

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Proteinový a glykoproteinový profil semenné plazmy jako  
marker fertility**

**Diplomová práce**

**Bc. Michaela Hromadová  
Reprodukční biotechnologie**

**Vedoucí práce: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.  
Konzultant práce: Mgr. Veronika Páleníková**

© 2021 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Proteinový a glykoproteinový profil semenné plazmy jako marker fertility" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. 4. 2021

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za její vstřícnost, odborné vedení a cenné připomínky při zpracování této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Veronice Páleníkové za řadu konzultací a pomoc při získání laboratorních zkušeností.

## Proteinový a glykoproteinový profil semenné plazmy jako marker fertility

### Souhrn

Semenná plazma představuje vysoce komplexní tekutinu, která je produktem samčích přídatných pohlavních žláz. Jedná se o nebuněčnou složku ejakulátu, jejíž hlavní funkce spočívá ve vytváření vhodného prostředí pro spermie. Semenná plazma je velmi bohatá na proteiny, které jsou výrazně glykosylovány. Řada těchto proteinů má schopnost přímo či nepřímo asociovat se spermiemi, a má tak klíčový vliv na interakci mezi spermií a oocytem. Zastoupení proteinů a sacharidových struktur na jejich povrchu by tak mohlo odrážet parametry ejakulátu a fertilitu pacientů podstupujících léčbu neplodnosti.

Cílem práce bylo sledování změn v glykoproteinovém profilu semenné plazmy mužů s různým spermioqramem pomocí vybraných lektinů (ConA, MAA, SNA a UEA). U těchto pacientů bylo také sledováno množství nejvíce zastoupeného epididymálního proteinu clusterinu pomocí specifické protilátky. U vybraných glykoproteinů byla odhadnuta jejich přibližná molekulová hmotnost.

Mezi jednotlivými vzorky normozoospermiků, astenozoospermiků a oligozoospermiků nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl v glykoproteinovém profilu, což připisujeme extrémní míře intraindividuální i interindividuální variability složení semenné plazmy. Glykoproteinový profil byl velmi podobný v případě detekce ConA a SNA, předpokládáme tedy, že oba lektiny reagovaly s identickými proteiny. Všechny použité lektiny vykazovaly reaktivitu s glykoproteinem o molekulové hmotnosti cca 40 kDa, který zřejmě odpovídá proteinu AZGP1 (human zinc-alpha-2 glycoprotein). Také v množství clusterinu jsme mezi vzorky normozoospermiků, astenozoospermiků a oligozoospermiků nenašli žádné statisticky významné rozdíly. Výrazně nižší množství clusterinu jsme však ve srovnání s normozoospermikem zaznamenali u pacientů s azoospermii a kryptozoospermii. Na základě těchto dat se lze domnívat, že clusterin by mohl být vhodným markerem pro diagnostiku kryptozoospermie, azoospermie a jejích subtypů. Vzhledem k tomu, že jsme však nepozorovali žádný významný rozdíl mezi množstvím clusterinu u pacientů s obstrukční a neobstrukční azoospermii, můžeme předpokládat, že clusterin nepředstavuje vhodný marker pro rozlišení těchto dvou typů azoospermie.

**Klíčová slova:** glykoproteiny, lektiny, clusterin, azoospermie

## **Protein and glycoprotein profiles of seminal plasma as a marker of fertility**

### **Summary**

Seminal plasma is a highly complex fluid secreted by the male accessory sex glands. It is a non-cellular component of semen and its main role is creating a suitable environment for spermatozoa. Seminal plasma is very rich in proteins that are highly glycosylated. Many of these proteins can directly or indirectly associate with spermatozoa and thus have a key role in sperm-oocyte interactions. The presence of these proteins and their carbohydrate modifications in seminal plasma is likely to reflect the seminal parameters and fertility of patients undergoing fertility treatment.

The aim of this study was to investigate changes in the glycoprotein profile in the seminal plasma of men with various seminal parameters using selected lectins (ConA, MAA, SNA and UEA). For these patients we also measured the amount of clusterin, which is the most abundant epididymal protein, using a specific antibody. For selected glycoproteins, we calculated their approximate molecular weight.

Regarding the glycoprotein profile, we did not find any statistically significant difference between the seminal plasma of men with various seminal parameters (normozoospermia, asthenozoospermia, oligozoospermia), probably due to the extreme intra- and inter-individual variability in the glycoprotein content of seminal plasma. The glycoprotein profile was very similar for ConA and SNA detection, suggesting a reactivity of these lectins with identical proteins. All lectins used in this study showed reactivity with 40 kDa glycoprotein, probably corresponding to AZGP1 (human zinc-alpha-2 glycoprotein).

In the amount of clusterin we did not find any statistically significant difference between the seminal plasma of men with various seminal parameters (normozoospermia, asthenozoospermia, oligozoospermia) either. However, we observed a considerably lower amount of clusterin in patients with azoospermia and cryptozoospermia, compared to normozoospermic sample. Based on these data we conclude that clusterin represents a useful protein marker for diagnosing cryptozoospermia, azoospermia and their subtypes. Given that we did not find any significant difference in the amount of clusterin in the samples with obstructive and non-obstructive azoospermia, we can conclude that clusterin is probably not a suitable marker for distinguishing between these two azoospermia subtypes.

**Keywords:** glycoproteins, lectins, clusterin, azoospermia

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>2</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Semenná plazma.....</b>	<b>3</b>
3.1.1 Samčí přídatné pohlavní žlázy .....	3
3.1.1.1 Semenné včky .....	4
3.1.1.2 Prostata .....	5
3.1.1.3 Bulbouretrální (Cowperovy) žlázy .....	5
3.1.2 Proteiny semenné plazmy .....	6
3.1.3 Glykom semenné plazmy .....	8
<b>3.2 Epididymální tekutina .....</b>	<b>12</b>
3.2.1 Struktura nadvarlete .....	12
3.2.2 Funkce nadvarlete .....	13
3.2.3 Epididymální proteiny .....	13
3.2.3.1 Clusterin .....	15
<b>3.3 Vyšetření spermiogramu .....</b>	<b>21</b>
3.3.1 Přehled proteinových markerů pro jednotlivé patologie .....	24
3.3.2 Azoospermie .....	24
3.3.2.1 Neobstrukční azoospermie .....	24
3.3.2.2 Obstrukční azoospermie .....	27
3.3.2.3 Markery neobstrukční a obstrukční azoospermie.....	27
<b>4 Materiál a metodika.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Materiál.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2 Metodika .....</b>	<b>32</b>
4.2.1 Příprava vzorků semenné plazmy .....	32
4.2.2 SDS elektroforéza .....	32
4.2.3 Western blot.....	33
4.2.4 Detekce sacharidových struktur pomocí lektinů.....	33
4.2.5 Detekce proteinů pomocí protilátky .....	34
4.2.6 Denzitometrická analýza .....	35

<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>36</b>
5.1	Proteinový profil semenné plazmy .....	36
5.2	Detekce glykoproteinů pomocí ConA (Concanavalin A).....	37
5.3	Detekce glykoproteinů pomocí MAA ( <i>Maackia amurensis</i> ).....	40
5.4	Detekce glykoproteinů pomocí SNA ( <i>Sambucus nigra</i> ) .....	44
5.5	Detekce glykoproteinů pomocí UEA ( <i>Ulex europaeus agglutinin</i> ).....	49
5.6	Detekce clusterinu .....	53
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>81</b>
<b>10</b>	<b>Samostatné přílohy .....</b>	<b>85</b>





# 1 Úvod

V posledních letech se dramaticky zvyšuje počet párů trpících poruchami plodnosti, přesto však zhruba u 10-20 % (Esteves et al. 2011) z nich nedokážeme určit příčinu neplodnosti. Takovéto poruchy plodnosti označujeme jako idiopatické (tj. bez zjevné příčiny) a postihují až 60 % mužských pacientů (Punab et al. 2017). Muži trpící idiopatickými poruchami plodnosti (tzv. infertilní normozoospermici) zpravidla nemají zhoršené parametry ejakulátu, co se týče počtu, pohyblivosti a morfologie spermií, a jejich spermioqram se tedy jeví být zcela v pořádku (Cooper et al. 2010; World Health Organization 2010). Pouhá analýza spermioqramu tak není dostatečným diagnostickým nástrojem k hodnocení příčin neplodnosti, protože řadu z těchto příčin nedokáže uspokojivě vysvětlit (Kratz et al. 2015). Nalezení biomarkeru, který by bylo možné u této poměrně početné skupiny pacientů detekovat, by výrazně přispělo k objasnění příčin neplodnosti.

Velmi častou posttranslační úpravou proteinů semenné plazmy je glykosylace, tj. modifikace proteinů různými sacharidovými strukturami. Pro semennou plazmu je navíc typické velké množství nestandardních typů glykosylace, které se v ostatních tkáních vyskytují pouze minimálně. Úloha těchto sacharidových molekul v semenné plazmě není zatím dostatečně objasněna, ale zřejmě se podílí mj. na potlačení imunogenicity spermie v samičím reprodukčním traktu. Obecným znakem glykosylace je, že u zdravých jedinců je poměrně stálá, naopak při patologických stavech dochází v glykoproteinovém profilu k výrazným změnám (Gornik et al. 2009). Sledování změn v glykosylaci proteinů semenné plazmy by tak mohlo být jednou z diagnostických možností. Konkrétní změny v glykosylaci by navíc měly být závislé na stupni závažnosti daného onemocnění, což by diagnostiku ještě více usnadnilo (Feren-Sieczkowska et al. 2013).

Z hlediska potenciálních markerů fertility je zajímavá také epididymální tekutina, neboť většinu jejího proteinového obsahu tvoří pouze cca 20 majoritních proteinů, a to jak u člověka, tak u hospodářských zvířat. Vysoká koncentrace těchto proteinů v epididymální tekutině zřejmě poukazuje na jejich nepostradatelnou funkci. Nejvíce zastoupeným proteinem v lidské epididymální tekutině je clusterin (CLU), který má klíčovou úlohu mj. v remodelaci plazmatické membrány spermie. Z uvedených důvodů se clusterin zdá být zajímavým proteinem ve vztahu k mužské neplodnosti. Vzhledem k tomu, že je majoritním proteinem ve varlatech i nadvarlatech, můžeme předpokládat jeho ústřední roli v regulaci spermatogeneze a následné maturaci spermií. Lze se také domnívat, že s ohledem na jeho vysokou koncentraci v epididymální tekutině, bude koncentrace CLU v semenné plazmě v případech některých patologických stavů (obstrukční azoospermie) značně snížena. Avšak vzhledem k nedostatečným informacím ohledně zastoupení CLU v ostatních přídatných pohlavních žlázách (především pak v semenných váčcích a prostatě) nelze vyloučit, že semenná plazma pacientů s obstrukční azoospermii bude obsahovat CLU právě z výše uvedených tkání.

