

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Bakalářská práce

VZTAH TESTOSTERONU K SEKREČNÍM PROTEINŮM
PŘÍDATNÝCH POHLAVNÍCH ŽLÁZ KANCE S OHLEDEM NA
JEJICH ROLI V REPRODUKČNÍM PROCESU

Tomáš Dunda

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Jiří Liberda, Ph.D

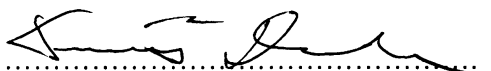
Praha 2006

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele RNDr. Jiřího Liberdy, Ph.D, a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 24.8.2006.....

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal dotted line. The signature is cursive and appears to be 'Jiří Liberda'.

podpis

Úvodem své bakalářské práce bych chtěl poděkovat všem, kteří mi vytvořili podmínky pro její vypracování, zejména vedoucímu a konzultantovi RNDr. Jiřímu Liberdovi, Ph.D za jeho velkou trpělivost a poskytnuté konzultace při sepisování. Dále bych jmenovitě poděkoval Mgr. Ivaně Tiché, Mgr. Tomáši Drábovi za morální podporu a odbornou pomoc během práce, Mgr. Lucii Prelovské za poskytnutí cenných materiálů a RNDr. Pavle Maňáskové za provedení RP-HPLC. Rovněž bych chtěl poděkovat pracovníkům inseminační stanice ISK Grygov za dodání vzorků, bez nichž by projekt nemohl být realizován. V neposlední řadě děkuji rodičům za jejich důvěru a podporu při studiu.

Tomáš Dunda

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
1 ÚVOD	7
1.1 POHLAVNÍ ROZMNOŽOVÁNÍ	7
1.2 STAVBA UROGENITÁLNÍHO TRAKTU KANCŮ	7
1.2.1 Varlata (testes).....	8
1.2.2 Nadvarle (epididymis).....	8
1.2.3 Chámovod (ductus deferens).....	8
1.2.4 Šourek (scrotum)	9
1.2.5 Přídavné pohlavní žlázy (glandulae genitales accessoriae).....	9
1.3 SAMČÍ POHLAVNÍ BUŇKY	9
1.4 FERTILIZACE.....	10
1.5 AKROZOMOVÁ REAKCE.....	11
1.6 PROTEINY KANČÍ SEMENNÉ PLAZMY.....	12
1.7 STEROIDNÍ HORMONY	13
1.7.1 Chemie a struktura hormonů	13
1.7.2 Rozdělení steroidů podle původu	14
1.7.3 Mechanismus účinku steroidních hormonů.....	14
1.7.4 Biosyntéza steroidních hormonů	15
1.7.5 Funkce steroidních hormonů	16
1.7.6 Hormonální regulace samčích pohlavních žláz.....	16
1.8 CÍL PRÁCE	17
2 MATERIÁL A METODY	18
2.1 Použitý materiál.....	18
2.1.1 Chemikálie.....	18
2.1.2 Biologický materiál	19
2.2 Afinity chromatografie na sloupci hydroxylapatitu.....	19
2.3 RP HPLC.....	19
2.4 Stanovení obsahu neutrálních sacharidů podle Duboise	20
2.5 SDS-elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu (diskontinuální elektroforeza dle Laemmliho)	20

2.6	Stanovení celkového cholesterolu.....	22
3	VÝSLEDKY	23
3.1	Afinitní chromatografie KSP na hydroxylapatitu.....	23
3.2	SDS-elektroforeza proteinů kančí semenné plazmy	24
3.3	Charakterizace HA ⁺ , HA ⁻ a HA ⁻ frakcí kančí semenné plazmy pomocí HPLC	25
3.4	Afinitní chromatografie proteinů kančí semenné plazmy na hydroxylapatitu	27
3.5	Stanovení glykosylace proteinů KSP	29
3.6	Indukovaný testosteron.....	30
3.7	Stanovení cholesterolu ve spermích.....	31
3.8	Sledování glykosylace a proteinů KSP na množství indukovaného testosteronu	32
3.9	Vztah sledovaných ukazatelů k reprodukci.....	34
4	DISKUSE.....	35
5	ZÁVĚR	38
	LITERATURA.....	39

Seznam použitých zkratek

AA	- akrylamid
ACN	- acetonitril
ACTH	- adrenokortikotropní hormon
APS	- peroxodisíran amonný
Bis/AA	- N, N'-methylen-bisakrylamid
CBB	- Coomassie Brilliant Blue R-250
D-Glc	- D-glukosa
FSH	- hormon stimulující folikuly
HA ⁺	- hydroxylapatit-vázající frakce proteinů kančí semenné plazmy
HA ⁻	- hydroxylapatit-nevázající frakce proteinů KSP
H ⁺	- heparin-vázající frakce
H ⁻	- heparin-nevázající frakce
Hep	- heparin
HPLC	- vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KSP	- kančí semenná plazma
LH	- luteinizační hormon
Lys	- lysozym
PB	- fosfátový pufr (z angl. Phosphate-Buffer)
RP-HPLC	- vysokoúčinná kap. chromatografie s reverzní fází
SDS	- dodecylsulfát sodný
TEMED	- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	- tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TFA	- trifluoroctová kyselina

1 ÚVOD

1.1 POHLAVNÍ ROZMNOŽOVÁNÍ

Rozmnožovací schopnost je základním kamenem života, protože umožňuje živým organismům zvyšovat počet jedinců svého druhu, využívat nové příležitosti v prostředí kolem nich a vyvíjet se. Je to tedy vlastnost, která umožňuje zachování jednotlivých druhů a časovou kontinuitu života [1].

Při pohlavním rozmnožování se vytvářejí specializované pohlavní buňky (haploidní gamety), samičí vajíčko a samčí spermie, které splývají v diploidní zygotu. Vzájemného kontaktu a spojení jsou schopny pouze zralé pohlavní buňky.

Značný význam v řízení vývoje a funkčních změn pohlavních orgánů v průběhu života jedince, v ovlivnění pohlavního cyklu, libida, březosti a porodu mají orgány nervové soustavy a žlázy s vnitřní sekrecí [2].

1.2 STAVBA UROGENITÁLNÍHO TRAKTU KANCŮ

Samčí pohlavní orgány kanců zahrnují varlata, nadvarlata, chámovod, přídatné pohlavní žlázy a kopulační orgán – pyj. Mezi přídatné pohlavní žlázy kance patří semenné vaky, párové ampule chámovodu, prostata a Cowperovy žlázy [3].

Hlavní reprodukční funkcí samců je tvorba spermií a jejich následná doprava do samičích pohlavních orgánů. Množství produkovaných spermií je druhově odlišné a mění se i v závislosti na fotoperiodě nebo na stáří. Proces samčí reprodukce je řízen hormony a autonomním nervovým systémem [4].

1.2.1 Varlata (testes)

Varle je samčí pohlavní žláza obratlovců. Ve varleti dochází k vývoji samčí pohlavní buňky, spermie, varlata jsou také důležitá endokrinní žláza [5,7]. Na zadní stěně na ně shora navazuje nadvarle. Na povrchu je varle pokryto vazivovým obalem, vazivo zasahuje i do parenchymu varlete a rozděluje ho na neúplné lalůčky. Nerozdělená část varlete (mediastinum) přechází v hlavu nadvarlete. Parenchym varlete se skládá z mnohonásobně stočených semenotvorných kanálků a řídkého vaziva vyplňujícího prostor mezi nimi. Stěnu semenotvorných kanálků tvoří zárodečný epitel, ve kterém dochází k vývoji spermií ze spermatogonií. Zárodečné buňky – spermatogonie – jsou chráněné a vyživované podpůrnými Sertoliho buňkami. Semenotvorné kanálky se spojují a přecházejí do kanálků nadvarlete [6,7]. Semenotvorné kanálky jsou obaleny v řídkém vazivu, kde se nacházejí intersticiální Leydigovy buňky. Ty produkují testosteron – samčí pohlavní hormon. Kromě testosteronu produkují Leydigovy buňky i antimülleriánský hormon, který způsobuje atrofii a resorpci Müllerova vývodu během embryonálního vývoje pohlavních cest, a tak zajišťuje správný vývoj samčích pohlavních orgánů [7].

1.2.2 Nadvarle (epididymis)

Nadvarle je umístěno na vrcholu varlete, kde leží na horní a zadní ploše varlete. Nadvarle je zásobárnou spermií, které se zde uchovávají po dobu přibližně dvou týdnů, během kterých spermie dozrávají, získávají schopnost pohybu a schopnost oplodnění vajíčka. V nadvarleti vzniká i hlenovitý sekret, který má význam pro látkovou výměnu spermií. Spermie opouštějí nadvarle chámovodem [8,9].

1.2.3 Chámovod (ductus deferens)

Chámovod, vycházející z nadvarlete spolu s cévami, tvoří svazek, který pokračuje do tříselného kanálu a dutiny břišní [9].

1.2.4 Šourek (scrotum)

Šourek je kožovitý vak, vychlípenina břišní stěny, ve kterém jsou uložena varlata. Většinou je umístěn mezi řitním otvorem a penisem [10].

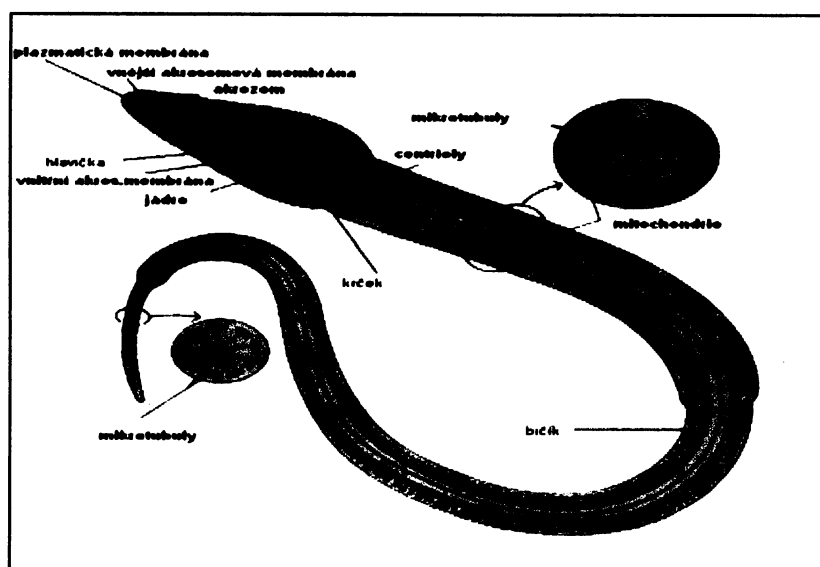
1.2.5 Přídavné pohlavní žlázy (glandula genitales accessoriae)

Přídavné pohlavní žlázy jsou samostatné orgány, které produkují sekrety vylučované do močové trubice. Tyto sekrety poskytují spermii výživné látky a upravují jim prostředí během průchodu močovou tubicí. K těmto pohlavním žlázám patří párové ampule chámovodu, semenný vak, předstojná žláza (prostata) a Cowperovy žlázy [5].

1.3 SAMČÍ POHLAVNÍ BUŇKY

Samčí pohlavní buňky se vyvíjejí v semenných kanálcích varlete ze zárodečného epitelu.

Hotová spermie (obr. 1) je tvořena hlavičkou, spojovací částí (krčkem), střední částí a bičíkem. Hlavička se skládá z akrozomu, jádra, a v menší míře i cytoskeletálních struktur a cytoplazmy. Akrozom je velká sekreční granule, obklopující jádro vnější a vnitřní akrozomovou membránou. Akrozom obsahuje enzymy štěpící glykosaminoglykany a proteolytické enzymy nezbytné při fertilizaci. Jádro spermie je



Obr. 1: Stavba spermie [1]

haploidní. Ve střední části spermie jsou shromážděny mitochondrie [1].

Spermie po svém vývoji ve varleti (testis) není schopná oplodnit vajíčko. Tuto schopnost získává při průchodu nadvarletem

(epididymem).

Tento proces se nazývá epididymální maturace – zrání spermie. Během zrání spermie v epididymu dochází ke změnám na plazmatické membráně.

Je známo, že semenná plazma má na spermie prokazatelně dekapacitační účinek. Dekapacitované ejakulované spermie nejsou schopny oplodnit vajíčko. K jejich rekapacitaci dochází v samičím pohlavním traktu [3].

