cystein-rich secretory protein) (Schambony et al. 1998b). CRISP-3 (HSP-3) se primárně tvoří v ampulích chámovodu a v menší míře v jiných částech samčího pohlavního traktu (Schambony et al. 1998b; Topfer-Petersen et al. 2005). HSP-4 je příbuzný s produktem genu podobnému kalcitoninu. Bylo prokázáno, že hladiny kalcitoninu jsou v korelaci s motilitou spermií (Mungan et al. 2001). HSP-5 není příbuzný s žádnými známými proteiny. HSP-6 a 8 patří do skupiny proteinů podobných kallikreinu. Tyto proteiny mají homologii s lidským PSA (prostatic specific antigen) (Jonsson et al. 2005; Topfer-Petersen et al. 2005).

V semenné plazmě hřebců se nachází minoritní protein HSP-7 reagující s protilátkami proti kančímu proteinu vázajícímu se na *zona pellucida* AWN-1 = hřebčí AWN-like protein (okolo 16 kDa) (Calvete et al. 1994). Primárně se váže na ekvatoriální segment - to naznačuje, spolu se schopností vázat ligandy a proteinovou strukturou, že se podílí na vazbě spermie na ZP (Topfer-Petersen et al. 2005).

#### 4.6.1 Homologie proteinů SP hřebců s jinými druhy

Hřebčí proteiny HSP-1 a HSP-2 a kančí pB1 patří do stejné rodiny jako býčí heparin a fosforylcholin vázající proteiny BSP-A1/2, BSP-A3 a BSP-30K. Kvantifikace proteinů pomocí analýzy aminokyselin po separaci pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (RP-HPLC) ukázala, že proteiny HSP-1,2 a pB1 a spermadhesin AQN-1 jsou přítomny přibližně ve stejné koncentraci v hřebčí a kančí SP (ve frakci heparin a fosforylcholin vázajících proteinů). Sekvence aminokyselin proteinu pB1 je ze 60-65% shodná s hřebčím HSP-1 a býčím BSP-A1,2 (PDC-109), BSP-A3 a BSP-30K (Calvete et al. 1997). Jak již bylo zmíněno, protein HSP-7 je hřebčí homolog kančího spermadhesinu AWN. Jeho sekvence aminokyselin je rozdílná pouze ve třech místech. Stejně jako kančí AWN je jeho hřebčí homolog vázaný k hydrogenuhličitanům (Ekhlasi-Hundrieser et al. 2002).

Hlavní heparin vázající proteiny SP kanců patří do rodiny spermadhesinů (Sanz et al. 1993; Calvete et al. 1995a), které nejsou strukturálně příbuzné k rodině proteinů BSP u býků. Kančí spermadhesiny se vážou na povrch akrozomu. Býčí PDC-109 se váže k povrchu hlavičky, avšak více pevně ke střednímu oddílu spermie (Manjunath et al. 1994) a zdá se, že zahajují hyperaktivní pohyb spermie (Aumuller et al. 1988).



## 4.7 Role SP a jejích proteinů při kryokonzervaci

Technologie kryokonzervace spermií vyvolává změny struktury spermií podobné kapacitaci a akrozomální reakci (Kumar et al. 2003). Chladový šok a osmotický šok spojený s kryokonzervací může vést ke změnám v složení lipidů plazmatické membrány spermií, čímž ovlivňuje její fluiditu. Tento fenomén indukuje zvýšení membránové permeability, což vede k úniku enzymů a změnám v propustnosti membránových kanálů. V případě kančích spermií, typ mastných kyselin a rozdíly ve složení fosfolipidů jsou příčinou vysoké náchylnosti k chladovému šoku, ve srovnání se spermiemi jiných druhů (Deleeuw et al. 1990).

Faktory přítomné v SP ovlivňují metabolismus, motilitu a mrazitelnost spermií. Tyto faktory mohou být proteinové nebo neproteinové povahy (mastné kyseliny, enzymy, hormony). Kryokonzervace indukuje poškození spermií a přidání určitého množství SP do suspenze spermií může snížit možné poškození během biotechnologického procesu a manipulace. SP však může mít jak škodlivý, tak pozitivní účinek (Caballero et al. 2008). Bylo zjištěno určité pozitivní působení na parametry kvality spermatu, když byla SP přidána ke vzorkům spermatu hřebců před kryokonzervací (Aurich et al. 1996) ale také negativní nebo žádný účinek (Moore et al. 2005). Je pravděpodobné, že pozitivní nebo negativní účinek je závislý na koncentraci proteinů a době interakce se spermiemi před kryokonzervací a také na zdroji SP (Aurich et al. 1996; Moore et al. 2005). Morrell et al. (2014) dosáhli variabilních výsledků s přidávkem heterologní nebo homologní SP a také potvrzují rozdíly mezi SP od dobře nebo špatně mrazitelného hřebce (Al-Essawe et al. 2016). Vliv SP na spermie zůstává kontroverzní vzhledem k tomu, že se liší mezi jednotlivými hřebci (Katila & Kareskoski 2006) a individuální složení SP ovlivňuje vhodnost hřebčího ejakulátu ke kryokonzervaci (Aurich et al. 1996).

U kanců, kteří jsou klasifikováni jako dobře mrazitelní, SP pozitivně ovlivňuje funkce spermatu po kryokonzervaci, tím, že zvyšuje odolnost vůči chladovému šoku (Hernandez et al. 2007). Výsledky Mogielnicka-Brzozowska & Kordan (2011) naznačují, že před následky chladového šoku chrání plazmatickou membránu a akrozom kančí spermie proteiny SP vázající zinek. Jobim et al. (2004) pozorovali rozdíly v proteinovém profilu semenné plazmy býků u ejakulátů s vysokou nebo nízkou vhodností k mražení. Během mrazení spermií býků dochází ke ztrátě povrchových proteinů spermií, jako je BSP-A1/A2, BSP-A3 a BSA-30 kDa (z 40-57 % na 4-6 %), což souvisí s nárůstem předčasně kapacitovaných buněk (Nauc & Manjunath 2000).

#### 4.7.1 Využití celé semenné plazmy

Ve starší studii Aurich et al. (1996) zkoumali, jak individuální složení SP ovlivňuje vhodnost hřebců pro kryokonzervaci spermatu. Kontakt s 30% SP před kryokonzervací od hřebců s vysokou motilitou spermií po rozmrazení k ejakulátům od hřebců s nízkou motilitou spermií po rozmrazení zvýšil progresivní motilitu (PMOT; z 24% na 34%) a SP od špatně mrazitelných hřebců, přidaná k ejakulátům s vysokou motilitou po rozmrazení, naopak snížila PMOT (36-30%). Stejná myšlenka byla provedena ve studii Al-Essawe et al. (2018), kde zkoumali účinek přidání SP od dobře a špatně mrazitelných hřebců před kryokonzervací (konečný poměr SP byl 5%). Nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly v kinematických parametrech spermií (computer-assisted sperm analysis; CASA) ani mezi přidavky SP nebo mezi ejakuláty (dobře nebo špatně mrazitelné).

Také ve studii Arruda et al. (2008) nebyla motilita ovlivněna přidáním SP (25% nebo 50%) od dobře mrazitelného hřebce přidané ke vzorkům špatně mrazitelných hřebců po rozmrazení. Stejně jako ve studii De Andrade et al. (2011) přidání po rozmrazení 20% homologní a heterologní SP od dobře mrazitelných hřebců nezměnilo celkovou motilitu (TMOT) nebo mitochondriální potenciál, ale homologní SP snížila PMOT ( $P < 0,05$ ). V této studii přidání SP po rozmrazení nezměnilo parametry rychlosti spermií (VAP-average pathway velocity, VSL-straight line velocity, VCL-curvilinear velocity), avšak BCF (beat cross frequency), STR (straightness) a LIN (linearity) byly sníženy v obou SP skupinách ( $P < 0,05$ ) a 20% autologní SP snížilo ALH (amplitude of lateral head displacement) ( $P < 0,05$ ). Rozdílné výsledky mohou být dány individuální reakcí na přídavek SP a rozdíly v jejích složkách. Na druhou stranu v práci Neuhauser et al. (2014) autoři zjistili, že TMOT a PMOT se zlepšovaly se zvyšujícími se koncentracemi homologní SP přidané po rozmrazení 20 % až 50 % (50 % a 80 % poskytovaly stejné výsledky). Statisticky významné zvýšení TMOT bylo zaznamenáno s 20 a 50 % SP, rozdíl mezi přídavkem 0 a 5 % SP nebyl zaznamenán. Zajímavé je, že nebyl žádný rozdíl v motilitě spermií u SP od šesti různých hřebců-dárců, bez ohledu na koncentraci SP. Dokonce, když byla přidána SP od poníků se špatnou motilitou k rozmraženým vzorkům epididymálních spermií v poměru ředění 1: 4 (1 díl semene + 4 díly SP), přidání SP zvýšilo motilitu (TMOT, PMOT) spermií po rozmrazení. Epididymální sperma s přídavkem SP po rozmrazení navíc vykazovalo vyšší hodnoty parametrů rychlosti (VCL, VAP, VSL), ALH a BCF, ale STR a LIN byly nižší s přídavkem SP, a parametr WOB (wobble) se neměnil (Neuhauser et al. 2013). K rozdílným výsledkům došli Heise et al. (2011), kteří proplachovali ocas nadvarlat 20 ml SP a následně pracovali s těmito epididymálními vzorky

jako s ejakulovanými. Nepozorovali žádné rozdíly v PMOT mezi epididymálními vzorky vystavenými a nevystavenými SP před zmrazením. Nicméně čerstvé vzorky se SP obsahovaly více progresivně pohyblivých spermií než vzorky bez SP.

#### 4.7.2 Použití proteinových frakcí a proteinů SP

Rozdíly v účinku SP na spermie mohou být důsledkem přítomnosti, nepřítomnosti nebo rozdílné koncentrace složek SP (Usuga et al. 2017), a to zejména proteinů (Caballero et al. 2008). Existuje možný způsob, jak využít určité benefity SP a zároveň se vyhnout negativním vlivům některých složek, a to například rozdělením SP na proteinové frakce. Použití izolovaných frakcí a proteinů by zabránilo variabilitě ve složení SP (Centurion et al. 2003).

Hlavní proteiny hřebčí SP (HSP) jsou schopny vázat heparin (H<sup>+</sup>) a mohou regulovat proces kapacitace (Parrish et al. 1988). Tyto proteiny jsou spojovány s kryoteolerancí (Jobim et al. 2011) a mají možný ochranný účinek na spermie jako jejich ortologové u býků (Jobim et al. 2004). H<sup>+</sup> proteiny patří ke kapacitačním faktorům, zdá se, že stabilizují plazmatickou membránu v oblasti akrozomu před kapacitací. Předpokládá se, že složky SP připojené k povrchu ejakulovaných spermií mohou zabránit předčasné akrozomální reakci (Calvete et al. 1997). Na druhou stranu u býků (D'Amours et al. 2010; Srivastava et al. 2013a) byl zpochybněn pozitivní účinek hlavních H<sup>+</sup> proteinů na spermie. V práci Kumar et al. (2008) byl potvrzen negativní účinek H<sup>+</sup> frakce na epididymální spermie býka po kryokonzervaci. Nicméně pokud byly frakce použity v kombinaci, heparin nevázející proteinová frakce (H<sup>-</sup>) snižovala negativní účinek H<sup>+</sup> frakce. Je pravděpodobné, že v proteinové frakci H<sup>-</sup> jsou přítomny faktory s ochrannými účinky. O negativním vlivu frakce H<sup>+</sup> na spermie jsou také přesvědčeni Singh et al. (2007) a Harshan et al. (2006). V práci Singh et al. (2016) však přidání 250 µg/ml H<sup>+</sup> proteinové frakce zlepšilo *in vitro* akrozomovou reakci zmrazených a rozmrazených spermií.

Stejně jako u býků i u kančů přidání heparin vázejících a heparin nevázejících (heterodimer PSP-I/-II) spermadhesinů mělo opačný efekt na viabilitu, motilitu a mitochondriální aktivitu spermií (Caballero et al. 2008). Heparin vázející proteiny (H<sup>+</sup>) mají výrazný škodlivý efekt, na čase a koncentraci závislý, zatímco PSP-I/-II (H<sup>-</sup>) funkci vysoce ředěných kančích spermií zachovávají. Příznivý účinek proteinů PSP-I/-II je na koncentraci závislý (s optimální koncentrací 1,5 mg/ml odpovídající 10% nezpracované prvotní SP) (Centurion et al. 2003). V práci Garcia et al. (2006) se ukázalo, že podjednotky PSP-I a PSP-II mají různé vlivy na biologické vlastnosti a ochranný účinek byl způsoben hlavně peptidovou částí těchto proteinů. Hlavní protein SP býků, protein PDC-109 (BSP-A1/A2), indukuje změny plazmatické membrány stimulací odstraňování cholesterolu a fosfolipidů. Odstranění lipidů,

hlavně cholesterolu, vede k destabilizaci membrány, snižuje se odolnost k chladovému šoku a mražení. Působením stresorů během kryokonzervace dochází k předčasné kapacitaci a akrozomální reakci. Pozitivní či škodlivý efekt PDC-109 je závislý na délce působení a koncentraci (Srivastava et al. 2013b).

## 5 Cíle a hypotézy

Na základě dostupných informací byly stanoveny následující hypotézy:

1. špatně a dobře mrazitelní hřebci se liší v zastoupení subpopulací spermií v rozmražené inseminační dávce
2. semenná plazma od dobře mrazitelných hřebců zlepšuje funkční parametry kryokonzervovaných spermií hřebců, kteří jsou klasifikováni jako špatně mrazitelní
3. proteinové frakce semenné plazmy hřebců přidávané do kryokonzervačního média ovlivňují kvalitu spermií po rozmrazení

K ověření hypotéz byly stanoveny tyto cíle:

1. ověřit hypotézu, že se špatně a dobře mrazitelní hřebci liší v charakteristice pohybu spermií po rozmrazení
2. zjistit efekt přídatku semenné plazmy od dobře mrazitelných hřebců na spermie hřebců, kteří jsou klasifikováni jako špatně mrazitelní
3. zjistit efekt proteinových frakcí semenné plazmy na mrazitelnost hřebčích spermií

## **6 Materiál a metody**

### **6.1 Experiment I**

Pro ověření 1. hypotézy byl proveden experiment I: Hodnocení zastoupení subpopulací motilních spermií v rozmražených ejakulátech špatně a dobře mrazitelných hřebců.

#### **Odběr a zpracování ejakulátu**

Ejakulát byl odebírán od 24 hřebců v certifikovaném reprodukčním centru (CZ 53790026, Equine Reproduction Centre Ltd., Pardubice-Mnětice, Česká Republika). Spermatická frakce byla odebírána standardním způsobem pomocí otevřeného typu umělé vagíny. Bezprostředně po odběru byly hodnoceny objem spermatu (laboratorní váhy, Minitube, Německo), koncentrace (fotometr SDM 1, Minitube) a motilita spermií (Eclipse E600, Nikon, Japonsko). Shromážděné frakce bohaté na spermie byly předředěny ředidlem na bázi odstředěného mléka (Kenneyho ředidlo připravované v naší laboratoři, obsahující odstředěné mléko a glukózu) a 15 minut centrifugovány při 650 g. Následně byl odstraněn supernatant a pelety spermií byly naředěny ředidlem Gent (Minitube, Germany). Finální koncentrace progresivně se pohybujících spermií byla v každé dávce  $350 \times 10^6$  v mililitru. Naředěný ejakulát byl následně balen do 0,5 ml pejet. Pejety byly mrazeny v parách tekutého dusíku, umístěné v horizontální pozici 4 cm nad jeho hladinou po dobu 15 minut (Animal Reproduction systems, Chino, USA) a následně uloženy do tekutého dusíku. Inseminační dávky (ID) byly rozmrazeny při teplotě 37°C po dobu 30s.

#### **Hodnocení parametrů motility spermií**

Po naředění byly hodnoceny kinematické parametry rozmražených dávek v čase T0 (po 5 min pre-inkubace při 37°C ve vodní lázni) a v čase T30 (po 30 min inkubace při 37°C ve vodní lázni). Motilita spermií byla měřena pomocí modulu CASA (Nis-Elements, verze 4.50, Laboratory Imaging, Česká republika). Do 37°C předeřáté komory Makler (Sefi-Medical Instrument, Izrael) bylo aplikováno 4  $\mu$ l každého vzorku spermatu a následně bylo snímáno šest polí na vzorek za použití fázového mikroskopu (Eclipse E600, Nikon, Japonsko) vybaveného výhřevnou deskou předeřátou na 37°C při 100 násobném zvětšení. Hodnocení bylo založeno na analýze 41 po sobě jdoucích digitalizovaných obrazů, které byly pořízeny v časovém úseku 0,66 s fotoaparátem s frekvencí 60 fps (DMK 23UM021; Imaging Source, Německo). Byly hodnoceny následující parametry motility: celková motilita (TMOT, %), progresivní motilita

(PMOT, %), křivočará rychlost (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), přímočará rychlost (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), průměrná rychlost na dráze (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), linearita (LIN, %), přímot (STR, %), kmitání bičíku (WOB, %), amplituda laterálního vybočení hlavičky spermie (ALH,  $\mu\text{m}$ ) a frekvence kmitu bičíku (BCF, Hz). Prahové hodnoty STR a VAP pro progresivní motilitu byly 50 % a 30  $\mu\text{m/s}$ . Spermie byly považovány za pohyblivé, když VAP >15  $\mu\text{m/s}$ .

### **Úprava dat**

K úpravě a analýze dat byl použit software R (R Core Team 2019). Byly vytvořeny čtyři soubory dat na základě času inkubace a mrazitelnosti hřebce. Mrazitelnost byla stanovena na základě celkové motility (TMOT). Dobře mrazitelní hřebci mají TMOT větší či rovno 30 % ze všech hodnocených dávek, špatně mrazitelní hřebci tuto podmínku nesplňují. Pro další analýzu byly použity pouze spermie motilní. Soubory obsahovaly sloučené hodnoty vybraných parametrů pro klastrovou analýzu hřebců v dané kategorii (spermie dobře a špatně mrazitelných hřebců hodnocené v čase inkubace T0 a T30).

### **Klastrová analýza**

U kinematických parametrů spermií získaných pomocí CASA byl vyhodnocen variační koeficient pro jednotlivé parametry v jednotlivých souborech k selekci parametrů s reprezentačním významem pro daná data. Pro variační koeficient byl stanoven limit 40 %, kde takové parametry motility, které měly průměrný variační koeficient menší, než stanovený limit 40 %, nebyly použity v klastrové analýze. Takovou podmínku nesplnily dva parametry, a to STR a WOB.

### **Statistická analýza**

Statistická analýza byla provedena v programu Statistica software (StatSoft, ver. 12, CZ) a v R výpočetním prostředí (R Core Team, 2019). Rovina statistické významnosti byla stanovena na  $P < 0,05$ . Pokud není uvedeno jinak, výsledky jsou předkládány jako  $\text{LSM} \pm \text{SEM}$ . Studentův t-test byl použit ke stanovení statistické průkaznosti rozdělení hřebců do kategorie špatně a dobře mrazitelných na základě TMOT a PMOT. Pomocí  $\chi^2$  testu byly porovnány středové (průměrné) hodnoty jednotlivých parametrů motility mezi zvolenými soubory k vyhodnocení rozdílů mezi subpopulacemi v jednotlivých skupinách. Jednokroková analýza rozptylu (ANOVA) byla využita společně s testy Wilks a Scheffe vícenásobné srovnání subpopulací mezi datovými soubory. Porovnávány byly soubory dat o různé mrazitelnosti a stejné době inkubace nebo stejné mrazitelnosti a jiné době inkubace.

## 6.2 Experiment II

K ověření druhé hypotézy, byl proveden experiment II: Přidání semenné plazmy od dobře mrazitelných hřebců k rozmraženým dávkám špatně mrazitelných hřebců.

### Semenná plazma

Ejakuláty byly získány standardním odběrem s využitím otevřeného typu umělé vagíny. Získané sperma bylo odstředěno pro odstranění spermií (700 g, 10 min) a následovala centrifugace při 10 000 g po dobu 10 minut a supernatant bez spermií byl odstraněn a zmrazen při -80 ° C až do doby použití.

V tomto experimentu byli použiti dva hřebci, jako dárci SP. První byl "dobře mrazitelný" hřelec (standardní SP, S-SP) s motilitou po rozmrazení v průměru 35%. Druhý byl hřelec s nadstandardními (nadstandardní SP, N-SP) parametry motility nativního ejakulátu (> 95%), podobně jako u spermií rozmrazených (60-70%).

### Odběr ejakulátu

Odběr ejakulátu byl proveden v certifikovaném reprodukčním centru (ERC s.r.o., Pardubice-Mnětice, Česká republika). Semeno (frakce bohaté na spermie) od deseti hřebců bylo odebráno pomocí otevřeného typu umělé vagíny.

### Zpracování semene

Shodně jako v experimentu I bylo semeno po odběru zhodnoceno a odstředěno centrifugací. Poté byl supernatant odstraněn a pelety spermií byly zředěny laktózovým-EDTA ředidlem, které bylo vyrobeno v ERC. Ředidlo L-EDTA obsahuje laktózu, destilovanou vodu, glycerol, pufovací soli, antibiotika, EDTA a 20% (v / v) vaječného žloutku. Připravené ejakuláty byly zředěny na konečnou koncentraci alespoň  $350 \times 10^6$  progresivně pohyblivých spermií na inseminační dávku (ID) a plněny do 5 ml hliníkových tub. Poté byly tuby ekvilibrovány při 5 ° C po dobu 2 hodin a následně mrazeny v parách tekutého dusíku. Tuby byly rozmrazeny při 37 ° C po dobu 60 s. Po rozmrazení spermií byly vzorky rozděleny do tří alikvot, které byly zředěny buď fyziologickým roztokem (kontrolní skupina, K) nebo S-SP popř. N-SP; kdy byly oba vzorky semenné plazmy přidány ve finální koncentraci 33,3% (v / v).



## **Hodnocení parametrů kvality spermatu**

Kvalitativní parametry byly hodnoceny u rozmrazených vzorků 5 minut po rozmrazení (T0) a po 30 minutách inkubace se semennou plazmou při teplotě 37°C (T30).

### *Počítačová analýza spermií*

Motilita spermií byla měřena pomocí modulu CASA (viz. experiment I). Rozdělení spermií do pomalé, středně rychlé a rychlé subpopulace bylo založeno na průměrných hodnotách STR, VAP, VCL a VSL po shlukové analýze (viz. Statistická analýza) (Sichtar et al. 2017).

### *Viabilita*

Pro získání procentuálního zastoupení živých a mrtvých spermií bylo využito barvení pomocí eosinu / nigrosinu. Barvivo eosin prochází membránou mrtvých buněk a barví tak jejich hlavičky na růžovo, hlavičky živých buněk zůstávají neobarvené. Nigrosin je využíván k obarvení pozadí vzorku. Byly připraveny dva nátěry na každý rozmrazený vzorek a bylo hodnoceno minimálně 200 spermií na sklíčku za použití světelného mikroskopu.

### *Integrita plazmatické membrány*

Na vyhodnocení funkční integrity plazmatické membrány spermií byl použit hypoosmotický test (HOS). Po 30 minutách inkubace v hypoosmotickém roztoku (7,35 g citrátu sodného; 13,51 g fruktózy rozpuštěné v 1000 ml destilované vody s konečnou osmolaritou 150 mOsmol/litr) ve vodní lázni o teplotě 37°C, byla vyhodnocena reakce spermií na roztěru pomocí mikroskopie s fázovým kontrastem (Eclipse E600, Nikon) a to minimálně u 200 buněk. Procento spermií s typicky ohnutým bičíkem (HOS+) indikuje přítomnost spermií s funkční a intaktní plazmatickou membránou.

## **Statistická analýza**

Data byla statisticky vyhodnocena pomocí softwaru STATISTICA (verze 12, StatSoft, CZ). Účinek přídatku semenné plazmy na TMOT, PMOT, vybrané kinematické parametry, životaschopnost a integritu plazmatické membrány byly vyhodnoceny analýzou rozptylu (ANOVA). Pro vyhodnocení motility byla použita klastrová analýza pro klasifikaci spermií do subpopulací. Euklidovské vzdálenosti byly vypočítány ze čtyř proměnných - STR, VAP, VCL a VSL. K určení rozdílů mezi subpopulacemi byl použit  $\chi^2$  test. Data byla vyhodnocena na úrovni  $P < 0,05$  a jsou uváděna jako Least Squares Means (LSM)  $\pm$  standard error of the means (SEM).

### 6.3 Experiment III

Experiment III k ověření hypotézy 3: Přídavek heparin vázající a heparin nevážící proteinové frakce semenné plazmy k hřebčím ejakulátům před mražením.