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

Cílem práce je porovnání proteinového a glykoproteinového obsahu semenné plazmy mužů s různým spermioqramem. Pro práci byly vytyčeny následující dílčí cíle:

- a) sledování sacharidových struktur pomocí vybraných lektinů
- b) sledování množství proteinu clusterinu pomocí specifické protilátky.

Cíle práce vycházejí z následujících hypotéz:

- a) sacharidové struktury glykoproteinů semenné plazmy se budou lišit mezi spermioqramy mužů se zhoršenými parametry ejakulátu v porovnání s normozoospermiky.
- b) množství clusterinu bude rozdílné u mužů s obstrukční a neobstrukční azoospermii (v případě obstrukční azoospermie bude množství clusterinu výrazně sníženo).

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Semenná plazma

Semenná plazma představuje nebuněčnou složku ejakulátu, která je produktem samčích přídatných pohlavních žláz. Množství semenné plazmy v ejakulátu je druhově specifické, např. u člověka tvoří semenná plazma cca 95 % ejakulátu. Co se týče složení, obsahuje semenná plazma celou řadu makromolekul – sacharidy (jednoduché cukry i oligosacharidy), lipidy, proteiny a peptidy, ale také nukleové kyseliny v podobě DNA, RNA či tzv. malých RNA (sRNA, z angl. small RNA). Nejvýznamnějším cukrem v semenné plazmě je fruktóza, která slouží spermii jako energetický zdroj, společně s některými aminokyselinami, které jsou v semenné plazmě rovněž obsaženy. Neméně důležitými složkami semenné plazmy jsou dále anorganické ionty, hormony a organické sloučeniny jako např. kyselina citronová, kyselina askorbová a kreatin (Juyena & Stelletta 2012; Samanta et al. 2018).

Hlavní funkcí semenné plazmy je tvorba vhodného prostředí pro spermie, jejich transport do reprodukčního traktu samice a zajištění optimálního průběhu kapacity, akrozomální reakce a oplození, neboť semenná plazma obsahuje dekapacitační faktory (Begley & Quinn 1982). Cukerné molekuly v semenné plazmě slouží jako zdroj energie pro spermie, a brání tak jejich předčasnému energetickému vyčerpání (Juyena & Stelletta 2012). Semenná plazma má také výraznou pufrací kapacitu – je schopna udržovat vhodné pH pro spermie a odolávat jeho případným výkyvům. Slabě zásaditý charakter semenné plazmy navíc pomáhá neutralizovat kyselé prostředí vagíny (Wolters-Everhardt et al. 1986). Za zásaditost semenné plazmy jsou zodpovědné tzv. zásadité polyaminy - spermin, spermidin a putrescin (Samanta et al. 2018). Semenná plazma dále obsahuje sérové proteiny (albumin, globulin) a také množství zánětlivých molekul – cytokiny, interleukiny aj. (Quinlivan 1968; Maegawa et al. 2002).

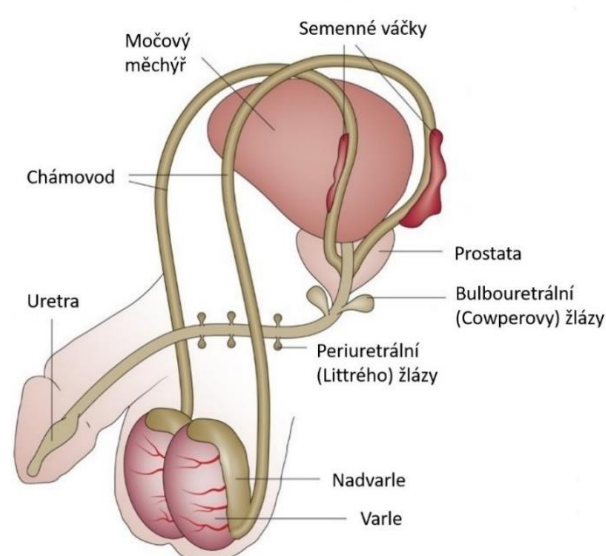
Další součástí semenné plazmy jsou speciální mikrovezikuly, tzv. exosomy, které obsahují proteiny, transkripty a regulační sRNA. Tyto váčky původně vznikají uvnitř buněk přídatných pohlavních žláz (nadvarle, prostata) a následně jsou uvolněny do extracelulárního prostředí. Dle původu vzniku váčky pak můžeme rozlišovat epididymozomy a prostazomy. Tímto způsobem může být jejich obsah transportován semennou plazmou k cílovým buňkám. Typicky se jedná o transport sRNA a proteinů ke spermii. Tyto proteiny mohou být následně zabudovány do plazmatické membrány spermie, zatímco sRNA zůstávají uvnitř buňky, kde se podílejí na regulaci genové exprese. Takto mohou spermie získávat nové RNA a proteiny, které jsou nezbytné pro jejich funkci a maturaci (Brody et al. 1983; Yanagimachi et al. 1985; Frenette & Sullivan 2001; Frenette et al. 2002; Hermo & Jacks 2002; Sullivan et al. 2007; Belleannée et al. 2013). Do semenné plazmy výrazně přispívá také epididymální tekutina (viz Literární rešerše, kap. 3.2 Epididymální tekutina).

#### 3.1.1 Samčí přídatné pohlavní žlázy

Mezi hlavní samčí přídatné pohlavní žlázy řadíme semenné váčky, prostatu a Cowperovy neboli bulbouretrální žlázy. Menší měrou přispívají k tvorbě lidské semenné plazmy také uretrální (Littreho) žlázy a ampula chámovodu. Během embryonálního vývoje se tyto žlázy zakládají z Wolffových vývodů (ampula chámovodu, semenné váčky) a z urogenitálního sinu (prostata, bulbouretrální žlázy a uretrální žlázy). Sekrety těchto žláz dohromady vytváří

semennou plazmu, která zajišťuje výživu spermií a funguje taktéž jako transportní médium pro dopravu spermií do samičího pohlavního ústrojí. Semenná plazma mj. slouží i k pročištění močové trubice od zbytků moči, která má kyselý charakter, a tudíž nepříznivý vliv na spermie.

Sekrety přídatných pohlavních žláz jsou zodpovědné také za koagulaci ejakulátu po ejakulaci. Např. v děložním krčku prasnice se po ejakulaci vytváří činností Cowperových žláz hlenová zátka. Ta brání ztrátě ejakulátu z dělohy samice a zároveň zajišťuje oplození pouze jedním samcem. Příspěvek jednotlivých žláz do objemu ejakulátu je druhově specifický. Vývoj žláz je řízen prostřednictvím steroidních hormonů, především testosteronu a dihydrotestosteronu (Flint et al. 2015; Ricardo 2018; Whitney 2018). Pokud není uvedeno jinak, je níže popsána struktura lidských přídatných pohlavních žláz. Mužský reprodukční trakt je znázorněn na Obr.1.



**Obr. 1.** Mužské reprodukční orgány včetně přídatných pohlavních žláz. Převzato a upraveno podle Drabovich et al. (2014).

### 3.1.1.1 Semenné vajíčky

Semenné vajíčky, označované také jako měchýřkovitá žláza, přispívají do semenné plazmy nejvíce ze všech přídatných pohlavních žláz – až 85 % objemu lidské semenné plazmy je tvořeno sekrety semenných vajíčků (Flint et al. 2015). Jedná se o párový orgán o délce zhruba 7,5 cm, tvořený stočenými kanálky. Nachází se mezi rektem a zadní částí močového měchýře a ústí do tzv. ejakulačního vývodu, což je společný vývod semenných vajíčků a chámovodu. Produktem semenných vajíčků je nažloutlá zásaditá tekutina. Význam zásaditého charakteru spočívá v neutralizaci kyselého pH vagíny. Mezi hlavní složky sekretů semenných vajíčků patří fruktóza, proteiny (semenogeliny, fibronektin), prostaglandiny, fibrinogen, kyselina askorbová (vitamin C) a další (Aumüller & Riva 1992). Nejdůležitější funkcí semenných vajíčků je poskytnutí energie spermiím prostřednictvím produkce fruktózy, která slouží jako substrát pro tvorbu ATP během glykolýzy. Produkce ATP je nezbytná pro motilitu spermií. Fibrinogen je další komponentou SP, která zajišťuje koagulaci ejakulátu. Produktem semenných vajíčků je také prostaglandin, který ovlivňuje stahy hladké svaloviny. Prostaglandin obsažený v semenné plazmě stimuluje nejen hladkou svalovinu v samčím pohlavním traktu při ejakulaci, ale má vliv

také na svalový tonus dělohy a vaginy, čímž podporuje nasávání spermií do samičího pohlavního ústrojí. Kyselina askorbová je významným antioxidantem a chrání spermie před kyslíkovými radikály. Mezi další složky semenných váčků patří např. flaviny, fosforylcholin a ergotionein (Aumüller & Riva 1992; Flint et al. 2015; Ricardo 2018). Zatímco u člověka a hřebce mají semenné váčky skutečně charakter váčků, u jiných druhů (býk, kanec) mají spíše lalůčkovitou strukturu. U psa tato žláza chybí (Aumüller & Riva 1992).

### **3.1.1.2 Prostata**

Prostata neboli předstojná žláza je nepárová tuboalveolární žláza zhruba velikosti ořechu. Nasedá na krček močového měchýře a obklopuje část močové trubice (tzv. prostatickou část uretry). Kromě tuboalveolárních žláz je prostata tvořena také vazivem a hladkou svalovinou. U člověka rozlišujeme na prostatě 4 zóny – periferní (největší), centrální, přechodnou a fibromuskulární (Flint et al. 2015). U hospodářských zvířat pak bývá popisováno tělo a tzv. roztroušená část prostaty. U býka a kance můžeme najít obě tyto části, u hřebce pouze tělo prostaty a u berana a kozla naopak jen roztroušenou část (Khalaf & Merhish 2010; Marvan 2017).

Prostata vytváří sekrety mléčného zbarvení, které tvoří asi 30 % objemu semenné plazmy. Jsou bohaté např. na kyselinu citronovou, anorganické ionty (zinečnaté a hořečnaté), proteolytické enzymy, polyaminy, cholesterol, fosfolipidy, kyselou fosfatázu a další látky. Součástí prostatické tekutiny jsou enzymy, které reagují s fibrinogenem (ze semenných váčků) a katalyzují jeho přeměnu na nerozpustný fibrin. Ten přispívá ke koagulaci ejakulátu. Zároveň ale v prostatě dochází k produkci enzymů, které způsobují pozdější zkapalnění ejakulátu – PSA (prostatický specifický antigen), který štěpí semenogelin na kratší fragmenty a fibrinolysin, který rozkládá fibrinová vlákna. PSA je mj. markerem rakoviny prostaty, která představuje nejčastější formu rakoviny u mužů. Poměrně častým patologickým stavem je také benigní hyperplazie prostaty (BHP). Při BHP dochází ke zvětšování prostaty, a tím i k útlaku močové trubice, což bývá doprovázeno obtížemi při močení (Flint et al. 2015; Ricardo 2018).