Kapacitace je soubor reverzibilních změn, které se odehrávají na spermiu během jejího transportu k místu fertilizace, tedy v samičím pohlavním traktu [11]. Těmito změnami jsou odstraněny nebo modifikovány komponenty pláště spermie, zejména akrozomálního regionu, čímž se odkryjí nebo vytvoří receptory pro interakci s vajíčkem [12]. Ejakulované spermie, které neprošly kapacitačními změnami, nejsou schopny oplodnit vajíčko.

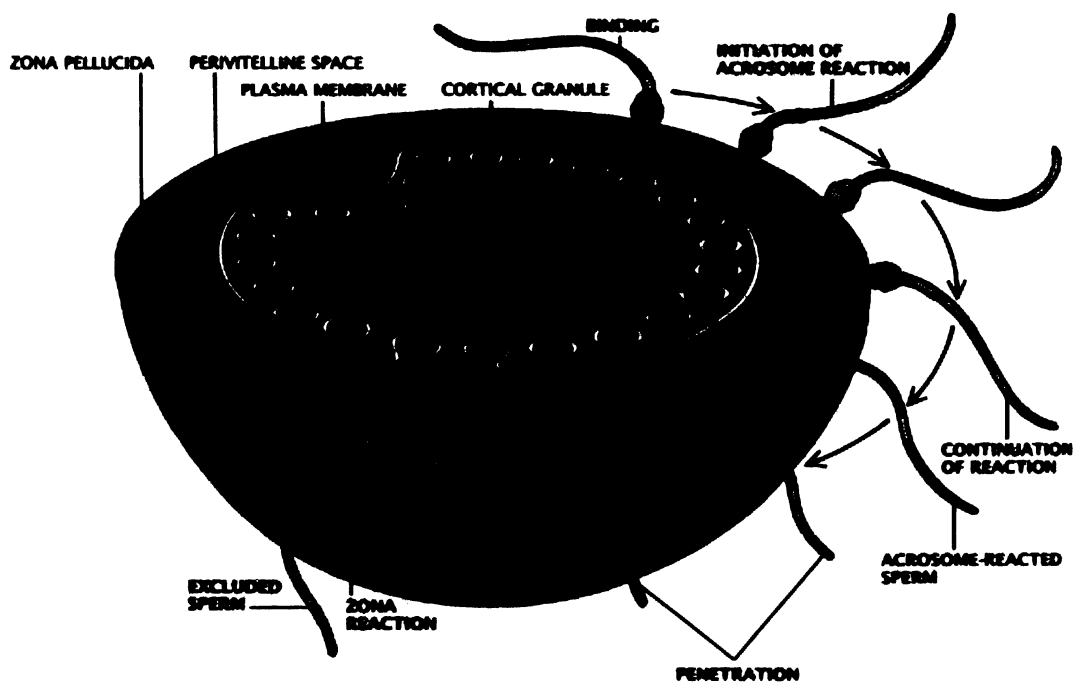
1.4 FERTILIZACE



Oplodnění (fertilizace, obr. 2) je splynutí dvou pohlavních buněk (gamet) v zygotu za účelem zformování nového organismu. U živočichů tento proces zahrnuje fúzi spermie s vajíčkem, což vede ke vzniku zygoty a jejímu následnému vývoji v embryo a plod. Podle živočišného druhu může oplodnění proběhnout uvnitř těla samice (vnitřní oplození) nebo mimo ně (vnější oplození).

Obr. 2: Fertilizace [III]

Fertilizace zahrnuje vysoce specializované děje: interakci proteinů semenné plazmy na povrch spermie během ejakulace, interakci povrchových proteinů spermie s epiteliálními buňkami oviduktu, kapacitaci spermie, rozpoznávání gamet, vazbu spermie k vajíčku a penetraci zonou pellucidou vajíčka [13,14]. Po smíchání proteinů semenné plazmy se spermiemi během ejakulace prochází plazmatická membrána spermie intenzivním remodelováním. Některé proteiny semenné plazmy i v agregované formě, se stávají povrchovými složkami spermie. V tomto procesu jsou obsaženy dva typy interakcí: interakce proteinů s plazmatickou membránou spermie [15] a vzájemné interakce mezi proteiny [16].

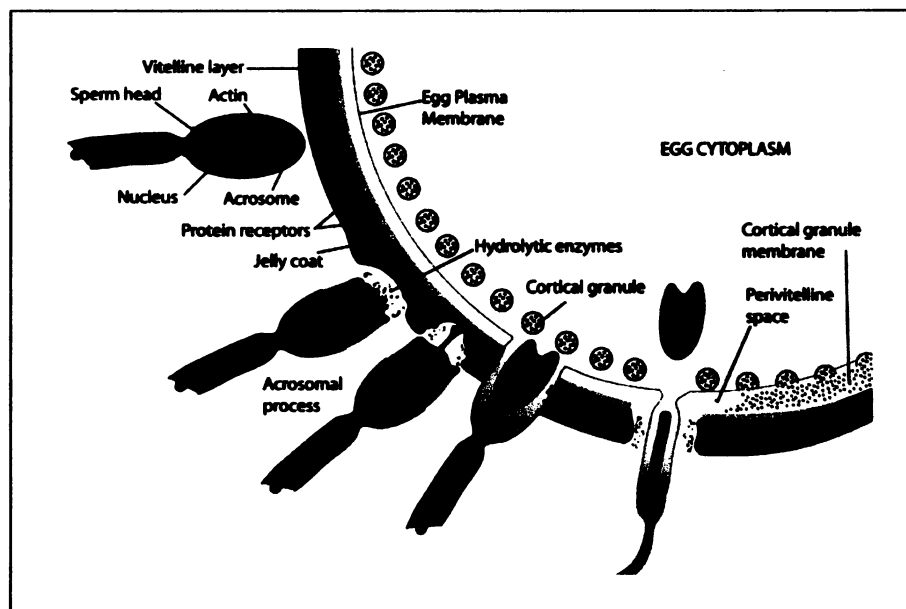


Obr. 3: Průběh fertilizace [III]

1.5 AKROZOMOVÁ REAKCE

Akrozomová reakce (obr. 4) nastává po kontaktu (interakci) spermie se zónou pellucidou vajíčka (primární vazba). Akrozomová reakce zahrnuje mnohonásobnou fúzi vnější akrozomové membrány a plazmatické membrány spermie. Dochází k vylití obsahu akrozomu a na povrch se dostává vnitřní akrozomová membrána, kde proteiny na ní navázané nově interagují s glykoproteiny zony pellucidy [14]. Glykoproteinová vrstva pokrývající vnější akrozomovou membránu může sloužit k vesikulaci plazmatické a vnější akrozomové membrány během akrozomové reakce, stejně tak některé glykoproteiny a sacharidy obsažené v akrozomální matrix. V době pobytu spermie v samičím pohlavním traktu se může objevit nepravá akrozomová reakce, která je spojena s apoptózou spermie. Zónou pellucidou zprostředkovaná akrozomová reakce je druhově specifická [17]. Jeden z glykoproteinů zony pellucidy hraje roli jako ligand a jeho vazba s receptorem na povrchu spermie spouští řetězovou reakci řídicí akrozomovou reakci. Klíčovou roli v přípravě fúze membrán hraje kapacitační proces [11,19]. Kapacitace je spojena se schopností prodělat akrozomovou reakci jako odpověď na vazbu fyziologických ligandů. Zónové receptory přítomné v membráně mohou mít proteinkinázovou aktivitu. Jejich aktivace spouští kaskádu reakcí zahrnující

stimulaci G-proteinů a fosfolipasy C, štěpení fosfatidylinositoldifosfátu na diacylglycerol a inositolfosfát, zvýšení hladiny intracelulárních vápenatých iontů a aktivaci proteinkinázy C a následnou fosforylaci proteinů [18]. Aktivovaný G-protein také stimuluje fosfolipázu A2, umožňující štěpení fosfatidylcholinu na lysofosfatidylcholin a arachidonovou kyselinu, tedy vysoce fúzogenní látky.



Obr. 4: Akrozomová reakce [IV]

Zvýšení koncentrace vápníku, vzrůst intracelulárního pH a produkce fúzogenních látek jsou základním předpokladem pro spuštění akrozomové reakce [18].

1.6 PROTEINY KANČÍ SEMENNÉ PLAZMY

Semenná plazma obsahuje nejrůznější složky jak nízkomolekulárního tak vysokomolekulárního charakteru. Z vysokomolekulárních látek představují proteiny pravděpodobně nejdůležitější složku. Jsou produkovány převážně semennými vaky a prostatou. Některé z těchto proteinů se váží na povrch spermie a účastní se velmi významně jednotlivých kroků fertilizace [20].

Většina proteinů kančí semenné plazmy (80 % celkových proteinů) patří mezi spermadheziny. Jsou to nízkomolekulární proteiny s rel. mol. hmotností 12000 – 16000. Spermadheziny a další proteiny semenné plazmy se váží jednak mezi sebou a jednak na spermii.

Proteiny lokalizované na povrchu spermie se účastní interakcí buď s komponentami oviduktu, zony pellucidy nebo s látkami přítomnými v přirozeném okolí obou gamet. Proteiny kančí semenné plazmy byly rozděleny afinitní chromatografií na imobilizovaném heparinu na dvě části: heparin-vázající (H^+) a heparin-nevázající (H^-) proteiny. Následná HPLC analýza a N-koncová sekvenace ukázaly, že obě frakce jsou tvořeny nízkomolekulárními složkami: H^+ frakci tvoří protein DQH, spermadheziny AQN a AWN, zatímco H^- frakci tvoří spermadheziny PSP-I a PSP-II [21].

Kančí spermadheziny (AQN 1-3, AWN 1 a 2 a PSP I a II proteiny) patří k velké rodině vývojově řízených proteinů. DQH povrchový protein spermie se strukturou liší od spermadhezínů a patří do velké rodiny adhezivních proteinů buněk a mezibuněčné hmoty [22]. Bylo zjištěno, že proteiny kančí semenné plazmy jsou za fyziologických podmínek přítomny převážně jako agregáty o různé molekulové hmotnosti, rozdílného složení a vazebných vlastností [23]. Tyto agregované formy proteinů semenné plazmy (DQH, AQN, AWN, PSP), spíše než individuální proteiny, se účastní vazby na povrch spermie, kapacitace spermie a primární vazby spermie k zoně pellucidě vajíčka [24,25].

1.7 STEROIDNÍ HORMONY

1.7.1 Chemie a struktura hormonů

Steroidní sloučeniny tvoří početnou skupinu přírodních látek. Základ molekuly steroidních hormonů je strukturně odvozen od cyklopentanoperhydrofenantrenového jádra [26]. Steroidní hormony vznikají v pohlavních žlázách a nadledvinách a tvoří pouze steroidy s 21, 19 a 18 uhlíkovými atomy.

Steroidní hormony jsou lipofilní, a proto volně prostupují plazmatickou membránou do extracelulárního prostoru. V krevní plazmě je většina steroidních hormonů transportována ve formě vázané na albumin a specifické proteiny, menší část ve volné formě, která jediná je aktivní a váže se na specifické receptory. Steroidní hormony mají pomalejší nástup účinku a delší poločas života než polypeptidové

hormony, především proto, že jsou transportovány až do buněčného jádra, kde působí jako regulátory proteosyntézy [27].

1.7.2 Rozdělení steroidů podle původu

Rozdělení podle počtu uhlíků částečně koresponduje s rozdělením podle žlázového původu a funkce.

Kortikoidy s 21 uhlíky se tvoří v kůře nadledvin (adrenokortexu). Progestiny s 21 uhlíky jsou prekurzory kortikoidů i sexuálních hormonů; sám progesteron (4 pregnen-3,20-dion) je jedním ze samičích sexuálních hormonů.

Androgeny a estrogeny s 19 a 18 uhlíky se tvoří v samčích a samičích pohlavních žlázách, v menší míře ale také v kůře nadledvin [26].

1.7.3 Mechanismus účinku steroidních hormonů

Steroidy účinkují většinou dlouhodobě, prostřednictvím nitrobuněčných receptorů, mechanismem regulace exprese genů pro určité proteiny – enzymy, strukturní bílkoviny, peptidové hormony. Tímto mechanismem regulují i syntézu svých vlastních receptorů. Steroidní hormony nadto mohou účinkovat i krátkodobě, na některé jiné úrovni než je exprese genů (tzv. negenomové účinky) [28].