#### Zpracování semenné plazmy

Semenná plazma (SP) byla po odběru v certifikovaném Equinním reprodukčním centru s.r.o. (ERC) získána shodným způsobem jako v případě experimentu II a uskladněna při  $-80^{\circ}\text{C}$  až do konečného zpracování.

#### Izolace proteinových frakcí semenné plazmy

Proteiny semenné plazmy byly separovány na afinitním nosiči Heparin-Sepharose (GE Healthcare, Švédsko) na dvě frakce: heparin vázající (H+) a heparin nevážící (H-), které byly po dialýze a lyofilizaci přidávány do kryokonzervačního média ve třech koncentracích: 125  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$  a 500  $\mu\text{g/ml}$ . Před separací byly vzorky SP rozmrazeny a odstředěny po dobu 5 min, 10 000 g. Supernatant byl poté nanesen na kolonu Heparin-Sepharose (GE Healthcare) napojenou k pumpě a automatickému sběrači. Při sběru H- frakce byl průtok pumpy nastaven na 1,5 ml/10 min, zkumavka na sběrači byla měněna každých 10 min. Kolona byla při sběru H- frakce připojena k zásobnímu roztoku PBS, kterým byla kolona po nasátí SP po dobu separace (150 min) promývána. Pro sběr H+ frakce byla kolona přepojena na zásobní roztok 3M NaCl v PBS, který při zvýšeném průtoku na 4ml/10 min po dobu 60 min uvolňoval navázané proteiny z kolony. Po separaci byly všechny odebrané vzorky proměřeny spektrofotometrem (Biochrom, Libra S22, Fisher Scientific) při vlnové délce 280 nm na obsah proteinů. Frakce s absorbcí nad 0,03 mg/ml byly zamrazeny. Získané proteinové frakce byly následně dialyzovány a lyofilizovány. Dialýza probíhala po dobu 48 hodin v 3% roztoku kyseliny octové ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Byla použita dialyzační membrána Membrana-Cel Dialysis Tubing (MWCO 3500, SERVA). Roztok  $\text{CH}_3\text{COOH}$  byl pravidelně měněn pro odstranění všech solí z roztoku proteinových frakcí. Po dialýze byly frakce proměřeny na konduktometru (Eutech ECTestr 11, OAKTON Instruments) pro stanovení obsahu solí a kontrolu účinnosti dialýzy. Následně byly vzorky proteinových frakcí v lyofilizačních baňkách zamrazeny a poté lyofilizovány (LYOVAC GT 2 E, FINN-AQUA).

## **Odběr spermií, mrazení**

Čerstvý ejakulát byl odebírán hřebcům v Zemském hřebčinci Písek, s.p.o. pomocí otevřeného typu umělé vagíny a odebrané semeno bylo dále zpracováno standardním způsobem přípravy komerční inseminační dávky (viz. experiment II) a uloženo v 0,5 ml pejetách v tekutém dusíku.

## **Stanovení parametrů kvality spermií**

Každý ejakulát byl hodnocen po rozmrazení (37°C, 30 s) a naředění Tyrodovým roztokem modifikovaným pro spermie (Sp-TALP) (114 mM NaCl; 3,2 mM KCl; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0,34 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O; 10 mM laktát sodný; 2,0 mM CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O; 10 mM HEPES, redestilovaná Milli-Q voda).

### *Počítačem řízená analýza spermií*

Motilita byla měřena pomocí systému CASA a hodnoceny byly parametry TMOT, PMOT, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH a BCF (viz. experiment I).

### *Viabilita a stav akrozomu spermií*

Poměr živých a mrtvých spermií a poškození a stav akrozomální membrány byl stanoven pomocí průtokového cytometru (BD LSRFortessa™ SORP) s využitím fluorescenčních barev – propidium iodide (PI) barvicí mrtvé spermie, HOECHST 33342, který barví jádra buněk a pomůže v odlišení nebuněčných komponent ejakulátu a s fluorochromem konjugovaným PNA lektinem, který se váže na akrozomální membránu.

Pejety byly rozmrazeny (30 s, 37°C), následovala centrifugace v sp-TALP 5 min 700xg, po odstranění supernatantu bylo odebráno 5 µl pelety spermií. Spermie byly rozředěny v 1 ml sp-TALP a ke vzorku byly přidány fluorescenční barvy – HOECHST 5 µl, PI 5 µl a PNA-FITC 1 µl. Takto připravené vzorky byly hodnoceny průtokovou cytometrií. Hodnoceno bylo minimálně 30 tis. buněk na vzorek. Pro zobrazení signálu FITC (PNA) byl použit laser o excitaci 488 nm a 525 nm filtr emise, pro PI excitace 561 nm a emise 610 nm, pro HOECHST excitace 346 nm a emise 460 nm. Napětí bylo nastaveno pro optimální snímání signálu podle kontrolních vzorků s jednotlivými samostatnými fluorescenčními barvami. Před samotným měřením byly pro vhodné nastavení průtokového cytometru připraveny negativní vzorky, bez přídavku fluorescenčních barviv, pro eliminaci případné autofluorescence.

### *Míra fosforylace spermií*

Zvýšená míra fosforylace proteinů spermií značí nastupující kapacitaci a tím zkrácení doby jejich životaschopnosti. Vzorky spermií po rozmrazení byly zafixovány v roztoku

formaldehydu a fosforylace byla hodnocena pomocí protilátky proti fosfotyrosinu (4G10, Millipore) s využitím zobrazovací průtokové cytometrie na přístroji AMNIS (Amnis® ImageStream® XMark II, AMNIS Luminex Corporation, Austin, USA). Data byla analyzována v softwaru IDEAS verze 6.0 (AMNIS Luminex Corporation). Optimální nastavení pro hodnocení signálu bylo získáno pomocí kontrolních vzorků s jednotlivými fluorescenčními barvivy. Před měřením byly připraveny negativní vzorky pro správné nastavení průtokového cytometru, aby se vyloučila možná autofluorescence.

### **Statistická analýza**

Data byla statisticky vyhodnocena pomocí softwaru STATISTICA (verze 12, StatSoft, CZ) stejným způsobem jako v případě experimentu II.

## 7 Výsledky a diskuze

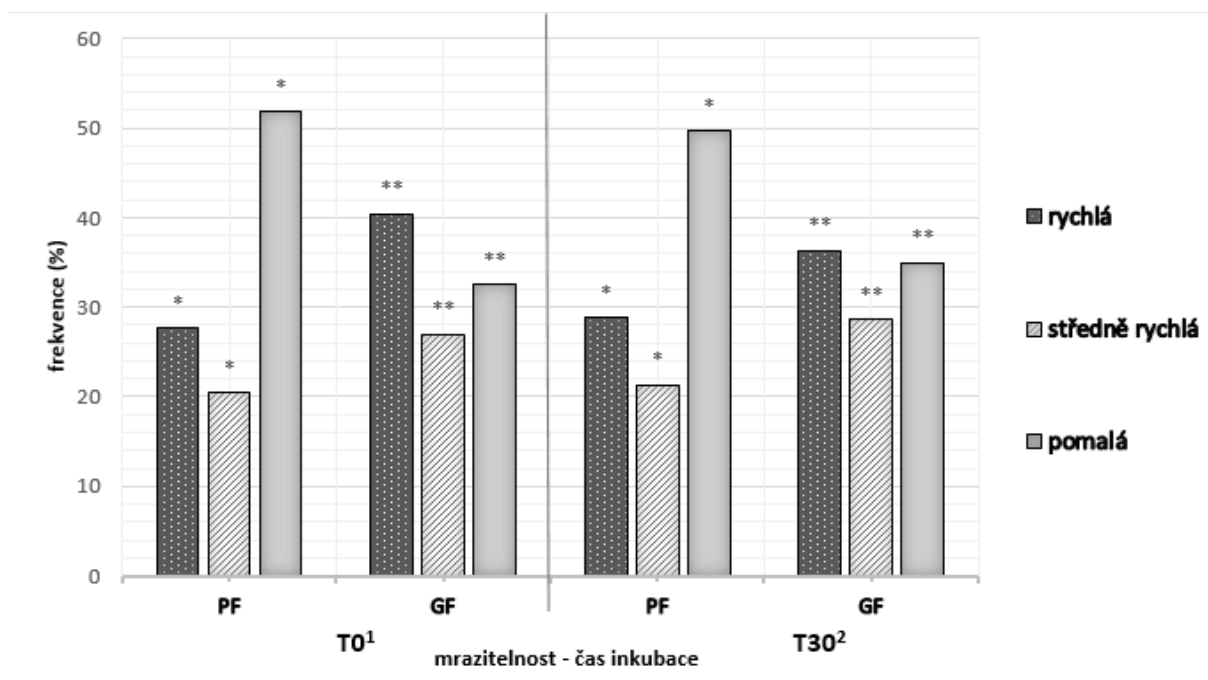
### 7.1 Výsledky experiment I

V experimentu I, zaměřeného na porovnání zastoupení subpopulací motilních spermií mezi hřebci, kteří jsou klasifikováni jako špatně a dobře mrazitelní, byl zjištěn signifikantní vliv mrazitelnosti hřebce a také doby inkubace po rozmražení na rozložení subpopulací i hodnoty kinematických parametrů spermií ( $P < 0,05$ ).

#### Procentuální zastoupení spermií v subpopulacích

Z hodnot kinematických parametrů získaných z hodnocení pomocí CASA systému, byla pomocí klastrové analýzy získána data popisující 3, respektive 4 subpopulace spermií špatně (poor freezers - PF) a dobře (good freezers - GF) mrazitelných hřebců v jednotlivých souborech (graf 1, 2). Procentuální zastoupení spermií v jednotlivých subpopulacích je pro PF a GF hřebce různé ( $P < 0,05$ ). Při rozdělení na 3 subpopulace (Graf 1) v čase inkubace T0 i T30 mají PF hřebci nižší zastoupení v rychlé a středně rychlé subpopulaci a vyšší zastoupení spermií v pomalé subpopulaci než GF hřebci ( $P < 0,05$ ).

**Graf 1:** Procentuální zastoupení spermií v rychlé, střední a pomalé subpopulaci dobře a špatně mrazitelných hřebců v čase inkubace T0 a T30 rozdělené klastrovou analýzou na tři subpopulace,  $n=24$ .

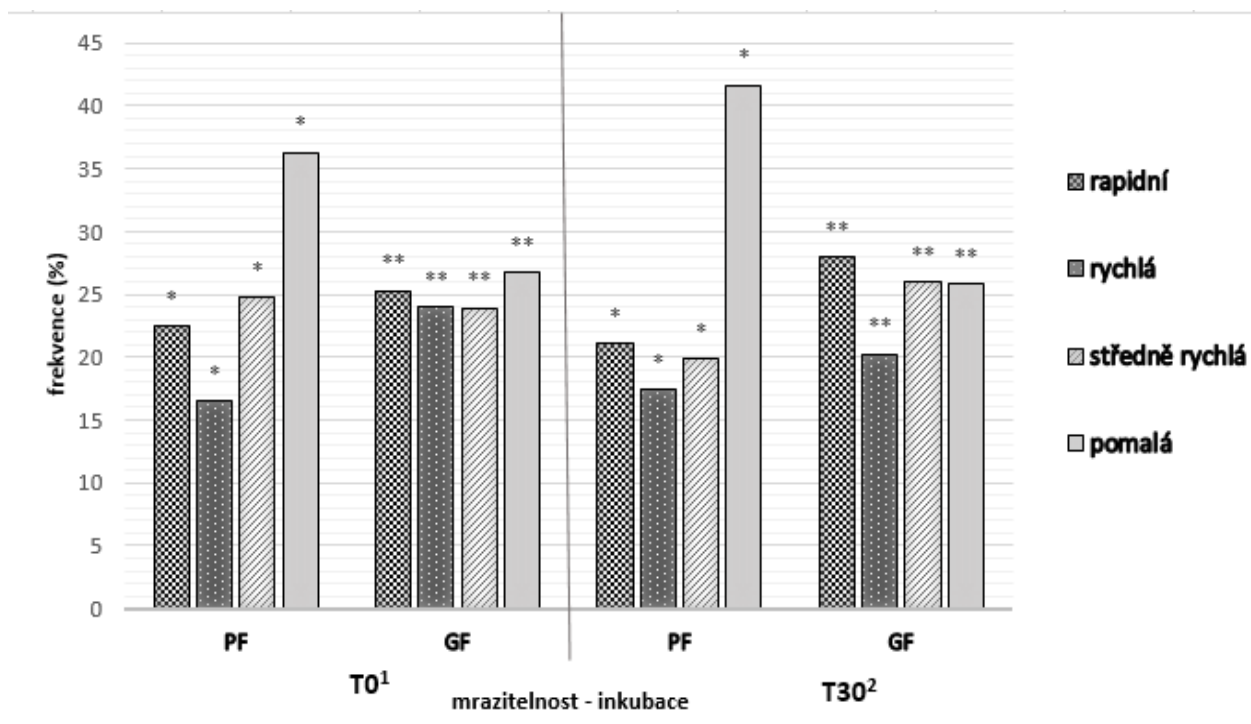


\*,\*\* statisticky signifikantní rozdíly v rámci dané subpopulace mezi špatně (PF) a dobře (GF) mrazitelnými hřebci ve stejném čase inkubace ( $P < 0,05$ )

1,2 statisticky signifikantní rozdíly v rámci dané subpopulace a skupiny hřebců (PF a GF) mezi časy inkubace T0 ihned po rozmražení a po 30 minutách inkubace při 37°C (T30) ( $P < 0,05$ )

Při rozdělení motilních spermií na čtyři subpopulace - rapidní, rychlou, středně rychlou a pomalou (graf 2), je v čase inkubace T0 i T30 rapidní a rychlá subpopulace spermií a v čase T30 i středně rychlá subpopulace spermií PF hřebců zastoupena méně než u GF hřebců ( $P < 0,05$ ).

**Graf 2:** Procentuální zastoupení spermií rapidní, rychlé, středně rychlé a pomalé subpopulace spermií dobře a špatně mrazitelných hřebců v čase inkubace T0 a T30 rozdělené klastrovou analýzou na čtyři subpopulace,  $n=24$ .



\*,\*\* statisticky signifikantní rozdíly v rámci dané subpopulace mezi špatně(PF) a dobře (GF) mrazitelnými hřebci ve stejném čase inkubace ( $P < 0,05$ )

1,2 statisticky signifikantní rozdíly v rámci dané subpopulace a skupiny hřebců (PF a GF) mezi časy inkubace T0 a T30 ( $P < 0,05$ )

## Vliv mrazitelnosti hřebců na výskyt subpopulací spermií v rozmraženém ejakulátu

### Tři subpopulace

Výsledné hodnoty parametrů motility u jednotlivých testovaných skupin v rámci subpopulací spermií jsou ukázány v tabulce 2 v podobě  $LSM \pm SEM$  (střední hodnota průměru  $\pm$  standardní chyba střední hodnoty), s hladinou významnosti  $P < 0,05$ .

**Tabulka 2:** Hodnoty parametrů motility jednotlivých subpopulací spermií při rozdělení do tří klastrů ve formě  $LSM \pm SEM$ ,  $n=24$ .

Subpopulace	čas inkubace - mrazitelnost		ALH ( $\mu\text{m}$ )	BCF (Hz)	LIN (%)	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )
rychlá	T0	PF	$7,0 \pm 0,0^1$	$13,3 \pm 0,1^1$	$47,5 \pm 0,3^1$	$109,7 \pm 0,4^1$	$210,4 \pm 0,9^1$	$95,0 \pm 0,4$
		GF	$6,3 \pm 0,0^2$	$14,4 \pm 0,1^2$	$50,8 \pm 0,1^2$	$104,3 \pm 0,2^2$	$189,2 \pm 0,4^2$	$94,0 \pm 0,2$
	T30	PF	$5,8 \pm 0,0$	$17,5 \pm 0,2^1$	$61,6 \pm 0,4^1$	$95,9 \pm 0,4^1$	$154,1 \pm 0,9^1$	$90,3 \pm 0,5^1$
		GF	$5,9 \pm 0,0$	$14,7 \pm 0,1^2$	$50,9 \pm 0,2^2$	$98,5 \pm 0,2^2$	$178,1 \pm 0,4^2$	$88,1 \pm 0,2^2$
středně rychlá	T0	PF	$3,7 \pm 0,0$	$17,9 \pm 0,2^1$	$56,3 \pm 0,4^1$	$58,5 \pm 0,5^1$	$99,7 \pm 1,0$	$54,2 \pm 0,5^1$
		GF	$3,7 \pm 0,0$	$21,5 \pm 0,1^2$	$67,4 \pm 0,2^2$	$67,1 \pm 0,2^2$	$98,6 \pm 0,5$	$64,4 \pm 0,2^2$
	T30	PF	$5,6 \pm 0,1^1$	$9,6 \pm 0,2^1$	$30,6 \pm 0,4^1$	$68,8 \pm 0,5^1$	$169,8 \pm 1,1^1$	$49,5 \pm 0,5^1$
		GF	$3,6 \pm 0,0^2$	$20,3 \pm 0,1^2$	$65,9 \pm 0,2^2$	$63,8 \pm 0,2^2$	$95,9 \pm 0,4^2$	$61,2 \pm 0,2^2$
pomalá	T0	PF	$3,9 \pm 0,0^1$	$8,3 \pm 0,1^1$	$25,5 \pm 0,2^1$	$37,5 \pm 0,3^1$	$104,6 \pm 0,7^1$	$23,3 \pm 0,3^1$
		GF	$3,2 \pm 0,0^2$	$9,8 \pm 0,1^2$	$35,0 \pm 0,1^2$	$35,2 \pm 0,2^2$	$83,4 \pm 0,4^2$	$27,3 \pm 0,2^2$
	T30	PF	$3,0 \pm 0,0$	$9,3 \pm 0,1^1$	$32,9 \pm 0,3^1$	$28,2 \pm 0,3^1$	$72,2 \pm 0,7^1$	$22,1 \pm 0,4^1$
		GF	$3,0 \pm 0,0$	$10,1 \pm 0,1^2$	$36,4 \pm 0,2^2$	$32,1 \pm 0,2^2$	$75,3 \pm 0,4^2$	$25,9 \pm 0,2^2$

<sup>1,2</sup> rozdílné indexy značí statisticky průkazný rozdíl mezi dobře (GF) a špatně (PF) mrazitelnými hřebci v jednotlivých časech inkubace (T0; T30) ( $P < 0,05$ ). CASA parametry: amplituda laterálního vybočení hlavičky (ALH,  $\mu\text{m}$ ), frekvence křížení (BCF, Hz), linearita (LIN, %), přímost (STR, %), rychlost po průměrné dráze (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), rychlost po skutečné dráze (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), rychlost po napřimené dráze (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), kmitání (WOB, %).

### Čas inkubace T0

Rychlá subpopulace spermií PF a GF hřebců v čase inkubace T0 je rozdílná ve všech průměrných hodnotách kinematických parametrů ( $P < 0,05$ ), kromě VSL. Hodnoty parametrů ALH a LIN u rychlé subpopulace značí nižší progresivitu spermií špatně mrazitelných (PF) hřebců než u dobře mrazitelných (GF), ale za to jsou rychlejší ve všech rychlostních parametrech.

Středně rychlá populace spermií se vyznačuje vysokou linearitou a progresivními spermii u obou kategorií hřebců. Spermie GF hřebců jsou na základě parametrů LIN a BCL přímější ve svém pohybu s vyšší oscilací bičíku než spermie PF hřebců.

Pomalá spermie obou kategorií hřebců má nízkou linearitu, je neprogresivní a ze všech subpopulací má nejnižší BCF. Všechny rozdíly mezi parametry pomalé subpopulace mezi PF a GF hřebci jsou statisticky signifikantní ( $P < 0,05$ ).

### **Čas inkubace T30**

U rychlé subpopulace spermií v čase T30 jsou všechny rozdíly mezi parametry pro obě kategorie mrazitelnosti statisticky signifikantní ( $P < 0,05$ ), kromě hodnoty ALH. Hodnoty parametrů VAP, VCL jsou nižší pro PF hřebce a naopak VSL, BCF a LIN je vyšší.

Středně rychlá spermie PF hřebců je nepřímá, se střední hodnotou ALH a nízkým BCF, naopak středně rychlá spermie GF má přímou trajektorii, s nízkou amplitudou hlavičky a vysokým BCF. Opět z rychlostních parametrů jsou VAP a VCL vyšší u PF hřebců a VSL je vyšší u GF.

Subpopulace pomalých spermií není rozdílná v parametru ALH mezi PF a GF hřebci, ostatní parametry nesou signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ). Spermie PF hřebců jsou pomalejší ve všech kinematických parametrech v porovnání s GF.

### **Čtyři subpopulace**

Hodnoty všech kinematických parametrů sledovaných ihned po rozmrazení (T0) se mezi dobře a špatně mrazitelnými hřebci statisticky průkazně liší ( $P < 0,05$ ), jak je uvedeno v tabulce 3.



*Tabulka 3: Hodnoty parametrů motility jednotlivých subpopulací spermií při rozdělení do 4 subpopulací ve formě LSM ± SEM, n=24.*

Subpopulace	čas inkubace - mrazitelnost		ALH ( $\mu\text{m}$ )	BCF (Hz)	LIN (%)	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )
rapidní	T0	PF	7,0 ± 0,0 <sup>1</sup>	9,8 ± 0,1 <sup>1</sup>	39,0 ± 0,3 <sup>1</sup>	103,0 ± 0,4 <sup>1</sup>	220,5 ± 0,9 <sup>1</sup>	82,5 ± 0,4 <sup>1</sup>
		GF	6,6 ± 0,0 <sup>2</sup>	18,0 ± 0,1 <sup>2</sup>	56,6 ± 0,2 <sup>2</sup>	113,5 ± 0,2 <sup>2</sup>	192,4 ± 0,4 <sup>2</sup>	106,1 ± 0,2 <sup>2</sup>
	T30	PF	6,5 ± 0,1 <sup>1</sup>	16,4 ± 0,2 <sup>1</sup>	57,9 ± 0,4 <sup>1</sup>	107,6 ± 0,5 <sup>1</sup>	180,9 ± 1,0	100,4 ± 0,5 <sup>1</sup>
		GF	5,9 ± 0,0 <sup>2</sup>	11,9 ± 0,1 <sup>2</sup>	47,0 ± 0,2 <sup>2</sup>	96,4 ± 0,2 <sup>2</sup>	182,8 ± 0,4	84,0 ± 0,2 <sup>2</sup>
rychlá	T0	PF	5,9 ± 0,1 <sup>1</sup>	20,8 ± 0,2 <sup>1</sup>	61,3 ± 0,4 <sup>1</sup>	102,3 ± 0,5 <sup>1</sup>	161,6 ± 1,1 <sup>1</sup>	96,0 ± 0,5 <sup>1</sup>
		GF	5,4 ± 0,0 <sup>2</sup>	10,4 ± 0,1 <sup>2</sup>	43,3 ± 0,2 <sup>2</sup>	83,2 ± 0,2 <sup>2</sup>	168,1 ± 0,4 <sup>2</sup>	69,7 ± 0,2 <sup>2</sup>
	T30	PF	5,7 ± 0,1 <sup>1</sup>	9,1 ± 0,2 <sup>1</sup>	26,9 ± 0,4 <sup>1</sup>	67,3 ± 0,5 <sup>1</sup>	173,7 ± 1,1 <sup>1</sup>	45,2 ± 0,5 <sup>1</sup>
		GF	4,9 ± 0,0 <sup>2</sup>	23,3 ± 0,1 <sup>2</sup>	65,7 ± 0,2 <sup>2</sup>	90,1 ± 0,2 <sup>2</sup>	135,5 ± 0,5 <sup>2</sup>	86,2 ± 0,2 <sup>2</sup>
středně rychlá	T0	PF	3,1 ± 0,0 <sup>1</sup>	13,5 ± 0,1 <sup>1</sup>	47,3 ± 0,3 <sup>1</sup>	40,5 ± 0,4 <sup>1</sup>	80,2 ± 0,9 <sup>1</sup>	36,6 ± 0,4 <sup>1</sup>
		GF	3,5 ± 0,0 <sup>2</sup>	21,6 ± 0,2 <sup>2</sup>	68,0 ± 0,2 <sup>2</sup>	63,3 ± 0,2 <sup>2</sup>	92,2 ± 0,4 <sup>2</sup>	60,8 ± 0,2 <sup>2</sup>
	T30	PF	3,7 ± 0,1 <sup>1</sup>	16,5 ± 0,2	59,8 ± 0,4	56,2 ± 0,5 <sup>1</sup>	91,8 ± 1,1 <sup>1</sup>	53,1 ± 0,5 <sup>1</sup>
		GF	3,1 ± 0,0 <sup>2</sup>	16,3 ± 0,2	60,0 ± 0,2	49,4 ± 0,2 <sup>2</sup>	81,5 ± 0,4 <sup>2</sup>	46,8 ± 0,2 <sup>2</sup>
pomalá	T0	PF	4,0 ± 0,0 <sup>1</sup>	7,5 ± 0,1 <sup>1</sup>	20,9 ± 0,3 <sup>1</sup>	36,0 ± 0,3 <sup>1</sup>	107,3 ± 0,7 <sup>1</sup>	20,2 ± 0,3 <sup>1</sup>
		GF	2,9 ± 0,0 <sup>2</sup>	9,8 ± 0,2 <sup>2</sup>	34,2 ± 0,2 <sup>2</sup>	29,6 ± 0,2 <sup>2</sup>	71,7 ± 0,4 <sup>2</sup>	23,0 ± 0,2 <sup>2</sup>
	T30	PF	3,0 ± 0,0	8,2 ± 0,1 <sup>1</sup>	28,7 ± 0,3 <sup>1</sup>	26,1 ± 0,4 <sup>1</sup>	72,2 ± 0,7	19,4 ± 0,4 <sup>1</sup>
		GF	2,9 ± 0,0	9,3 ± 0,1 <sup>2</sup>	31,4 ± 0,2 <sup>2</sup>	28,6 ± 0,2 <sup>2</sup>	73,1 ± 0,4	21,6 ± 0,2 <sup>2</sup>

<sup>1,2</sup> Rozdílné indexy značí statisticky průkazný rozdíl mezi dobře (GF) a špatně (PF) mrazitelnými hřebci v jednotlivých časech inkubace (T0; T30) ( $P < 0,05$ ). CASA parametry: amplituda laterálního vybočení hlavičky (ALH,  $\mu\text{m}$ ), frekvence křížení (BCF, Hz), linearita (LIN, %), přímost (STR, %), rychlost po průměrné dráze (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), rychlost po skutečné dráze (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), rychlost po napřimené dráze (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), kmitání (WOB, %).