### **3.1.1.3 Bulbouretrální (Cowperovy) žlázy**

U člověka se jedná o párový orgán zhruba velikosti hrášku přiléhající k membranózní části uretry, jehož sekrety přispívají do celkového objemu semenné plazmy pouze minimálně (cca 1 %). Cowperovy žlázy představují tuboalveolární žlázu ústící do močové trubice. Produktem těchto žláz je čirá tekutina zásaditého charakteru, tzv. preejakulát, který funguje především jako lubrikant. Menší měrou také přispívají k sekreci některých glykoproteinů, např. PSA. U člověka a kance mají laločnatou strukturu, u hřebce a přežvýkavců mají hladký povrch, u psa tyto žlázy chybí. Nejvýrazněji jsou vyvinuté u kance, kde mohou dosahovat délky až 15 cm a také jejich příspěvek do celkového objemu semene je u kance větší (až 20 %). U kance mají Cowperovy důležitou úlohu naopak ke konci ejakulace, kdy jsou zodpovědné za tvorbu hlenové zátky v děložním krčku samice (McKenzie et al. 1938; Testa-Riva et al. 1994; Chughtai et al. 2005; Flint et al. 2015; Marvan 2017).

### 3.1.2 Proteiny semenné plazmy

Semenná plazma obsahuje velké množství nejrůznějších proteinů, jejichž funkce je mezidruhově vysoce konzervovaná. U savců se jedná se např. o proteiny související s energetickým metabolismem (především pak enzymy spojené s metabolismem sacharidů), proteolýzou (proteázy), regulací kapacity a akrozomální reakce (heparin binding proteiny), fúzí a interakcí gamet (např. spermadheziny) a v neposlední řadě také s vytvářením imunitní odpovědi v samičím reprodukčním traktu (např. clusterin). Většina proteinů savčí semenné plazmy pochází ze semenných vaků či váčků, případně z nadvarlete. Společným rysem seminálních proteinů u savčích druhů je také jejich afinita k různým typům ligandů, např. k již zmíněnému heparinu nebo k zinečnatým kationtům (Mogielnicka-Brzozowska & Kordan 2011; Rodríguez-Martínez et al. 2011; Juyena & Stelletta 2012). Pokud není uvedeno jinak, jsou v literárním přehledu popsány především proteiny lidské semenné plazmy.

Při prvních elektroforetických studiích byly v semenné plazmě popsány pouze čtyři proteiny (Gray & Huggins 1942; Ross et al. 1942), ale díky nejnovějším metodám studia proteomu (2D elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie) již víme, že se jedná o výrazně komplexnější tekutinu. Např. Drabovich et al. (2014) odhaduje počet proteinů v semenné plazmě (na základě publikovaných dat) na 3200 (Batruch et al. 2011, 2012; Kagedan et al. 2012). Koncentrace proteinů v lidské semenné plazmě se pohybuje kolem 35-55 g/l (Pilch & Mann 2006).

Proteinový profil lidské semenné plazmy se do určité míry shoduje s proteinovým profilem spermií, například Wu et al. (2019) popisuje, že docházelo k překryvu až u 73 % genových produktů. Je tomu tak zřejmě hned z několika důvodů. Proteiny ze semenné plazmy (případně z epididymální tekutiny) se mohou vázat na povrch spermií, ale může docházet i k opačnému jevu, kdy jsou povrchové proteiny spermií uvolněny do semenné plazmy. U spermií a přídatných pohlavních žláz může také existovat řada shodných genů kódujících tyto proteiny. Typicky se může jednat o tzv. „housekeeping“ geny (Wu et al. 2019).

Většina semenné plazmy je tvořena sekrety ze semenných váčků, a proto patří proteiny semenných váčků (semenogelin I, semenogelin II, fibronectin) mezi nejhojnější proteiny semenné plazmy (Pilch & Mann 2006). Do semenné plazmy samozřejmě významně přispívá i testikulární a epididymální tekutina a jejich proteiny (Batruch et al. 2011).

Proteiny mohou být v semenné plazmě volně rozpuštěny, a regulovat tak spermie nepřímo vytvářením vhodného prostředí. Mohou se však i vázat na povrch spermií a přímo tak ovlivňovat jejich motilitu, kapacitaci, akrozomální reakci a obecně interakci mezi spermií a oocytem (Rodríguez-Martínez et al. 2011).

Jak již bylo zmíněno, některé proteiny semenné plazmy můžeme najít i v krevní plazmě. Jedná se o sérové proteiny, jako je např. albumin, globulin, imunoglobuliny či různé transportní proteiny, jako je např. transferin (Quinlivan 1968), řada proteinů je však specifická pouze pro semennou plazmu.

Z hlediska molekulární funkce jsou v semenné plazmě nejvíce zastoupeny enzymy. Nejčastěji se jedná o proteázy nebo peptidázy, tj. enzymy štěpící proteiny či peptidy, případně o enzymy, které tyto nějakým způsobem regulují (Gilany et al. 2015). V lidské semenné plazmě nacházíme především serinové proteázy (kalikreiny, KLK), časté jsou také cysteinové proteázy

označované jako katepsiny. Společně s těmito proteázami se v semenné plazmě vyskytují i jejich inhibitory. Např. alfa-1-antitrypsin patří mezi inhibitory serinových proteáz, inhibitory cysteinových proteáz jsou tzv. cystatiny (LaFlamme & Wolfner 2013). Výše uvedené enzymy regulující proteolýzu jsou zodpovědné za zkapalnění ejakulátu do cca 30 min po ejakulaci. Mezi nejznámější proteázy semenné plazmy patří např. PSA sekretovaný prostatou, jehož substrátem je protein semenogelin, který společně s fibronektinem umožňuje koagulaci ejakulátu, a brání tak předčasné kapacitaci. Následné štěpení semenogelinu PSA je nutné pro uvolnění spermií z tohoto koagula a přispívá k zisku jejich progresivní motility (Lilja 1985; Lilja et al. 1987, 1989; Lee et al. 1989). Fragmenty vzniklé proteolytickým štěpením semenogelinu mají navíc významnou antibakteriální funkci (Edström et al. 2008; Zhao et al. 2008).

Vzhledem k velkému množství sacharidových struktur v semenné plazmě se řada proteinů semenné plazmy účastní metabolismu sacharidů, tj. pentózofosfátové dráhy, glykolýzy, glukoneogeneze a metabolismu fruktózy. Důležitou složkou semenné plazmy jsou také enzymy chránící spermie před poškozením reaktivními formami kyslíku - superoxid dismutáza, glutathion reduktáza, glutathion peroxidáza, kataláza a další (Gilany et al. 2015).

Klasifikace proteinů semenné plazmy je poměrně problematická, neboť způsob klasifikace se u různých druhů liší. Proteiny v rámci jednotlivých tříd se navíc mohou vzájemně prolínat. Např. u kance se můžeme setkat s rozdělením proteinů na tzv. heparin vázající proteiny (heparin binding proteins; HBP) a heparin nevážající proteiny (non-heparin binding proteins; non-HBP) (Jonáková et al. 1998; Maňásková et al. 1999). HBP jsou analogicky popisovány i u jiných druhů – u býka jako tzv. BSP (bovine seminal plasma proteins), u koně jako tzv. HSP (horse seminal plasma proteins) (Chandonnet et al. 1990; Calvete et al. 1995). Další možností je rozdělení na proteiny obsahující ve své molekule fibronektinovou doménu typu II (FnII), spermadheziny a CRISP proteiny (cysteine-rich secretory proteins), přičemž spermadheziny mohou být dále rozděleny na HBP a non-HBP (Rodríguez-Martínez et al. 2011). Proteiny obsahující ve své molekule fibronektinovou doménu typu II se vyskytují ve velké míře v semenné plazmě kopytníků. Protein s určitou mírou homologie byl sice nalezen také u člověka (Epididymal sperm-binding protein 1, ESPB1 či HE12), ale jeho zastoupení v semenné plazmě není zdaleka tolik významné (Saalman et al. 2001). Samostatnou třídu pak mohou představovat proteiny pocházející z epididymozomů či prostazomů.

Obecně však platí, že nejvíce zastoupenými proteiny v lidské semenné plazmě jsou právě heparin vázající proteiny (Kumar et al. 2008).

Heparin patří mezi glykosaminoglykany (GAG), což jsou lineární polysacharidy, které jsou hojně produkovány samičím reprodukčním traktem (Lee & Ax 1984). Bylo zjištěno, že GAG stimuluje kapacitaci spermií, a vůbec nejúčinnějším stimulem kapacity je u některých druhů právě heparin (Handrow et al. 1982). HBP se vyskytují ve velké míře na povrchu ejakulovaných spermií a jejich schopnost vazby na GAG v samičím traktu a na glykoproteiny *zona pellucida* je zřejmě klíčová pro indukci kapacity a následně akrozomální reakce. Na povrchu epididymálních spermií se HBP vyskytují již v daleko menší míře. Zajímavé je, že samotný heparin nedokáže u epididymálních spermií indukovat akrozomální reakci – k té dochází až za přítomnosti nejen heparinu, ale právě i HBP (Handrow et al. 1982; Miller et al. 1990; Kumar et al. 2008). Role HBP se však u různých druhů

opět značně liší, předpokládá se však, že alespoň u některých živočichů mají tyto proteiny značný vliv na plodnost samce.

Mezi HBP řadíme např. semenogeliny, laktoferrin, PSA, proteiny s motivem zinkového prstu (ZnF proteins), prostatickou kyselou fosfatázu (prostatic acid phosphatase; PAP), fibronektin, fosfolipázu A2, ale také např. lidský sérový albumin (Kumar et al. 2008, 2009). Schopnost vázat heparin má také protein clusterin, kterému se budeme dále věnovat v následujících kapitolách (Pankhurst et al. 1998; Martins et al. 2013).

V souvislosti se semennou plazmou se můžeme setkat také s již zmíněnými CRISP proteiny, které jsou exprimovány nejen v přídatných pohlavních žlázách, ale také ve varlatech a nadvarlatech. Tyto proteiny se vážou na povrch spermie a jejich funkce pravděpodobně spočívá v regulaci vazby mezi spermií a oocytem. U myši byly popsány 4 CRISP proteiny (CRISP1-4), lišící se místem exprese. Jako nejzajímavější se jeví CRISP1 syntetizovaný v nadvarleti a podílející se na fúzi gamet. Myší spermie, u kterých byl proveden knockout genů pro tyto proteiny, vykazovaly sníženou oplozovací schopnost, resp. schopnost vazby na *zona pellucida* oocytu (Cohen et al. 2011; Weigel Muñoz et al. 2019). CRISP proteiny byly také studovány jako markery fertility a kvality spermií (Koppers et al. 2011; Légaré et al. 2013).