Hormon se váže na intracelulární receptor, čímž dochází ke konformačním, případně dalším změnám v molekule receptorové bílkoviny, která zaujme formu, schopnou interakce s jadernou DNA (tzv. aktivace nebo též transformace). U receptorů rozeznáváme tři části – domény – plnící odlišné funkce. První je oblast – doména odpovědná za vazbu na DNA, druhá doména obsahující vazebné místo pro hormon a třetí (N-terminální) zprostředkuje vlastní spuštění ('triggering') transkripce příslušného (příslušných) genů [27].

V jádře buňky se pak „aktivovaný“ hormon-receptorový komplex svou „DNA vázající doménou“ váže na určité úseky DNA, tzv. hormony regulované elementy, které nejsou totožné s iniciačním místem pro přepis (transkripci) genu do mRNA, dokonce mohou být od něj dosti vzdálené. K „překlenutí“ vzdálenosti mezi hormony regulované elementy a iniciačním místem pro transkripci, jenž se zpřístupňuje pro jadernou RNA-polymerázu, slouží celá molekula receptorové bílkoviny, zejména

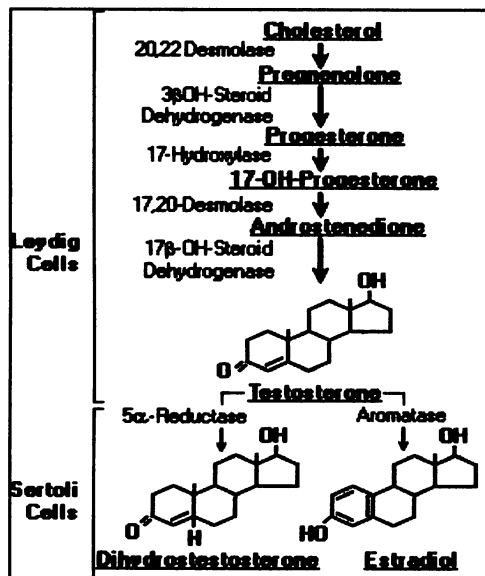
však její N-terminální část, za spoluúčasti dalších jaderných proteinů, tzv. transkripčních faktorů [29].

1.7.4 Biosyntéza steroidních hormonů

Prekursorem všech steroidních hormonů je cholesterol (obr. 5). Hlavním zdrojem cholesterolu pro biosyntézu steroidních hormonů je cirkulující cholesterol, vázaný na tzv. LDL a HDL lipoproteiny a nitrobuněčný cholesterol, uvnitř buněk pak ve formě esterů v cytoplazmatických vakuolách [26]. Buňky schopné zužitkovat cholesterol, tedy všechny steroidogenní tkáně, obsahují na svých membránách receptory pro zmíněné lipoproteiny, které zprostředkovávají endocytózu cholesterolu do buněk.

1.7.4.1 Androgeny (samčí sexuální hormony)

Androgeny se tvoří v tzv. Leydigových (vmezeřených, intersticiálních) buňkách varlat, tvořících asi 5 % objemu žlázy. Větší část tvoří semenotvorné kanálky s tzv. Sertoliho buňkami, produkujícími peptid inhibin, jenž podobně jako statiny brzdí tvorbu a výdej FSH; v semenotvorných kanálcích jsou uloženy samčí zárodečné buňky. Androgeny se tvoří i ve vaječnících a rovněž v kůře nadledvin. Hlavními androgeny jsou testosteron (17 β -hydroxy-4-androsten-3-on) a jeho nasycený derivát, dihydrotestosteron (17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-on) [29].



Obr. 5: Biosyntéza steroidů [V]

Transport a metabolismus:

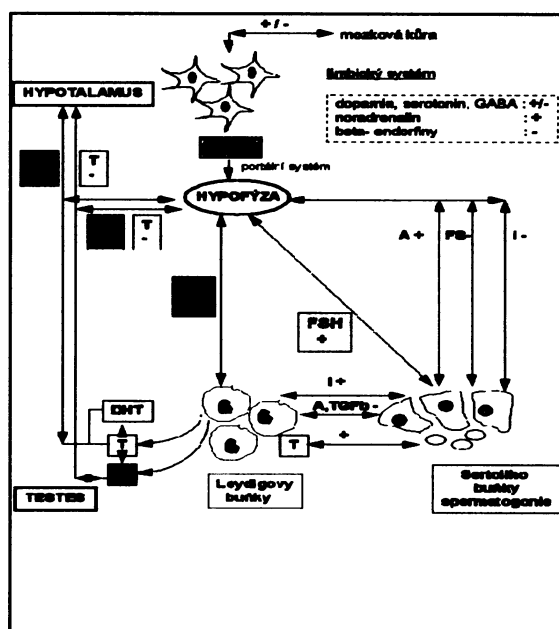
Testosteron a dihydrotestosteron (obr. 5) jsou v krevní plazmě vázány na transportní protein sexuální hormony vázající globulin a z části na albumin. Testosteron se metabolizuje v játrech na 17-ketosteroidy, ty se vylučují močí. Malé množství testosteronu se konvertuje na estrogen.

1.7.5 Funkce steroidních hormonů

Testosteron působí proteoanabolicky (zvýšení syntézy a snížení rozpadu proteinů). Jeho efekt je jednak cílený a jednak celkový, kdy má proteoanabolický účinek zejména v kosterních svalech (zvyšuje objem svalové hmoty). Ve většině cílových tkání je však vlastním účinným androgenem *dihydrotestosteron*, který vzniká z testosteronu přímo v tkáních působením 5 α -reduktázy [29].

1.7.6 Hormonální regulace samčích pohlavních žláz

Řízení sekrece samčích pohlavních žláz – činnost pohlavních žláz je řízena v rámci hypotalamo-hypofyzálního systému pomocí zpětnovazebních mechanismů [26]. Gonadoliberin (Gn-RH) uvolňovaný v hypotalamu řídí sekreci gonadotropinů (LH a FSH) v adenohipofýze. Zvýšení koncentrace LH stimuluje zvýšení koncentrace cAMP spojené se syntézou testosteronu v Leydigových buňkách varlat. Testosteron ve varlatech stimuluje Sertoliho buňky a následně zvyšuje spermatogenezi. Zbytek hormonu je uvolňován do krevního oběhu a působí zpětnovazebně snížení sekrece Gn-RH. FSH působí zvýšení koncentrace cAMP v Sertoliho buňkách varlat, které má za následek aromatizaci testosteronu na estradiol. Sertoliho buňky nejsou schopné syntetizovat testosteron, který se do nich dostává difúzí z Leydigových buněk. FSH je



nezbytný pro nástup spermatogeneze v pubertě [30]. Sertoliho buňky dále uvolňují inhibin – peptid, který zpětnovazebně snižuje sekreci FSH v adenohipofýze. Zpětnovazebné mechanismy působí i na úrovni samotných varlat. Leydigovy buňky uvolňují peptid podobný – ACTH, který stimuluje funkci Sertoliho buněk a dále uvolňují β -endorfin, který ji naopak inhibuje. Inhibin snižuje syntézu androgenů v Leydigových buňkách [26].

Obr. 6: Hormonální regulace pohlavních žláz [VI]

1.8 CÍL PRÁCE

Interakce spermií a vajíčka se u savců skládá z řady vysoce specializovaných dějů, které vedou k vzájemné aktivaci gamet. Tyto děje jsou regulovány na úrovni receptorů podobně jako funkce somatických buněk, které jsou regulovány hormony, nervovými přenašeči, růstovými faktory.

Cílem předkládané bakalářské práce bylo:

- porovnat fertilizační ukazatele kanců z hlediska jejich odpovědi na hladinu indukovaného testosteronu.
- sledovat vliv hladiny indukovaného testosteronu na stupeň glykosylace proteinů v kančí semenné plazmě.
- korelovat hodnoty indukovaného testosteronu s množstvím proteinů kančí semenné plazmy.

2 Materiál a metody

2.1 Použitý materiál

2.1.1 Chemikálie

Acetonitril (ACN)	- Merck, Darmstadt, Německo
Akrylamid	- Serva, Heidelberg, Německo
APS (peroxodisíran amonný)	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Bis AA	- Serva, Heidelberg, Německo
Bromfenolová modř	- Lachema, Brno
CBB (Coomassie Brilliant Blue R-250)	- Serva, Heidelberg, Německo
Ethanol	- Lachema, Brno, ČR
Fenol	- Lachema, Neratovice, ČR
Formaldehyd	- Lachema, Brno
D-glukosa	- Lachema, Brno
Glycerol	- Lachema, Brno
Hydrogenuhlíčan amonný	- Lachema, Brno
Hydrogenfosforečnan sodný	- Lachema, Brno
Hydroxylapatit	- Léčiva, Praha
Chlorid sodný	- Lachema, Brno
Chlorid hořečnatý	- Lachema, Brno
Kyselina chlorovodíková	- Lachema, Neratovice, ČR
Kyselina octová	- Lachema, Brno
Kyselina sírová	- Lachema, Neratovice, ČR
Merkaptoethanol	- Loba Chemie, Fishamend
Methanol	- Lachema, Brno
SDS (dodecylsulfát sodný)	- Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin)	- Serva, Heidelberg, Německo
TFA (trifluoroctová kyselina)	- Merck, Darmstadt, Německo
Tris (tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	- Serva, Heidelberg, Německo

2.1.2 Biologický materiál

Kančí semenná plazma byla získána z inseminační stanice ISK Grygov. Spermie byly od semenné plazmy odděleny centrifugací 600 - 1000 * g po dobu 20 minut při 5 °C. Poté byly vzorky uchovávány ve zmrazeném stavu.

2.2 Afinity chromatografie na sloupci hydroxylapatitu

Sloupec polyakrylamidu s navázaným hydroxylapatitem (2,8 x 15 cm) byl ekvilibrován 200 ml fyziologického roztoku (pH = 7,02).

Na sloupec afinitního nosiče při průtokové rychlosti 2 ml / 3 min byl nanesen 1 ml kančí semenné plazmy. Po nanesení vzorku byl sloupec promýván 10mM PB (pH = 7.2). Přítomnost hydroxylapatit nevázaných proteinů byla sledována absorbance při $\lambda = 280$ nm na spektrofotometru Helios γ . Po poklesu absorbance eluátu pod hodnotu 0,08 byly navázané proteiny eluovány pomocí 100mM PB (pH = 7.1). Zbývající navázané proteiny byly eluovány zvýšením iontové síly roztokem 50mM $MgCl_2$. Získané frakce byly zamrazeny a poté lyofilizovány.

2.3 RP HPLC

Dělení proteinových frakcí získaných z afinitní chromatografie (kap. 3.1) bylo provedeno pomocí RP HPLC na přístroji WATERS (Milford, USA) při použití analytické kolony VYDAC C-18 typu 218 TP 104 (4,6 x 250 mm) s velikostí částic 10 μ m.

Na kolonu byl vždy nanášen 1 ml vzorku (1 mg lyofilizovaného vzorku rozpuštěný v 1 ml 0,05% TFA v redest. H_2O).

Průběh lineárního gradientu acetonitrilu (ACN) byl následující: 20 - 50% ACN během 60 minut, pak promývací gradient 50 - 70% ACN během 5 minut, dalších 5 minut izokraticky 70% ACN a 70 - 20% ACN po dobu 5 minut. Průtoková rychlost byla nastavena na 1 ml/min.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na koloně s reverzní fází (RP HPLC) byla provedena Dr. Pavlou Maňáskovou na ÚMG AV ČR.

2.4 Stanovení obsahu neutrálních sacharidů podle Duboise

Metoda [31] je založena na dehydrataci cukrů koncentrovanou kyselinou sírovou a následné kondenzaci vzniklého furfuralu či 5-hydroxymethylfurfuralu za vzniku barevných kondenzačních produktů, které lze spektrofotometricky stanovit.

Pro kalibraci byly připraveny vodné roztoky D-glukosy o koncentraci 0, 0,025, 0,0125, 0,00625, 0,003125, 0,00156, 0,000781, 0,00039 mg/ml. K 500 ul všech vzorků a standardů bylo přidáno z dávkovací láhve 1 ml 5% roztoku fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Směs byla protřepána a nechala se od stát při laboratorní teplotě 30 min. Na spektrofotometru Helios γ byla měřena absorbance při 490 nm ve skleněných kyvetách.

Vynesením hodnot absorbance standardů proti množství glukosy v jednotlivých zkumavkách byl vytvořen kalibrační graf a jeho interpolací byl stanoven obsah neutrálních sacharidů ve vzorku.