Rapidní subpopulace obsahuje spermie přímé s vysokou rychlostí a pravděpodobně hyperaktivované. BCF, LIN a hodnoty rychlostních parametrů VAP a VSL jsou nižší u PF hřebců, naopak je tomu u parametru VCL a ALH.

Rychlá spermie se vyznačuje střední hodnotou amplitudy hlavičky, vyšší hodnotou BCF a LIN ( $P < 0,05$ ). ALH, BCF a LIN má vyšší hodnoty u PF hřebců než u GF, stejně tak rychlost po průměrné dráze a VSL.

Středně rychlá spermie má nižší ALH, vysoké BCF a je nejpřímější ve směru pohybu ( $P < 0,05$ ). Hodnota parametrů ALH, BCF a LIN je nižší u PF hřebců než u GF, stejně tak rychlostní parametry VCL, VSL a VAP.

Pomalá subpopulace obsahuje spermie nepřímé ve svém směru s nízkými hodnotami ALH a BCF v porovnání s ostatními subpopulacemi ( $P < 0,05$ ). ALH, VAP a VCL jsou vyšší u PF hřebců než u GF, parametry BCF, LIN a VSL naopak nižší.

### **Čas inkubace T30**

Rapidní spermie jsou přímé, s nejvyšší hodnotou ALH v porovnání s ostatními subpopulacemi. V rapidní subpopulaci mají spermie PF hřebců vyšší hodnoty u všech parametrů ( $P < 0,05$ ) kromě statisticky nesignifikantního rozdílu v parametru VCL. Hodnoty parametru VCL stále poukazují na možnou hyperaktivaci rapidních spermií.

Subpopulace rychlých spermií mohou být charakterizovány u PF hřebců nízkou hodnotou a u GF vysokou hodnotou parametrů BCF a LIN ( $P < 0,05$ ). Spermie rychlé subpopulace GF hřebců jsou velmi přímé ve svém směru pohybu, spermie PF hřebců jsou nepřímé s vyššími parametry rychlosti VAP a VSL.

U středně rychlé subpopulace v čase T30 jsou ALH i hodnoty rychlostních parametrů VAP, VCL, VSL vyšší pro PF hřebce než pro GF ( $P < 0,05$ ). Přímost směru středně rychlých spermií PF hřebců v T30 je nejvyšší v porovnání s ostatními subpopulacemi.

Pomalá spermie v čase inkubace T30 je nepřímá s nízkou hodnotou ALH a nejnižšími hodnotami BCF v porovnání s ostatními subpopulacemi. Hodnoty parametrů BCF a LIN i parametry VAP a VSL jsou nižší u PF než u GF ( $P < 0,05$ ).

## 7.2 Diskuze experiment I

V experimentu I byl studován vliv rozdílné mrazitelnosti hřebců na zastoupení spermií v subpopulacích a to ihned po rozmrazení ejakulátu a dále pak v průběhu třicetiminutové inkubace při 37°C po rozmrazení.

Základní statistiky založené na průměrných hodnotách parametrů kvality ejakulátu nejsou schopné vždy odhalit rozdíly v kvalitě kryokonzervovaného ejakulátu a mrazitelnosti hřebců. Oproti tomu klastrová analýza je schopna poskytnout cenné informace o mrazitelnosti vzorků, které obvyklá statistika neodhalí (Ortega-Ferrusola et al. 2009). Jak potvrzuje Nunez-Martinez et al. (2006), využívání průměrných hodnot maskuje skutečné rozdíly v motilitě spermií mezi jednotlivými samci a také zkresluje vliv biotechnologických postupů na spermie (například kryokonzervace) a proto je adekvátnějším přístupem stanovení subpopulací. Fenomén subpopulací spermií je známá, ovšem ve vědeckých publikacích stále poměrně často ignorovaná věc. Využití rozdělení spermií do subpopulací pro jejich hodnocení, ať již ve vědeckých kruzích či možné praktické implikaci, by mohlo vést k markantnímu zlepšení predikce fertilizační schopnosti spermií (Ferraz et al. 2014).

V rámci experimentu I. jsme se zabývali kvalitou rozmrazeného ejakulátu hřebců a zjistili jsme, že procentuální zastoupení jednotlivých subpopulací se signifikantně liší mezi špatně (PF) a dobře (GF) mrazitelnými hřebci ihned po rozmrazení (T0) a po 30-ti minutách inkubace (T30). Při rozdělení motilních spermií na 3 subpopulace, mají v obou časech inkubace PF nižší zastoupení subpopulace rychlé a středně rychlé, naopak zastoupení pomalých spermií je vyšší než u GF. Při rozdělení na 4 subpopulace mají po rozmrazení PF nižší procentuální zastoupení rapidní a rychlé subpopulace spermií a více středně rychlé a pomalé subpopulace. Po 30-ti minutové inkubaci u PF hřebců výrazně převažují pomalé spermie.

Bylo potvrzeno, že stanovení subpopulací spermií v ejakulátu poměrně zásadně zlepšuje schopnost predikce mrazitelnosti ejakulátu hřebců (Ortega-Ferrusola et al. 2009) a také například psů (Nunez-Martinez et al. 2006). Ortega-Ferrusola et al. (2009) porovnávali zastoupení subpopulací spermií u hřebců v čerstvém a rozmrazeném ejakulátu, ve kterém stanovili 4 subpopulace motilních spermií. Rozdělení subpopulací spermatu se v dané studii lišilo mezi hřebci a bylo výrazně ovlivněno kryokonzervací. Pomocí shlukové analýzy a porovnání distribuce subpopulací spermií před a po mrazení bylo možné poskytnout informace o mrazitelnosti vzorků, které obvyklé statistiky neodhalily (Ortega-Ferrusola et al.

2009). Vzhledem k tomu, že kryokonzervace je u kanců dlouhodobě výzvou stejně jako u hřebců kvůli vysoké citlivosti spermií na chladový šok, mohou studie provedené na kancích spermiích poskytnout srovnání k našim výsledkům u hřebců. Naše výsledky se shodují se závěrem práce Flores et al. (2009), kteří u kanců stanovovali subpopulace spermií po rozmrazení. Zastoupení subpopulací se lišilo v motilitě mezi kanci s dobrou snášenlivostí mrazení a mezi těmi, kteří jsou špatně mrazitelní. Také mitochondriální aktivita byla nejnižší u kanců špatně mrazitelných. U kanců tedy autoři doporučují před mražením kontrolu zastoupení subpopulací a mitochondriální aktivity, což může opět pomoci predikovat mrazitelnost semene (Flores et al. 2009). Hernandez et al. (2006) identifikovali u kanců také rozdíl ve struktuře chromatinu mezi špatně a dobře mrazitelnými samci, PF kanci mají chromatin méně homogenní.

Ve studii Ramon et al. (2012) byly pomocí CASA u jelenů stanoveny 4 subpopulace se vzory pohyblivosti: slabě pohyblivá, progresivní, přechodná a hyperaktivovaná. Samci vykazující špatnou mrazitelnost byli charakterizováni vysokým procentem subpopulace spermií s nedostatečnou motilitou. Naproti tomu samci vykazující dobrou mrazitelnost byli charakterizováni vyšším procentem spermatu s progresivním a hyperaktivovaným vzorem pohyblivosti a nižším procentem spermatu s nedostatečným pohybovým vzorem (Ramon et al. 2012). Výsledky naší studie u hřebců s různou mrazitelností se shodují s výše uvedenými studiemi u jiných druhů, navíc jsme potvrdili významné rozdíly v zastoupení subpopulací spermií mezi hřebci se špatně a dobře mrazitelným semenem.

V naší studii bylo prokázáno, že jak v případě GF tak i PF hřebců má třicetiminutová inkubace statisticky signifikantní ( $P < 0,05$ ) vliv na procentuální zastoupení jednotlivých subpopulací spermií. Při rozdělení na 3 subpopulace zastoupení rychlé subpopulace roste v průběhu inkubace u PF hřebců a klesá u GF, to samé platí i při rozdělení na 4 subpopulace, ale nikoli pro subpopulaci rapidní, jejíž zastoupení klesá u PF hřebců a roste u GF. Toto je celkem neočekávané zjištění a jak je vidět, rozdělení na 4 subpopulace může poskytnout podrobnější znalosti o ejakulátu daných hřebců. Dělení na 3, respektive 4 subpopulace, se liší ve vyčlenění subpopulace rapidních spermií. Spermie v rapidní subpopulaci dosahují nejvyšších hodnot rychlosti a přímosti, což je specifické pro hyperaktivaci spermií (Kathiravan et al. 2011). Vyšší podíl spermií s hyperaktivovaným vzorem pohybu byl zaznamenán u býků s větší plodností (Shojaei et al. 2012) a u samců jelenů s dobrou mrazitelností (Ramon et al. 2012). Při porovnání zastoupení subpopulací spermií mezi PF a GF hřebci jsou v obou způsobech rozdělení (na 3 i na 4) subpopulace s vyššími hodnotami kinematických parametrů (rapidní, rychlé, většinou i středně rychlé) zastoupeny více u GF hřebců. Vyšší kvalita ejakulátu

je asociována s rychlými a přímočaře pohybujícími se spermii a naopak pomalé a nepřímě se pohybující spermie korelují s nízkou kvalitou ejakulátu (Quintero-Moreno et al. 2003; Ortega-Ferrusola et al. 2009; Martínez-Pastor et al. 2011; Ferrez et al. 2014). Ve studii Simonik & Sichter (2018) bylo zjištěno, že procentuální zastoupení rychlé subpopulace spermii klesá po 30-ti minutové inkubaci po rozmrazení, naopak zastoupení pomalé subpopulace roste. Toto zjištění souhlasí s námi zjištěným vlivem inkubace na spermie GF hřebců, ale nikoli na spermie PF hřebců. Navíc je u hřebců rychlá subpopulace spermii také pozitivně asociována s mírou zabřeznutí (Gibb et al. 2014).

Podobně jako v tomto experimentu jsme v dřívější práci - Sichter et al. (2017) sledovali CASA parametry a subpopulace spermii v rozmrazeném ejakulátu hřebců. Jelikož v dané studii vybraní hřebci nedosahovali hodnoty progresivní motility (TMOT) po rozmrazení 30%, mohou být hodnoceni jako špatně mrazitelní. Statistické hodnocení a rozdělení spermii do subpopulací u konkrétních hřebců pomohlo lépe odhalit zastoupení spermii s vyššími hodnotami a tedy kvalitními kinematickými parametry (Sichter et al. 2017; supplementary material). Limitem pro špatně mrazitelné hřebce je tedy to, že takto „dobrých“ spermii je v jejich ejakulátu výrazně nižší zastoupení než u hřebců dobře mrazitelných, jejichž celková TMOT se po rozmrazení pohybuje nad 30 %.

Vyšší hodnoty kinematických parametrů jsou spojovány s vyšší kvalitou a fertilizační schopností spermii (Quintero-Moreno et al. 2003; Ortega-Ferrusola et al. 2009; Martínez-Pastor et al. 2011). Studie na myších prokázaly, že vysoká hodnota parametru VCL je zásadní pro proniknutí utero-tubálním spojem, a tím pro tvorbu rezervoáru spermii i pro průnik *zona pellucida* (ZP) (Olds-Clarke 1996). Toto potvrzují výsledky u mužů, které prokázaly, že fertilní spermie zřetelně dosahují vyššího VCL než ty neplodné (De Geyter et al. 1998). Ferraz et al. (2014) se zaměřili na kinematické parametry býčích spermii a VCL měla významnou a pozitivní korelaci s počtem spermii navázaných na ZP. Ve své studii spojují subpopulaci s nejrychlejšími a progresivně se pohybujícími spermii býků s vyšší kvalitou a schopností fertilizace (Ferraz et al. 2014). U oslů zjistili Taberner et al. (2010) významnou pozitivní korelaci mezi CASA parametry – VAP, VCL a ALH a mírou oplodnění *in vitro*. Rovněž u skotu (*in vivo*) Farrell et al. (1998) uvedli silnou korelaci mezi několika charakteristikami pohyblivosti (BCF, LIN, VAP, STR a VCL) a plodností. Zdá se tedy, že subpopulace spermii s maximální schopností fertilizace je ta s nejvyššími parametry rychlosti (velocities) (Quintero-Moreno et al. 2003).

Při zaměření na jednotlivé kinematické parametry, naše výsledky ukazují rozdíly v jednotlivých charakteristikách pohybu spermii od různě mrazitelných hřebců v jednotlivých

subpopulacích ( $P < 0,05$ ). Spermie GF hřebců byly ve většině subpopulací průměrněji než PF hřebců. Tato zjištění souhlasí s pozitivní korelací vyšších hodnot parametrů s vyšší kvalitou spermií a pravděpodobně s lepší fertilizační schopností (Quintero-Moreno et al. 2003; Ortega-Ferrusola et al. 2009; Martinez-Pastor et al. 2011). Rápidní subpopulace vykazovala vyšší hodnoty parametrů v čase inkubace T0 u GF hřebců a v čase T30 u PF. Bylo očekáváno, že GF hřebci budou mít vyšší průměrné hodnoty rychlostních parametrů, ale v rychlé subpopulaci mají spermie PF hřebců vyšší hodnoty kinematických parametrů než u GF. Naše výsledky naznačují, že spermie PF hřebců, které přežily proces kryokonzervace, jsou velmi motilní, ale intenzivněji negativně ovlivněné dobou inkubace než spermie GF hřebců. Z tohoto hlediska se zdá být, mimo jiné, důležité správné načasování inseminace mraženého spermatu získaného od PF hřebců. Gibb et al. (2014) zdůraznili pozitivní vztah rychle se pohybujících spermií a míry zabřeznutí u klisen a obecně se předpokládá pozitivní vztah zastoupení subpopulací spermií s nejvyššími hodnotami rychlosti s jejich fertilizační schopností (Quintero-Moreno et al. 2003). Ve vztahu ke kryokonzervaci pak vyšší poměr subpopulace s rychlými spermii v ejakulátu pozitivně koreluje s vyšší kryorezistencí (Ortega-Ferrusola et al. 2009).

Množství motilních spermií je sice v inseminační dávce PF hřebců nižší, avšak tyto spermie jsou poměrně rychlé. Problémem kvality spermií PF hřebců není tedy rychlost motilních spermií, ale jejich celkové procentuální zastoupení v rozmrazené dávce. Je pravděpodobné, že kromě motility je limitním faktorem kvality spermií PF hřebců také stav plazmatické membrány (Alvarenga et al. 2005; Pukazhenzhi et al. 2014). Jak uvádí Martinez (2004), existuje pozitivní korelace mezi rychlostními parametry a integritou plazmatické membrány. Stejně tak limituje spermie PF hřebců snížená schopnost reagovat na změny osmotického tlaku (Alvarenga et al. 2005; Pukazhenzhi et al. 2014). Dle studie Hoffmann et al. (2011) mají spermie PF hřebců nižší toleranci k osmotickým změnám během kryokonzervace v porovnání se spermii od GF hřebců. Pro zvýšení kvality zmrazeného a rozmrazeného spermatu PF hřebců, mohou například přispět techniky výběru nejkvalitnějšího spermií z čerstvého ejakulátu (Morrell 2012). Studium distribuce motilních spermií v subpopulacích může být vhodným nástrojem ke zlepšení běžných analýz kvality hřebčího ejakulátu poskytující nový úhel pohledu na jeho kvalitu (Quintero-Moreno et al. 2003).

### 7.3 Výsledky experiment II

V druhém experimentu byl hodnocen přídavek semenné plazmy k rozmrazeným spermím hřebců, jejichž semeno je špatně mrazitelné. Výsledky charakteristik motility mezi testovanými skupinami hodnocené pomocí CASA systému jsou popsány v tabulce 4.

Přidávky SP (S-SP nebo N-SP) neovlivnily v T0 ani celkovou ani progresivní motilitu ( $P > 0,05$ ) stejně tak v čase inkubace T30. Hodnota PMOT byla nejvyšší ve skupině s přídavkem N-SP při hodnocení bezprostředně po rozmrazení (T0), avšak po 30 minutách inkubace (T30) byla PMOT nejvyšší v kontrolní skupině bez přídavku SP. TMOT v čase 0 se mezi 3 testovanými skupinami nelišila a po 30 minutách inkubace byla také nejvyšší v kontrolní skupině. Není překvapením, že 30 minut inkubace vedlo ke snížení hodnoty TMOT a PMOT ( $P < 0,05$ ) u všech hodnocených skupin.

**Tabulka 4:** Celková motilita (TMOT), progresivní motilita (PMOT) a kinematické parametry po rozmrazení (T0) a po 30 min inkubace při 37°C (T30).

Motilita a kinematické parametry	čas	K	S-SP	N-SP
TMOT (%)	T0	12,0 ± 1,2 <sup>a</sup>	12,0 ± 1,2 <sup>a</sup>	12,8 ± 1,2 <sup>a</sup>
	T30	9,4 ± 1,0 <sup>b</sup>	7,0 ± 1,0 <sup>b</sup>	8,2 ± 1,1 <sup>b</sup>
PMOT (%)	T0	10,6 ± 1,2 <sup>a</sup>	10,7 ± 1,2 <sup>a</sup>	11,7 ± 1,2 <sup>a</sup>
	T30	7,8 ± 0,9 <sup>b</sup>	5,9 ± 0,9 <sup>b</sup>	7,3 ± 1,0 <sup>b</sup>
ALH (μm)	T0	3,1 ± 0,07 <sup>1</sup>	3,3 ± 0,1 <sup>2</sup>	3,5 ± 0,08 <sup>3</sup>
	T30	3,4 ± 0,05	3,6 ± 0,06 <sup>1</sup>	3,3 ± 0,06 <sup>2</sup>
BCF (Hz)	T0	11,0 ± 0,3 <sup>1</sup>	11,2 ± 0,4	11,7 ± 0,3 <sup>2</sup>
	T30	9,6 ± 0,2	10,2 ± 0,2	10,3 ± 0,2
LIN (%)	T0	38,2 ± 0,6 <sup>1</sup>	38,6 ± 0,8 <sup>2</sup>	39,9 ± 0,6 <sup>2</sup>
	T30	33,3 ± 0,4 <sup>1</sup>	36,0 ± 0,5 <sup>2</sup>	37,2 ± 0,5 <sup>2</sup>
STR (%)	T0	85,4 ± 0,6 <sup>2</sup>	85,1 ± 0,8 <sup>2</sup>	86,0 ± 0,7 <sup>1</sup>
	T30	80,8 ± 0,5 <sup>2</sup>	82,3 ± 0,6 <sup>2</sup>	85,6 ± 0,6 <sup>1</sup>
VAP (μm/s)	T0	38,8 ± 1,1 <sup>1</sup>	41,3 ± 1,5 <sup>2</sup>	46,1 ± 1,2 <sup>2</sup>
	T30	37,1 ± 0,7 <sup>1</sup>	40,8 ± 0,9 <sup>2</sup>	38,2 ± 0,9
VCL (μm/s)	T0	88,5 ± 2,2 <sup>1</sup>	92,9 ± 3,0 <sup>2</sup>	100,9 ± 2,4 <sup>2</sup>
	T30	92,4 ± 1,5	96,1 ± 1,9 <sup>1</sup>	88,9 ± 2,0 <sup>2</sup>
VSL (μm/s)	T0	34,1 ± 1,0 <sup>1</sup>	36,5 ± 1,5 <sup>2</sup>	41,1 ± 1,1 <sup>2</sup>
	T30	31,0 ± 0,6 <sup>1</sup>	34,8 ± 0,8 <sup>2</sup>	33,9 ± 0,9
WOB (%)	T0	44,1 ± 0,5 <sup>1</sup>	44,6 ± 0,7 <sup>2</sup>	45,5 ± 0,5 <sup>2</sup>
	T30	40,7 ± 0,3 <sup>1</sup>	43,1 ± 0,4 <sup>2</sup>	42,8 ± 0,4 <sup>2</sup>

K (kontrolní skupina bez přidavku semenné plazmy), S-SP (standardní semenná plazma), N-SP (nadstandardní semenná plazma). CASA parametry: amplituda laterálního vybočení hlavičky (ALH, μm), frekvence křížení (BCF, Hz), linearita (LIN, %), přímost (STR, %), rychlost po průměrné dráze (VAP, μm/s), rychlost po skutečné dráze (VCL, μm/s), rychlost po napřímené dráze (VSL, μm/s), kmitání (WOB, %).

a,b rozdílná písmena ve sloupci značí statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ) mezi T0 a T30 v rámci jednotlivých parametrů.

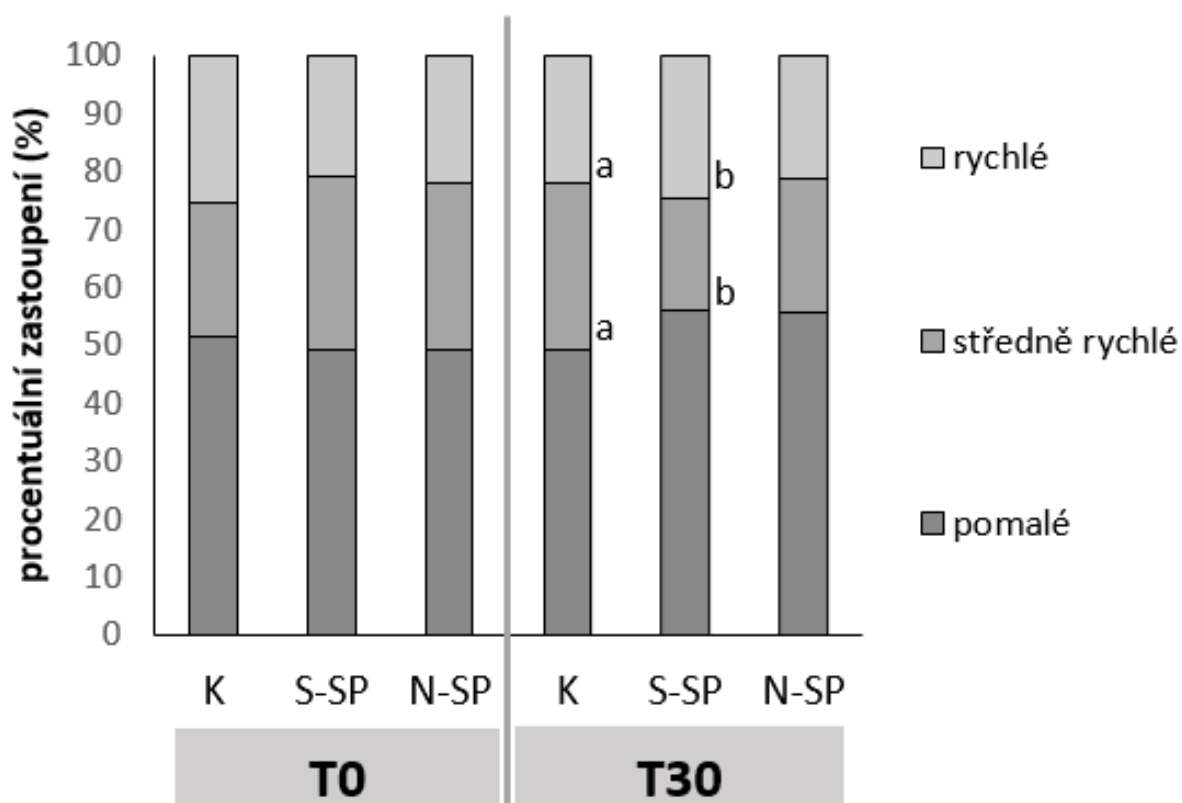
1,2 rozdílná čísla v řádce mezi testovanými skupinami značí statisticky signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ )



Při zaměření na jednotlivé kinematické parametry zjištěné pomocí CASA byl zaznamenán významný vliv přídatku SP ( $P < 0,05$ ). V T0 se následující kinematické parametry spermií ALH, LIN, VAP, VCL, VSL, WOB zvýšily po přidání S-SP, stejně tak i N-SP ve srovnání s kontrolní skupinou. Parametry BCF a STR byly pozitivně ovlivněny pouze přidáním N-SP. Všechny parametry v čase T0 vykazovaly nejvyšší hodnoty s přídatkem N-SP. Vyhodnocení v inkubační době 30 minut po rozmrazení ukázalo nejvyšší výsledky po přidání SP u parametrů ALH, VAP, VCL, VSL, WOB. Parametry LIN, VAP, VSL ( $P < 0,05$ ) se po přidání S-SP signifikantně zvýšily ve srovnání s kontrolní skupinou. Naopak nadstandardní semenná plazma (N-SP) významně snížila ALH a VCL ( $P < 0,05$ ) ve srovnání se skupinou S-SP. Naproti tomu přidání N-SP ovlivnilo pozitivně ( $P < 0,05$ ) LIN a WOB ve srovnání s kontrolní skupinou. Semenná plazma nezměnila ( $P > 0,05$ ) pouze parametr BCF.