### 3.1.3 Glykom semenné plazmy

Většina proteinů semenné plazmy, které jsou považovány za potenciální markery mužské neplodnosti, je bohatě glykosylována, tj. modifikována různými cukernými zbytky. Funkcí těchto cukerných struktur je mnoho, od adheze molekul až po zprostředkování antigenní odpovědi. Glykom semenné plazmy je navíc velmi specifický – můžeme se zde setkat s poměrně nestandardními typy glykosylace, které se v jiných tkáních za fyziologických podmínek běžně nevyskytují, a pokud ano, jedná se spíše o známku patologického stavu (Ferens-Sieczkowska et al. 2013). U zdravého jedince navíc většinou nedochází k žádným výrazným změnám v glykosylaci, na druhou stranu je však glykosylace velmi citlivá na drobné změny ve vnitřním prostředí organismu.

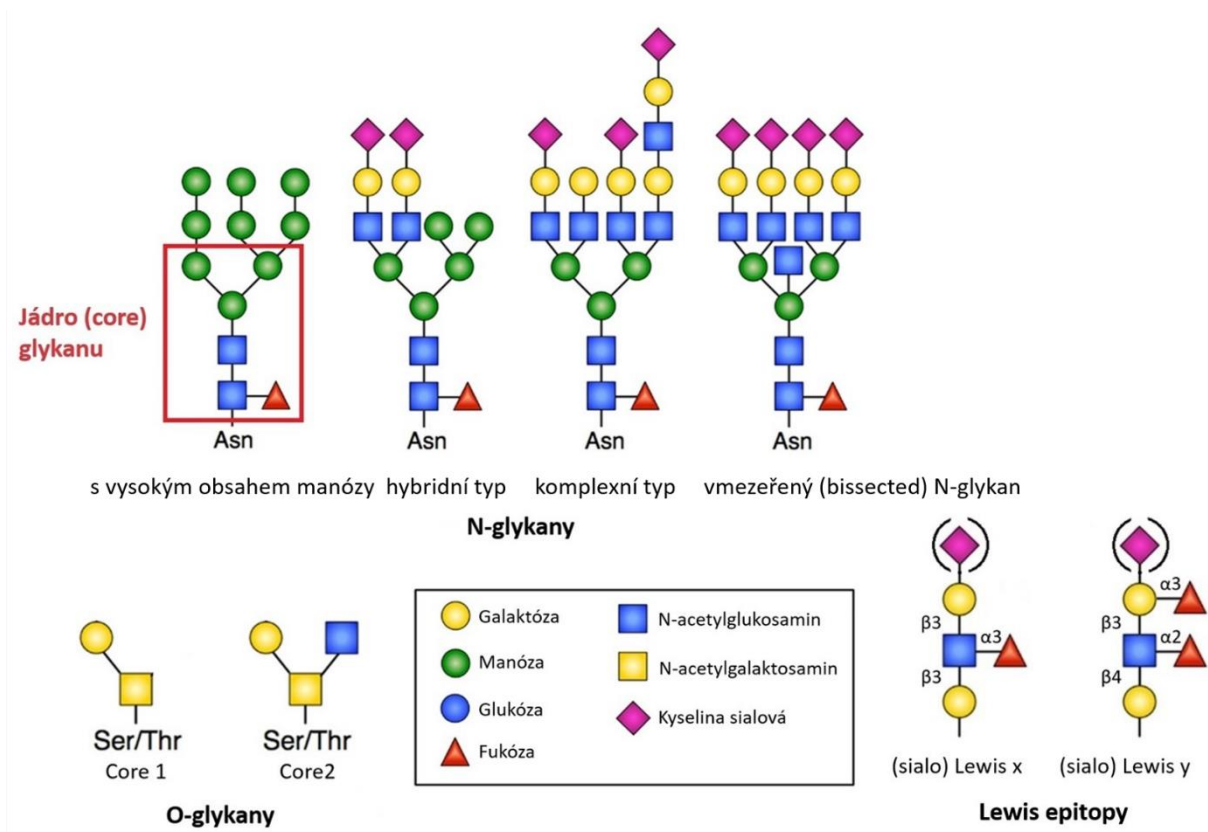
Spermie je reprodukčním traktem ženy do určité míry vnímána jako cizorodá struktura. Aby však mohlo dojít k úspěšnému oplození, musí existovat mechanismus, který zajistí, aby byla imunogenicita spermie (a míra imunitní odpovědi ze strany organismu ženy) snížena. V opačném případě by byly veškeré spermie v samičím reprodukčním traktu zlikvidovány imunitním systémem. Zřejmě z tohoto důvodu na povrchu lidských spermií nedochází k expresi tzv. MHC molekul typu I. Buňky, kterým tento typ molekul chybí, bývají odolné vůči cytotoxickým T-lymfocytům. Naopak se ale stávají snadným cílem NK buněk, jejichž funkcí je právě destrukce buněk, které MHC I. typu nenesou. Absence MHC I je typická například pro nádorové buňky. Ty však na svém povrchu mají specifický typ glykanů (tzv. vmezeřené N-glykany či „bisecting type“ N-glykany), které zajišťují jejich ochranu před aktivitou NK buněk (Pang et al. 2007). Podobnou strategii využívají i spermie, které na svém povrchu tyto glykany taktéž exprimují (Patankar et al. 1997; Pang et al. 2007). Přítomnost vmezeřených N-glykanů byla navíc prokázána i v semenné plazmě, i když se zde vyskytují v menší míře než na spermiích (Pang et al. 2007, 2009). Proteiny spermií i semenné plazmy jsou také bohaté na další specifické cukerné molekuly, tzv. Lewis X a Lewis Y antigeny. Tyto struktury jsou klíčové pro zprostředkování vazby spermie na *zona pellucida* oocytu, nicméně jejich role



spočívá také v potlačování adaptivní imunity – tímto způsobem je využívají parazité, viry a rakovinné buňky. Semenná plazma tedy nezajišťuje pouze ochranu a výživu spermií, ale také jejich imunologickou toleranci v reprodukčním traktu ženy (Pang et al. 2007, 2011).

Kromě Lewis antigenů obsahuje semenná plazma celou řadu dalších, poměrně nestandardních typů glykosylace. N-glykosylované proteiny semenné plazmy jsou velmi bohaté na manóзовé zbytky a na tzv. hybridní typy oligosacharidů (Pang et al. 2009; White et al. 2009). Přítomny jsou také komplexní N-glykany, které vykazují různou míru větvení – glykany se dvěma, třemi, nebo čtyřmi větvemi (anténami). Dále je pro semennou plazmu typická extrémní míra fukosylace. U zdravých jedinců může být v rámci jednoho glykanu navázáno až devět fukózových zbytků (Pang et al. 2009). Fukózové zbytky mohou být buď součástí jádra (core) glykanu (k němuž jsou připojeny vazbou  $\alpha 1,6$ ), nebo mohou být spojeny vazbou  $\alpha 1,2$ ,  $\alpha 1,3$ , případně i  $\alpha 1,4$  s anténárními částmi glykanu, a vytvářet tak výše zmiňované Lewis epitopy (Olejnik et al. 2015b). V případě Lewis X antigenu je fukóza vázaná na N-acetylglukosamin, pokud je vázaná na N-acetylglukosamin a další také na galaktózu, jedná se o antigen Lewis Y (Chen 2011; Kałuža et al. 2016). V případě množství kyseliny sialové byly výsledky velice variabilní – u některých jedinců sialylované glykany téměř chyběly, zatímco u jiných byly tyto struktury velmi časté. Zajímavé je, že pokud je kyselina sialová navázána na anténárních strukturách glykanu, jádro glykanu je pak modifikováno pouze jednou molekulou fukózy. Pokud však vnější větve obsahují N-acetylglukosamin a zároveň zde terminální kyselina sialová chybí, bývá fukosylace glykanu výrazně bohatší (Pang et al. 2009). Co se týče O-glykoproteinů, v semenné plazmě byly nalezeny jak „core 1“, tak „core 2“ struktury, modifikované fukózou nebo kyselinou sialovou (Pang et al. 2009). Přehled jednotlivých typů glykosylací, včetně glykosylací typických pro semennou plazmu, je znázorněn na Obr. 2.

Výše uvedené typy glykosylací jsou u savců spíše raritou. N-glykany bohaté na manózu a hybridní typ glykanů se např. v lidské krevní plazmě téměř nevyskytují, vazba většího počtu molekul fukózy zase bývá často spojována se zánětlivými stavy (Ferens-Sieczkowska et al. 2013). Naopak větší množství manózy a fukózy je typické i pro glykoproteiny spermií (Pang 2007).



**Obr. 2.** Přehled jednotlivých typů glykosylací. Převzato a upraveno podle Lyons et al. (2015).

Glykoproteinové struktury v rámci semenné plazmy byly doposud prozkoumány jen u poměrně úzkého spektra proteinů (alpha-1-acid glycoprotein (AGP), fibronectin (FN), glycodelin S (GdS), prostatický specifický antigen (PSA) aj.). Určitým milníkem ve studiu glykosylovaných proteinů semenné plazmy byl popis glycodelinu (Koistinen et al. 1996). Tento protein existuje ve čtyřech různých izoformách (GdA, GdS, GdF a GdC), které se mezi sebou liší pouze v glykosylaci (Julkunen et al. 1985; Koistinen et al. 1996, 2003; Tse et al. 2002; Chiu et al. 2007). S tím souvisejí také odlišné biologické funkce těchto izoform, což je umožněno právě díky rozdílům v sacharidových strukturách mezi nimi (Uchida et al. 2013). Jedna z izoform, glycodelin S (GdS), je v semenné plazmě velmi hojně zastoupena a podílí se na udržování spermií v nekapacitovaném stavu (Chiu et al. 2005). Zbylé tři glykoformy jsou produkovány samičím reprodukčním traktem a před kapacitací nahrazují glycodelin S, který je odstraněn (Chiu et al. 2005). Pro správný průběh oplození je tedy klíčové, aby byl organismus schopen rozeznávat i takové proteiny, které se odlišují jen z hlediska modifikace cukernými zbytky.

Hojně zastoupeným proteinem v semenné plazmě je také fibronectin. Pacienti s abnormálním spermioqramem měli sice v semenné plazmě vyšší koncentrace tohoto proteinu, sialylace fibronektinu však byla výrazně snížena (Katnik-Prastowska et al. 2006).

Spíše než změnám v glykosylaci konkrétních proteinů semenné plazmy, byla však v poslední době věnována pozornost změnám v glykomu semenné plazmy jakožto celku, a to u mužů s různým spermioqramem. Společným rysem většiny jedinců se sníženou plodností (oligozoospermici – O, astenozoospermici – As, oligoastenozoospermici – OAs a infertilní normozoospermici – IF N) se zdá být zvýšená fukosylace některých proteinů (včetně PSA,

PAP, Gd a choriového gonadotropinu). Signifikantní rozdíly pak byly nalezeny především mezi astenozoospermiky a normozoospermiky, a také mezi oligoastenozoospermiky a normozoospermiky (Olejnik et al. 2015b). Olejnik et al. (2015b) touto studií také potvrdili, že výraznější reaktivita proteinů vůči lektinu AAL, který je specifický právě pro fukózu, je v 11 ze 12 případů dána skutečně vyšší mírou fukosylace jako takové, a nesouvisí tedy pouze se zvýšeným množstvím proteinů. Vzhledem k tomu, že fukóza je mj. součástí Lewis antigenů, byla jejich přítomnost u těchto skupin (O, As, OAs) vyšší, než u normozoospermiků (Kažuza et al. 2016). U pacientů s O, As a OAs bylo zjištěno také větší množství větvených glykanů a nižší stupeň sialylace (Kažuza et al. 2016). Vůbec nejnižší množství kyseliny sialové pak bylo pozorováno u astenozoospermiků (Kažuza et al. 2016).