2.5 SDS-elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu (diskontinuální elektroforéza dle Laemmliho)

Složení roztoků:

A. Roztok akrylamidu: 29,2 g AA + 0,8 g bis AA do 100 ml H₂O

B. 1,5M Tris. HCl o pH 8,8: 18,5 g Tris + 100 ml H₂O, pH upraveno pomocí HCl

C. 0,5M Tris. HCl o pH 6,8: 6 g Tris + 100 ml H₂O, pH upraveno pomocí HCl

D. 10% SDS: 10 g SDS + 100 ml H₂O

E. Vzorkový pufr:	neredukující	redukující
H ₂ O	4,4 ml	3,7 ml
0,5M Tris. HCl o pH 6.8	1,0 ml	1,0 ml
glycerol	0,8 ml	0,8 ml
10% SDS	1,6 ml	1,6 ml
0,1% bromfenolová modř	0,2 ml	0,5 ml
merkapt ethanol	-	0,4 ml

F. Elektrodový pufr: 9 g Tris + 43,2 g glycinu + 3 g SDS + 600 ml H₂O, před použitím ředěno 80 ml zásobního roztoku 320 ml H₂O

G. 10% APS: 1 g APS + 10 ml H₂O

Zaostřovací gel 4%: 1,52ml H₂O + 0,625ml roztoku C + 0,025 ml roztoku D + 0,325ml roztoku A. Těsně před aplikací bylo přidáno 3,8μl TEMEDu a 5μl roztoku G.

Separční gel 12%: 2,5 ml roztoku B + 4,0 ml roztoku A + 3,5 ml H₂O + 100 μl roztoku D. Těsně před aplikací bylo přidáno 4,5 μl TEMEDu a 35 μl roztoku G.

Barvení gelů: 0,5 g CBB + 450 ml methanolu + 100 ml kyseliny octové + 450 ml H₂O

Odbarvení gelů: 250 ml methanolu + 100 ml kyseliny octové + 650 ml H₂O

Standard: směs oligomerů lysozymu (monomer – M_r = 14 500)

Postup:

1. Pro elektroforézu byl použit přístroj firmy Bio-Rad. 12% separční gel byl nalit mezi dvě vertikální skla upevněná do stojanu pro nalévání gelů, převrstven vodou a ponechán polymerovat.

2. Po vysušení gelů filtračním papírem byla nalita vrstva 4% zaostřovacího gelu, do níž byl zasunut hřeben pro tvorbu jamek.

3. Vzorky o koncentraci 1 mg proteinů na 100 μl vzorkového neredukujícího pufru byly před nanesením inkubovány 5 minut v horké vodní lázni.

4. Po ukončení polymerace byla sestavena aparatura pro provedení elektroforézy. Do katodového i anodového prostoru byl nalit elektrodový pufr. Po odstranění hřebenů byly do jamek nanášeny vzorky o objemu 10 μl pomocí mikrostříkačky. Vana byla doplněna elektrodovým pufrem.

5. Elektrody byly připojeny ke zdroji napětí. Jako zdroj napětí byl použit přístroj Electrophoresis Constant Power Supply 3000/150 firmy Pharmacia. Elektroforéza probíhala zpočátku při napětí 70 V, po překročení rozhraní gelů bylo nastaveno napětí 130 V. Elektroforéza trvala 90 min.

6. Po skončení elektroforézy byly gely propláchnuty destilovanou vodou a barveny přes noc v roztoku pro barvení gelů. Poté byly odbarveny v odbarvovacím roztoku, opláchnuty destilovanou vodou a vysušeny v celofánu.

2.6 Stanovení celkového cholesterolu

Cholesterol reaguje s acetanhydridem a koncentrovanou kyselinou sírovou za vzniku zeleně zbarvené molekuly cholestahehexan-sulfonové kyseliny. Interferenci bílkovin potlačuje 2,5-dimethylbenzensulfonová kyselina.

Činidla:

- | | |
|---|----------|
| 1 Standardní roztok | (10 ml) |
| Cholesterol 5,17 mmol/l, kyselina octová 17,5 mol/l | |
| 2 Acetanhydrid 6,5 mol/l, kyselina octová 7 mol/l,
kys. 2,5-dimethylbenzensulfonová 0,05 mol/l | (250 ml) |
| 3 Kyselina sírová konc. | (50 ml) |

Postup:

Ve třech zkumavkách se smíchá činidlo 2 v poměru 30+1 se vzorkem, činidlem 1 (standard) a s destilovanou vodou (kontrolní roztok). Promíchá se a inkubuje se 5 min ve vodní lázni s proudící vodou o teplotě 10 – 20 °C. Pak se do všech zkumavek na 1 objemový díl vzorku přidá 6 objemových dílů činidla 3. Rychle se promíchá a temperuje se 10 min ve vodní fázi s proudící vodou o teplotě 10 – 20 °C. Změří se absorbance vzorku (A₁) a standardu (A₂) při 585 nm proti kontrolnímu roztoku. Měření je nutné provést do 45 minut po ochlazení.

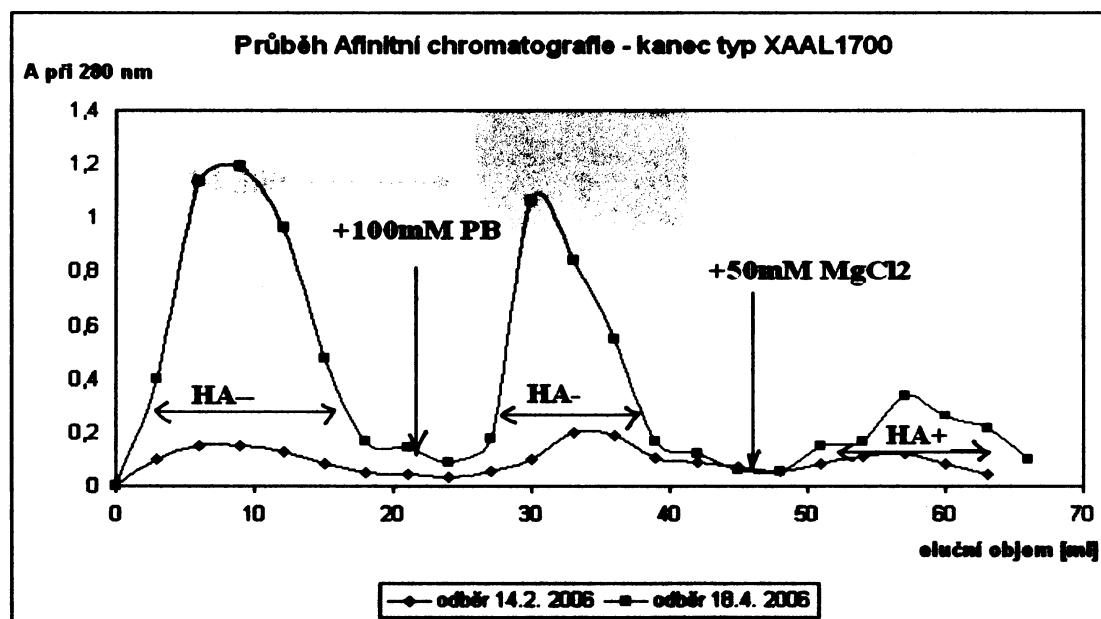
Výpočet celkového cholesterolu:

Celkový cholesterol (mmol/l) = $5,17 \cdot (A_1 / A_2)$,

3 VÝSLEDKY

3.1 Afinitní chromatografie KSP na hydroxylapatitu

Kančí semenná plazma byla rozdělena pomocí afinitní chromatografie na sloupci hydroxylapatitu na tři frakce. První frakce, která se na afinitní nosič nevázala a byla eluována 10mM PB (pH 7.2), byla označena jako hydroxylapatit-nevázájící (HA^-). Poté byly proteiny eluovány pomocí 100mM PB (pH 7.1), tato druhá frakce byla označena jako hydroxylapatit-nevázájící (HA^-). Zbylé proteiny byly vytěsněny zvýšením iontové síly pomocí roztoku 50mM $MgCl_2$ a tato třetí frakce byla označena jako hydroxylapatit-vázající (HA^+). Průběh chromatografie byl sledován měřením absorbance při 280 nm. Získané proteinové frakce byly odsoleny pomocí dialýzy proti destilované vodě a poté namrazeny a lyofilizovány. Eluční profil je znázorněn na obr. 7. Složení jednotlivých frakcí bylo sledováno pomocí HPLC s reverzní fází na koloně VYDAC C-18 (kap. 2.4) a SDS-elektroforézou (kap. 2.6).

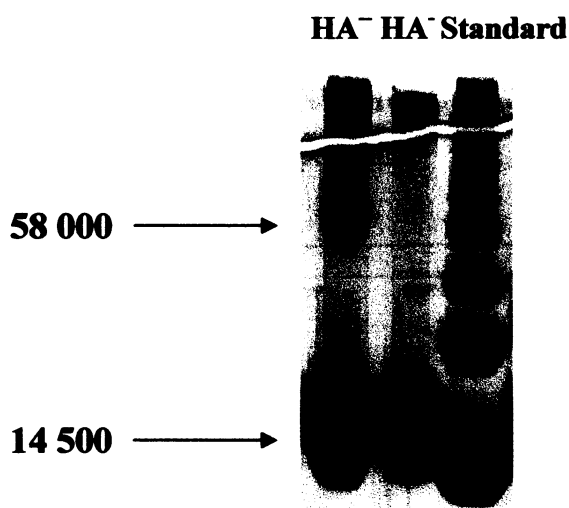


Obr. 7: Průběh afinitní chromatografie na sloupci hydroxylapatitu

HA^- = hydroxylapatit-nevázájící frakce po vymytí 10mM PB (pH 7.2),
 HA^- = hydroxylapatit-nevázájící frakce po vymytí 100mM PB (pH 7.1),
 HA^+ = hydroxylapatit-vázající frakce po vymytí 50mM $MgCl_2$.

3.2 SDS-elektroforéza proteinů kančí semenné plazmy

Proteiny HA^+ , HA^- a HA^- získané z kančí semenné plazmy chromatografií na sloupci hydroxylapatitu byly analyzovány pomocí SDS-elektroforézy v 12% polyakrylamidovém separačním gelu v neredukujícím prostředí. SDS-elektroforéza a barvení na proteiny a glykoproteiny byly použity ke studiu přítomnosti a glykosylace proteinů nacházejících se v kančí semenné plazmě. Výsledek elektroforézy je znázorněn na obr. 8.



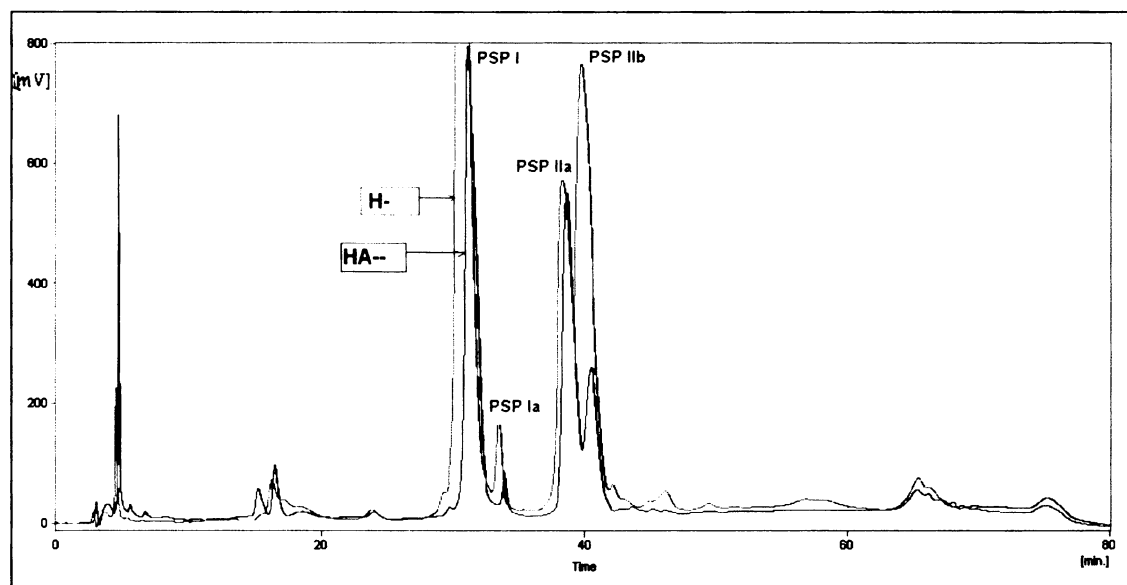
Obr. 8: SDS-elektroforeogram proteinů kančí semenné plazmy v neredukujícím prostředí po barvení v Coomassie Brilliant Blue na proteiny

3.3 Charakterizace HA^+ , HA^- a HA^- frakcí kančí semenné plazmy pomocí HPLC

HPLC s reverzní fází byla použita pro charakterizaci HA^+ , HA^- a HA^- proteinů získaných z kančí semenné plazmy chromatografií na sloupci hydroxylapatitu.