Jak je patrné z grafu 3 v čase T0 nebylo procento spermií patřících k pomalé, středně rychlé nebo rychlé subpopulaci ovlivněno ( $P > 0,05$ ) přídatkem semenné plazmy. Zaznamenali jsme však rozdíly mezi podílem spermií patřících do středně rychlé a rychlé subpopulace v inkubačním čase T30. Procento spermií patřících k rychlé subpopulaci bylo ve skupině S-SP významně vyšší ( $P < 0,05$ ) ve srovnání s kontrolní skupinou. Také bylo ve středně rychlé subpopulaci významně méně spermií u vzorků se S-SP ve srovnání s kontrolní skupinou ( $P < 0,05$ ).

**Graf 3:** Distribuce subpopulací spermií (pomalé, středně rychlé, rychlé) ve třech zkoumaných skupinách (K, S-SP, N-SP) v inkubačních časech 0 (T0) a 30 minut (T30).



K (kontrolní skupina bez přídavku SP), S-SP (standardní SP), N-SP (nadstandardní SP)

Rozdílná písmena a,b ukazují statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) v zastoupení spermií v dané subpopulaci mezi testovanými skupinami

Výsledky hodnocení viability a integrity plazmatické membrány (HOS test) jsou uvedeny v tabulce 5. Přídavek semenné plazmy bez ohledu na její kvalitu významně nezměnil ( $P > 0,05$ ) životaschopnost spermií v obou časech inkubace. V čase T30 se životnost snížila ( $P < 0,05$ ) ve srovnání s T0 ve všech třech skupinách. Integrita plazmatické membrány se mezi zkoumanými skupinami v čase T0 neměnila. Po 30 minutách inkubace se přidáním N-SP snížilo ( $P < 0,05$ ) procentuální zastoupení HOS+ buněk. Číselně nejvyšší zastoupení spermií HOS+ bylo v kontrolní skupině bez přídavku semenné plazmy v obou časech inkubace.

**Tabulka 5:** Viabilita a integrita plazmatické membrány (HOS+) po rozmražení (T0) a v inkubačním čase 30 min (T30) po přidavku SP.

skupina	Viabilita (%)		HOS+ (%)	
	T0	T30	T0	T30
<b>K</b>	48,5 ± 1,6 <sup>a</sup>	39,3 ± 1,7 <sup>b</sup>	35,0 ± 2,0	34,2 ± 1,6 <sup>1</sup>
<b>S-SP</b>	47,8 ± 1,7 <sup>a</sup>	39,2 ± 1,9 <sup>b</sup>	33,6 ± 2,1	32,9 ± 1,8
<b>N-SP</b>	47,2 ± 1,7 <sup>a</sup>	43,0 ± 1,9 <sup>b</sup>	34,5 ± 2,1	29,4 ± 1,8 <sup>2</sup>

*K* (kontrolní skupina bez přidavku SP), *S-SP* (standardní SP), *N-SP* (nadstandardní SP)

Rozdílná písmena *a, b* značí statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ) mezi časy T0 a T30 v rámci testované skupiny. Rozdílná čísla 1, 2 ve sloupci značí statisticky významná rozdíly mezi skupinami ( $P < 0,05$ ).

## 7.4 Diskuze experiment II

Cílem experimentu II bylo vyhodnotit účinek semenné plazmy (SP) od různých dárců přidané po rozmrazení na funkční charakteristiky spermií hřebců se špatnou mrazitelností se zaměřením na okamžitý účinek přidavku SP po rozmrazení na spermie a účinek po 30 minutách inkubace při 37°C. Výsledky experimentu II ukazují, že přidání semenné plazmy po rozmrazení k ejakulátu špatně mrazitelných hřebců od hřebců s průměrnou (standardní S-SP) a nadprůměrnou (nadstandardní N-SP) mrazitelností má příznivé účinky na kinematické parametry spermatu a distribuci spermií do subpopulací. Dále byl v této práci navíc hodnocen vliv SP na rozmražené spermie v prodlouženém časovém intervalu, aby byla lépe simulována situace po inseminaci v samičím reprodukčním traktu.

Hřebci v této studii byli klasifikováni jako špatně mrazitelní - TMOT po rozmrazení 12,0 - 12,8 %, PMOT 10,6 - 11,7 %. Přidavky SP (S-SP nebo N-SP) neovlivnily ihned po rozmrazení (T0) ani celkovou (TMOT) ani progresivní motilitu (PMOT) ( $P > 0,05$ ), stejně tak po inkubaci 30 min (T30). Není překvapením, že 30 minut inkubace vedlo ke snížení hodnot TMOT a PMOT ( $P < 0,05$ ) u všech hodnocených skupin. Předpokládali jsme, že by měly existovat rozdíly mezi dvěma typy SP podle původu a mrazitelnosti našich dvou dárců. Tyto rozdíly byly pouze číselné, ale statisticky nevýznamné.

Ve své studii Arruda et al. (2008) dosáhli stejných výsledků, kdy v čase 0 nebyla motilita spermií ovlivněna přidáním SP (25 % nebo 50 %) od dobře mrazitelného hřebce ke vzorkům po rozmrazení od špatně mrazitelných hřebců. Podobně ve studii De Andrade et al. (2011) nebyl zjištěn žádný účinek na celkovou motilitu po přidání 20% homologní a autologní

SP od dobrých hřebců po rozmrazení, ale autologní SP snížila PMOT ( $P < 0,05$ ). Což by mohlo poukazovat na individuální reakci na přídavek SP a na rozdíly v jejích složkách. Ve starší studii Aurich et al. (1996) potvrdili, že individuální složení SP ovlivňuje vhodnost hřebců pro kryokonzervaci spermatu.

Přestože SP aktivuje pohyblivost epididymálních spermií (Neuhauser et al. 2013), zdá se, že tato fyziologická funkce neovlivňuje ejakulované spermie vždy stejným způsobem (Aurich et al. 1996; Moore et al. 2005; Al-Essawe et al. 2018). Nejpravděpodobnějším důvodem je variabilita složek SP mezi jednotlivými hřebci (Usuga et al. 2017), a to zejména mezi dobře a špatně mrazitelnými (El-Badry et al. 2016). Naše výsledky můžeme porovnávat se studii na spermatu kanců, protože kryokonzervace je u nich výzvou stejně jako u hřebců kvůli vysoké citlivosti spermií na chladový šok a jelikož oba druhy mají vysoký podíl SP v ejakulátu. U kanců přídavek SP po kryokonzervaci zlepšil TMOT a PMOT ( $P < 0,05$ ) (Torres et al. 2016) a bylo zjištěno, že přídavek SP od dobře mrazitelných kanců ke spermatu špatně mrazitelných zlepšuje motilitu spermií po rozmrazení (Hernandez et al. 2007). Ve studii Okazaki et al. (2009) přídavek 10 % SP po rozmrazení výrazně zvýšil úspěch inseminace, ale neovlivnil motilitu. Ve zmíněné studii dospěli k závěru, že odstranění SP bezprostředně po odběru a poté přidání 10 % SP k rozmrazeným dávkám je užitečným nástrojem pro obnovení kompetence spermií k *in vivo* fertilizaci u kanců se špatnou mrazitelností (Okazaki et al. 2009).

I když je subjektivní hodnocení motility zlatým standardem v polních podmínkách, je vysoce doporučeno použití systému CASA, který odhalí detailněji změny v pohybu spermií (Simonik & Sichter 2018). Jak prokázaly výsledky tohoto experimentu, přidání SP (jak S-SP, tak N-SP) po rozmrazení mělo pozitivní vliv na několik kinematických parametrů (ALH, LIN, STR, VAP, VCL, VSL a WOB) spermií špatně mrazitelných hřebců. Všechny parametry v čase T0 vykazovaly nejvyšší hodnoty s přídavkem N-SP. Je zajímavé, že ve studii De Andrade et al. (2011) přídavek SP od dobře mrazitelných hřebců nezměnil parametry rychlosti spermií (VAP, VSL, VCL) a další parametry byly sníženy ( $P < 0,05$ ). Naše výsledky byly opačné, ale v našem experimentu jsme přidávali vyšší podíl SP ke spermiím od špatně mrazitelných hřebců po rozmrazení. Ve studii na epididymálních spermiích hřebců v práci Neuhauser et al. (2013) se zjistilo, že epididymální spermie s přídavkem SP po rozmrazení vykazují vyšší hodnoty parametrů rychlosti (VCL, VAP, VSL) a také parametrů ALH a BCF.

V našem experimentu následná 30 min inkubace spermatu jak s S-SP, tak s N-SP prospěla kinematickým parametrům spermií. Kromě zmíněného účinku na kinematické parametry jsme také zjistili pozitivní účinek přidání SP na distribuci spermií do subpopulací. Hodnocení celkové a progresivní motility vede k zavádějícím výsledkům, protože ejakulát

se skládá z heterogenních populací spermií. V ejakulátu hřebce koexistují samostatné subpopulace spermií s různými charakteristikami motility (Quintero-Moreno et al. 2003). Rozdělení hřebčích spermií na subpopulace lépe vystihuje kinetiku spermií. Proto hodnocení subpopulací dává větší biologický význam. Rozdělení motilních spermií do různých skupin vede k určení subpopulací, které jsou diferencovány klastrovou analýzou. Identifikace subpopulací spermií je smysluplnějším přístupem ke stanovení kvality pohyblivých buněk (Simonik et al. 2015). Jak ukazují výsledky našeho předešlého výzkumu (Sichtar et al. 2017) bylo zastoupení subpopulací spermií hřebců významně ovlivněno použitým ředidlem jak u čerstvého ejakulátu, tak i ve vzorcích rozmrazených a rovněž bylo ovlivněno kroky procesu mrazení. Stejně tak se zastoupení subpopulací liší mezi dobře a špatně mrazitelnými hřebci, jak bylo prokázáno experimentem I této práce.

V čase T0 nebylo procento spermií patřících k pomalé, středně rychlé nebo rychlé subpopulaci ovlivněno přidavkem semenné plazmy. Byly však zaznamenány rozdíly mezi podílem spermií patřících do středně rychlé a rychlé subpopulace v inkubačním čase T30. Procento spermií patřících k rychlé subpopulaci bylo ve skupině S-SP významně vyšší ( $P < 0,05$ ) ve srovnání s kontrolní skupinou. Také bylo ve středně rychlé subpopulaci významně méně spermií u vzorků se S-SP ve srovnání s kontrolní skupinou ( $P < 0,05$ ).

Ve studii Ferraz et al. (2014) u býků se zmrazeným a rozmrazeným spermatem byla zjištěna pozitivní korelace mezi počtem spermií patřících k nejrychlejší subpopulaci a počtem spermií navázaných na *zona pellucida* a také mírou proniknutí do oocyty a rychlostí tvorby pronukleu. Jejich výsledky naznačují, že vysoce pohyblivá subpopulace je pozitivně a významně korelovaná se schopností rozmrazených býčích vzorků interagovat s oocytem a poměr rychlé subpopulace může předpovídat schopnost fertilizace spermií (Ferraz et al. 2014).

Plazmatická membrána spermií hraje důležitou roli v několika procesech, které vedou k úspěšnému oplodnění oocyty (Gadella & Luna 2014). Semenná plazma obsahuje faktory (hlavně proteiny), které ovlivňují stav plazmatické membrány, regulují nástup kapacity a akrozomální reakce (Topfer-Peterson et al. 2005). V naší studii přidání S-SP a N-SP ke kryokonzervovanému spermatu špatně mrazitelných hřebců neovlivnilo integritu membrány spermií po rozmrazení. Avšak v případě přidání N-SP se funkčnost plazmatické membrány snížila přibližně o 5 % po 30 minutách inkubace. Jak bylo potvrzeno v dřívějších studiích, účinek SP je závislý nejen na její koncentraci, ale také na době interakce se spermiemi a také na jejím zdroji (Aurich et al. 1996; Moore et al. 2005, Morrell et al. 2014, Al-Essawe et al. 2016). Naproti tomu u dobře mrazitelných hřebců funkčnost plazmatické membrány významně

vzrostla, když byla přidána homologní nebo autologní SP, ačkoli tento účinek byl vyhodnocen už bezprostředně po rozmrazení (De Andrade et al. 2012). Přídavek SP od hřebce s dobrou kvalitou semene po rozmrazení do kryokonzervačního ředidla před mražením spermatu hřebců s nízkou kvalitou semene po rozmrazení v práci Aurich (1996) zvýšilo integritu plazmatické membrány a progresivní motilitu. Tyto přínosy autoři přikládají pravděpodobně antioxidačním mechanismům chránícím plazmatickou membránu proti ROS (Aurich 1996).

Složky semenné plazmy se vážou na spermie během jejich cesty reprodukčním traktem hřebce. Protože se komponenty semenné plazmy liší mezi dobře a špatně mrazitelnými hřebci (El-Badry et al. 2016), můžeme předpokládat, že odebraný ejakulát od špatně mrazitelných hřebců má předem stanovenou mrazitelnost, danou již před manipulací a přípravou kryokonzervované inseminační dávky. Tuto myšlenku podporuje studie Cabrera et al. (2018), kteří identifikovali rozdílné lipidové profily spermií ve srovnání s dobře mrazitelnými hřebci a dali tyto změny do spojitosti s jejich mrazitelností. Tento rozdílný profil u špatně mrazitelných spermií je pravděpodobně spojen se sníženou schopností odolávat osmotickým tlakům během změn teploty (Hoffmann et al. 2011). Zastoupení lipidů a poměr cholesterolu v plazmatické membráně hraje klíčovou roli při udržování její fluidity, což souvisí s náchylností k poškození způsobeným nízkými teplotami (Sieme et al. 2015), kterým jsou buňky vystavovány v průběhu chlazení spermatu během úspěšné kryokonzervace (Amann & Pickett 1987). U hřebců, kteří jsou klasifikováni jako špatně mrazitelní je tedy možné využít semennou plazmu od dobře mrazitelných hřebců k zefektivnění procesu výroby kryokonzervované inseminační dávky.

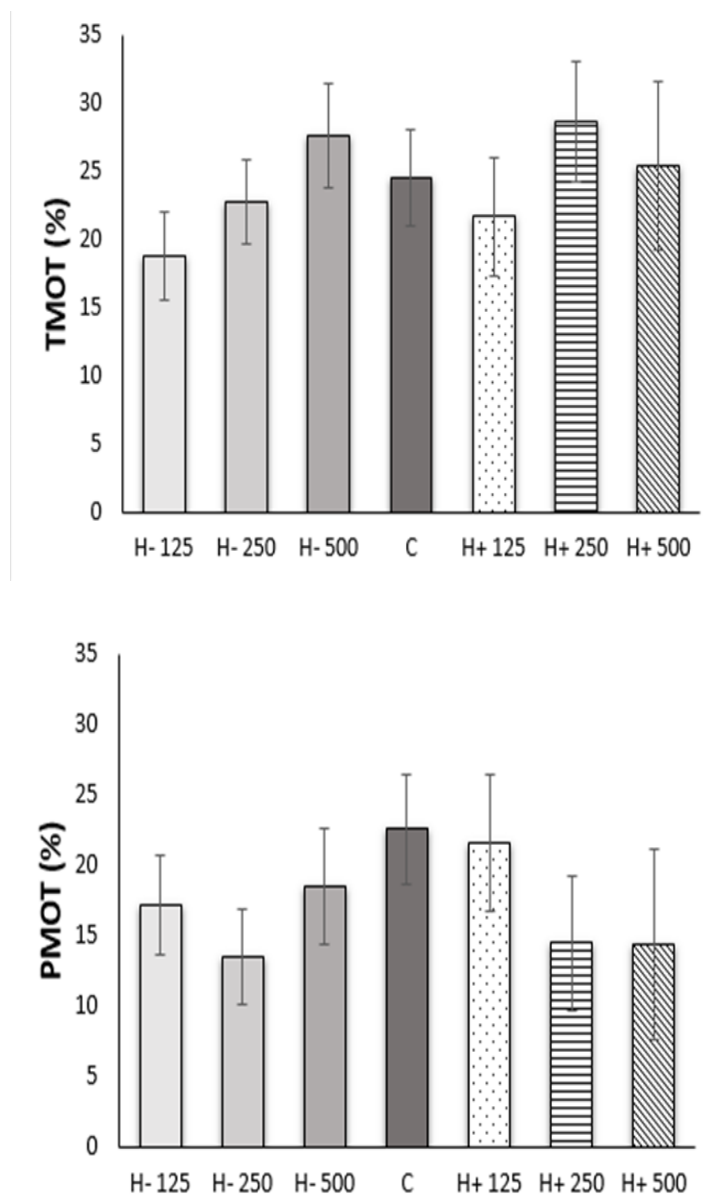
## **7.5 Výsledky experiment III**

Cílem experimentu III bylo zhodnotit účinek přidání proteinových frakcí semenné plazmy (SP) do kryokonzervačního ředidla na kvalitu ejakulátu hřebce po rozmrazení. Heparin vázající proteinová frakce (H<sup>+</sup>) a heparin nevážající proteinová frakce (H<sup>-</sup>) byla přidána do ředidla ve třech finálních koncentracích - 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml. Účinek proteinových frakcí na spermie byl hodnocen na základě motility, viability (integrita plazmatické membrány), akrozomální integrity a mírou tyrosinové fosforylace proteinů.

### **Efekt proteinových frakcí SP na motilitu a kinematické parametry spermií**

Celková (TMOT) a progresivní (PMOT) motilita spermií v rozmraženém ejakulátu s přídavkem proteinových frakcí se významně nelišila (graf 4). Signifikantní rozdíly byly patrné pouze při zaměření na jednotlivé kinematické parametry pohybu.

**Graf 4:** Efekt proteinových frakcí SP ve třech koncentracích na celkovou (TMOT) a progresivní motilitu (PMOT) po rozmražení



*C kontrolní skupina, H- heparin-nevázající frakce v koncentracích 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, H+ heparin vázající frakce v koncentracích 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml*

Parametry CASA uvedené v tabulce 6 byly významně ovlivněny ( $P < 0,05$ ) přidáním proteinových frakcí SP, kromě parametrů BCF, VAP a VSL. Hodnoty ALH byly významně vyšší v kontrolní skupině (C) než v obou skupinách s přidavkem frakcí SP. Parametr LIN byl významně nižší v kontrolní skupině a H+ skupině než ve skupině H-. Parametr pohybu VCL se výrazně liší mezi kontrolou a skupinou H-, kde byl VSL nejnižší. Na druhé straně byl parametr WOB nejvyšší ve skupině H- a nejnižší v kontrole.

**Tabulka 6:** Efekt proteinových frakcí SP ve třech koncentracích na kinematické parametry po rozmražení.

Motilita a kinematické parametry	kontrola	H-	H+
TMOT (%)	24,52 ± 3,6	22,61 ± 1,9	25,19 ± 2,8
PMOT (%)	22,56 ± 3,9	16,08 ± 2,1	17,31 ± 3,0
ALH (µm)	4,60 ± 0,07 <sup>a</sup>	4,20 ± 0,04 <sup>b</sup>	4,32 ± 0,06 <sup>b</sup>
BCF (Hz)	13,91 ± 0,3	14,05 ± 0,2	13,75 ± 0,2
LIN (%)	45,44 ± 0,7 <sup>a</sup>	48,02 ± 0,4 <sup>b</sup>	46,26 ± 0,6 <sup>a</sup>
STR (%)	86,17 ± 0,7 <sup>a</sup>	88,28 ± 0,4 <sup>b</sup>	87,76 ± 0,6
VAP (µm/s)	70,98 ± 1,3	67,71 ± 0,8	68,45 ± 1,1
VCL (µm/s)	141,06 ± 2,4 <sup>a</sup>	132,75 ± 1,5 <sup>b</sup>	135,96 ± 2,1
VSL (µm/s)	63,47 ± 1,3	61,42 ± 0,8	61,71 ± 1,1
WOB (%)	51,20 ± 0,6 <sup>a</sup>	52,90 ± 0,4 <sup>b</sup>	51,50 ± 0,5

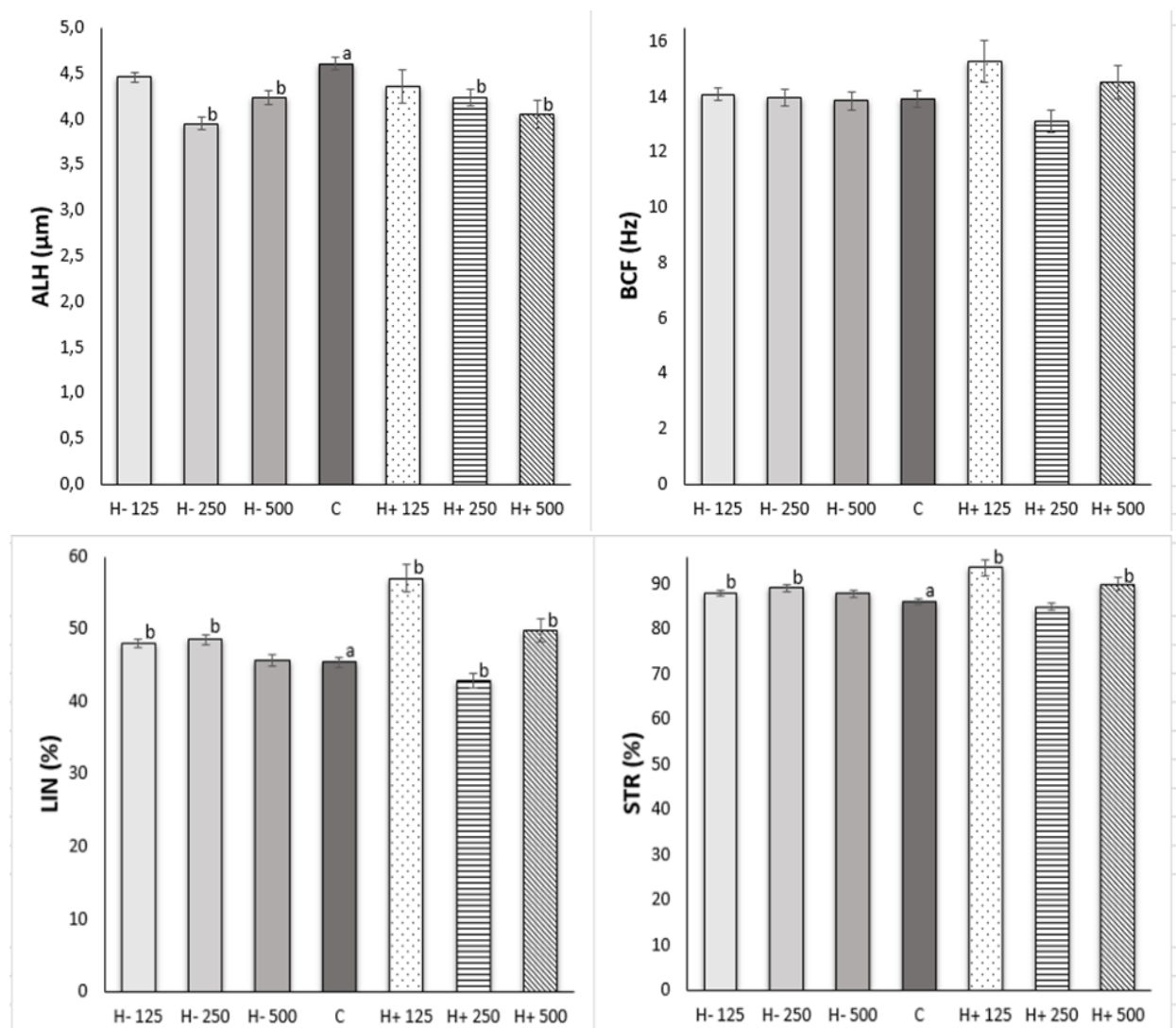
H- heparin nevázející frakce v koncentracích 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, H+ heparin vázející frakce v koncentracích 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml. CASA parametry: amplituda laterálního vybočení hlavičky (ALH, µm), frekvence křížení (BCF, Hz), linearita (LIN, %), přímost (STR, %), rychlost po průměrné dráze (VAP, µm/s), rychlost po skutečné dráze (VCL, µm/s), rychlost po napřimené dráze (VSL, µm/s), kmitání (WOB, %). a,b rozdílné indexy v řádku značí statisticky významné rozdíly (P <0,05) u jednotlivého kinematického parametru