Nejvýraznější změny v expresi glykanů však byly pozorovány u oligozoospermiků (Kratz et al. 2015). Tuto skupinu bylo možné odlišit od kontrolní skupiny (fertilní normozoospermici) co do množství komplexních glykanů a vysoce větvených N-glykanů. Jejich množství bylo v obou případech značně sníženo. Jako signifikantní se projeví i odlišnosti v expresi kyseliny sialové. Zatímco hladina  $\alpha$ 2,3 vázané kyseliny sialové byla ve srovnání s infertilními normozoospermiky a astenozoospermiky nižší, exprese  $\alpha$ 2,6 vázané kyseliny sialové byla u oligozoospermiků naopak vyšší než u astenozoospermiků (Kratz et al. 2015). Glykanový profil u pacientů s oligozoospermii dále vykazoval také menší množství O-glykanů (Kratz et al. 2015) a vůbec nejnižší hladinu manózy a hybridních oligosacharidů ze všech skupin (Kažuza et al. 2016).

U pacientů s astenozoospermii byly detekovány nižší hladiny  $\alpha$ 2,6 vázané kyseliny sialové, a to jak oproti normozoospermikům s prokázanou fertilitou, tak oproti infertilním normozoospermikům a oligozoospermikům (Kratz et al. 2015).

Samostatnou kapitolu pak představují jedinci s idiopatickými poruchami plodnosti. Výsledky se navíc v rámci této skupiny výrazně liší. Vzorky byly ve srovnání s plodnými normozoospermiky poněkud chudší na hybridní typ oligosacharidů a obsahovaly menší množství glykanů bohatých na manózu (Olejnik et al. 2015a). V jiné studii byl naopak zjištěn zcela opačný výsledek – oba typy sacharidových struktur byly u infertilních normozoospermiků popsány jako lehce zvýšené (Kažuza et al. 2016). Dále bylo u mužů s idiopatickými poruchami plodnosti detekováno zvýšené množství vysoce větvených glykanů (glykany se třemi či čtyřmi anténami) a taktéž vyšší míra sialylace (Kažuza et al. 2016). U pacientů s idiopatickými poruchami plodnosti byla také popsána snížená exprese O-glykanů (Kratz et al. 2015).

Zastoupení sacharidových struktur u glykoproteinů může i přímo odrážet některé parametry ejakulátu. Snížené množství vysoce větvených N-glykanů pozitivně koreluje s počtem spermií, snížená hladina  $\alpha$ 2,6 vázané kyseliny sialové zase s motilitou spermií (Kratz et al. 2015).

Pro studium glykoproteinových struktur v semenné plazmě byly kromě klasické lektinové histochemie využity také tzv. lektinové mikročipy („microarray“). Proteiny semenné plazmy byly obarveny fluorescenčním barvivem Cy3, a lektiny s různou specifitou byly imobilizovány na speciálním sklíčku, na které se následně nanese vzorek semenné plazmy. Navázané glykoproteiny pak vykazovaly fluorescenční signál, jehož míra odrážela reaktivitu vůči danému lektinu. Výhodou této metody je, že jeden vzorek semenné plazmy může reagovat s velkým množstvím různých lektinů najednou. U semenné plazmy neplodných mužů byla v rámci této studie zjištěna snížená reaktivita proteinů vůči všem použitým lektinům (kromě ConA,

specifického pro manózu) oproti kontrolní skupině fertilních mužů. U osmi z osmnácti použitých lektinů byla nejnižší reaktivita pozorována u oligozoospermiků, a to především vůči lektinům specifickým pro O-vázané glykany (např. AIL, PNA, WFL lektiny aj.). Autoři se tak domnívají, že snížená fertilita u oligozoospermiků zřejmě souvisí právě se změnami v O-glykosylaci (Kołodziejczyk et al. 2018).

## 3.2 Epididymální tekutina

Vzhledem k tomu, že do složení semenné plazmy významným způsobem přispívá také epididymální tekutina, je následující kapitola věnována nadvarleti, jeho struktuře, funkci, a především pak epididymálním proteinům. Řada těchto proteinů by totiž mohla představovat zajímavé markery neplodnosti.

### 3.2.1 Struktura nadvarlete

Nadvarle je orgán tvořený jedním výrazně stočeným kanálkem, který navazuje na vývodné kanálky varlete a distálně přechází v chámovod. Délka tohoto kanálku se u hlodavců a primátů pohybuje kolem 1-7 metrů, u některých hospodářských zvířat (kůň, prase) však může dosahovat až 80 metrů. Vývojově vzniká nadvarle z Wolffových vývodů. U nadvarlete standardně rozlišujeme tři hlavní segmenty – hlavu (*caput*), tělo (*corpus*) a ocas (*cauda*). U některých druhů (např. potkan) se navíc popisuje ještě tzv. iniciální segment a intermediární zóna, na které navazuje hlava nadvarlete, u člověka se ale tyto segmenty nenacházejí. Odlišné prostředí v segmentech, které je zajištěno specifickou genovou expresí, je klíčové pro optimální maturaci spermií. Jednotlivé segmenty se však liší také typem buněk, výškou epitelu a průměrem kanálku. Obecně se dá říci, že zatímco průměr kanálku se směrem k ocasu nadvarlete zvyšuje, výška epitelu se naopak snižuje. Nadvarle je tvořeno tzv. pseudostratifikovaným epitelem, kdy všechny buňky přímo přisedají na bazální membránu, ale liší se svojí výškou (Cosentino & Cockett 1986; Flint et al. 2015).

Nadvarle je tvořeno celou řadou buněčných typů. Většinou bývá popisováno šest typů buněk – hlavní buňky, apikální buňky, cylindrické buňky, světlé či projasněné buňky, bazální buňky a buňky imunitního systému. Nejvíce zastoupeným typem buněk jsou hlavní buňky bohaté na stereocilie. Vyskytují se v průběhu celého nadvarlete, nejhojněji však v hlavě nadvarlete (případně v iniciálním segmentu či intermediární zóně), směrem k ocasu nadvarlete se jejich zastoupení snižuje, a stejně tak i výška buněk. V počátečních segmentech se nacházejí také apikální buňky a cylindrické buňky, v těle a ocasu se pak setkáváme se světlými buňkami, jejichž funkcí je zřejmě degradace nežádoucích produktů, acidifikace lumen a endocytóza. Druhou nejzastoupenější skupinou buněk jsou buňky bazální, které opět můžeme najít v průběhu celého nadvarlete. Podílí se pravděpodobně na regulaci vodního transportu, detoxifikaci buněk a ochraně před reaktivními formami kyslíku (Flint et al. 2015; Souza et al. 2017).

V nadvarleti je také přítomna bariéra mezi krví a epitelem, kterou zajišťují těsné spoje. Tato bariéra, která je obdobou hematotestikulární bariéry ve varleti, zaručuje udržení spermatických antigenů mimo krevní oběh a jiné tělní tekutiny, a chrání tak organismus před autoimunitní odpovědí (Hoffer & Hinton 1984).

### 3.2.2 Funkce nadvarlete

V hlavě nadvarlete probíhá intenzivní sekrece proteinů, glykoproteinů a nízkomolekulárních látek. Ty mohou být zabudovány do membrány spermií, stejně tak ale mohou být i proteiny odlučovány z povrchu spermií do epididymální tekutiny, nebo v rámci plazmatické membrány spermie různým způsobem translokovány. V hlavě nadvarlete (resp. v iniciálním segmentu, pokud je přítomen) probíhá také velmi intenzivní resorpce testikulární tekutiny a s tím související zakoncentrování spermií (Levine & Marsh 1971; Turner & Cesarini 1983). Funkce těla nadvarlete není zatím zcela objasněna, ale zřejmě se společně s hlavou nadvarlete podílí na zisku motility a oplozovací schopnosti spermií (Mathieu et al. 1992; Turner 1995). V ocasu nadvarlete jsou spermie ukládány (cca 2-5 dní) do doby ejakulace, mohou zde však být uloženy i déle (Bedford 1994; Turner 2008). Množství spermií v nadvarletí představuje u člověka zásobu cca na tři ejakulace (Johnson 1982; Johnson & Varner 1988). Zároveň zde dochází k eliminaci nefunkčních a poškozených spermií (Sutovsky et al. 2001) a u některých savčích druhů k migraci, případně i k úplnému odstranění cytoplazmatické kapénky. Při ejakulaci jsou spermie z nadvarlete aktivně (pohybem cílů a aktivitou myoidních buněk) i pasivně (tlakem sekretovaných molekul) posouvány do dalších částí vývodných pohlavních cest (Cosentino & Cockett 1986; Flint et al. 2015).

Jak již bylo zmíněno, ústřední funkcí nadvarlete je sekrece a také resorpce proteinů. K sekreci proteinů dochází merokrinním způsobem, kdy proteiny procházejí klasickou sekreční dráhou přes endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát a pomocí sekrečních váčků jsou exocytózou vyloučeny z buňky. Řada proteinů je však sekretována také apokrinním způsobem. V tomto případě se z buňky odškrtí její apikální část obsahující sekretované molekuly (tzv. apikální puchýřky či „blebs“), a ta je uvolněna do extracelulárního prostředí. Součástí těchto puchýřků jsou mikrovezikuly, tzv. epididymozomy, které obsahují proteiny (typicky proteiny, které postrádají signální sekvenci) a regulační miRNA. Epididymozomy pak mohou fúzovat s plazmatickou membránou spermií, čímž dojde k zabudování epididymálních proteinů do membrány (Yanagimachi et al. 1985; Frenette & Sullivan 2001; Frenette et al. 2002; Hermo & Jacks 2002; Sullivan et al. 2007; Belleannée et al. 2013).

Během průchodu spermií nadvarletem (tzv. epididymální transit spermií) dochází k řadě změn, a to jak ve složení epididymální tekutiny, tak ve složení a modifikacích spermatických proteinů. Tyto změny jsou nezbytné pro budoucí oplozovací schopnost spermie (zisk motility, schopnost vazby spermie na vajíčko) a označují se jako epididymální maturace spermií. Doba průchodu spermií nadvarletem je druhově specifická a pohybuje se zhruba mezi 3-15 dny (Amann & Howards 1980; Hikim & Hoffer 1988; Dacheux & Dacheux 2014).