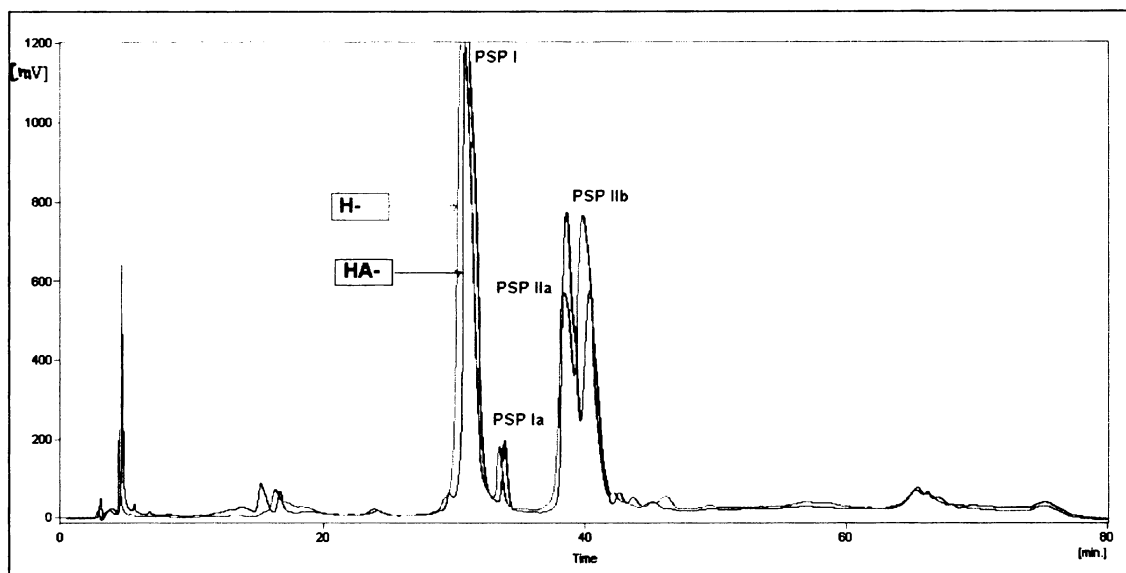
Porovnání průběhu chromatografického dělení hydroxylapatit-nevázající frakce (HA^-) po vymytí 10mM PB (pH 7.2) s průběhem chromatografického dělení H^- proteinů kančí semenné plazmy je znázorněno na obr. 9. Srovnání průběhu chromatografického dělení hydroxylapatit-nevázající frakce (HA^-) po vymytí 100mM PB (pH 7.1) s průběhem chromatografického dělení H^- proteinů kančí semenné plazmy je znázorněno na obr. 10. Porovnání průběhu chromatografického dělení hydroxylapatit-vázající frakce (HA^+) s průběhem chromatografického dělení H^+ proteinů kančí semenné plazmy je znázorněno na obr. 11.

Z porovnání retenčních časů H^+ a H^- proteinů kančí semenné plazmy je zřejmé, že proteinové složení frakcí je velmi podobné.



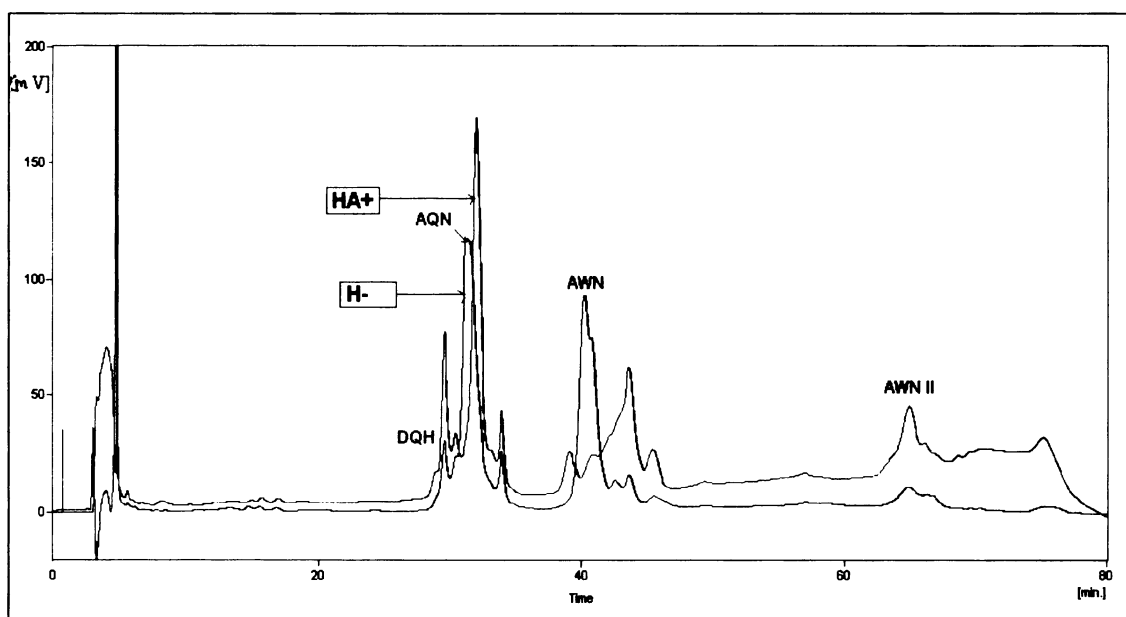
Obr. 9: RP HPLC – dělení HA^- frakce získané z afinitní chromatografie na sloupci hydroxylapatitu po vymytí 10mM PB (pH 7.2)

H^- = heparin-nevázající proteiny kančí semenné plazmy, HA^- = hydroxylapatit-nevázající frakce; PSP I, PSP Ia, PSP IIa, PSP IIb = separované proteiny kančí semenné plazmy vyskytující se v jednotlivých frakcích



Obr. 10: RP HPLC – dělení HA^- frakce získané z afinitní chromatografie na sloupci hydroxylapatitu po vymytí 100mM PB (pH 7.1)

H^- = heparin-nevázající proteiny kančí semenné plazmy, HA^- = hydroxylapatit-
-nevázající frakce; PSP I, PSP Ia, PSP IIa, PSP IIb = separované proteiny kančí
semenné plazmy vyskytující se v jednotlivých frakcích



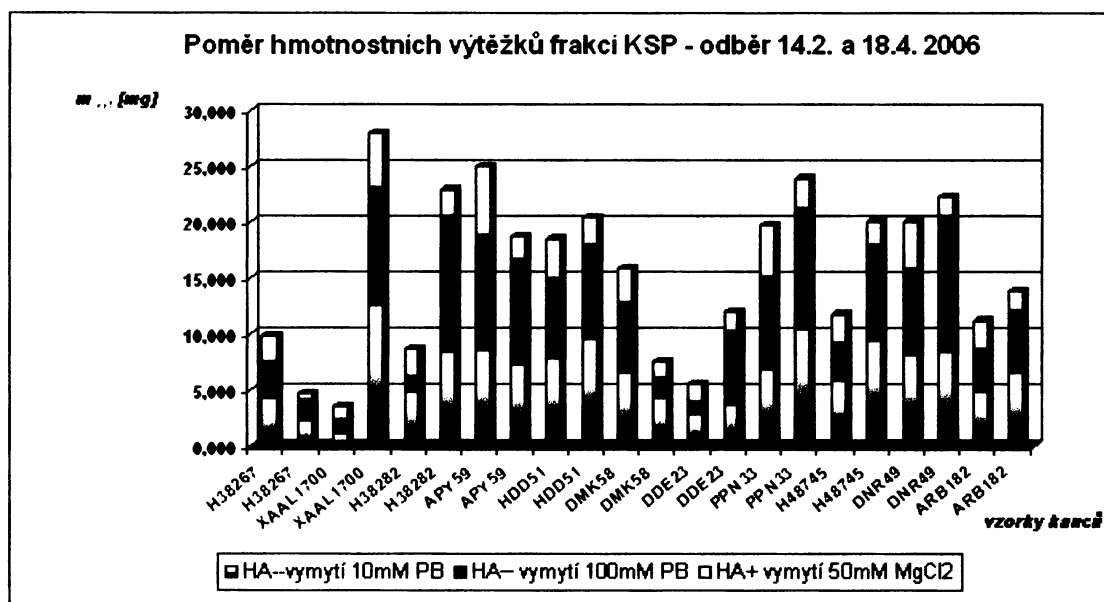
Obr. 11: RP HPLC – dělení HA^+ frakce získané z afinitní chromatografie na sloupci hydroxylapatitu po vymytí 50mM $MgCl_2$

H^+ = heparin-vázající proteiny kančí semenné plazmy (výchozí vzorek),
 HA^+ = hydroxylapatit-vázající frakce; DQH, AQN, AWN, AWN II = separované
proteiny kančí semenné plazmy vyskytující se v jednotlivých frakcích

3.4 Chromatografie proteinů kančí semenné plazmy na hydroxylapatitu

Proteiny kančí semenné plazmy byly rozděleny pomocí afinitní chromatografie na sloupci hydroxylapatitu na 3 frakce. První frakce, která byla eluována 10mM PB, se nevázala a byla označena jako hydroxylapatit-nevázájící (HA^-). Druhá frakce, eluovaná 100mM PB se opět nevázala na sloupec hydroxylapatitu a byla označena hydroxylapatit-nevázájící (HA^-). Proteiny adsorbované na sloupec hydroxylapatitu byly eluovány roztokem 50mM $MgCl_2$ a byly označeny hydroxylapatit-vázající (HA^+).

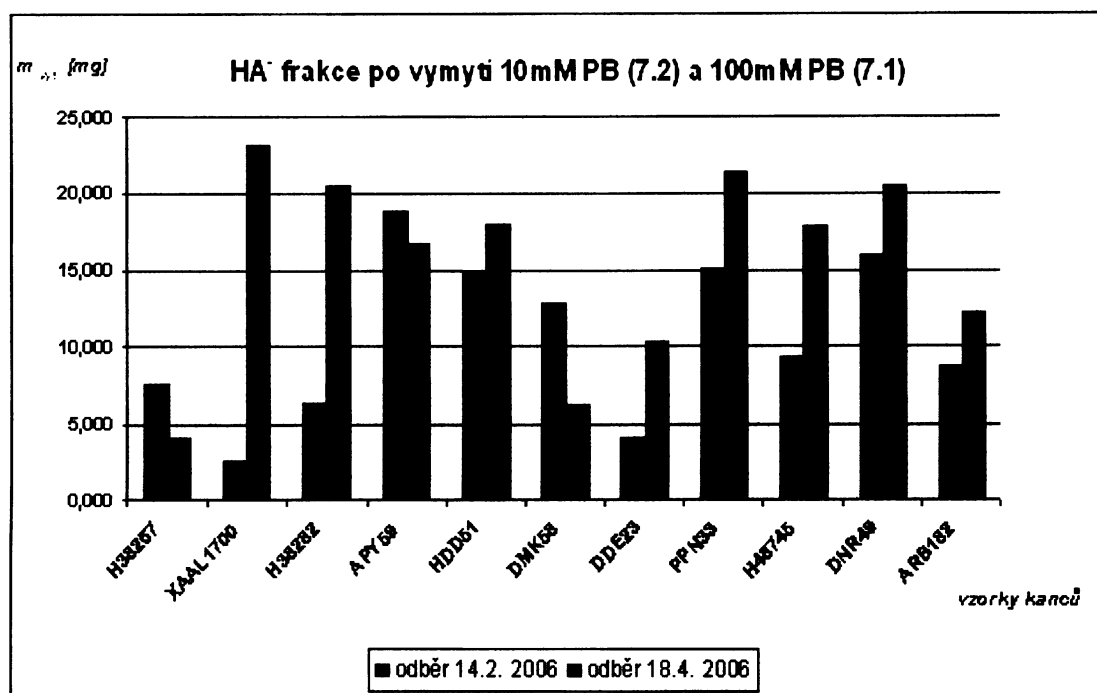
Na obr. 12 je znázorněno srovnání hmotnostních výtěžků proteinů 11 vzorků kančí semenné plazmy v časovém intervalu. Obr. 13 představuje výtěžky proteinů hydroxylapatit-nevázájící frakce (HA^-) po vymytí 10mM PB a poté 100mM PB mezi dvěma odběry. Proteiny hydroxylapatit-vázající frakce (HA^+) jsou znázorněny na obr. 14. Z grafů 12, 13, 14 vyplývá, že se individuální výtěžky proteinů ve dvou odběrech značně liší.