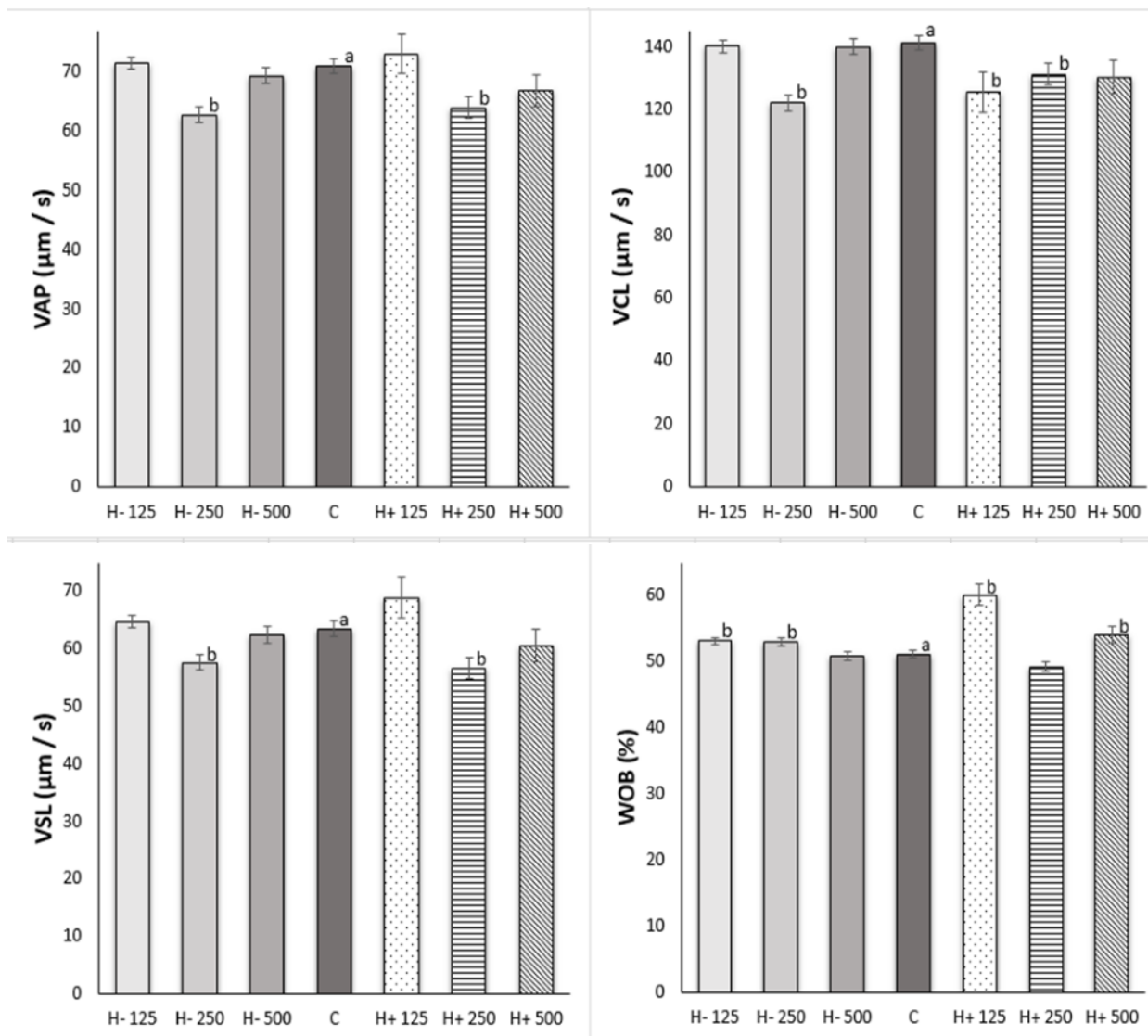
Přidavek proteinových frakcí SP v různých koncentracích ovlivňují (P <0,05) kinematické parametry spermií po rozmražení (graf 5, tabulka 7). Pouze parametr BCF se nelišil mezi testovanými skupinami. Nejnižší parametr ALH byl ve skupině H- 250 a liší se s kontrolou a všemi ostatními koncentracemi kromě H+ 500. Nejvyšší hodnoty parametru ALH jsou v kontrolní skupině a H- 125, obě hodnoty se významně liší od H- 500, H+ 250 a H+ 500. V parametru LIN dominuje skupina H+ 125 nad všemi ostatními vzorky a kontrolní skupinou. Linearita (LIN) v koncentraci H+ 250 je výrazně nejnižší ve srovnání se všemi ostatními vzorky a kontrolní skupinou. Parametr LIN v kontrolní skupině byl významně nižší než ve skupinách H- 125, H- 250 a H+ 500. V koncentraci H- 500 byla linearita významně nižší než H- 125, H- 250 a H+ 500. Hodnoty přímosti (STR) byly významně vyšší v koncentraci H+ 125 ve srovnání s kontrolní skupinou a všemi testovanými skupinami s výjimkou H+ 500. Parametr STR byl významně nižší ve skupině H+ 250 než všechny ostatní skupiny kromě kontrolní skupiny. Hodnoty parametru STR v kontrolní skupině byly významně nižší než H- 125, H- 250



a H+ 500. Rychlostní parametr VAP vykazuje nejnižší hodnoty ve skupinách H+ 250 a H- 250 ve srovnání s kontrolní skupinou a zbylými skupinami s výjimkou H+ 500. Parametr VSL byl významně nejnižší ve vzorcích H- 250 a H+ 250 ve srovnání se všemi skupinami a kontrolou, s výjimkou skupiny H+ 500, která nevykazuje žádné rozdíly s ostatními skupinami. Parametr WOB byl významně nejvyšší ve skupině H+ 125. WOB ve skupině H- 500 byl významně nižší ve srovnání s H- 125, H- 250 a H+ 500 a ve skupině H+ 250 a v kontrolní skupině byl nižší ve srovnání s H- 125, H- 250 a H+ 500.

**Graf 5:** Efekt proteinových frakcí SP ve třech koncentracích na kinematické parametry spermií po rozmrazení.





C kontrolní skupina, H- heparin nevázející frakce v koncentracích 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , H+ heparin vázející frakce v koncentracích 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; CASA parametry: amplituda laterálního vybočení hlavičky (ALH,  $\mu\text{m}$ ), frekvence křížení (BCF, Hz), linearita (LIN, %), přímota (STR, %), rychlost po průměrné dráze (VAP,  $\mu\text{m}/\text{s}$ ), rychlost po skutečné dráze (VCL,  $\mu\text{m}/\text{s}$ ), rychlost po napřímené dráze (VSL,  $\mu\text{m}/\text{s}$ ), kmitání (WOB, %)

Index a pro kontrolní skupinu a index b značí statistické rozdíly u jednotlivého parametru ( $P < 0,05$ )

**Tabulka 7:** Hodnoty motility a kinematických parametrů spermií v jednotlivých koncentracích proteinových frakcí semenné plazmy.

	H- 125	H- 250	H- 500	kontrola	H+ 125	H+ 250	H+ 500
<b>TMOT</b> (%)	18,8 ± 3,2	22,7 ± 3,1	27,6 ± 3,8	24,5 ± 3,6	21,7 ± 4,4	28,6 ± 4,4	25,3 ± 6,2
<b>PMOT</b> (%)	17,2 ± 3,5	13,5 ± 3,4	18,5 ± 4,2	22,6 ± 3,9	21,6 ± 4,8	14,5 ± 4,8	14,4 ± 6,8
<b>ALH</b> (μm)	4,5 ± 0,06 <sup>a</sup>	3,9 ± 0,07 <sup>c</sup>	4,2 ± 0,07 <sup>b</sup>	4,6 ± 0,07	4,4 ± 0,2 <sup>a,b</sup>	4,2 ± 0,09 <sup>b</sup>	4,1 ± 0,1 <sup>b,c</sup>
<b>BCF</b> (Hz)	14,1 ± 0,2	13,9 ± 0,3	13,9 ± 0,3	13,9 ± 0,3	15,3 ± 0,8	13,1 ± 0,4	14,5 ± 0,6
<b>LIN</b> (%)	48,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	48,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	45,7 ± 0,8 <sup>d</sup>	45,4 ± 0,7	57,0 ± 1,9 <sup>c</sup>	42,9 ± 1,0 <sup>b</sup>	49,8 ± 1,6 <sup>a</sup>
<b>STR</b> (%)	87,9 ± 0,6 <sup>a</sup>	89,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	87,9 ± 0,7 <sup>a</sup>	86,2 ± 0,7	93,6 ± 1,8 <sup>c</sup>	84,9 ± 0,9 <sup>b</sup>	90,0 ± 1,5 <sup>a,c</sup>
<b>VAP</b> (μm/s)	71,5 ± 1,05 <sup>a</sup>	62,8 ± 1,3 <sup>b</sup>	69,4 ± 1,4 <sup>a</sup>	71,0 ± 1,3	73,1 ± 3,4 <sup>a</sup>	64,1 ± 1,7 <sup>b</sup>	66,9 ± 2,8
<b>VCL</b> (μm/s)	140,1 ± 2,0 <sup>a</sup>	122,1 ± 2,5 <sup>b</sup>	140,0 ± 2,6 <sup>a</sup>	141,1 ± 2,4	125,4 ± 6,4 <sup>b,c</sup>	131,2 ± 3,3 <sup>c</sup>	130,3 ± 5,2
<b>VSL</b> (μm/s)	64,7 ± 1,1 <sup>a</sup>	57,6 ± 1,3 <sup>b</sup>	62,4 ± 1,4 <sup>a</sup>	63,5 ± 1,3	68,9 ± 3,5 <sup>a</sup>	56,7 ± 1,8 <sup>b</sup>	60,5 ± 2,8
<b>WOB</b> (%)	53,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	53,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	50,8 ± 0,7 <sup>b</sup>	51,2 ± 0,6	60,1 ± 1,6 <sup>c</sup>	49,3 ± 0,8 <sup>b</sup>	54,1 ± 1,3 <sup>a</sup>

*CASA parametry: amplituda laterálního vybočení hlavičky (ALH, μm), frekvence křížení (BCF, Hz), linearita (LIN, %), přímota (STR, %), rychlost po průměrné dráze (VAP, μm/s), rychlost po skutečné dráze (VCL, μm/s), rychlost po napřímené dráze (VSL, μm/s), kmitání (WOB, %).*

*a, b, c, d rozdílné indexy značí signifikantní rozdíly (P<0,05) v řádce v rámci kinematického parametru mezi testovanými skupinami s rozdílnými koncentracemi proteinových frakcí SP, H+ heparin vázající, H- heparin nevážající*

*rozdílné barvy značí statisticky významný rozdíl (P < 0,05) od kontrolní skupiny v daném kinematickém parametru*

### **Efekt přidavku proteinových frakcí SP na distribuci motilních spermií do subpopulací**

Výsledky chí-kvadrát testu jsou uvedeny v tabulce 8. Byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi vzorky s přidavkem H- frakce a kontrolou (Cramerův koeficient V: 0,08 = slabý vztah). Pro frakci H+ test neprokázal statisticky významný rozdíl s kontrolou.

Chí- kvadrát test také prokázal statisticky významný rozdíl mezi kategoriemi H+ a H- (Cramerův koeficient V: 0,051 = slabý vztah).

**Tabulka 8:** Procentuální zastoupení subpopulací spermií (pomalá, středně rychlá, rychlá) ve skupinách s přidavkem heparin vázající (H+) a heparin nevázájící (H-) proteinové frakce SP.

		procentuální zastoupení motilních spermií v subpopulacích		
		pomalá	středně rychlá	rychlá
Frakce	<b>H-</b>	34,3%	39,6%	26,1%
	<b>H+</b>	34,0%	35,9%	30,1%
	<b>kontrola</b>	30,9%	34,9%	34,3%
Frakce	<b>H-</b>	o	+	---
	<b>H+</b>	o	o	o
	<b>kontrola</b>	o	o	+++

H+ heparin vázající frakce SP, H- heparin nevázájící frakce SP

Modrá barva značí nejnižší, červená nejvyšší hodnotu v procentuálním zastoupení spermií v subpopulaci, +/- sílu signifikance ( $P < 0,05$ ), o bez závislosti.

Zastoupení středně rychlé subpopulace je významně vyšší ve vzorcích s přidavkem H- frakce oproti kontrole. Rychlá subpopulace spermií je více zastoupená v kontrolním vzorku a procentuální zastoupení pomalé subpopulace se neliší. V případě vzorků s přidavkem H+ frakce nebyly nalezeny žádné statistické rozdíly oproti kontrole v zastoupení subpopulací spermií v rozmrazeném ejakulátu hřebců.

Pro jednotlivé koncentrace proteinových frakcí chí-kvadrát test prokázal u frakce H- i H+ slabou závislost (Cramerův koeficient  $V=0.098$  pro H-, Cramerův koeficient  $V=0.068$  pro H+) (tabulka 9).

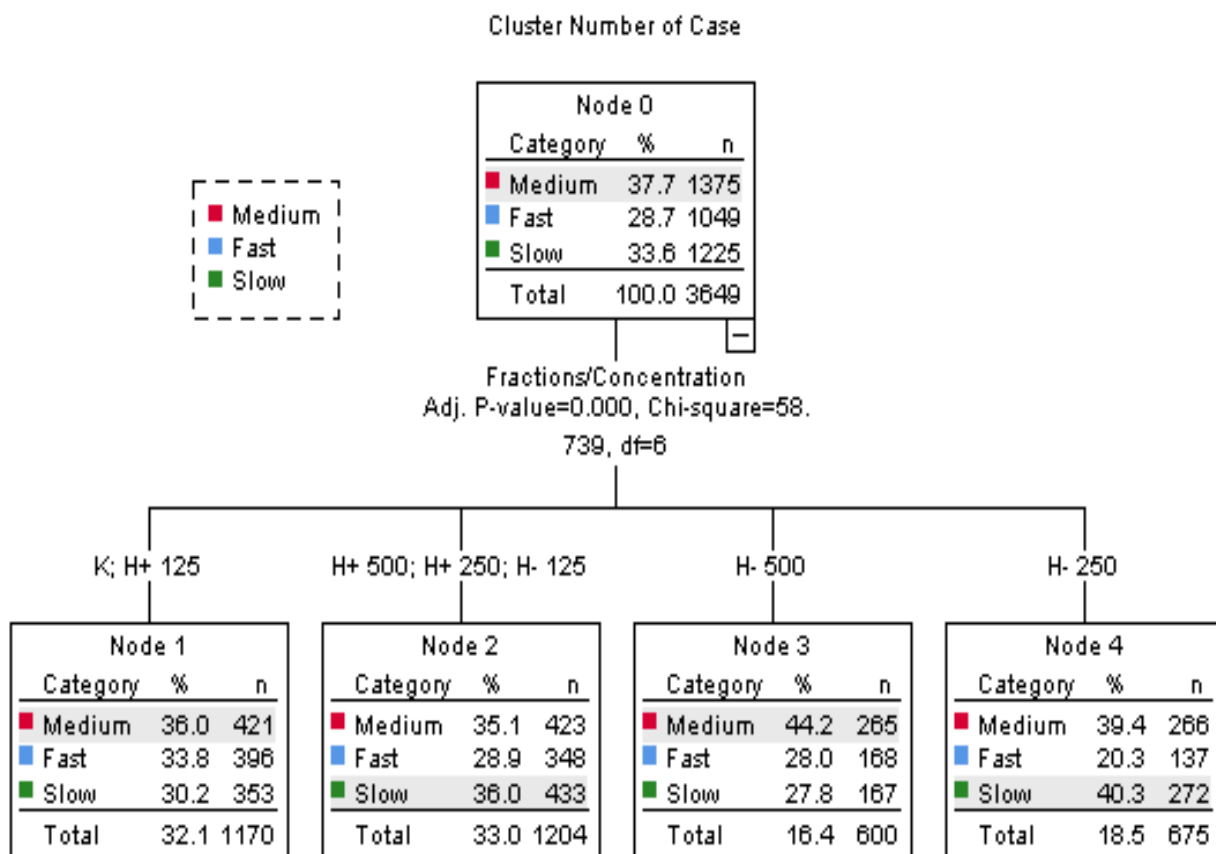
**Tabulka 9:** Procentuální zastoupení subpopulací (pomalá, středně rychlá, rychlá) ve skupinách s přidavkem heparin vázající (H+) a heparin nevážící (H-) proteinové frakce SP ve třech koncentracích: 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml; K - kontrolní skupina

Subpopulace		pomalá	středně rychlá	rychlá		pomalá	středně rychlá	rychlá
Frakce /koncentrace	H-125	34,1%	35,7%	30,2%	H+125	29,1%	37,7%	33,2%
	H-250	40,3%	39,4%	20,3%	H+250	36,7%	35,6%	27,7%
	H-500	27,8%	44,2%	28,0%	H+500	43,2%	30,9%	25,9%
	K	30,9%	34,9%	34,3%	K	30,9%	34,9%	34,3%
Frakce /koncentrace	H-125	o	o	o	H+125	o	o	o
	H-250	+++	o	---	H+250	o	o	o
	H-500	--	+++	o	H+500	++	o	o
	K	o	-	+++	K	o	o	o

H+ heparin vázající frakce SP, H- heparin nevážící frakce SP

Modrá barva značí nejnižší, červená nejvyšší hodnotu v procentuálním zastoupení spermií v subpopulaci, +/- sílu signifikance ( $P < 0,05$ ), o bez závislosti.

V případě jednotlivých koncentrací byl zaznamenán ve skupině H- 250 nejvyšší podíl spermií v pomalé subpopulaci a nejméně v rychlé, naopak tomu bylo u kontroly. Srovnatelné výsledky s kontrolou, tedy nejvyšší zastoupení rychlé a nejmenší zastoupení pomalé, poskytla skupina H+125. Skupina H- 500 měla nejvyšší podíl spermií středně rychlých. Nejvyšší zastoupení pomalé subpopulace u vzorků s přidavkem H+ proteinové frakce měla skupina s koncentrací 500 µg/ml a ta také obsahovala nejmenší zastoupení rychlé subpopulace spermií. Rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi a typy proteinových frakcí jsou znázorněny na obrázku 1.



**Obrázek 1:** Statisticky významné rozdíly mezi testovanými skupinami s přidavkem různých koncentrací proteinových frakcí SP a kontrolní skupinou.

K - kontrolní skupina, H- heparin nevážící frakce v koncentracích 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, H+ heparin vážící frakce v koncentracích 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml.

### Efekt přidavku proteinových frakcí SP na viabilitu a integritu akrozomu

Viabilita spermií (PI negativní) nebyla významně ovlivněna přidavkem proteinových frakcí SP ( $P > 0,05$ ). Pro úspěšnou fertilizaci je po kryokonzervaci důležitá intaktní akrozomová membrána spermií. Přítomnost živých buněk s intaktním akrozomem byla měřena průtokovou cytometrií s využitím fluorescenčně značeného lektinu PNA. PNA negativní (PNA-) buňky byly hodnoceny jako nepoškozené s intaktním akrozomem. PNA pozitivní byly buňky s poškozeným akrozomem. Nejlepší výsledky v procentech spermií s intaktní akrozomovou membránou byly ve vzorcích s přidavkem frakce H+ (tabulka 10).

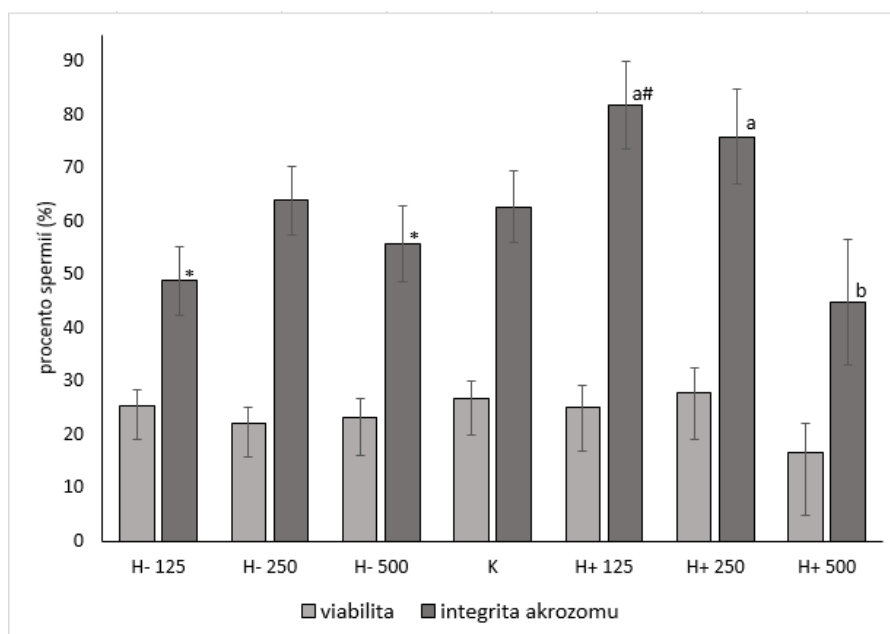
**Tabulka 10:** Vliv přidavku proteinových frakcí SP na viabilitu (PI-, PI negativní) a integritu akrozomu (PNA-, PNA negativní).

Viabilita a akrozomální integrita		
proteinová frakce	PI-	PNA-
<b>K</b>	26,58 ± 3,3	62,73 ± 7,1
<b>H-</b>	23,53 ± 1,8	56,16 ± 4,0
<b>H+</b>	24,24 ± 2,6	71,78 ± 5,7

H- heparin nevázející frakce, H+ heparin vázející frakce, K kontrolní skupina

Vliv jednotlivých koncentrací na viabilitu a integritu akrozomu je uveden v grafu 6 a tabulce 11. Skupina H+ 125 obsahovala významně ( $P < 0,05$ ) vyšší koncentraci buněk s intaktním akrozomem ve srovnání se vzorky H- 125, H- 500 a H+ 500. Podobně jako skupina H+ 250, která měla vyšší koncentraci spermií s intaktním akrozomem ve srovnání s H- 125 a H+ 500 ( $P < 0,05$ ).

**Graf 6:** Vliv přidavku proteinových frakcí SP ve třech koncentracích na viabilitu (PI-, PI negativní) a integritu akrozomu (PNA-, PNA negativní).



K - kontrolní skupina, H- heparin nevázející frakce v koncentracích 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, H+ heparin vázející frakce v koncentracích 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml.

a,b značí signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ) v H+ skupině

\*,# značí signifikantní rozdíly ( $P < 0,05$ ) mezi H+ a H- skupinami

**Tabulka 11:** Vliv přidavku proteinových frakcí SP ve třech koncentracích na viabilitu (PI-, PI negativní) a integritu akrozomu (PNA-, PNA negativní).