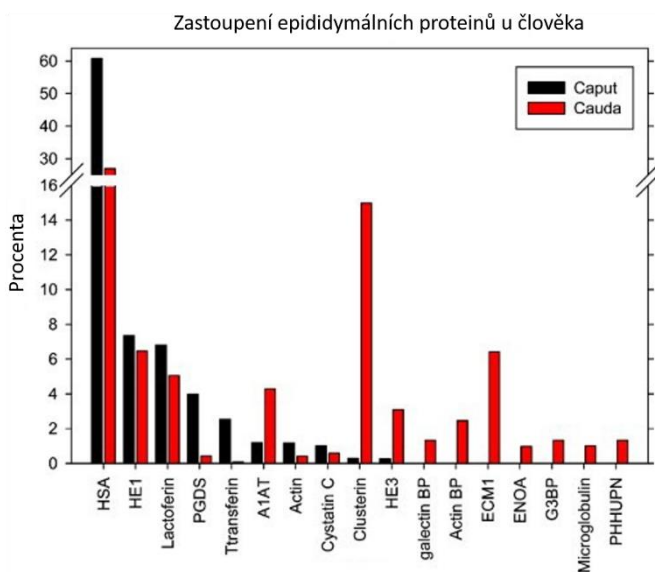
Epididymální proteiny jsou také hojně studovány z hlediska mužské antikoncepce – ta by v ideálním případě měla za cíl epididymální protein (či proteiny) zodpovědný za zisk oplozovací schopnosti spermie. Zároveň by však nedocházelo k narušení spermatogeneze a celý proces by byl reverzibilní (Reyes & Chavarría 1981; Sipilä et al. 2009).

### 3.2.3 Epididymální proteiny

Podobně jako v případě semenné plazmy, obsahuje i epididymální tekutina řadu proteinů, které se vyskytují i v jiných tkáních. Mezi takovéto proteiny patří např. albumin, clusterin a především pak řada enzymů (glykosidázy, proteázy, inhibitory proteáz). Velká část proteinů

je však specifická pouze pro nadvarle. Většina proteinů nadvarlete je rozpustných, méně rozpustné proteiny bývají opatřeny GPI kotvou (např. HE5/CD52) a typicky asociují s epididymozomy. Některé proteiny se také mohou sdružovat do vysokomolekulárních komplexů (Kirchhoff & Hale 1996; Ecroyd et al. 2005; Dacheux et al. 2009, 2016; Dacheux & Dacheux 2014).

U většiny savčích druhů (např. býk, kanec, hřebec, beran, člověk) bylo zjištěno, že 80-90 % proteinového obsahu epididymální tekutiny je tvořeno pouze asi 10-20 proteiny (v závislosti na konkrétním druhu), které jsou zde přítomny ve vysokých koncentracích (Dacheux et al. 2012). Zastoupení nejvýznamnějších proteinů v lidské epididymální tekutině je znázorněno na Obr. 3.



**Obr. 3.** Procentuální zastoupení hlavních proteinů v lidské epididymální tekutině.

A1AT:  $\alpha$ -1-antitrypsin; CLU: clusterin, ECM1: extracelular matrix protein 1; ENOA: enolase; G3BP: galectin-3-binding protein; HE3/EDDM3A: epididymal protein 3A; HSA: human serum albumin; HE1/NPC2: Niemann-Pick disease type C2; PGDS: prostaglandin D2-synthase; PHHUPN: purin-nukleosid phosphorylase. Převzato a upraveno podle Dacheux et al. (2012).

Situace je podobná i u ostatních druhů hospodářských zvířat, nejmarkantnější je pak zřejmě u býka, kde pouze 13 proteinů představuje 95 % všech epididymálních proteinů (Belleannée et al. 2011). Některé z těchto proteinů se mezi jednotlivými druhy překrývají (clusterin, Niemann-Pick disease type C2, laktoferin), jiné mohou být druhově specifické. Vysoce zastoupeným proteinem u savčích druhů, jako je ovce, skot, prase, kuň a člověk, je clusterin, který tvoří zhruba 30-40 % všech epididymálních proteinů (Syntin et al. 1996; Fouchécourt et al. 2000; Dacheux et al. 2009; Belleannée et al. 2011).

Z tohoto úhlu pohledu se proteiny nadvarlete jeví jako zajímavé potenciální markery fertility, neboť jejich vysoká koncentrace v epididymální tekutině zřejmě odráží jejich nepostradatelnost. U myši byl však proveden knockout genů kódujících některé z těchto proteinů (laktoferin, clusterin, glutathionperoxidáza 5 (GPX5), CRISP1, CRISP4 aj.), nicméně ke snížení fertility nedošlo (Bailey et al. 2002; Chabory et al. 2009; Dacheux & Dacheux 2014;

Hu et al. 2018). Na druhou stranu, např. protein CRISP1 se i tak zdá být poměrně dobrým markerem obstrukční azoospermie u lidí (Légaré et al. 2013).

Vzhledem k již zmíněné specifické genové expresi v jednotlivých segmentech nadvarlete, je i výskyt řady proteinů specificky vázán na daný segment (Krull et al. 1993; Dacheux et al. 2012). Množství proteinu je typicky nejvyšší v místě jeho vzniku a v dalších částech nadvarlete jeho koncentrace postupně klesá. Např. prostaglandin syntáza (PTGDS) je u některých druhů (člověk, býk, beran, hřebec) sekretována především v proximálních částech nadvarlete, zatímco jiné proteiny, např. gelsolin (u býka), převažují ve střední a distální části.

Clusterin pak můžeme nalézt ve všech částech nadvarlete (Dacheux et al. 2009, 2012, 2016). U hřebce, kance a berana obecně platí, že největší sekrece proteinů probíhá v proximálních částech nadvarlete, kde zároveň dochází i k nejvýraznějším modifikacím spermatických proteinů (Syntin et al. 1996; Dacheux et al. 2016). U člověka se však zdá být neaktivnější částí tělo nadvarlete (Dacheux et al. 2006). Množství epididymálních proteinů také podléhá pozitivní či negativní regulaci prostřednictvím androgenů (Syntin et al. 1999).

Zásadní změnou během průchodu spermií nadvarletem je remodelace membránových proteinů spermie. Spermatické proteiny procházejí řadou nejrůznějších změn a modifikací. Povrchové proteiny mohou být např. proteolyticky štěpeny a následně redistribuovány po povrchu spermie. Proteiny mohou podléhat také úpravám pomocí glykolytických enzymů (Dacheux et al. 2012). Nejmarkantnější změnou je pak zřejmě zabudování proteinů z epididymální tekutiny do plazmatické membrány spermie (proteiny HE2, HE4, HE5), nebo naopak odstranění některých povrchových proteinů a jejich uvolnění do epididymální tekutiny (ACE) (Kirchhoff 1998; Kirchhoff et al. 1998; Gatti et al. 1999; Dacheux et al. 2016). Změny na plazmatické membráně se však netýkají pouze proteinů – během maturace spermií v nadvarleti dochází i k úpravě fosfolipidového složení membrány (Haidl & Opper 1997).

U některých epididymálních proteinů se předpokládá klíčová role ve schopnosti vazby spermie na vajíčko a jejich následné fúze. Pravděpodobně se jedná právě o ty proteiny, které jsou během epididymálního transitu zabudovány do plazmatické membrány spermie (HE5, proteiny CRISP, proteiny ADAM a TEX) (Dacheux & Dacheux 2014).

Další proteiny nadvarlete zajišťují např. ochranu spermií před volnými kyslíkovými radikály (glutathion peroxidáza, superoxid dismutáza, kataláza) (Zini & Schlegel 1997; Schwaab et al. 1998; Potts et al. 1999), nebo před bakteriální infekcí (defensiny, cystatiny) (Flint et al. 2015). Neméně důležitou funkcí nadvarlete je také kontrola kvality spermií – nefunkční a poškozené spermie jsou ubikvitinylovány a následně odstraněny prostřednictvím fagocytózy (Sutovsky et al. 2001).

### 3.2.3.1 Clusterin

Nejvíce zastoupeným proteinem v lidské epididymální tekutině je clusterin, dříve označovaný také např. jako Apolipoprotein J. Jedná se o heterodimerní protein složený ze dvou polypeptidových řetězců (ApoJ $\alpha$  a ApoJ $\beta$ ), které jsou navzájem spojeny čtyřmi nebo pěti disulfidovými můstky. Molekulová hmotnost proteinu se pohybuje kolem 70-80 kDa (de Silva et al. 1990b, 1990c; Čapková et al. 2002; Dacheux et al. 2006). Clusterin je velmi bohatě glykosylován – cukerné zbytky představují zhruba 30 % jeho molekulové hmotnosti (de Silva et al. 1990c). Další výraznou posttranslační modifikací tohoto proteinu je sulfatace,

proto byl také původně označován jako Sulfatovaný glykoprotein 2 (SGP-2) (Sylvester et al. 1984). Dnešní název proteinu souvisí s jeho schopností shlukovat buňky (Sertoliho buňky a erytrocyty) *in vitro* (Blaschuk et al. 1983; O'Bryan et al. 1990).

Mediátorová RNA pro clusterin kóduje celkem 449 aminokyselin. Na začátku sekvence (aminokyseliny 1-22) se nachází signální sekvence, která zajišťuje kotranslační translokaci tohoto proteinu do endoplazmatického retikula, zbylé aminokyseliny (23-449) kódují polypeptidové řetězce  $\alpha$  a  $\beta$ . Signální peptid je v endoplazmatickém retikulu odštěpen, a není tak součástí vzniklého proteinu. V endoplazmatickém retikulu také dochází k tvorbě disulfidových můstků a k cukerným modifikacím proteinu. Jeho glykosylace je dokončena v Golgiho aparátu, kde protein navíc pravděpodobně podstupuje proteolytické štěpení na  $\alpha$  a  $\beta$  řetězec, čímž získává svoji finální heterodimerní strukturu. Takto upravený protein je poté připraven k sekreci do extracelulárního prostředí (de Silva et al. 1990a; de Silva et al. 1990c; Rohne et al. 2015, UniProtKB database - P10909).

U člověka bylo zatím popsáno 6 různých izoform tohoto proteinu – izoforma 1 (secreted clusterin, sCLU, CLU35), izoforma 2 (CLU34), izoforma 3, izoforma 4 (nuclear clusterin, nCLU), izoforma 5 (CLU36) a izoforma 6 (Leskov et al. 2003; Prochnow et al. 2013). Nesekreční formy clusterinu jsou lokalizovány v cytosolu, případně v jádře a jsou zastoupeny pouze minimálně. Vyskytují se převážně ve formě jednoho polypeptidového řetězce, protože nedochází k jejich proteolytickému štěpení v Golgiho aparátu. Oproti sekreční formě clusterinu bývají výrazně méně glykosylovány nebo u nich glykosylace zcela chybí (Prochnow et al. 2013). Některé z těchto nesekrečních (nekanonických) forem byly detekovány pouze u stresovaných buněk. Zvýšená míra stresu může také indukovat retranslokaci sekreční formy clusterinu do cytosolu (Nizard et al. 2007). Vzhledem k minoritnímu výskytu nesekrečních forem tohoto proteinu se budeme dále v textu zabývat především sekrečním clusterinem (sCLU).