Obr. 12 – Srovnání hmotnostních výtěžků proteinů kančí semenné plazmy mezi odběry

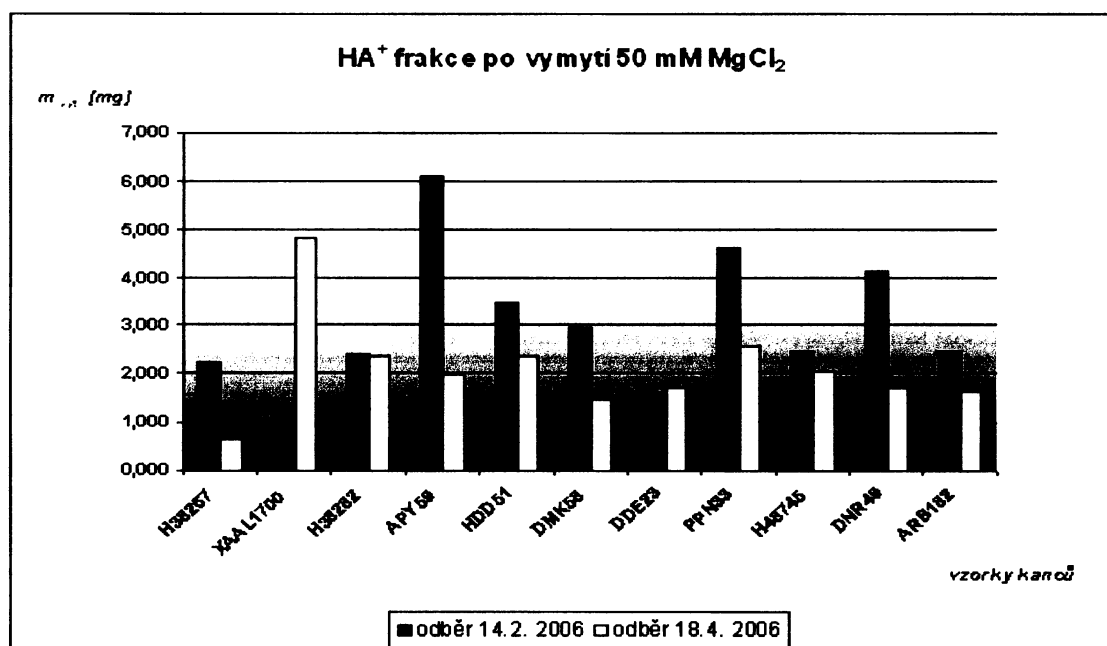
První sloupec (zleva) u typu kance vždy označuje odběr 14.2.2006, druhý odběr 18.4.2006

(HA^-) označuje hydroxylapatit-nevázájící frakci H^- proteinů kančí semenné plazmy, (HA^+) označuje hydroxylapatit-vázající frakci H^+ proteinů kančí semenné plazmy



Obr. 13 - Srovnání hmot.výtěžků hydroxylapatit-nevázajících proteinů kančí semenné plazmy mezi odběry

(HA⁻) označuje hydroxylapatit-nevázající frakci proteinů kančí semenné plazmy po vymytí 10 mM PB (pH 7.2) a 100 mM PB (pH 7.1)



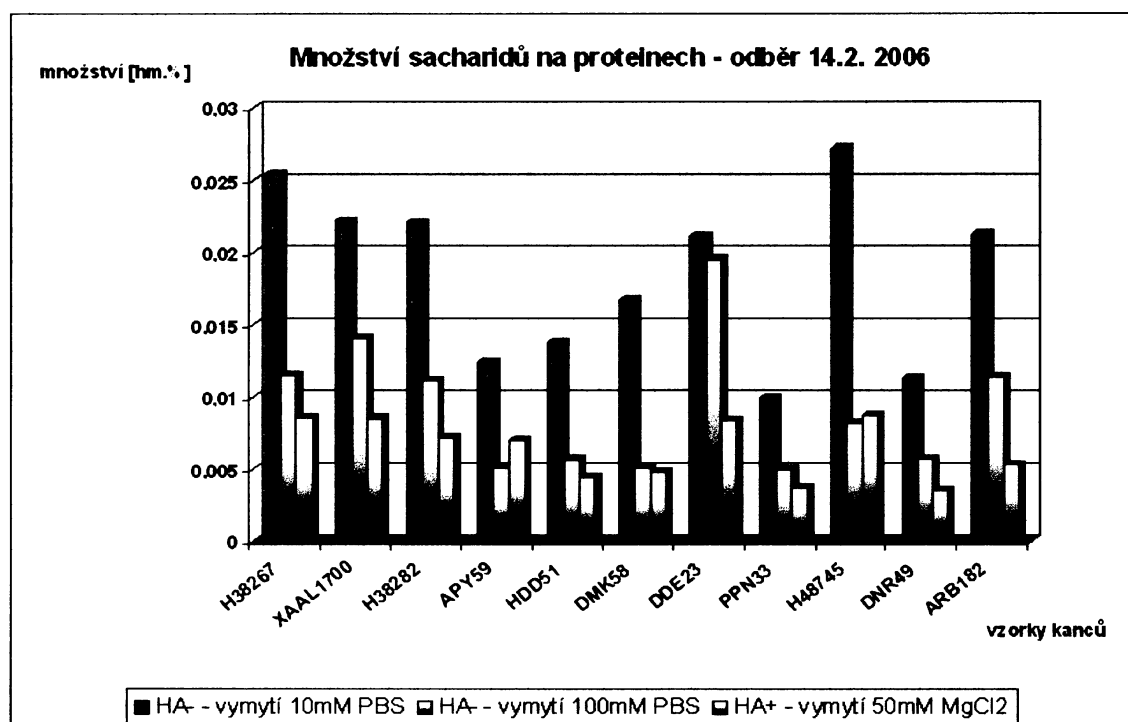
Obr. 14 - Srovnání hmot.výtěžků hydroxylapatit-vázajících proteinů kančí semenné plazmy mezi odběry

(HA⁺) označuje hydroxylapatit-vázající frakci H⁺ proteinů kančí semenné plazmy po vymytí 50mM MgCl₂

3.5 Stanovení glykosylace proteinů KSP

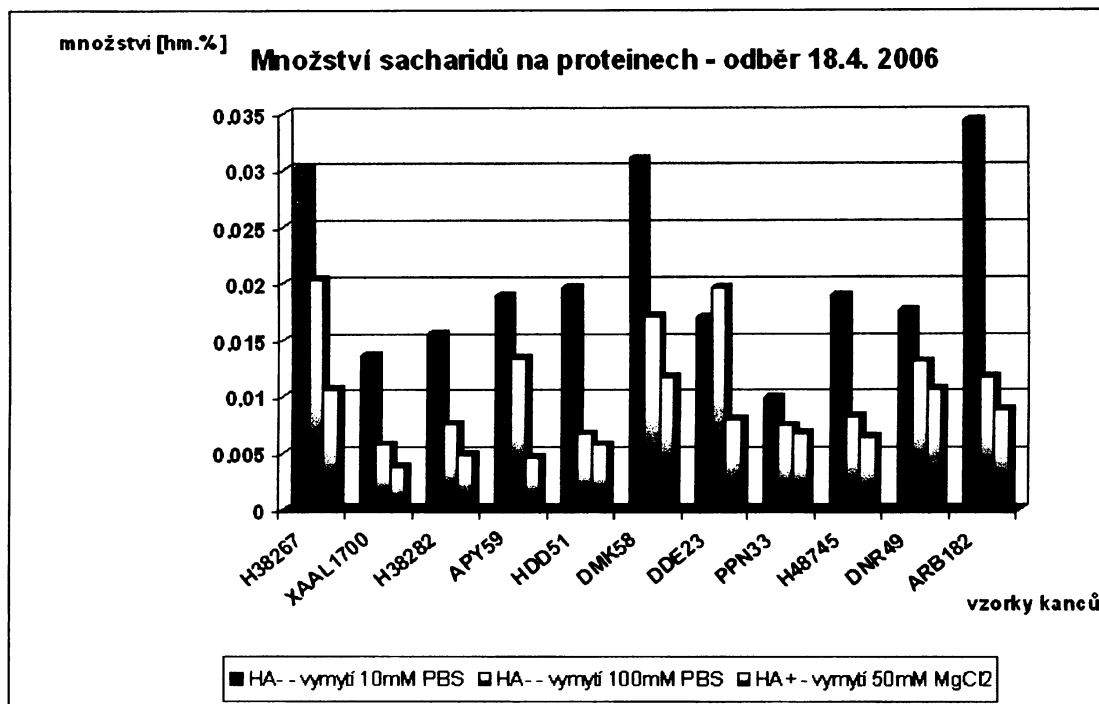
Pro charakterizaci bylo provedeno stanovení neutrálních sacharidů dle Duboise [31].

Hlavním úkolem bylo sledovat změny glykosylace proteinů kančí semenné plazmy jednotlivých frakcí získané afinitní chromatografií na hydroxylapatitu ve dvou odběrech. Z obr. 15 a 16 je patrné, že proteiny KSP obsahují přibližně do 0,03 % sacharidů. Porovnáním grafů č.15, 16 můžeme říci, že stupeň glykosylace u individuálních kanců je variabilní v závislosti na čase.



Obr. 15: Množství sacharidů na proteinech – odběr 14.2.2006

HA⁻ označuje hydroxylapatit-nevázající frakci proteinů kančí semenné plazmy po vymytí 10mM PB (pH 7.2), HA⁻ označuje hydroxylapatit-nevázající frakci proteinů kančí semenné plazmy po vymytí 100mM PB (pH 7.1), HA⁺ označuje hydroxylapatit-vázající frakci H⁺ proteinů kančí semenné plazmy po vymytí 50mM MgCl₂



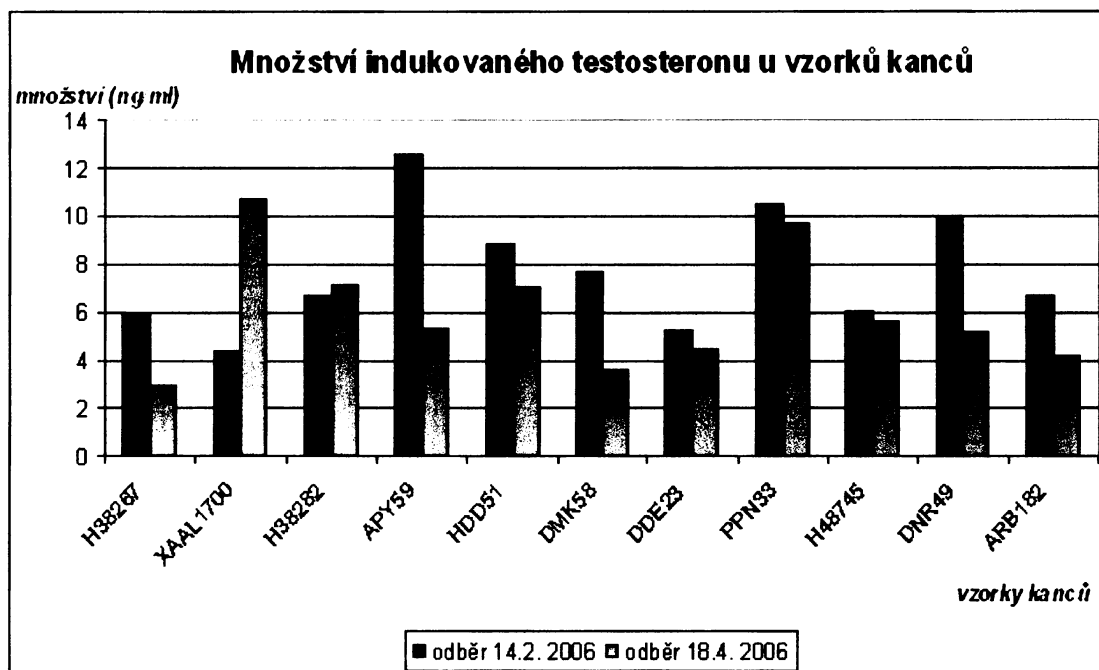
Obr. 16: Množství sacharidů na proteinech – odběr 18.4.2006

HA^- označuje hydroxylapatit-nevázající frakci proteinů kančí semenné plazmy po vymytí 10mM PB (pH 7.2), HA^- označuje hydroxylapatit-nevázající frakci proteinů kančí semenné plazmy po vymytí 100mM PB (pH 7.1), HA^+ označuje hydroxylapatit-vázající frakci H^+ proteinů kančí semenné plazmy po vymytí 50mM $MgCl_2$

3.6 Indukovaný testosteron

Biosyntéza testosteronu vychází z cholesterolu. Indukovaný testosteron u kanců byl vyvolán gonádo-liberiny.