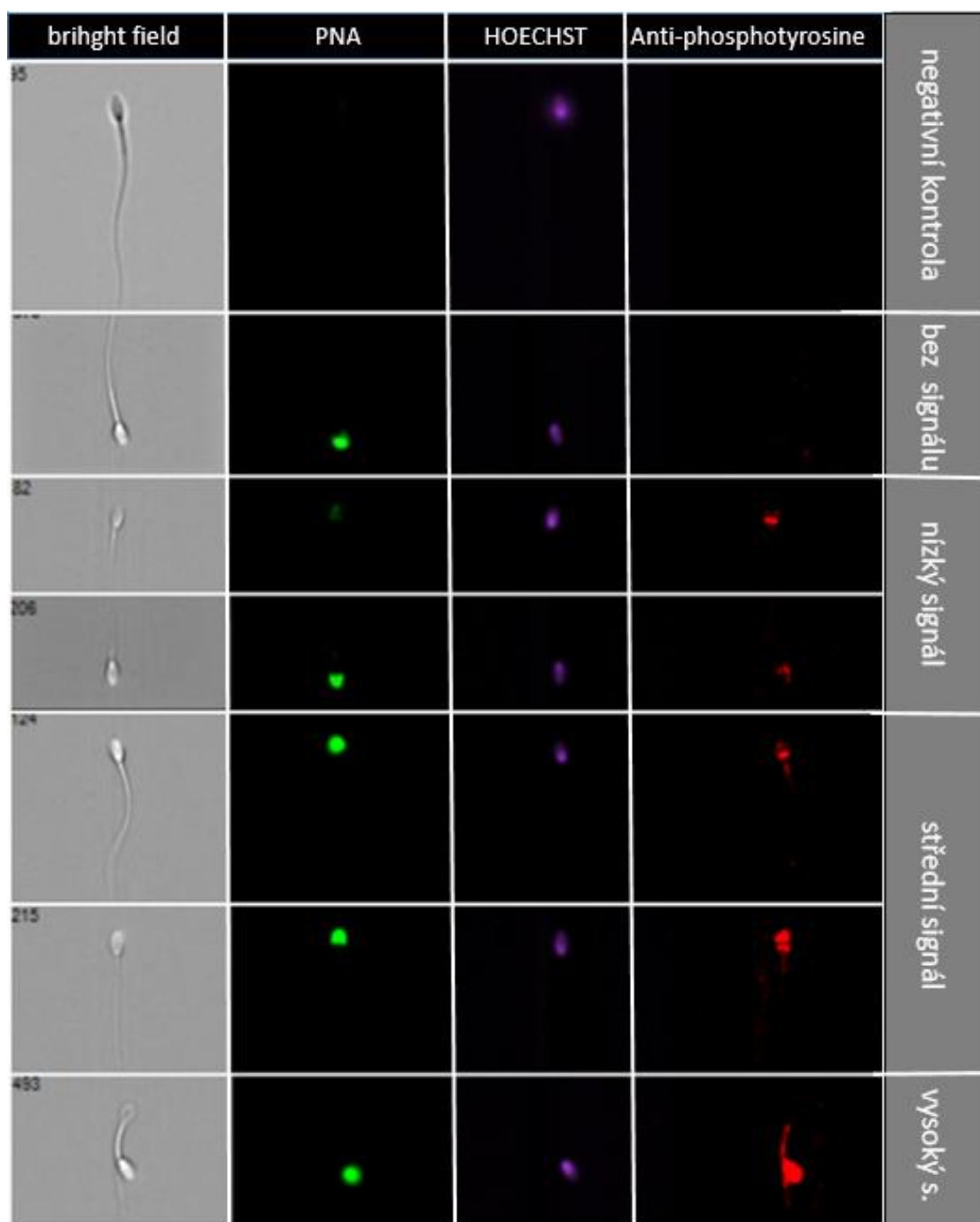
Viabilita a akrozomální integrita		
koncentrace	PI-	PNA-
<b>H- 125</b>	25,36 ± 3,1	48,77 ± 6,4*
<b>H- 250</b>	22,03 ± 3,1	63,86 ± 6,4
<b>H- 500</b>	23,10 ± 3,5	55,78 ± 7,1*
<b>K</b>	26,58 ± 3,3	62,73 ± 6,7
<b>H+ 125</b>	25,05 ± 4,0	81,87 ± 8,2 <sup>a</sup> #
<b>H+ 250</b>	27,94 ± 4,4	75,88 ± 9,0 <sup>a</sup>
<b>H+ 500</b>	16,47 ± 5,7	44,77 ± 11,7 <sup>b</sup>

*K - kontrolní skupina, H- heparin nevázející frakce v koncentracích 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, H+ heparin vázející frakce v koncentracích 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml  
a,b značí signifikantní rozdíly (P<0,05) v H+ skupině  
\*,# značí signifikantní rozdíly (P<0,05) mezi H+ a H- skupinami*

### **Efekt přidavku proteinových frakcí SP na fosforylaci proteinů spermií**

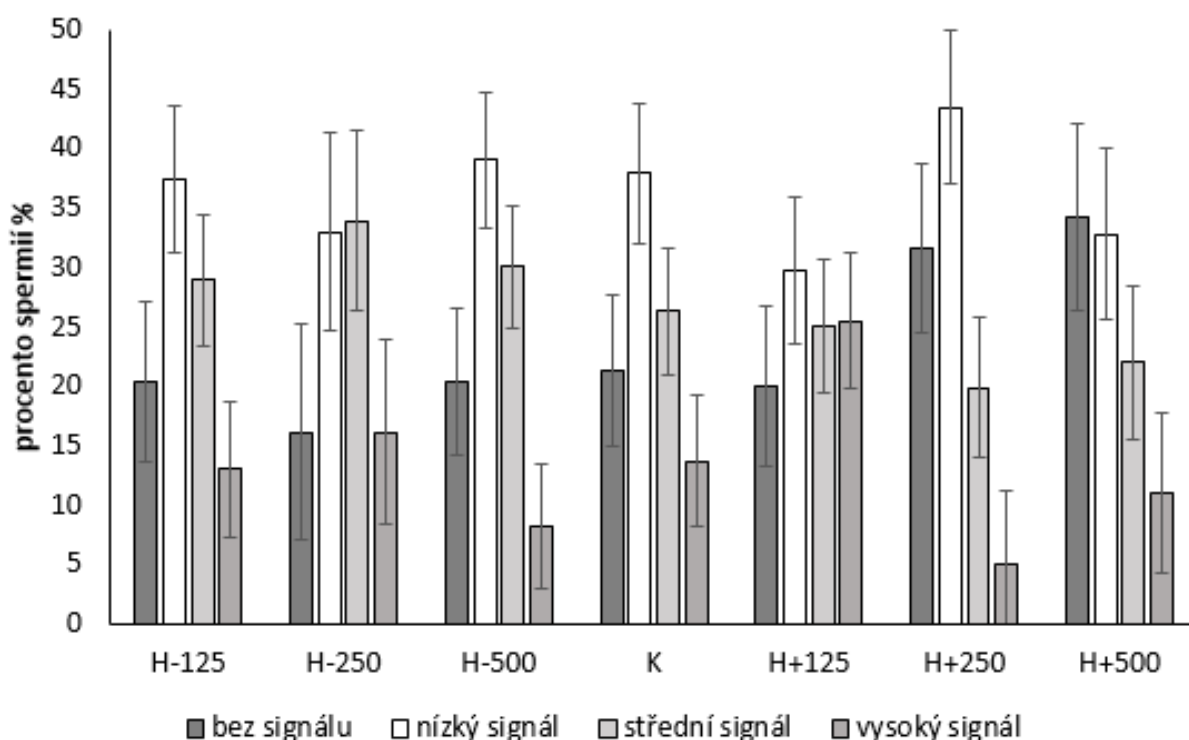
Měření zobrazovací průtokovou cytometrií na fosforylaci tyrosinu proteinů spermií ukazuje na kapacitační stav spermií. Obrázek 2 představuje různé skupiny spermií dle lokalizace a intenzity signálu. První skupinou byly spermie bez signálu a dále se slabým signálem - spermie se značeným ekvatoriálním segmentem, případně diskrétní značení v oblasti hlavičky. Středním signálem byly charakterizovány spermie s označenou akrozomální nebo post-akrozomální oblastí. Vysoký signál označuje spermie s intenzivním signálem v oblasti celé hlavičky s/bez bičíku. Přidání proteinových frakcí SP nezměnilo distribuci signálu protilátky u spermií (graf 7). Když byla fosforylace proteinu porovnána po přidání různých koncentrací proteinových frakcí SP, nebyly pozorovány statisticky významné (P <0,05) rozdíly. Nicméně přidání frakce H+ v koncentraci 500 µg/ml dává nejvyšší podíl spermií bez antifosforylačního signálu, což ukazuje na nízkou úroveň kapacity.





**Obrázek 2:** Flow cytometrické hodnocení intenzity signálu protilátky antifosfotyrosinu. Negativní kontrola; skupiny spermii: spermie bez signálu, nízký signál - ekvatoriální segment a bodové značení na hlavičce, střední signál - akrozomální a post-akrozomální segment, vysoký signál - hlavička s bičíkem.

**Graf 7:** Efekt proteinových frakcí SP ve třech koncentracích na intenzitu signálu fosforylace spermií; spermie bez signálu, nízký signál - ekvatoriální segment a bodové značení na hlavičce, střední signál - akrozomální a post-akrozomální segment, vysoký signál - hlavička s bičíkem.



K - kontrolní skupina, H- heparin nevázející frakce v koncentracích 125  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , H+ heparin vázející frakce v koncentracích 125  $\mu\text{g/ml}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$

## 7.6 Diskuze experiment III

V experimentu III jsme se blíže zaměřili na proteiny semenné plazmy (SP) s cílem zjistit, zda v proteinových frakcích SP jsou přítomny některé ochranné faktory působící proti škodlivým účinkům procesu zmrazování a rozmrazování na spermie. Separovali jsme proteiny SP podle jejich schopnosti vázat se k heparinu na frakce heparin vázející (H+) a na heparin nevázející (H-). Bylo zaznamenáno, že vliv proteinů SP na spermie závisí na jejich koncentraci (Centurion et al. 2003; Kumar 2008; Srivastava et al. 2013b). Podle studie Singh et al. (2016) provedené na býčích byly stanoveny testovací koncentrace proteinů SP 0, 125, 250 a 500  $\mu\text{g/ml}$ .

V hřebčí SP jsou hlavními proteiny HSP (horse seminal plasma protein; HSP-1-8) (Calvete et al. 1994; Topfer-Petersen et al. 2005). Podle výsledků Calvete et al. (1994) schopnost vázat se na heparin mají proteiny SP hřebce HSP-1, HSP-2, HSP-5, HSP-6, HSP-7 a HSP-8. Proteiny HSP-3 a HSP-4 schopnost vázat se na heparin nemají (Calvete et al. 1994). Pokud tedy používáme H+ frakci, měla by převážně obsahovat proteiny HSP-1, -2 a HSP-5

až - 8. Tyto proteiny vzhledem ke známým homologiím mezi druhy můžeme porovnávat se studii na býčích nebo kančích spermích s přidavkem proteinů BSP (bovine seminal plasma protein), pB1/DQH nebo AQN a AWN (H<sup>+</sup> proteiny u býků a kanců). V H<sup>-</sup> frakci by měly být přítomny proteiny HSP-3 (CRISP-3) a HSP-4 (Calvete 1994). Pozdější studie Calvete et al. (1995b) odhalila v H<sup>-</sup> frakci také proteiny HSP-1 a HSP-2. V obou frakcích (H<sup>+</sup> i H<sup>-</sup>) byly hlavními proteinovými složkami právě HSP-1 a HSP-2. Nevázající se izoformy se lišily od forem vázajících se na heparin ve svém obsahu sacharidů, rozdílnými posttranslačními modifikacemi a různým agregačním stavem. Výsledky ukázaly, že agregační stav heparin vázajících proteinů je multimerní, zatímco heparin nevážající tvoří monomerní formy (Calvete et al. 1995b), a tím pádem dle agregačního stavu mohou mít proteiny SP naprosto odlišné vlastnosti.

Výsledky různých studií ukazují, že přidání SP nebo jejích proteinů by mohly mít na kvalitu kryokonzervovaných spermí jak pozitivní, tak i negativní účinky (Harshan et al. 2006; Singh et al. 2007; Srivastava et al. 2013a; Ramirez-Vaquez et al. 2019). Vliv a funkce proteinů SP jsou velmi složité a komplexní a dosud nebyly zcela objasněny. Kromě toho je semenná plazma vysoce variabilní mezi druhy, v rámci jednoho druhu, mezi jednotlivci a také mezi ejakuláty konkrétního samce (Centurion et al. 2003).

Známým faktem je, že kryokonzervace snižuje motilitu a fertilizační schopnost spermí (Bedford et al. 1995). Pro uchování spermatu hřebce a zachování dobré motility po zmrazení a rozmrazení existují různé studie s přidáním SP v různých koncentracích před nebo po kryokonzervačním procesu. Výsledky těchto studií však nejsou konzistentní (Aurich et al. 1996; Arruda et al. 2008; de Andrade et al. 2011; Heise et al. 2011; Neuhauser et al. 2014; Al-Essawe et al. 2018; Sichtar et al. 2019). Rozdílnost výsledků může být způsobena individuálními reakcemi spermí na přidání SP a rozdíly v jejím složení a zastoupení jednotlivých složek. Ve studii Aurich et al. (1996) bylo zjištěno, že individuální složení SP ovlivňuje vhodnost hřebců pro kryokonzervaci spermatu. Chceme-li se vyhnout individualitě ve složkách SP, může být vhodnějším přístupem využít samostatné proteinové frakce.

Na základě schopnosti proteinů vázat heparin jsme v tomto experimentu rozdělili SP na dvě proteinové frakce - heparin vázající (H<sup>+</sup>) a heparin nevážající (H<sup>-</sup>). Přidání dvou typů proteinových frakcí SP v naší studii ke kryokonzervačnímu ředidlu neovlivnilo celkovou (TMOT) ani progresivní (PMOT) motilitu spermí po rozmrazení. Ve studii na býčích bylo studováno přidání H<sup>+</sup> proteinů k ředidlu v koncentraci 10, 20 a 40 µg/ml. Bylo zjištěno, že optimální dávka byla 20 µg/ml, tato koncentrace zvýšila před zmrazením a po rozmrazení motilitu spermí ve srovnání s kontrolou a ostatními koncentracemi. V porovnání s naší studií

bylo použito v této práci u býků podstatně menší množství proteinů (Patel et al. 2016). Vliv na motilitu byl zaznamenán také ve studii u bůvolů, avšak na epididymálních spermích, kde přídavek H<sup>+</sup> frakce měl negativní a naopak H<sup>-</sup> pozitivní efekt závislý na koncentraci. Proteiny H<sup>+</sup> měly pozitivní vliv na progresivní motilitu epididymálních spermií pouze na úrovni před zmrazením (Kumar 2008), podobně jako u skotu (Harshan et al. 2006). Tento účinek lze vysvětlit díky BSP (binder sperm proteins) obsažených v této frakci, které iniciují eflux cholesterolu a modulují konformaci složek plazmatické membrány, což vede ke zvýšení motility (Harshan et al. 2006). U kanců je vysoká koncentrace H<sup>-</sup> proteinu semenné plazmy (PSP-I) negativně korelována s celkovou a progresivní motilitou spermií (De Lazari et al. 2019). Nedávná studie kolektivu Usuga et al. (2020) také prokázala, že příliš vysoká koncentrace SP u hřebců snížila celkovou a progresivní motilitu po rozmrazení a také některé kinematické parametry spermií.

V naší studii nebyly pozorovány žádné účinky přídatku proteinových frakcí na motilitu po rozmrazení, jak škodlivé tak ani pozitivní, všechny skupiny poskytují srovnatelné výsledky s kontrolou. Přidání proteinových frakcí však mění kinematické parametry získané z měření pomocí počítačem řízené analýzy spermií CASA. Koncentrace 125 µg/ml heparin vázající frakce (H<sup>+</sup>) poskytla významně (P <0,05) nejvyšší hodnoty v parametrech charakterizující přímost a rychlost (LIN, STR, VAP, VSL) a parametru WOB. Vyšší hodnoty kinematických parametrů jsou spojovány s vyšší kvalitou a fertilizační schopností spermií (Quintero-Moreno et al. 2003; Ortega-Ferrusola et al. 2009; Martínez-Pastor et al. 2011). Fertilní spermie u mužů dosahují vyššího parametru VCL než ty neplodné (De Geyter et al. 1998). Shodně byla zjištěna u býků významná pozitivní korelace parametru VCL s počtem spermií navázaných na ZP (Ferraz et al. 2014). Ve své studii spojují subpopulaci s nejrychlejšími a progresivně se pohybujícími spermii býků s vyšší kvalitou a schopností fertilizace. U oslů zjistili Taberner et al. (2010) významnou pozitivní korelaci mezi některými CASA parametry a mírou oplodnění *in vitro*. Rovněž u skotu (*in vivo*), Farrell et al. (1998) uvedli silnou korelaci mezi několika charakteristikami pohyblivosti a plodností. Zdá se tedy, že spermie s maximální schopností fertilizace jsou ty s nejvyššími parametry rychlosti (Quintero-Moreno et al. 2003). Je zajímavé, že v naší předchozí studii (experiment II) měl přídavek celé SP hřebce k rozmraženým spermii významný pozitivní vliv na shodné kinematické parametry (LIN, STR, VAP, VSL a WOB) (P <0,01) (Sichtar et al. 2019). Také hřebčí rozmrazené epididymální spermie s přídatkem SP vykazovaly vyšší hodnoty parametrů rychlosti (VCL, VAP, VSL), ALH a BCF, ale parametry STR a LIN byly s přídatkem SP nižší a WOB se nezměnil (Neuhauser et al. 2013). Naopak ve studii Arruda et al. (2008) přidání celé SP po rozmrazení

nezměnilo rychlost spermií (VAP, VSL, VCL), ale BCF, STR a LIN byly sníženy ( $P < 0,05$ ) a přidavek 20% autologní SP snížil ALH ( $P < 0,05$ ).

Distribuce pohyblivých spermií do subpopulací (pomalá, středně rychlá a rychlá) by mohla předpovídat fertilizační potenciál zmrazeného a rozmrazeného ejakulátu hřebců. Studium distribuce motilních spermií v subpopulacích může být vhodným nástrojem ke zlepšení rutinních analýz kvality hřebčího ejakulátu, poskytující nový úhel pohledu na jeho kvalitu (Quintero-Moreno et al. 2003). Podobně jako u jednotlivých kinematických parametrů jsme zjistili, že nejvyšší množství rychlé subpopulace a nejnižší množství spermií v pomalé subpopulaci bylo ve skupině s H<sup>+</sup> proteinovou frakcí v koncentraci 125 µg/ml. Na druhé straně H<sup>+</sup> frakce v nejvyšší koncentraci (500 µg/ml) měla opačný účinek na procento spermií v subpopulacích. Jak ukázala naše předchozí studie, přidání celé SP do vzorku spermií po rozmrazení výrazně zvýšilo procento spermií v rychlé subpopulaci (Sichtar et al. 2019).

Podle studie Ferraz et al. (2014) rychlá a progresivní subpopulace korelovala se schopností oplodnění *in vitro*. Vztah mezi jednotlivými subpopulacemi spermií a plodností *in vivo* u koní není úplně jasný. Nicméně, Gibb et al. (2014) zdůraznili pozitivní vztah rychle se pohybujících spermií a míry zabřeznutí u klisen. Tudiž se předpokládá pozitivní vztah zastoupení subpopulací s nejvyššími hodnotami rychlosti s fertilizační schopností (Quintero-Moreno et al. 2003). Co se týče kryokonzervace, vyšší poměr subpopulace s rychlými spermiemi v ejakulátu je pozitivně asociovaný s vyšší kryorezistencí (Ortega-Ferrusola et al. 2009).

Proteiny SP jsou spojovány s pozitivním vlivem na integritu plazmatické membrány jako možné stabilizační faktory působící jako ochrana membrány spermie (Kumar et al. 2008). Předpokládá se, že SP obsahuje dekapacitační faktory, které se váží na plazmatickou membránu spermií a udržují tak jejich fertilizační potenciál (Centurion et al. 2003). Proteiny SP ovlivňují několik zásadních kroků ve fertilizačním procesu, jako je kapacitace, vytvoření rezervoáru spermií v oviduktu, modulace imunitního prostředí v reprodukčním traktu samice a interakce gamet (Caballero et al. 2012). Většina proteinů zabraňuje aglutinaci spermií, předčasné akrozomální reakci a fagocytóze buňkami imunitního systému v samičím reprodukčním traktu (Jonakova & Ticha 2004).

V našem experimentu nebyla po rozmrazení hřebčích spermií ovlivněna integrita plazmatické membrány (viabilita, PI) různými koncentracemi proteinových frakcí. Je zajímavé, že v případě přidání proteinové frakce H<sup>+</sup> v koncentraci 500 µg/ml vykazovalo negativní trend životaschopnosti spermií po rozmrazení. Kryokonzervace částečně způsobuje nevratné poškození membrán spermií hřebců kvůli změně tekutosti membrány. Uvádí se, že přidání

cholesterolu zlepšuje přežívání kryokonzervovaných spermií hřebců (Moore et al. 2005). Ve studii Aurich (1996) byla integrita membrány a progresivní motilita spermií hřebců zlepšena, když byla přidána celá SP (před zmrazením) od hřebců s dobrou mrazitelností k ejakulátům hřebců se špatnou motilitou po rozmrazení. U kanců přidání celé SP před zmrazením zlepšilo životaschopnost, pohyblivost a *in vitro* fertilizační schopnost rozmrazených spermií (Guthrie et al. 2000). Na bovinním modelu měla H<sup>+</sup> proteinová frakce negativní vliv na integritu plazmatické membrány po kryokonzervaci (Patel et al. 2016). Proteiny BSP, které se vyskytují v H<sup>+</sup> proteinové frakci SP vykazovaly negativní vztah k mrazitelnosti nebo plodnosti skotu (Roncoletta et al. 2006; D'Amours et al. 2010; Sarsaifi et al. 2015). U hřebce byla také nalezena negativní korelace heparin vázajícího proteinu HSP-1 s plodností (homolog býčího proteinu BSP-1) (Novak et al. 2010; Jobim et al. 2011). BSP mohou ovlivnit tekutost plazmatické membrány spermií zvýšením efluxu cholesterolu, iontů (Visconti et al. 1998; Therein et al. 1999; Moreau & Manjunath 2000) a také efluxu fosfolipidů, což přispívá k destabilizaci membrány a její větší citlivosti na chladový šok a celý proces kryokonzervace (Manjunath et al. 2002). Fertilizační potenciál zmrazených a rozmrazených spermií je snížen jejich kryokonzervací a jedním z důvodů by mohla být ztráta povrchových proteinů, což naznačuje pozorování Lessard et al. (2000).

Neporušený akrozom je klíčovou částí spermií pro dosažení úspěšného oplodnění a dalším důležitým parametrem kvality spermatu po jeho uchování. Míra akrozomální integrity je pozitivně korelována s plodností (Sellem et al. 2015). V naší studii proteinová frakce H<sup>+</sup> v koncentracích 125 µg/ml a 250 µg/ml poskytla nejvyšší procento spermií s intaktními akrozomy (P <0,05). Na druhé straně byla zaznamenána nedostatečná ochrana akrozomu ve vzorcích kryokonzervovaných v přítomnosti nejvyšší koncentrace (500 µg/ml) frakce H<sup>+</sup>. Bylo prokázáno, že účinek proteinů SP závisí na koncentraci (Centurion et al. 2003; Kumar 2008; Srivastava et al. 2013b) a naše výsledky tento předpoklad potvrdily. Lze tedy odvodit, že proteinová frakce H<sup>+</sup> ve vyšších koncentracích může u hřebců indukovat akrozomální reakci, jak se předpokládá u býků (Ordonez-Leon 2011; Patel et al. 2016; Singh 2016), což je pro kryokonzervaci spermií nežádoucí. Kromě toho studie na buvolích epididymálních spermiích také podporují naše výsledky, kdy přidání H<sup>+</sup> proteinů k ředidlu před zmrazením vyústilo ve významné snížení akrozomální integrity ve srovnání s kontrolou (Harshan et al. 2006). Na druhé straně akrozomální integrita nebyla ovlivněna přidáním H<sup>+</sup> nebo/a H<sup>-</sup> proteinových frakcí ve studii Kumar et al. (2008) na epididymálních spermiích buvolů. Jak již bylo zmíněno, H<sup>+</sup> proteiny u býků (BSP) stimulací efluxu cholesterolu a fosfolipidů

z plazmatické membrány mohou způsobit, že membrána spermií je velmi citlivá na skladování (Therien et al. 1999; Manjunath et al. 2007; Srivastava et al. 2013a).

Tyrosinová fosforylace proteinů je jedním z důležitých intracelulárních mechanismů regulujících funkci spermií a je indikátorem kapacitace (Visconti et al. 1995). Kryokonzervace vede ke změnám podobným kapacitaci, včetně přítomnosti fosforylovaných proteinů spermií (Bailey et al. 2000; Watson 2000). Předpokládá se, že dlouhověkost spermií v samičím reprodukčním traktu je snížena předčasnými změnami spojenými s kapacitací ovlivněnými kryokonzervací, které byly prokázány u spermatu býka, kance a hřebce (Cormier et al. 1997; Bedford et al. 2000; Kumaresan et al. 2011; de Andrade et al. 2012). Je dokázáno, že kryokonzervace podporuje kapacitaci spermií. Kadirvel et al. (2011) na buvolích spermiích ukázali, že *in vitro* kapacitované a kryokapacitované spermie měly podobnou lokalizaci na tyrosinu fosforylovaných proteinů. Na základě vyhodnocení detekce fosforylovaných proteinů jako jednoho z klíčových parametrů z hlediska kapacitace spermií; náš experiment neprokázal žádný významný účinek proteinových frakcí SP na snížení kryokapacitace během zmrazování a rozmrazování spermatu hřebce. Fosforylace na tyrosinu ve spermiích hraje důležitou roli v intracelulární signalizaci a transportu a hodnocení fosforylace je používáno jako nástroj pro sledování funkčnosti spermatu po kapacitaci (Visconti et al. 1995; Vieira et al. 2013).