Clusterin (CLU) se vyskytuje v tělních tekutinách – v krevní plazmě, mléce, mozkomíšním moku, ale také právě v semenné plazmě, kde je jeho koncentrace ve srovnání s krevní plazmou výrazně vyšší.

Tento protein je zajímavý také z hlediska glykosylace. Saraswat et al. (2016) popisuje u clusterinu 4 různá glykosylační místa, díky kterým se v semenné plazmě vyskytuje až 43 variant tohoto proteinu. V rámci této studie se jednalo o protein s nejvyšším počtem variant lišících se sacharidovými strukturami, druhý v pořadí byl fibronektin s 32 variantami.

Sérový CLU a CLU vyskytující se v semenné plazmě se mezi sebou liší právě ve způsobu glykosylace. Sérová varianta proteinu je vysoce sialylovaná (obsahuje N-glykany komplexního typu s navázanou kyselinou sialovou), ale nenese žádné Lewis antigeny a ani O-vázané sacharidy. Naopak CLU vázaný na semennou plazmu je bohatý na antigenní struktury Lewis typu (ale i na další – např. antigen H), které jsou výrazně fukosylovány. CLU v SP má také typicky navázanou terminální galaktózu, případně kyselinu sialovou (Sabatte et al. 2011; Janiszewska & Kratz 2020).

Výskyt clusterinu je vázán i na celou řadu savčích tkání (mozek, játra, slinivka), především pak na takové, které produkují steroidní hormony (varlata, vaječníky) (Collard & Griswold 1987; Choi et al. 1990; de Silva et al. 1990a; O'Bryan et al. 1990). V samčím reprodukčním traktu je clusterin produkován zejména ve varlatech a nadvarlatech, nicméně jeho přítomnost byla popsána také v semenných váčcích (Kissinger et al. 1982;

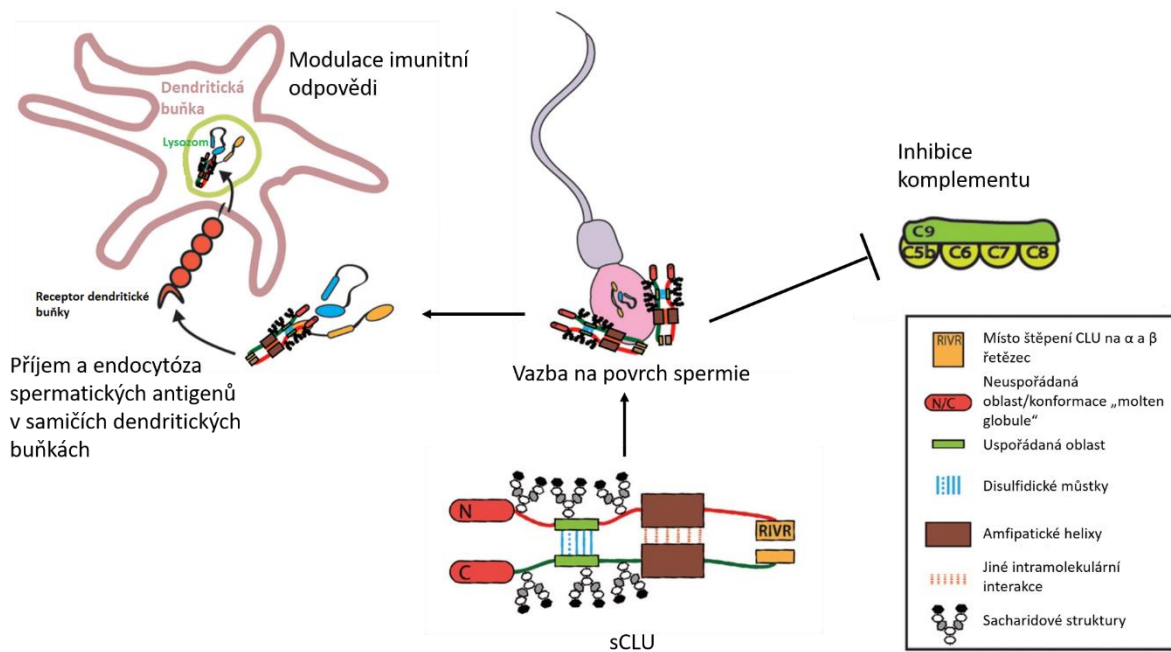


Blaschuk et al. 1983; O'Bryan et al. 1990, 1994a). Za produkci clusterinu ve varlatech jsou zodpovědné Sertoliho buňky (Blaschuk et al. 1983). Clusterin se vyskytuje v semenné plazmě volně, ale také vázaný na spermie (O'Bryan et al. 1990; Sylvester et al. 1991). Předpokládá se, že při průchodu spermií nadvarletem je testikulární clusterin nahrazen epididymálním (Sylvester et al. 1991). Ten je nutný pro jejich maturaci a pro správnou remodelaci spermatické membrány, neboť se podílí na transportu proteinů nesoucích GPI kotvu do plazmatické membrány spermie (Griffiths et al. 2009).

Clusterin je spojován s velkým množstvím fyziologických funkcí, přičemž nevyznamnější z nich je nepochybně jeho funkce jako chaperon (Humphreys et al. 1999; Poon et al. 2000). S tím souvisí i výrazně zvýšená tvorba tohoto proteinu v maligních tkáních, ve tkáních které jsou stresované, vystavené toxickým vlivům nebo podstupující apoptózu (Viard et al. 1999; Shapiro et al. 2015). Proto je clusterinu věnována pozornost také ve vztahu ke studiu rakoviny prsu, prostaty nebo neurodegenerativních chorob, jako je např. Alzheimerova choroba (Harold et al. 2009; Rizzi & Bettuzzi 2010). Jeho role spočívá ve vazbě nesbalených či špatně sbalených proteinů. Ty se tak stávají přístupnějšími pro další chaperony, které se následně přímo podílí na jejich správném složení. Samotný clusterin ale tuto schopnost přímého přeskládávání proteinů nemá (Poon et al. 2000). Zvýšená produkce proteinu v reakci na stres byla popsána i u reprodukčních tkání, konkrétně u varlat (Clark & Griswold 1997).

Vzhledem k tomu, že clusterin je zároveň apolipoproteinem, jeho úloha spočívá také v transportu lipidů, konkrétně částic HDL (de Silva et al. 1990b). I zde může být jistá souvislost s reprodukčními tkáněmi, neboť cholesterol, transportovaný pomocí těchto lipoproteinových částic, je prekurzorem steroidních hormonů (Fujimoto et al. 2010).

Množství dalších funkcí tohoto proteinu úzce souvisí s regulací různých komponent imunitního systému. Clusterin inhibuje komplemem (soubor proteinů sloužící jako humorální složka nespecifické imunity) iniciovanou lýzi buněk, a brání tak apoptóze. Na základě této schopnosti byl clusterin dříve označován také jako „Complement Cytolysis Inhibitor (CLI)“ či jako „complement-associated protein SP-40“ (Jenne & Tschopp 1989; Purrello et al. 1991). Inhibice komplemenu představuje mimo jiné obecnou vlastnost semenné plazmy, a vzhledem k množství clusterinu v semenné plazmě je pravděpodobné, že za tuto vlastnost semenné plazmy je z velké části zodpovědný právě tento protein (Tarter & Alexander 1984; O'Bryan et al. 1990). Antiapoptotická role je ale zřejmě vázána pouze na sekreční formu clusterinu (Zhang et al. 2005), u jaderné formy (nCLU) se naopak předpokládá proapoptotická funkce (Leskov et al. 2003). Clusterin dále usnadňuje endocytózu proteinů dendritickými buňkami, čímž se opět podílí na modulaci imunitní odpovědi (Merlotti et al. 2015). To je umožněno díky fukózovým zbytkům, respektive Lewis antigenům, které jsou součástí proteinu. Tyto epitopy zajišťují vazbu clusterinu na receptory dendritických buněk (Sabatte et al. 2011). K výše uvedenému dochází i v samičím reprodukčním traktu, tj. antigenní struktury na spermiích jsou pohlcovány dendritickými buňkami, díky čemuž jsou spermie imunitním systémem samice do jisté míry tolerovány. Struktura clusterinu a jeho funkce v samčím a samičím reprodukčním traktu je znázorněna na Obr. 4.



**Obr. 4.** Struktura clusterinu a jeho funkce v reprodukčním traktu. Převzato a upraveno podle Rohne et al. (2015).

Mezi další imunitní funkce clusterinu patří schopnost zvyšovat proliferaci NK buněk, migraci makrofágů a životnost B-lymfocytů (Rohne et al. 2015).

Glykosylace CLU je však klíčová nejen pro optimální funkci imunitního systému, ale také pro funkci clusterinu jakožto chaperonu. Pokud je clusterin plně deglykosylovaný, nebo nedojde-li k jeho štěpení na  $\alpha$  a  $\beta$  řetězec, je jeho chaperonová aktivita narušena (Rohne et al. 2014).

U býka a berana byla reaktivita protilátky proti clusterinu popsána pouze u morfologicky abnormálních spermií. Množství spermií pozitivních na clusterin se také zvýšilo u zvířat, jejichž varlata byla vystavena vyšší teplotě, než je fyziologické (Ibrahim et al. 2000, 2001). Také u potkanů, kteří prodělali testikulární hypertermii, byla pozorována zvýšená exprese clusterinu ve varlatech, což opět potvrzuje roli clusterinu jakožto proteinu tepelného šoku (Matsushita et al. 2014). U spermií kanců využívaných k inseminaci (tj. s prokázanou fertilitou) byly pozorovány nízké koncentrace mRNA pro clusterin, proteinový produkt u těchto zvířat nebyl detekován vůbec (Zannoni et al. 2017). U koně byla zjištěna negativní asociace mezi množstvím clusterinu v semenné plazmě a fertilitou (Novak et al. 2010).

V případě lidských ejakulovaných spermií je však situace poněkud složitější. Zatímco na povrchu defektních spermií byla detekována standardní forma clusterinu o molekulové hmotnosti 80 kDa, spermie normozoospermiků reagovaly jak s protilátkou proti této klasické heterodimerní formě (v případě aglutinovaných spermií), tak s protilátkou, která má vysokou afinitu pro podjednotku  $\alpha$  (u morfologicky normálních spermií). Tato forma clusterinu, vyskytující se na normálních spermiích, byla vázaná na oblast akrozomu (O'Bryan et al. 1994b). Lokalizaci clusterinu v akrozomu popisuje také Atlas-White et al. (2000). Autoři tedy předpokládají, že na těchto morfologicky normálních spermiích je v určité míře navázána jiná forma clusterinu, která zřejmě odpovídá pouze podjednotce  $\alpha$

(O'Bryan et al. 1990; 1994b). Lokalizací clusterinu na normálních lidských spermích se zabýval také Han et al. (2012). Popisuje u nich přítomnost clusterinu pocházejícího z varlat ve vnitřní vrstvě plazmatické membrány, zatímco clusterin vyskytující se u abnormálních spermíí byl v předchozích studiích lokalizován na jejich povrchu (Han et al. 2012). Vzhledem k tomu, že Han et al. (2012) clusterin nedetekoval ve spermatogoniích, ale až u pozdějších vývojových stádií spermatických buněk, domnívá se, že k syntéze clusterinu může docházet v pokročilejších stádiích spermatogeneze. Dle této teorie by tedy clusterin ve vnitřní vrstvě membrány normálních spermíí byl syntetizován přímo v zárodečných buňkách, zatímco clusterin na povrchu abnormálních spermíí by měl pocházet z přídatných pohlavních žláz (nadvarle, semenné váčky).