Náplní projektu bylo najít vzájemný vztah hladiny indukovaného testosteronu ke koncentraci cholesterolu ve spermiích. Hladiny indukovaného testosteronu ve dvou odběrech jsou zobrazeny na obr. 17. Je patrné, že hladina indukovaného testosteronu u jednoho kance mezi odběry u většiny kanců značně kolísá.

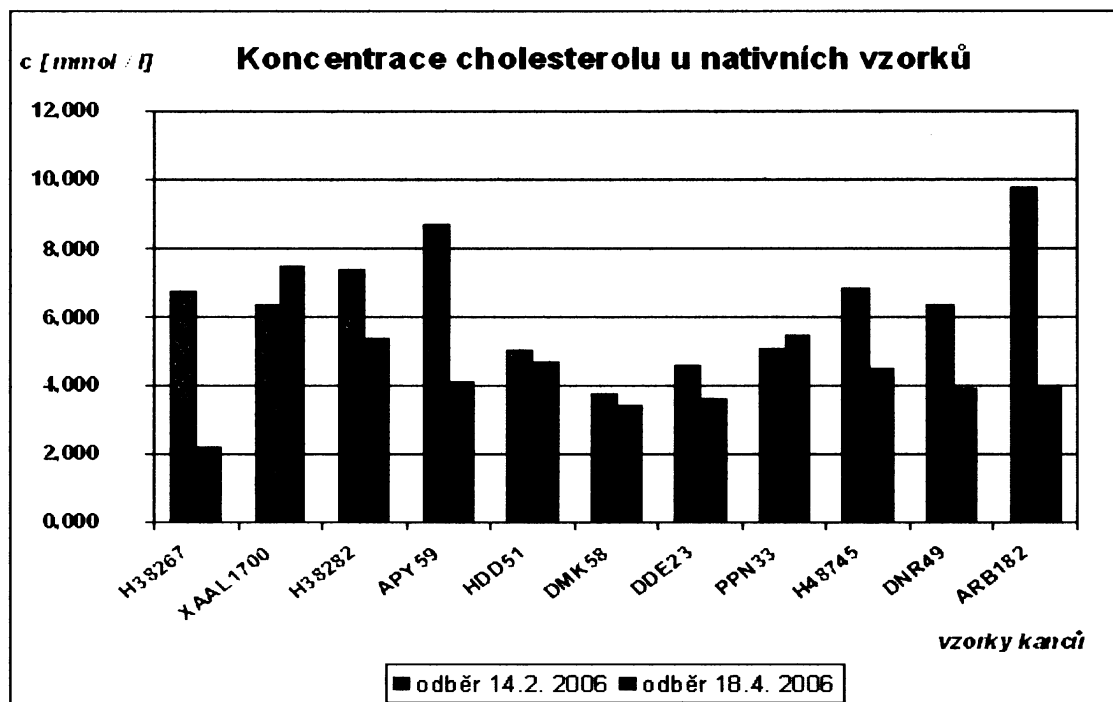


Obr. 17: Hladiny indukovaného testosteronu

3.7 Stanovení cholesterolu ve spermích

Stanovení cholesterolu bylo provedeno u nativních (neředěných) vzorků spermií všech kanců.

Cílem bylo porovnat hladiny indukovaného testosteronu s množstvím cholesterolu ve spermích. Na obr. 18 jsou znázorněny koncentrace cholesterolu v prvním a druhém odběru. Vztah testosteronu a cholesterolu je vidět na obr. 21. Z grafů 17 a 18 lze vyčíst, že u většiny kanců hladina cholesterolu je korelativní k množství indukovaného testosteronu.

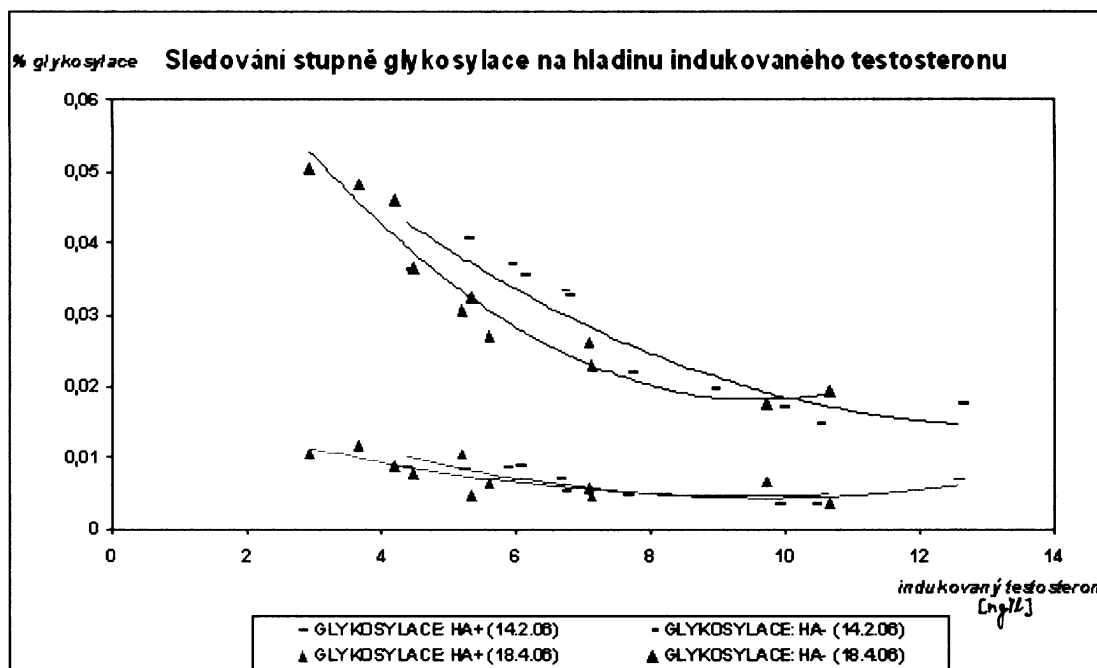


Obr. 18: Koncentrace cholesterolu u nativních vzorků kancí v 1. a 2. odběru

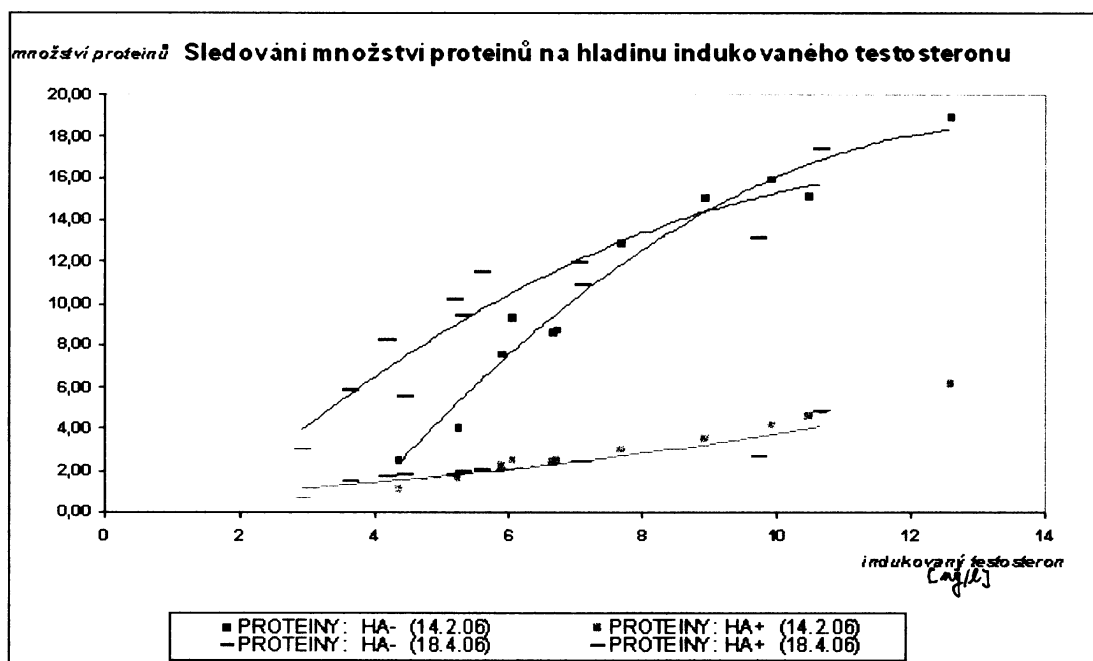
3.8 Sledování glykosylace a množství proteinů KSP v závislosti na množství indukovaného testosteronu

Podstatou pokusu bylo analyzovat závislost stupně glykosylace, množství proteinů kančí semenné plazmy a koncentrace cholesterolu na množství indukovaného testosteronu. Analýza byla provedena u obou odběrů.

Graf č.19 ukazuje, že stupeň glykosylace HA⁺ proteinů KSP není ve vztahu k množství indukovaného testosteronu. Závislost množství proteinů KSP na hladině indukovaného testosteronu je znázorněna na obr.č.20. Experimentálně bylo zjištěno, že s rostoucí hladinou indukovaného testosteronu roste i množství proteinů kančí semenné plazmy.



Obr. 19: Sledování stupně glykosylace na množství indukovaného testosteronu ve 2 odběrech
 (HA⁻) označuje hydroxylapatit-nevázající frakci H proteinů kančí semenné plazmy,
 (HA⁺) označuje hydroxylapatit-vázající frakci H⁺ proteinů kančí semenné plazmy



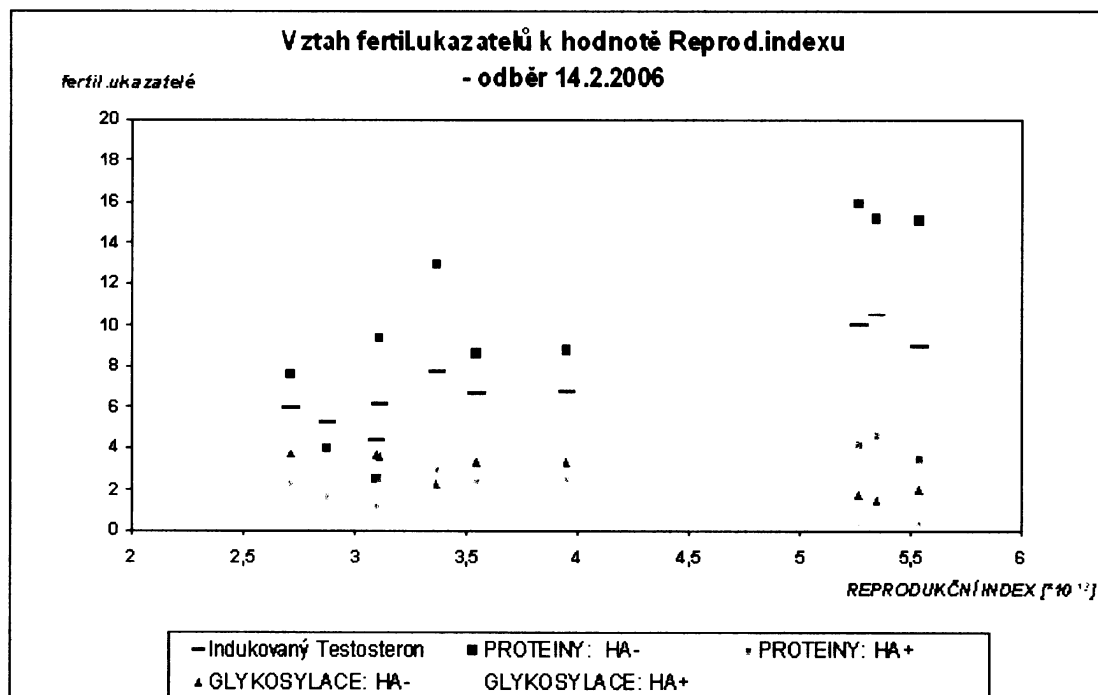
Obr. 20: Sledování závislosti proteinů kančí semenné plazmy na množství indukovaného testosteronu ve 2 odběrech
 (HA⁻) označuje hydroxylapatit-nevázající frakci H proteinů kančí semenné plazmy,
 (HA⁺) označuje hydroxylapatit-vázající frakci H⁺ proteinů kančí semenné plazmy

3.9 Vztah sledovaných ukazatelů k reprodukci

Hodnota reprodukčního indexu je kvalitativním ukazatelem plodnosti kanců. Reprodukční index (RI) byl vypočten z naměřených údajů z ISK Grygov dle vzorce:
 $RI = V \text{ [ml] ejakulátu} * \text{koncentrace spermií} * \text{pohyblivost spermií} * \% \text{ živých spermií} * (100 - (\% \text{ patolog. spermií}))$
Reprodukční index byl vypočten pro 1. odběr.