Pommer et al. (2003) zkoumali tyrosinovou fosforylací spermií hřebce před nebo po kryokonzervaci za kapacitujících podmínek. Pozorovali čtyři různé vzorce fluorescence tyrosinové fosforylace proteinů: (a) equatoriální segment; (b) bičík; (c) equatoriální segment s bičíkem a (d) žádný signál. Došli k závěru, že samotný proces kryokonzervace neindukuje tyrosinovou fosforylací proteinů, ale že spermie se stanou náchylnější k podstoupení fosforylace po inkubaci za kapacitačních podmínek, což naznačuje změny membrány spojené s kryokonzervací. Ve studii Viera et al. (2013) spermie hřebců vykazovaly zvýšení fosforylace proteinů, když byly kapacitovány *in vitro*. Ve zmíněné práci byly spermie rozděleny do dvou skupin podle lokalizace signálu proti anti-fosfotyrosinu: (a) sub-equatoriální segment a (b) bičík. Hodnocení probíhalo standardním způsobem na malém souboru buněk pod fluorescenčním mikroskopem (Vieira et al. 2013). Pommer et al. (2003) zaznamenali zvýšení fosforylace ve střední a hlavní části bičíku, když byly čerstvě ejakulované hřebčí spermie kapacitovány. Naše výsledky získané pomocí zobrazovacího průtokového cytometru na velkém souboru spermatických buněk s použitím protilátky proti fosfotyrosinu neprokázaly žádné rozdíly v množství spermií s rozdílnou lokalizací signálu mezi skupinami s proteinovými frakcemi a kontrolou.

Podle Centurion et al. (2003) SP obsahuje dekapacitační faktory, které zabraňují předčasné akrozomální reakci a zvyšují potenciál oplodnění. Dekapacitační účinek SP je pravděpodobně výsledkem proteinů, které jsou vázány na povrch spermií, což brání změnám v membráně, které vedou ke kapacitaci a/nebo inhibují některé signály kapacitace do jiných částí buňky. Ve studii de Andrade et al. (2012) zjistili, že přidání semenné plazmy snížilo množství fosforylovaných proteinů spermií a snížilo procento kapacitovaných buněk. Proteiny H<sup>+</sup> z kančí SP mají schopnost inhibovat kapacitaci pouze při chlazení a v *in vitro* kapacitačních podmínkách. Avšak proteiny H<sup>+</sup> SP u kanců nezabránilly kapacitačním změnám indukovaným kryokonzervací (Vadnais & Roberts 2007). Předpokladem je, že H<sup>+</sup> proteiny semenné plazmy slouží jako faktor indukující kapacitaci. Lusignan et al. (2007) uvedli, že kančí protein SP pB1 - homologní s proteiny BSP u býků (proteiny BSP-A1/-A2 a pB1 sdílejí 65% podobnost v aminokyselinových sekvencích), může vyvolat kapacitaci kančích epididymálních spermií. Pozitivní účinek na kapacitaci kančích spermií měly také býčí proteiny BSP-A1/-A2 v koncentraci 20 µg/ml, když byly přidány do kapacitačního média. Celá SP kanců neměla schopnost vyvolat kapacitaci epididymálních spermií, pravděpodobně proto, že SP obsahuje faktory, které inhibují kapacitaci spermií. Autoři došli k závěru, že proteiny BSP a jejich homology u jiných druhů indukují kapacitaci spermií (Lusignan et al. 2007). V případě hřebců nebyl tento předpoklad naším experimentem potvrzen.

Spermie různých druhů vyžadují pro kapacitaci rozdílný čas a jejich reakce na kapacitační faktory je jiná (Zhang et al. 1991). To může souviset s různým složením membrán spermií a s tím, jak cholesterol reguluje tekutost a propustnost lipidové dvojvrstvy v membráně. Variace v rychlosti a schopnosti spermií podstoupit kapacitaci mohou souviset s rozdíly v poměru cholesterol/fosfolipidy v plazmatické membráně (Davis 1981; Hoshi et al. 1990). Individuální predispozice spermatu hřebce významně ovlivňuje účinnost kapacitace (Baranska & Tishner 1995). Rovněž se vyskytují rozdíly mezi hřebci v morfologických a funkčních změnách, které vykazují jejich spermie v reakci na přidavek prokapacitačního faktoru – kalcium ionoforu (Zhang et al. 1991).



## 8 Závěry

Dosáhnout úspěšné kryokonzervace hřebčích spermií je stále výzvou, jelikož existují značné rozdíly mezi mrazitelností a přežíváním spermií hřebců kvůli jejich individualitě. Standardizace protokolu pro kryokonzervaci spermatu hřebce je tedy komplexní úkol vyžadující další výzkum.

### Závěry experimentu I

Z výsledků prvního experimentu vyplývá, že spermie dobře mrazitelných (GF) hřebců mají vyšší procentuální zastoupení rychlé a rapidní subpopulace. Rozdíl ve většině parametrů motility je mezi hřebci GF a špatně mrazitelnými (PF) signifikantní. Subpopulace rapidních spermií GF hřebců je po rozmrazení ejakulátu v čase inkubace T0 rychlejší a přímější než spermie rapidní subpopulace PF hřebců. Avšak subpopulace rychlých spermií PF hřebců je po rozmrazení ejakulátu v čase inkubace T0 rychlejší než rychlé spermie GF hřebců. Pokud tedy spermie PF hřebce přežije proces kryokonzervace, je velmi motilní, ale na druhou stranu je více ovlivněna inkubací. Spermie PF hřebců jsou citlivější na prodloužený čas inkubace než spermie GF hřebců. Na základě uvedených výsledků lze doporučit rozdílný přístup ke zpracování inseminační dávky (ID) dobře a špatně mrazitelných hřebců. Pro zvýšení kvality ID a úspěšnosti následné inseminace je vhodné využít u špatně mrazitelných hřebců metody selekce spermií či vysoce efektivní postupy inseminace po rozmrazení (např. Deep horn insemination technique). Další výzkum zabývající se rozdílností subpopulací spermií a také kvality plazmatické membrány u GF a PF hřebců je doporučen. Znalost typu a složení jednotlivých subpopulací spermií v ejakulátu je možným nástrojem, který pomůže predikovat fertilizační potenciál i mrazitelnost konkrétního samce. Tím pádem znalosti o heterogenitě ejakulátu mohou napomáhat k výběru vhodných metod asistované reprodukce a následně vést k vyšší oplozovací schopnosti a mít tak vliv na ekonomickou složku chovu koní.

### Závěry experimentu II

Semenná plazma (SP) ovlivňuje životnost spermií, a zvláště u hřebců produkujících sperma s omezenou tolerancí ke skladování, lze zlepšit kvalitu spermatu pomocí modifikací postupů zpracování spermatu. V současné době se zdá, že dostupné znalosti o účincích obsahu SP na spermie a plodnost jsou nejednotné a někdy i konfliktní. To lze považovat za silnou motivaci k dalšímu výzkumu v této oblasti. Z výsledků experimentu II vyplývá, že přidání SP

po rozmrazení od dobře mrazitelných hřebců (S-SP a N-SP) pozitivně ovlivňuje kinematické parametry spermií a zastoupení spermií v subpopulacích, ale stav plazmatické membrány (HOS+) u špatně mrazitelných hřebců po 30 minutách inkubace od rozmrazení zhoršuje. Z čehož vyplývá, že doba interakce spermií se SP může být důležitým faktorem, stejně tak jako její zdroj. I když obecně inseminační dávka špatně mrazitelných hřebců obsahuje méně pohyblivých spermií ve srovnání s dobře mrazitelnými hřebci, zmrazené a rozmrazené sperma by mohlo být použito při inseminaci do děložních rohů (Deep horn insemination) nebo pro produkci embryí, kde se provádí výběr nejlepších spermií. Existují rozdíly mezi výsledky studií popisujících účinek přídatku SP na kryokonzervaci semene hřebců, čímž se otevírá prostor pro další výzkum, ideálně zaměřený na podrobnější studium SP a jejích složek. Další studie by mohly přispět k zefektivnění procesu kryokonzervace a odhalit nové strategie pro uchovávání spermií kvalitních hřebců, kteří jsou klasifikováni jako špatně mrazitelní.

### **Závěry experimentu III**

Cílem experimentu III bylo zjistit efekt proteinových frakcí semenné plazmy (SP) hřebce na mrazitelnost spermatu. Jelikož bylo prokázáno u dalších druhů zvířat, že některé proteiny SP mohou mít pozitivní vliv na spermie, bylo by vhodné odhalit přirozenou složku ejakulátu, která by sloužila jako ochrana proti negativnímu vlivu mrazení a rozmrazování na kvalitu hřebčích spermií. Z našich výsledků je patrné, že heparin vázající (H<sup>+</sup>) proteinová frakce má pozitivní vliv na charakter pohybu spermií po rozmrazení. Nejlepší výsledky v kinematických parametrech spermií byly ve skupině s nejnižší koncentrací H<sup>+</sup> proteinové frakce (125 µg/ml). Podobné výsledky poskytla distribuce spermií do subpopulací pomocí klastrové analýzy - nejvyšší zastoupení rychlé subpopulace měla skupina H<sup>+</sup> 125 a naopak pomalá subpopulace ve skupině s nejvyšší koncentrací H<sup>+</sup> proteinů (H<sup>+</sup>500 µg/ml). V případě vlivu proteinových frakcí na akrozomální membránu, můžeme soudit, že integritu akrozomu nejlépe uchovávají H<sup>+</sup> 125 a H<sup>+</sup> 250 a naopak nejvíc akrozomální integritu snižují H<sup>+</sup> proteiny v koncentraci 500 µg/ml. Podobně v případě integrity plazmatické membrány přidání proteinové frakce H<sup>+</sup> v koncentraci 500 µg/ml vykazovalo negativní trend v životaschopnosti spermií po rozmrazení. Lze tedy odvodit, že u hřebců H<sup>+</sup> proteiny ve vyšších koncentracích mohou vyvolat akrozomální reakci, snížit viabilitu i motilitu, což je ovšem pro kryokonzervaci spermií nežádoucí. Kryokonzervace také způsobuje změny podobné kapacitaci, které negativně ovlivňují fertilizační schopnost spermií po rozmrazení. Hodnocení tyrosinové fosforylace proteinů spermií, jako indikátoru kapacitačního stavu, v našem případě neodhalilo signifikantní rozdíly mezi proteinovými frakcemi SP v různých koncentracích. Avšak jistý pozitivní trend

byl zaznamenán ve skupinách s přidavkem frakce H<sup>+</sup> ve vyšších koncentracích (250 µg/ml a 500 µg/ml), z čehož lze předpokládat, že v SP hřebců by proteiny H<sup>+</sup> mohly patřit k dekapacitačním faktorům. Hřelec se však liší od ostatních druhů savců v *in vitro* kapacitaci, která není u koní spolehlivě úspěšná a stále je prostor pro další výzkumy v této oblasti. Jak je patrné z uvedených výsledků, jak našeho experimentu či dalších zmíněných studií, je účinek proteinových frakcí SP závislý na koncentraci a je vysoce ovlivněn individualitou samce, zejména v případě hřebců. Další výzkum vlivu jak SP, tak jejích složek je doporučen. Bylo by vhodné zaměřit se na složky SP u kvalitních a dobře mrazitelných hřebců a do budoucna tak pomoci v uchování semene hřebců, u kterých má kryokonzervace neuspokojivé výsledky. Dalším využitím stanovení složek SP by mohla být predikce mrazitelnosti a potenciálně i fertilizační schopnosti hřebců.

## 9 Literatura

- Abdel-Rahman HA, El-Belely MS, Al-Qarawi AA, El-Mougy SA. 2000. The relationship between semen quality and mineral composition of semen in various ram breeds. *Small Ruminant Research* **38**:45-49.
- Akcay 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.
- Al-Essawe E, Tsikis G, Labas V, Druart X, Wulf M, Aurich C, Morrell JM. 2016. Seminal plasma components differ between "good freezer" and "poor freezer" stallions. *Animal Reproduction Science* **169**:113-113.
- Al-Essawe EM, Johannisson A, Wulf M, Aurich C, Morrell JM. 2018. Improved cryosurvival of stallion spermatozoa after colloid centrifugation is independent of the addition of seminal plasma. *Cryobiology* **81**:145-152.
- Alghamdi AS, Troedsson MHT, Xue JL, Crabo BG. 2002. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. *American Journal of Veterinary Research* **63**:880-885.
- Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros AS. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim. Reprod. Sci.* **89**:105–113.
- Amann RP, Pickett BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* **7**:145-173.
- Amman RP, Graham JK. 2011. Spermatozoa function. Pages 1053-1084 in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, and Varner DD, editors. *Equine Reproduction*. Blackwell Publishing, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, United Kingdom.
- Amann RP, Waberski D. 2014. Computer-assisted spermanalysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* **81(1)**:5–17.
- Ardon F, Suarez SS. 2013. Cryopreservation increases coating of bull sperm by seminal plasma binder of sperm proteins BSP1, BSP3, and BSP5. *Reproduction* **146**:111-117.
- Arienti G, Carlini E, De Cosmo AM, Di Profio P, Palmerini CA. 1998. Protasome-like particles in stallion semen. *Biology of Reproduction* **59**:309-313.
- Arruda RP, Andrade AFC, Raphael CF, Peres KR, Nascimento J, Martins S, Bianconi LL. 2008. Effects of addition of seminal plasma on lifespan of frozen-thawed equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **107**:307-308.
- Asari M, Sasaki K, Miura K, Ichihara N, Nishita T. 1996. Immunohistochemical localization of the carbonic anhydrase isoenzymes (CA-I, CA-II, and CA-III) in the reproductive tract of male horses. *American Journal of Veterinary Research* **57**:439-443.
- Aumuller G, Vesper M, Seitz J, Kemme M, Scheit KH. 1988. BINDING OF A MAJOR SECRETORY PROTEIN FROM BULL SEMINAL-VESELICLES TO BOVINE SPERMATOZOA. *Cell and Tissue Research* **252**:377-384.

- Aurich JE, Kuhne A, Hoppe H, Aurich C. 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* **46**:791-797.
- Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.* **21**:1-6.
- Baker MA, Hetherington L, Ecroyd H, Roman SD, Aitken RJ. 2004. Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *Journal of Cell Science* **117**:211-222.
- Ball BA, Gravance CG, Wessel MT, Sabeur K. 2003. Activity of angiotensin-converting enzyme (ACE) in reproductive tissues of the stallion and effects of angiotensin II on sperm motility. *Theriogenology* **59**:901-914.
- Baranska K, Tischner M. 1995. EQUINE REPRODUCTION VI Evaluating Capacitation of Stallion Spermatozoa Obtained from the Mare's Reproductive Tract. *BIOL REPROD MONO* **1**:707-712.
- Barbas JP, Mascarenhas CRD. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking* **10**:49-62.
- Barbieri MA, Veisaga ML, Paolicchi F, Fornes MW, Sosa MA, Mayorga LS, BustosObregon E, Bertini F. 1996. Affinity sites for beta-glucuronidase on the surface of human spermatozoa. *Andrologia* **28**:327-333.
- Baronos S. 1971. SEMINAL CARBOHYDRATE IN BOAR AND STALLION. *Journal of Reproduction and Fertility* **24**:303.
- Barrier-Battut I, Delajarraud H, Legrand E, Bruyas JF, Fieni F, Tainturier D, Thorin C, Pouliquen H. 2002. Calcium, magnesium, copper, and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability. *Theriogenology* **58**:229-232.
- Bedford SJ, Jasko DJ, Graham JK, Amann RP, Squires EL, Pickett BW. 1995. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* **43**:955-967.
- Bedford SJ, Varner DD, Meyers SA. 2000. Effects of cryopreservation on the acrosomal status of stallion spermatozoa. *J Reprod Fertil* **56**:133-140.
- Bjorndahl L, Kvist U. 2010. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Molecular Human Reproduction* **16**:23-29.
- Boisvert M, Bergeron A, Lazure C, Manjunath P. 2004. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. *Biology of Reproduction* **70**:656-661.
- Bork P, Beckmann G. 1993. THE CUB DOMAIN - A WIDESPREAD MODULE IN DEVELOPMENTALLY-REGULATED PROTEINS. *Journal of Molecular Biology* **231**:539-545.
- Brandon CI, Heusner GL, Caudle AB, Fayrer-Hosken RA. 1999. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology* **52**:863-873.
- Braun J, Sakai M, Hochi S, Oguri N. 1994. PRESERVATION OF EJACULATED AND EPIDIDYMAL STALLION SPERMATOZOA BY COOLING AND FREEZING. *Theriogenology* **41**:809-818.
- Brinsko PS, Blanchard LT, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman D. 2011. *Manual of equine reproduction*. Mosby Elsevier.

- Brinsko SP, Crockett EC, Squires EL. 2000. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology* **54**:129-136.
- Caballero I, Vazquez JM, Garcia EM, Parrilla I, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Martinez EA. 2008. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology* **70**:1352-1355.
- Caballero I, Parrilla I, Alminana C, del Olmo D, Roca J, Martinez EA, Vazquez JM. 2012. Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. *Reprod Domest Anim* **47(3)**:12-21.
- Cabrera T, Ramires-Neto C, Belaz KRA, Freitas-Dell'aqua CP, Zampieri D, Tata A, Eberlin MN, Alvarenga MA, Souza FF. 2018. Influence of spermatozoal lipidomic profile on the cryoresistance of frozen spermatozoa from stallions. *Theriogenology* **108**:161–166.
- Calvete JJ, Campanero-Rhodes MA, 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**:260-264.
- Calvete JJ, Dostalova Z, Sanz L, Adermann K, Thole HH, Topfer-Petersen E. 1996. Mapping the heparin-binding domain of boar spermadhesins. *Febs Letters* **379**:207-211.
- Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Raida M, Sanz L, Topfer-Petersen E. 1995a. 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**:179-182.
- Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Topfer-Petersen E. 1995b. AMINO-ACID-SEQUENCE OF HSP-1, A MAJOR PROTEIN OF STALLION SEMINAL PLASMA - EFFECT OF GLYCOSYLATION ON ITS HEPARIN-BINDING AND GELATIN-BINDING CAPABILITIES. *Biochemical Journal* **310**:615-622.
- Calvete JJ, Nessau S, Mann K, Sanz L, Sieme H, Klug E, Topfer-Petersen E. 1994. ISOLATION AND BIOCHEMICAL-CHARACTERIZATION OF STALLION SEMINAL-PLASMA PROTEINS. *Reproduction in Domestic Animals* **29**:411-426.
- Calvete JJ, Raida M, Gentzel M, Urbanke C, Sanz L, Topfer-Petersen E. 1997. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *Febs Letters* **407**:201-206.
- Carver DA, Ball BA. 2002. Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 degrees C. *Theriogenology* **58**:1587-1595.
- Centurion F, Vazquez JM, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, Garcia EM, Martinez EA. 2003. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biology of Reproduction* **69**:640-646.
- Corrales JJ, Burgo RM, Galindo P, Munoz-Barroso I, Miralles JM, Villar E. 2002. Abnormal expression of acid glycosidases in seminal plasma and spermatozoa from infertile men with varicocele. *Reproduction* **123**:411-417.
- Corrales JJ, Burgo RM, Miralles JM, Villar E. 2000. Abnormalities in sperm acid glycosidases from infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Fertility and Sterility* **73**:470-478.

- Cormier N, Sirard MA, Bailey JL. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* **18**:461–468.
- Cuasnicu PS, Ellerman DA, Cohen DJ, Busso D, Morgenfeld MM, Da Ros VG. 2001. Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. *Archives of Medical Research* **32**:614-618.
- Curry MR. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev. Reprod.* **5**:46-52.
- D'Amours O, Frenette G, Fortier M, Leclerc P, Sullivan R. 2010. Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. *Reproduction* **139**:545-556.
- Da Ros VG, Munuce MJ, Cohen DJ, Marin-Briggiler CI, Busso D, Visconti PE, Cuasnicu PS. 2004. Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein DE (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability. *Biology of Reproduction* **70**:1325-1332.
- Davis BK. 1981. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**:7560-7562.
- de Andrade AFC, Zaffalon FG, Celeghini ECC, Nascimento J, Tarrago OFB, Martins S, Alonso MA, Arruda RP. 2011. Addition of Seminal Plasma to Post-thawing Equine Semen: What is the Effect on Sperm Cell Viability? *Reproduction in Domestic Animals* **46**:682-686.
- De Andrade AF, Zaffalon FG, Celeghini EC, Nascimento J, Bressan FF, Martins SM, de Arruda RP. 2012. Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. *Theriogenology* **77**:1866–1872.
- De Geyter Ch, De Geyter M, Koppers B, Nieschlag E. 1998. Diagnostic accuracy of computer assisted sperm motion analysis. *Hum Reprod.* **13**:2512–2520.
- De Lazari FL, Sontag ER, Schneider A, Moura AAA, Vasconcelos FR, Nagano CS, Mattos RC, Jobim MIM, Bustamante-Filho IC. 2019. Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility and morphology in boars. *Andrologia.* **51**(4):e13222.
- Deleeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij AJ. 1990. COLD-INDUCED ULTRASTRUCTURAL-CHANGES IN BULL AND BOAR SPERM PLASMA-MEMBRANES. *Cryobiology* **27**:171-183.
- Desnoyers L, Manjunath P. 1992. MAJOR PROTEINS OF BOVINE SEMINAL PLASMA EXHIBIT NOVEL INTERACTIONS WITH PHOSPHOLIPID. *Journal of Biological Chemistry* **267**:10149-10155.
- Dostalova Z, Calvete JJ, Topferpetersen 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**:237-242.
- Druart X, et al. 2013. Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *Journal of Proteomics* **91**:13-22.
- Ekhlasi-Hundrieser M, Schafer B, Kirchhoff C, Hess O, Bellair S, Muller P, Topfer-Petersen E. 2005. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Molecular Reproduction and Development* **70**:45-57.

- Ekhlasi-Hundrieser M, Sinowatz F, De Wilke IG, Waberski D, Topfer-Petersen E. 2002. Expression of spermadhesin genes in porcine male and female reproductive tracts. *Molecular Reproduction and Development* **61**:32-41.
- El-Badry DA, Gamal AES, El-Maaty AMA. 2016. Seminal plasma hormonal profile of Arabian stallions that are classified 'good' or 'poor' for semen freezing. *Asian Pac. J. Reprod.* **5**:453–458
- Esch FS, Ling NC, Bohlen P, Ying SY, Guillemin R. 1983. PRIMARY STRUCTURE OF PDC-109, A MAJOR PROTEIN CONSTITUENT OF BOVINE SEMINAL PLASMA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **113**:861-867.
- Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* **49(4)**:871-879.
- Ferraz M, Morato R, Yeste M, Arcarons N, Pena AI, Tamargo C, Hidalgo CO, Muino R, Mogas T. 2014. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology* **81**:1067-1072.
- Flores E, Fernandez-Novell JM, Pena A, Rodriguez-Gil JE. 2009. The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. *Theriogenology*. **72(6)**:784-97.
- Florman HM, First NL. 1988. REGULATION OF ACROSOMAL EXOCYTOSIS .2. THE ZONA PELLUCIDA-INDUCED ACROSOME REACTION OF BOVINE SPERMATOZOA IS CONTROLLED BY EXTRINSIC POSITIVE REGULATORY ELEMENTS. *Developmental Biology* **128**:464-473.
- Gadella BM, Luna C. 2014. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology* **81**:74–84.
- Garcia EM, Vazquez JM, Calvete JJ, Sanz L, Caballero I, Parrilla I, Gil MA, Roca J, Martinez EA. 2006. Dissecting the protective effect of the seminal plasma spermadhesin PSP-I/PSP-II on boar sperm functionality. *Journal of Andrology* **27**:434-443.
- Gasset M, Saiz JL, Laynez J, Sanz L, Gentzel M, Topfer-Petersen E, Calvete JJ. 1997. Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes. *European Journal of Biochemistry* **250**:735-744.
- Ghaoui RE, Thomson PC, Evans G, Maxwell WMC. 2004. Characterization and localization of membrane vesicles in ejaculate fractions from the ram, boar and stallion. *Reproduction in Domestic Animals* **39**:173-180.
- Giese A, et al. 2002. Molecular characterization of the equine testis-specific protein 1 (TPX1) and acidic epididymal glycoprotein 2 (AEG2) genes encoding members of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Gene* **299**:101-109.
- Gibb Z, Lambourne SR, Aitken RJ. 2014. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biol. Reprod.* **91**:1–10.
- Graham JK. 1996. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice* **12**:131.