Cílem bylo sledovat závislost množství proteinů kančí semenné plazmy, stupně glykosylace, hladiny indukovaného testosteronu a koncentrace cholesterolu na hodnotě reprodukčního indexu.

Z obr. 21 je vidět, že množství proteinů KSP je korelativní k hodnotě reprodukčního indexu, zatímco stupeň glykosylace nevykazuje korelaci k RI. Koncentrace cholesterolu není ovlivněna hodnotou RI.



Obr. 21: Analýza závislosti RI na fertilizační ukazatelé – odběr 14.2.2006
(HA⁻) označuje hydroxylapatit-nevázající frakci H proteinů kančí semenné plazmy,
(HA⁺) označuje hydroxylapatit-vázající frakci H⁺ proteinů kančí semenné plazmy

4 DISKUSE

Pro reprodukci je velice důležitá kvalita gamet. Spermie jsou produkovány ve velkém množství a selekce kvalitních spermií probíhá jak v samci – epididymu, tak v samici. Děje, jichž se spermie v samici účastní, jsou zprostředkovány povrchovými proteiny původem ze semenné plazmy – spermadheziny. Spermadheziny stejně jako další proteiny semenné plazmy jsou produkovány v přídatných pohlavních žlázách a epididymu, které jsou pod přímou hormonální kontrolou androgenů samce. Tyto proteiny bývají navrhovány jako kandidátní molekuly markerů reprodukční kvality jedince.

Jako metoda první volby pro izolaci a frakcionaci spermadhezínů je používána afinitní chromatografie proteinů kančí semenné plazmy na heparinu. Tato metoda však není vhodná pro semimikroanalýzy vzorku kvůli jeho zasolení. Vyvinuli jsme tedy novou metodu dělení proteinů kančí semenné plazmy založenou na afinitní chromatografii na hydroxylapatitu. Získaná frakce HA^{2-} a HA^{-} (obr.č.7) plně odpovídá heparin nevázející frakci kančí semenné plazmy, jak ukázala analýza frakcí na RP HPLC (obr. 9,10), obdobně HA^{+} frakce je proteinovým složením shodná s heparin vázející frakcí proteinů kančí semenné plazmy (obr. 11).

Námi vyvinutou metodu jsme použili k srovnání hladin koncentrace heparin vázejících proteinů a jejich glykosylace u 11 kanců ve dvou odběrech s dvouměsíčním odstupem. V ejakulátu daných kanců byla provedena spermatoanalýza stejně jako sledování hladiny testosteronu (obr.č.17) po indukci GnRH.

Získané výsledky naznačují překvapivou individuální variabilitu hladiny heparin vázejících i heparin nevázejících proteinů mezi kanci (obr.č.12), zvláště uvážíme-li že všichni testovaní kanci patří mezi plemenné, s relativně homogenními spermatoanalytickými výsledky. Koncentrace heparin vázejících i heparin nevázejících proteinů se ukázala být nezávislá na koncentraci sérového testosteronu, ale vykazovala závislost na koncentraci indukovaného testosteronu (obr.č.20). Produkce heparin nevázejících proteinů je u kance stimulována testosteronem výrazněji než heparin vázejících proteinů (obr.č.20) – v literatuře často navrhovaných jako kandidátní molekuly reprodukční kvality jedince. Zajímavě v tomto kontextu vyzní srovnání

glykosylací na proteinech v semenné plazmě. Zatímco glykosylace heparin vázajících proteinů je na hladině testosteronu i indukovaného testosteronu nezávislá (obr. 19), u heparin nevážajících proteinů glykosylace s množstvím indukovaného testosteronu klesá (obr. 20). Srovnání dvou odběrů týchž kanců s dvouměsíčním odstupem naznačilo sezónní závislost hladiny indukovaného testosteronu (obr. 17), stejně jako buněčné odpovědi na testosteron u sekundárních pohlavích žláz změnami koncentrace heparin vázajících i heparin nevážajících proteinů (obr.č.13,14) v semenné plazmě, obdobně jako i glykosylace těchto proteinů (obr. 15,16).

Individuální rozdíly kanců se také podepisují na obtížné korelaci spermatoanalytických výsledků charakterizujících reprodukční kvalitu jedince s námi testovanými ukazateli – indukovaného testosteronu, hydroxylapatit vázajících i hydroxylapatit nevážajících proteinů kančí semenné plazmy a jejich glykosylace. Jako indikátory dobrého reprodukčního jedince mohou sloužit: vyšší hladina heparin nevážajících proteinů, indukovaného testosteronu i heparin vázajících proteinů. Reprodukčně méně kvalitní jedinci jsou obecně charakterizováni vyššími stupni glykosylace proteinů semenné plazmy.

5 ZÁVĚR

- K semimikrokvantitativnímu rozdělení proteinů kančí semenné plazmy na heparin vázající a heparin nevázající proteiny byla vyvinuta nová metoda – afinitní chromatografie na hydroxylapatitu.
- Touto metodou byly rozděleny vzorky ejakulátu 11 kanců ve dvou odběrech po dvou měsících, v každé frakci byla stanovena koncentrace proteinů a stupeň jejich glykosylace, u ejakulátu byly sledovány spermatoanalytické charakteristiky, u kanců stanoven testosteron v séru a GnRH indukovaný testosteron.
- U získaných výsledků byla nalezena korelace mezi hladinou indukovaného testosteronu a množstvím proteinů v semenné plazmě, zvýšení schopnosti sekretovat testosteron do séra má silnější efekt na aktivaci syntézy heparin nevázajících proteinů oproti heparin vázající frakci.
- Dále byla nalezena korelace mezi glykosylací heparin nevázajících proteinů kančí semenné plazmy a hladinou indukovaného testosteronu, zvýšená schopnost sekretovat testosteron do séra způsobuje nižší glykosylaci proteinů semenné plazmy.
- Získané výsledky vykazovaly výrazné individuální rozdíly mezi jedinci prakticky ve všech námi testovaných ukazatelích.
- Hladiny všech testovaných ukazatelů vykazují časovou variabilitu mezi dvěma odběry, způsobenou pravděpodobně sezónní rytmičitou.
- Byly navrženy indikátory dobrého reprodukčního jedince: vyšší hladina heparin nevázajících proteinů, indukovaného testosteronu a heparin vázajících proteinů.
- Reprodukčně horší kusy byly v našich experimentech charakterizovány především vyššími stupni glykosylace proteinů semenné plazmy.

Literatura

- 1 Romanovský, A. a kol.: Obecná biologie, SPN, Praha (1988), 519-560
- 2 Knoz J.: Obecná zoologie II, s. 341 (skripta), SPN Praha
- 3 Šmerha J. a kol.: Biologie rozmnožování hospodářských zvířat, SZN Praha (1964)
- 4 Majzlík, I.: Chov zvířat I., Česká zemědělská univerzita (2003)
- 5 Jílek, F.: Biologické základy chovu hospodářských zvířat, Česká zemědělská univerzita v Praze (2002)
- 6 Mann, T., Lutwak-Mann, C.: Male Reproductive Function and Semen, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York (1981)
- 7 Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Varle [online]. c2006
Dostupný z WWW: <[http://cs.wikipedia.org/wiki/ Varle](http://cs.wikipedia.org/wiki/Varle)>
- 8 Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Nadvarle [online]. c2006
Dostupný z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Nadvarle>>
- 9 Wikipedie: Otevřená encyklopedie:Chámovod [online]. c2006
Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Ch%C3%A1movod>
- 10 Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Šourek [online]. c2006
Dostupný z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/%C5%A0ourek>>
- 11 Jiménez, I., González-Márquez, Ortiz, J., Herrera, J., García, A., Betancourt, M., Sierro, R.: Theriogenology 59, 1171-1180 (2003)
- 12 Cooper, T.G.: The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1986)
- 13 Suzuki, Ch., Yoshioka, K., Itoh, S., Kawarasaki, T., Kikuchi, K.: Theriogenology, 1287-1296 (2005)
- 14 Yanagimachi, R.: Mammalian Fertilization, The Spermatozoon, The Physiology of Reproduction, vol. 1, 2nd edition (Knobil, E., Neill, J.D.), Raven Press, Ltd., New York (1994)
- 15 Talbot, P.: Am. J. Anat. 174, 331-346 (1985)
- 16 Töpfer-Petersen, E.: Arch. Tierz., 114-117 (2001)
- 17 Calvete, J.J., Sanz, L., Dostálová, Z., Topfer-Petersen, E.: FEBS Lett. 334, 37-40 (1993)
- 18 Evans, J.P., Florman, H.M.: Nature Cell Biology & Nature Medicine
- 19 Cooper, T.G.: Sperm maturation and fertilization, Springer Verlag, Berlin (1986)

- 20 Veselský, L., Jonáková, V., Topfer-Petersen, E., Plendl, J.: Cell Tissue Res. 282, 175-179 (1995)
- 21 Maňásková, P.; Meszarosová, A.; Liberda, J.; Voburka, Z.; Tichá, M.; Jonáková, V.: Folia Biol. (Praha) 45, 193-201 (1999)
- 22 Bezouška, K., Sklenář, J., Jovák, P., Halada, P., Havlíček, V., Kraus, M., Tichá, M., Jonáková, V.: Protein Sci. 8, 1551-1556 (1999)
- 23 Maňásková, P., Balínová, P., Kraus, M., Tichá, M., Jonáková, V.: AJRI 50, 399-410 (2003)
- 24 Maňásková, P.; Liberda, J.; Tichá, M.; Jonáková, V.: Folia Biol. (Praha) 46, 143-151 (2000)
- 25 Jonáková, V.; Maňásková, P.; Kraus, M.; Liberda, J.; Tichá, M.: Mol. Reprod. Dev. 56, 275-277 (2000)
- 26 Novák F.: Úvod do klinické biochemie, 1. vydání, Praha (2002) (skriptum)
- 27 Goodman H.M.: Basic Medical Endocrinology, 3rd Edition, Academic Press, An Imprint of Elsevier Science, Amsterdam, Boston, Tokyo (2003)
- 28 Stárka L. a kol.: Endokrinologie, Maxdorf Jessenius, Praha (1997)
- 29 Devlin TM, (Ed.): Textbook of biochemistry with clinical correlations, A John Willey and Sons, Inc., New York, 4th Edition (1997). Kapitoly 20 a 21.
- 30 Hanč, O.; Pádr, Z.: Hormony, Praha (1982)
- 31 Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.: Anal. Chem. 18, 350-356 (1956)
- 32 Laemmli, U.K.: Nature 227, 680-685 (1970)

Obrázky byly převzaty a upraveny z:

- I Wessells, N., K., Hopson, J., L.: Biology, str. 362, 1.vydání, New York (1988)
- II Dostupný z <http://molbiol.ru/pictures/80873.html>
- III Wasserman, P.M. 1988 Scientific American. p78
- IV Dostupný z:
<http://chswab.lk12.nj.us/mstanley/outlines/embryology/animal%20development.htm>
- V Dostupný z: www.utdallas.edu/.../steroids/peptides_2.html
- VI Dostupný z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/kb-f103.jpg>