- Graham JK. 2011. Principles of Cryopreservation. In: McKinnon, A. O. (ed.). Equine Reproduction. Volume 2. 2nd ed. Wiley-Blackwell. USA. p. 2959-2963. ISBN: 9780813819716.
- Green CE, Bredl J, Holt WV, Watson PF, Fazeli A. 2001. Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro. *Reproduction* **122**:305-315.
- Greube A, Muller K, Topfer-Petersen E, Herrmann A, Muller P. 2004. Interaction of fibronectin type II proteins with membranes: The stallion seminal plasma protein SP-1/2. *Biochemistry* **43**:464-472.
- Guthrie H, Maxwell W, Johnson L. 2000. The effect of seminal plasma and dilution rate on the motility and viability of frozen-thawed boar sperm. 14th International Congress of Animal Reproduction. 143.
- Gwathmey TM, Ignatz GG, Mueller JL, Manjunath P, Suarez SS. 2006. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biology of Reproduction* **75**:501-507.
- Hamamah S, Gatti JL. 1998. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Human Reproduction* **13**:20-30.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. 1990. CRYOPRESERVATION OF MAMMALIAN SPERM - WHAT WE ASK THEM TO SURVIVE. *Journal of Andrology* **11**:73-88.
- Harshan HM, Singh LP, Arangasamy A, Ansari MR, 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**:124-133.
- Heise A, Thompson PN, Gerber D. 2011. Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **123**:192-201.
- Henkel R, Baldauf C, Bittner J, Miska W, Weidner W. 2000. Elimination of zinc from the flagella of spermatozoa during epididymal transit is important for motility. *Human Reproduction* **15**:101-102.
- Hernandez M, Roca J, Ballester J, Vazquez JM, Martinez EA, Johannisson A, Saravia F, Rodriguez-Martinez H. 2006. Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability. *Int J Androl.* **29**(6):583-91.
- Hernandez M, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA, Vazquez JM, Martinez EA. 2007. Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *Journal of Andrology* **28**:689-697.
- Hoffmann N, Oldenhof H, Morandini C, Rohn K, Sieme H. 2011. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Anim. Reprod. Sci.* **125**:112-118.
- Holt WV, Van Look KJW. 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction.* **127**:527-535.
- Hoshi K, Aita T, Yanagida K, Yoshimatus N, Sato A. 1990. Variation in the cholesterol/phospholipid ratio in human spermatozoa and its relation with capacitation. *Hum Reprod* **5**:71-74.

- Hough SR, Parks JE. 1994. PLATELET-ACTIVATING-FACTOR ACETYLDHYDROLASE ACTIVITY IN SEMINAL PLASMA FROM THE BULL, STALLION, RABBIT, AND ROOSTER. *Biology of Reproduction* **50**:912-916.
- Howes EA, Hurst S, Laslop A, Jones R. 1998. Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin, beta-chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* **4**:673-681.
- James RW, Heywood R. 1979. BIOCHEMICAL OBSERVATIONS ON BEAGLE DOG SEMEN. *Veterinary Record* **104**:480-482.
- Jelinkova P, Ryslava H, Liberda J, Jonakova V, Ticha M. 2004. Aggregated forms of bull seminal plasma proteins and their heparin-binding activity. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **69**:616-630.
- Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Tramontina F, Mattos RC. 2004. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* **61**:255-266.
- Jobim MIM, Trein C, Zirkler H, Gregory RM, Sieme H, Mattos RC. 2011. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* **76**:765-771.
- Jonakova V, Kraus M, Veselsky L, Cechova D, Bezouska K, Ticha M. 1998. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility* **114**:25-34.
- Jonakova V, Manaskova P, Kraus M, Liberda J, Ticha M. 2000. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Molecular Reproduction and Development* **56**:275-277.
- Jonakova V, Ticha M. 2004. Boar seminal plasma proteins and their binding properties. A review. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **69**:461-475.
- Jonsson M, Linse S, Frohm B, Lundwall A, Malm J. 2005. Semenogelins I and II bind zinc and regulate the activity of prostate-specific antigen. *Biochemical Journal* **387**:447-453.
- Quintero-Moreno A, Miro J, Rigau AT, Rodriguez-Gil JE. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* **59**:1973-1990.
- Kadirvel G, Kathiravan P, Kumar S. 2011. Protein tyrosine phosphorylation and zona binding ability of in vitro capacitated and cryopreserved buffalo spermatozoa. *Theriogenology* **75**: 1630-1639.
- Kareskoski AM, Reilas T, Sankari S, Andersson M, Katila T. 2005. Composition of fractionated stallion ejaculates. *Animal Reproduction Science* **89**:228-230.
- Karow AM, Gilbert WB, Black JB. 1992. EFFECTS OF TEMPERATURE, POTASSIUM CONCENTRATION, AND SUGAR ON HUMAN SPERMATOZOA MOTILITY - A CELL PRESERVATION MODEL FROM REPRODUCTIVE MEDICINE. *Cryobiology* **29**:250-254.
- Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K, Kadirvel G. 2011. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System - A Review. *Reproduction in Domestic Animals* **46(1)**: 165-72.
- Katila T, Kareskoski M. 2006. Components of stallion seminal plasma and their influence on spermatozoa. *Pferdeheilkunde* **22**:193.

- Kerns K, Zigo M, Sutovsky P. 2018. Zinc: A Necessary Ion for Mammalian Sperm Fertilization Competency. *International Journal of Molecular Sciences* **19**.
- Kjellberg S, Bjorndahl L, Kvist U. 1992. SPERM CHROMATIN STABILITY AND ZINC-BINDING PROPERTIES IN SEMEN FROM MEN IN BARREN UNIONS. *International Journal of Andrology* **15**:103-113.
- Kosiniak K. 1975. CHARACTERISTICS OF SUCCESSIVE JETS OF EJACULATED SEMEN OF STALLIONS. *Journal of Reproduction and Fertility*:59-61.
- Kumar A, Singh LP, Harshan HM, Majumdar AC. 2008. Seminal plasma non-heparin binding proteins (NHBP) reduce the cryoinjury to buffalo cauda epididymal spermatozoa induced by heparin binding proteins (HBP). *Animal Reproduction Science* **104**:220-226.
- Kumar S, Millar JD, Watson PF. 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology* **46**:246-253.
- Kumaresan A, Siqueira AP, Hossain MS, Bergqvist AS. 2011. Cryopreservation-induced alterations in protein tyrosine phosphorylation of spermatozoa from different portions of the boar ejaculate. *Cryobiology* **63**: 137-144.
- Kumi-Diaka J. 1993. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*. **39(6)**:1279-1289
- Kwok SCM, Yang DF, Dai GL, Soares MJ, Chen S, McMurtry JP. 1993. MOLECULAR-CLONING AND SEQUENCE-ANALYSIS OF 2 PORCINE SEMINAL PROTEINS, PSP-I AND PSP-II - NEW MEMBERS OF THE SPERMADHESIN FAMILY. *DNA and Cell Biology* **12**:605-610.
- Lapointe S, Ahmad I, Buhr MM, Sirard MA. 1996. Modulation of postthaw motility, survival, calcium uptake, and fertility of bovine sperm by magnesium and manganese. *Journal of Dairy Science* **79**:2163-2169.
- Leblond E, Desnoyers L, Manjunath P. 1993. PHOSPHORYLCHOLINE-BINDING PROTEINS FROM THE SEMINAL FLUIDS OF DIFFERENT SPECIES SHARE ANTIGENIC DETERMINANTS WITH THE MAJOR PROTEINS OF BOVINE SEMINAL PLASMA. *Molecular Reproduction and Development* **34**:443-449.
- Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey JL, Sullivan R. 2000. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *J Androl.* **21(5)**:700-7.
- Loomis PR. 2001. The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science* **68**:191-200.
- Loomis PR, Graham JK. 2008. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science* **105**:119-128.
- Loomis PR, Squires EL. 2005. Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology* **64**:480-491.
- Loomis PR. 2011. Basic Principles and Techniques for semen Freezing. XVII Congresso Internazionale SIVE. USA.
- Lopez ML, Grez P, Gribbel I, Bustosobregon E. 1989. CYTOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS OF THE STALLION EPIDIDYMIS

- (EQUUS-CABALLUS). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* **21**:103-120.
- Lorenzoni SLG, Arruda NS, Rodrigues JL. 2011. Cryopreservation of Equine Semen Loaded in Cryovials. *Acta Scientiae Veterinariae*. 39.
- Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, Thompson JA, Blanchard TL, Varner DD. 2005. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology* **63**:1584-1591.
- Love CC, Loch WL, Bristol F, Garcia MC, Kenney RM. 1989. Comparison of pregnancy rates achieved with frozen semen using two packaging methods. *Theriogenology* **31**:613-622.
- Lusignan MF, Bergeron A, Crete MH, Lazure C, Manjunath P. 2007. Induction of Epididymal Boar Sperm Capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 Proteins, Members of the BSP Protein Family1. *Biol Reprod* **76**:424-432.
- Magistrini M, Lindeberg H, Koskinen E, Beau P, Seguin F. 2000. Biophysical and  $1^H$  magnetic resonance spectroscopy characteristics of fractionated stallion ejaculates. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* **56**:101-110.
- Manaskova P, Balinova P, Kraus M, Ticha M, Jonakova V. 2003. Mutual interactions of boar seminal plasma proteins studied by immunological and chromatographic methods. *American Journal of Reproductive Immunology* **50**:399-410.
- Manaskova P, Liberda J, Ticha M, Jonakova V. 2000. Aggregated and monomeric forms of proteins in boar seminal plasma: Characterization and binding properties. *Folia Biologica* **46**:143-151.
- Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J, Fan J. 2007. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Soc Reprod Fertil Suppl* **65**:217-228.
- Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L. 1994. Major proteins of bovine seminal-vesicles bind to spermatozoa. *Biology of Reproduction* **50**:27-37.
- Manjunath P, Therien I. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology* **53**:109-119.
- Manjunath P, Villemure M, Lazure C. 2002. Isolation and characterization of phospholipid-binding proteins from goat seminal plasma. *Biology of Reproduction* **66**:332-332.
- Marquez B, Suarez SS. 2004. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biology of Reproduction* **70**:1626-1633.
- Martinez AIP. 2004. Canine fresh and cryopreserved evaluation. *Anim. Reprod. Sci.* **82/83**:209-224.
- Martinez NI, Moran JM, Pena FJ. 2006. Two-step procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in Canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *J. Androl.* **27(4)**:596-603.
- Martinez-Pastor F, Cabrita E, Soares F, Anel L, Dinis MT. 2008. Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Soleasenegalensis* spermatozoa: a model for marine teleosts. *Reproduction*. **135(4)**:449-459.
- Martinez-Pastor F, Tizado EJ, Garde JJ, Anel L, de Paz P. 2011. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology*. **75**:783-795.

- Massanyi P, Trandzik J, Nad P, Toman R, Skalicka M, Korenekova B. 2003. Seminal concentrations of trace elements in various animals and their correlations. *Asian Journal of Andrology* **5**:101-104.
- Maxwell WMC, Johnson LA. 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of seminal plasma. *Theriogenology* **52**:1353-1362.
- Mazur P. 1985. Basic concepts in freezing cells. *Proceedings First International Conference on Deep freezing of Boar Semen*:91-111.
- Meryman HT. 2007. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* **47**:935-945.
- Mogielnicka-Brzozowska M, Kordan W. 2011. Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive processes in mammals. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **14**:489-499.
- Moore AI, Squires EL, Graham JK. 2005. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* **63**:2372-2381.
- Moreau R, Manjunath P. 2000. Characteristics of the cholesterol efflux induced by novel seminal phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. **1487(1)**:24-32.
- Morel MDCG. 2003. *Equine Reproductive Physiology Breeding and Stud Management*. CABI Publishing, United Kingdom.
- Morrell JM, Georgakas A, Lundeheim N, Nash D, Morel M, Johannisson A. 2014. Effect of heterologous and homologous seminal plasma on stallion sperm quality. *Theriogenology* **82**:176-183.
- Morrell J. 2012. Stallion Sperm Selection: Past, Present, and Future Trends. *Journal of Equine Veterinary Science* **32(8)**:436–440.
- Mortimer ST. 2000. CASA - Practical aspects. *Journal of Andrology* **21(4)**: 515-24.
- Mungan NA, Mungan G, Basar MM, Baykam M, Atan A. 2001. Effect of seminal plasma calcitonin levels on sperm motility. *Archives of Andrology* **47**:113-117.
- Nauc V, Manjunath P. 2000. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. *Biology of Reproduction* **63**:1058-1066.
- Neuhauser S, Dorfel S, Handler J. 2014. Motility of frozen-thawed stallion epididymal sperm after the addition of homologous seminal plasma from stallions with different semen quality. *Reproduction in Domestic Animals* **49**:83-84.
- Neuhauser S, Rheinfeld S, Handler J. 2013. Motility of Fresh and Frozen-Thawed Stallion Sperm from Three Segments of the Epididymal Cauda and the Effect of Post-Thaw Seminal Plasma Addition on Motility. *Journal of Equine Veterinary Science* **33**:942-949.
- Novak S, Smith TA, Paradis F, Burwash L, Dyck MK, Foxcroft GR, Dixon WT. 2010. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Theriogenology* **74**:956-967.
- Nunez-Martinez I, Moran JM, Pena FJ. 2006. A three step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.* **41**:408–415.
- Okazaki T, Abe S, Yoshida S, Shimada M. 2009. Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and

- conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology* **71**:491-498.
- Olds-Clarke P. 1996. How does poor motility alter sperm fertilizing ability. *J Androl.* **17**:183–186.
- Ordóñez-Leon E, Kjelland M, Moreno J, Welsh T, Randel R, Lammoglia M, DuColomb Y, Romo S. 2011. 171 in vitro fertilization using frozen-thawed sexed semen treated with recombinant heparin-binding proteins. *Reproduction Fertility and Development* **24(1)**:197-8.
- Ortega-Ferrusola C, Garcia B, Rama VS, Gallardo-Bolanos JM, Gonzalez-Fernandez L, Tapia JA, Rodríguez-Martínez H, Peña FJ. 2009. Identification of Sperm Subpopulations in Stallion Ejaculates: Changes after cryopreservation and Comparison with Traditional Statistics. *Reprod. Domest. Anim.* **44(3)**:419-423.
- Padilla AW, Foote RH. 1991. EXTENDER AND CENTRIFUGATION EFFECTS ON THE MOTILITY PATTERNS OF SLOW-COOLED STALLION SPERMATOZOA. *Journal of Animal Science* **69**:3308-3313.
- Park DU, Lee SM, Bolser D, Schroeder M, Lappe M, Oh DH, Bhak J. 2005. Comparative interactomics analysis of protein family interaction networks using PSIMAP (protein structural interactome map). *Bioinformatics* **21**:3234-3240.
- Parks JE, Arion JW, Foote RH. 1987. LIPIDS OF PLASMA-MEMBRANE AND OUTER ACROSOMAL MEMBRANE FROM BOVINE SPERMATOZOA. *Biology of Reproduction* **37**:1249-1258.
- Parks JE, Lynch DV. 1992. Lipid-composition and thermotropic phase-behaviour of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* **29**:255-266.
- Parrish JJ, Suskoparrish J, Winer MA, First NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction* **38**:1171-1180.
- Patel M, Gandotra VK, Cheema RS, Bansal AK, Kumar A. 2016. Seminal Plasma Heparin Binding Proteins Improve Semen Quality by Reducing Oxidative Stress during Cryopreservation of Cattle Bull Semen. *Asian-Australas J Anim Sci.* **29(9)**:1247-55.
- Pesch S, Bergmann M, Bostedt H. 2006. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology* **66**:307-313.
- Pommer AC, Rutllant J, Meyers SA. 2003. Phosphorylation of Protein Tyrosine Residues in Fresh and Cryopreserved Stallion Spermatozoa under Capacitating Conditions. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* **68**:1208–1214.
- Puglisi R, Pozzi A, Foglio L, Spano M, Eleuteri P, Grollino MG, Bongioni G, Galli A. 2012. The usefulness of combining traditional sperm assessments with in vitro heterospermic insemination to identify bulls of low fertility as estimated in vivo. *Animal Reproduction Science* **132(1-2)**: 17-28.
- Pukazhenthí BS, Johnson A, Guthrie HD, Songsasen N, Padilla LR, Wolfe BA, Coutinho da Silva M, Alvarenga MA, Wildt DE. 2014. Improved sperm cryosurvival in diluents containing amides versus glycerol in the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*). *Cryobiology.* **68**:205–214.
- Pycock JF. 1997. Veterinární problematika reprodukce a chovu koní. Manson Publishing Ltd. Medicus veterinarius, Česká republika.

- Quintero-Moreno A, Miro J, Rigau AT, Rodriguez-Gil JE. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* **59**:1973-1990.
- Ramirez-Vasquez R, Cesari A, Greco MB, Cano A, Hozbo F. 2019. Extenders modify the seminal plasma ability to minimize freeze-thaw damage on ram sperm. *Reprod Domest Anim.* **54(12)**:1621-1629.
- Ramon M, Martinez-Pastor F, Garcia-Alvarez O, Maroto-Morales A, Soler AJ, Jimenez-Rabadan P, Fernandez-Santos MR, Bernabeu R, Garde JJ. 2012. Taking advantage of the use of supervised learning methods for characterization of sperm population structure related with freezability in the Iberian red deer. *Theriogenology.* **77(8)**:1661-72.
- Reineke A, Hess O, Schambony A, Petrounkina AM, Bader H, Sieme H, Topfer-Petersen E. 1999. Sperm-associated seminal plasma proteins - a novel approach for the evaluation of sperm fertilizing ability of stallions? *Pferdeheilkunde* **15**:531-537.
- Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, Topfer-Petersen E. 1996. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *European Journal of Biochemistry* **242**:636-640.
- Rethinaswamy A, Yang CH, Srivastava PN. 1994. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF BETA-GLUCURONIDASE FROM BULL SEMINAL PLASMA AND ITS ROLE IN FERTILIZATION. *Molecular Reproduction and Development* **38**:404-409.
- Rodriguez-Martinez H, Iborra A, Martinez P, Calvete JJ. 1998. Immunoelectronmicroscopic imaging of spermadhesin AWN epitopes on boar spermatozoa bound in vivo to the zona pellucida. *Reproduction Fertility and Development* **10**:491-497.
- Rodriguez-Martinez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A, Vazquez JM, Martinez E, Roca J, Sanz L, Calvete JJ. 2005. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology* **63**:514-535.
- Roncoletta M, Morani Eda S, Esper CR, Barnabe VH, Franceschini PH. 2006. Fertility-associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Anim. Reprod. Sci.* **91**:77-87.
- Samper JC, Morris CA. 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation: A survey. *Theriogenology* **49**:895-903.
- Sanz L, Calvete JJ, Mann K, Gabius HJ, Topfer-Petersen E. 1993. ISOLATION AND BIOCHEMICAL-CHARACTERIZATION OF HEPARIN-BINDING PROTEINS FROM BOAR SEMINAL PLASMA - A DUAL ROLE FOR SPERMADHESINS IN FERTILIZATION. *Molecular Reproduction and Development* **35**:37-43.
- Saragusty J, Gacitua H, Pettit MT, Arav A. 2007. Directional freezing of equine semen in large volumes. *Reproduction in Domestic Animals.* **42**:610-615.
- Sarsaifi K, Haron AW, Vejayan J, Yusoff R, Hani H, Omar MA, Hong LW, Yimer N, Ju TY, Othman AM. 2015. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of Bali bull (*Bos javanicus*) seminal plasma proteins and their relationship with semen quality. *Theriogenology* **84**:956-968.
- Schambony A, Gentzel M, Wolfes H, Raida M, Neumann U, Topfer-Petersen E. 1998a. Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1387**:206-216.

- Schambony A, Hess O, Gentzel M, Topfer-Petersen E. 1998b. Expression of CRISP proteins in the male equine genital tract. *Journal of Reproduction and Fertility*. **53**:67-72.
- Seidah NG, Manjunath P, Rochemont J, Sairam MR, Chretien M. 1987. COMPLETE AMINO-ACID-SEQUENCE OF BSP-A3 FROM BOVINE SEMINAL PLASMA - HOMOLOGY TO PDC-109 AND TO THE COLLAGEN-BINDING DOMAIN OF FIBRONECTIN. *Biochemical Journal* **243**:195-203.
- Sellem E, Broekhuijse ML, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, Koenen EP. 2015. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology* **84(9)**:1447-1454.
- Shojaei H, Kroetsch T, Wilde R, Blondin P, Kastelic JP, Thundathil JC. 2012. Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. *Theriogenology*. **77**:940-951.
- Sichtar J, Nehasilova A, Simonik O, Bubenickova F. 2017. Effect of Two Freezing Extenders on Characteristic of Fresh and Frozen-Thawed Semen in Endangered Old Kladruber Stallions - A Pilot Study. *Czech Journal of Animal Science* **62**:227-233.
- Sichtar J, Bubenickova F, Sirohi J, Simonik O. 2019. How to Increase Post-Thaw Semen Quality in Poor Freezing Stallions: Preliminary Results of the Promising Role of Seminal Plasma Added after Thawing. *Animals* **9(7)**:414.
- Sieme H. 2011a. Freezing semen. Pages 2972-2982 in McKinnon AO, editor. *Equine Reproduction*. Wiley-Blackwell, USA.
- Sieme H. 2011b. Semen Extenders for Frozen Semen. Pages 296-2971 in McKinnon AO, editor. *Equine Reproduction*. Wiley-Blackwell, USA.
- Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. 2015. Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.* **50**:20–26.
- Simonik O, Sichtar J, Krejcarkova A, Rajmon R, Stadnik L, Beran J, Dolezalova M, Biniova Z. 2015. Computer assisted sperm analysis - the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: A review. *Indian Journal of Animal Sciences* **85**:3-11.
- Simonik O, Sichtar J. 2018. Effects of various incubation conditions on functional parameters of stallion spermatozoa. *Sci. Agric. Bohem.* **49(3)**:201-208.
- Singh AK, Brar PS, Cheema RS. 2016. Effect of Purified Seminal Plasma Heparin Binding Proteins on In vitro Acrosome Reaction of Frozen-Thawed Buffalo Bull Semen. *The Indian Veterinary Journal* **93**:69-70.
- Singh LP, Harshan HM, Ansari MR. 2007. Effect of egg yolk and seminal plasma heparin binding protein interaction on the freezability of buffalo cauda epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **99**:395-400.
- Sorensen MB, Bergdahl IA, Hjollund NHI, Bonde JPE, Stoltenberg M, Ernst E. 1999. Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility. *Molecular Human Reproduction* **5**:331-337.
- Srivastava N, Jerome A, Srivastava SK, Ghosh SK, Kumar A. 2013a. Bovine seminal PDC-109 protein: An overview of biochemical and functional properties. *Animal Reproduction Science* **138**:1-13.



- Srivastava N, Srivastava SK, Ghosh SK, Jerome A, Das GK, Mehrotra S. 2013b. Sequestration of PDC-109 Protein by Specific Antibodies and Egg Yolk Cryoprotects Bull Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* **48**:724-731.
- Suarez SS, Pacey AA. 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update* **12**:23-37.
- Taberner E, Morato R, Mogas T, Miro J. 2010. Ability of Catalonian donkey sperm to penetrate zona pellucida-free bovine oocytes matured in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* **118(2-4)**:354-361.
- Therien I, Moreau R, Manjunath P. 1999. Bovine seminal plasma phospholipid binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod.* **61(3)**:590-8.
- Topfer-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.
- Torres MA, et al. 2016. Novel Flow Cytometry Analyses of Boar Sperm Viability: Can the Addition of Whole Sperm-Rich Fraction Seminal Plasma to Frozen-Thawed Boar Sperm Affect It? *Plos One* **11**.
- Turner RMO, McDonnell SM. 2003. Alkaline phosphatase in stallion semen: characterization and clinical applications. *Theriogenology* **60**:1-10.
- Usuga A, Rojano B, Restrepo G. 2017. Effect of Seminal Plasma Components on the Quality of Fresh and Cryopreserved Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science* **58**:103-111.
- Usuga A, Rojano B, Restrepo G. 2020. Lyophilized seminal plasma can improve stallion semen freezability. *Indian Journal of Animal Sciences* **90(2)**: 171–175.
- Vadnais ML, Roberts KP. 2007. Effects of seminal plasma on cooling-induced capacitative changes in boar sperm. *J Androl* **28**: 416-422.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* **57(1)**:149-179.
- Veselsky L, Dostal J, Kraus M, Peknicova J, Holan V, Zajicova A, Jonakova V, Zelezna B. 2002. Reverse effect of indomethacin on the immunosuppressive activity of boar seminal immunosuppressive fraction. *Animal Reproduction Science* **71**:111-123.
- Vieira LA, Gadea J, García-Vázquez FA, Avilés-López K, Matás C. 2013. Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96h at 4°C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. *Animal Reproduction Science* **136(4)**: 280–288.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa: I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. **121**:1129–1137.
- Visconti PE, Galantino-Homer H, Moore GD, Bailey JL, Ning XP, Fornes M, Kopf GS. 1998. The molecular basis of sperm capacitation. *Journal of Andrology* **19**:242-248.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* **60-61**:481–492.
- Zhang JJ, Muzs LZ, Boyle MS. 1991. Variations in structural and functional changes of stallion spermatozoa in response to calcium ionophore. *J Reprod Fertil Suppl* **44**:199-205.