U pacientů s narušenou spermatogenezí byla detekována nižší hladina mRNA pro clusterin ve varlatech, nicméně signifikantní snížení oproti kontrole se týkalo pouze jedinců s konstitutivními či idiopatickými poruchami. V případě získaného selhání ke snížení mRNA pro clusterin nedošlo (Plotton et al. 2006). U této studie však nebyla zkoumaným vzorkem semenná plazma, ale část testikulární tkáně odebraná při biopsii varlat.

Nověji se studiem clusterinu na úrovni RNA i proteinu v semenné plazmě zabýval Zalata et al. (2012). Popisuje výrazně vyšší expresi genu i hladinu proteinu u neplodných pacientů (As, AsT, OAsT), přičemž vůbec nejvyšší hladiny byly pozorovány u případů oligoastenoteratozoospermie (OAsT). Větší množství RNA i proteinu bylo detekováno mimo jiné u jedinců s vyšším zastoupením morfologicky abnormálních spermíí v ejakulátu a s vyšší mírou fragmentace spermatické DNA, naopak negativní korelace byla pozorována ve vztahu k počtu spermíí, motilitě a k řadě dalších faktorů (Zalata et al. 2012).

K rozdílným výsledkům ale došel Salehi et al. (2013). Výsledek této studie poukazoval na výrazně snížené množství sCLU u neplodných mužů ve srovnání s kontrolní skupinou (fertilní muži). Odlišné závěry se týkaly také vztahu mezi koncentrací clusterinu a fragmentací spermatické DNA a abnormální morfologií spermíí – zde byla pro změnu pozorována negativní korelace (Salehi et al. 2013). V souladu s těmito výsledky je také proteomická analýza semenné plazmy pomocí hmotnostní spektrometrie (Sharma et al. 2013), v rámci které bylo zjištěno snížené množství CLU u oligozoospermiků oproti ostatním dvěma testovaným skupinám (normozoospermici a oligoteratozoospermici).

Mušská neplodnost bývá často dávana také do souvislosti s mobilními telefony, resp. s radiací, kterou vyzařují. Po expozici semenné plazmy radiací výrazně vzrostla jak koncentrace CLU, tak i exprese genu pro *CLU* a zhoršily se i parametry ejakulátu (Zalata et al. 2015). Clusterin byl popsán jako významný marker oxidativního stresu (Viard et al. 1999), k jehož nárůstu dochází mj. právě po expozici tkáně elektromagnetickým zářením. Závěry těchto studií tedy dále podporují teorii, že clusterin by mohl být dobrým markerem fertility, neboť právě oxidační poškození spermatické DNA je považováno za jednu z hlavních příčin neplodnosti (Janiszewska & Kratz 2020).

Dosavadní studie týkající se CLU a jejich výsledky jsou shrnuty v Tab. 1.

Clusterin by také mohl představovat marker úspěšnosti *in vitro* fertilizace (IVF). Kanannejad a Gharesi-Fard (2019) analyzovali proteinový profil semenné plazmy u mužů s idiopatickou neplodností, jejichž partnerky podstoupily IVF a pozorovali signifikantně vyšší expresi clusterinu u skupiny mužů, u kterých byla IVF úspěšná.

**Tab. 1.** Přehled dosavadních studií clusterinu a jejich výsledků.

	Úroveň studia CLU	Metodika	Studovaný biologický materiál	Sledovaný parametr	Výsledek	Zdroj
Potkan	mRNA, protein	RT-PCR, WB	Sertoliho buňky	jedinci, kteří prodělali testikulární hypertermii	zvýšená exprese CLU	Matsushita 2014
Býk a beran	protein	FC, FM	spermie	morfologicky abnormální spermie	CLU-pozitivní spermie	Ibrahim 2000
Kanec	mRNA, protein	qRT-PCR, WB	spermie	jedinci s prokázanou fertilitou	nižší hladina CLU mRNA, absence proteinu	Zannoni 2017
Hřebec	protein	2D elfo, MS	semenná plazma	jedinci se sníženou fertilitou	vyšší množství proteinu	Novak 2010
Člověk	protein	2D elfo, IF, IHC, EM	ejakulované spermie	defektní spermie	CLU na povrchu spermií	O'Bryan 1990, O'Bryan 1994b
				spermie normozoospermiků	CLU v oblasti akrozomu	
	protein	2D elfo, ELISA	semenná plazma	jedinci s OA a poruchami spermatogeneze	nižší množství proteinu	O'Bryan 1990
				jedinci s agenezí chámovodu	absence proteinu	
	mRNA	RT-PCR	testikulární tkáň	jedinci s konstitutivními/idiopatickými poruchami	nižší hladina CLU mRNA	Plotton 2006
	protein	2D elfo, MS	spermie	fertilní jedinec (ale pouze 1 vzorek!)	CLU-pozitivní spermie	Thacker 2011
	protein	2D elfo, MS	semenná plazma	jedinci s idiopatickou neplodností po úspěšném IVF	vyšší množství proteinu	
	protein	cytometrie, FM	spermie	jedinci s hypertenzí (často ve spojení s fragmentovanou spermatickou DNA)	CLU-pozitivní spermie	Muciaccia 2012
	mRNA, protein	RT-PCR, WB	semenná plazma	infertilní jedinci (As, AsT, OAsT)	vyšší hladina mRNA i vyšší množství proteinu (nejvýrazněji u OAsT)	Zalata 2012
				jedinci s abnormálními spermii		
				jedinci s fragmentovanou spermatickou DNA		
	protein	ELISA	semenná plazma	infertilní jedinci	nižší množství proteinu	Salehi 2013
jedinci s abnormálními spermii						
jedinci s fragmentovanou spermatickou DNA						
protein	MS	semenná plazma	oligozoospermici	nižší množství proteinu	Sharma 2013	
mRNA, protein	RT-PCR, WB	semenná plazma	semenná plazma po 1h radiaci	vyšší hladina mRNA i vyšší množství proteinu	Zalata 2015	

Vysvětlivky: As – astenozoospermie, AsT – astenoteratozoospermie, CLU – clusterin, ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, EM – elektronová mikroskopie, FC – průtoková cytometrie (z angl. flow cytometry), FM – fluorescenční mikroskopie, IF – imunofluorescence, IHC – imunohistochemie, mRNA – mediátorová RNA (z angl. messenger RNA), MS – hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry), OA – obstrukční azoospermie, OAsT – oligoastenoteratozoospermie, RT-PCR – polymerázová řetězová reakce v reálném čase (z angl. real-time polymerase chain reaction), WB – elektropřenos proteinů metodou Western blot, 2D elfo – 2D elektroforéza

### 3.3 Vyšetření spermogramu

Spermogram představuje základní andrologické vyšetření, které je doporučeno pacientům s podezřením na sníženou fertilitu. Referenční hodnoty spermogramu jsou každých několik let vydávány Světovou zdravotnickou organizací (WHO) na základě analýzy ejakulátu u plodných mužů. Metodika zpracování spermatu i způsob vyhodnocení spermogramu jsou popsány v Laboratorním manuálu WHO pro zkoumání a zpracování lidského ejakulátu. Nyní je aktuální 5. vydání toho manuálu z roku 2010.

V rámci této analýzy se hodnotí objem, koncentrace a pH ejakulátu, motilita a morfologie spermií, procento spermií s progresivním pohybem, případně také množství leukocytů v ejakulátu a u jedinců s nízkým objemem ejakulátu (či v případě absence spermií) sledujeme i množství fruktózy. Analýzu spermogramu se doporučuje provést alespoň dvakrát, ideálně však třikrát, aby mohly být vyloučeny přechodné poruchy spermatogeneze. Vzorek spermatu je získáván masturbací po 2-7denní sexuální abstinenci. Pokud z nějakého důvodu není možné uskutečnit odběr v prostorách příslušné laboratoře, lze jej provést i v domácích podmínkách. V tomto případě je však třeba vzorek dopravit do laboratoře do jedné hodiny od odběru při teplotě 20-37°C. Sperma by nemělo být kontaminováno slinami, bakteriemi ani poševním sekretem. Odběr provádíme vždy do speciální sterilní nádoby, ne do prezervativu, neboť ty mohou obsahovat spermicidní látky. Výjimkou jsou pouze speciální prezervativy přímo určené k odběru ejakulátu (Cooper et al. 2010; World Health Organization 2010).

Přesto, že se jedná o jedno z nejběžnějších vyšetření mužské neplodnosti, je nutné si uvědomit, že spermogram neodráží celou řadu faktorů, které mohou být za sníženou plodnost zodpovědné. Jedná se např. o poškození DNA či chromatinu spermií, výskyt reaktivních forem kyslíku (ROS) či produkci protilátek proti spermiím. Takovéto poruchy mohou být příčinou infertility, nicméně spermogram u těchto pacientů může být zcela v pořádku. Proto je vhodné v případě potřeby doplnit analýzu ejakulátu o další testy, které mohou tyto dysfunkce odhalit, jako např. hypo-osmotický „swelling“ test, test na spermatické protilátky či počítačem řízená analýza spermií (Computer Assisted Sperm Analysis - CASA) aj. (Esteves et al. 2012; Esteves 2014).

Z výše uvedeného tedy vyplývá, že normální hodnoty spermogramu rozhodně nezaručují plodnost pacienta, a naopak i jedinec s abnormálním spermogramem může být schopen úspěšné koncepce. Spermogram je tedy nutné vnímat pouze jako jakýsi interval normality, do kterého spadá většina plodných mužů, a měl by spíše představovat určité vodítko ke zvolení případné léčby. Pro správné určení diagnózy (a tedy i léčby) je klíčové také klinické vyšetření, anamnéza pacienta a řada dalších testů (hormonální profil, genetické vyšetření) (Cooper et al. 2010; Esteves et al. 2012; Esteves 2014).

V neposlední řadě je třeba mít na paměti, že při analýze spermogramu dochází k výrazné variabilitě, tj. že parametry ejakulátu mohou u jedince kolísat, a to i v poměrně krátkém časovém horizontu. Např. při odběru ejakulátu jedenkrát týdně po dobu 10 týdnů bylo zjištěno, že variabilita některých parametrů může u stejného jedince dosahovat až 28 %. Největší variabilitu vykazovala koncentrace spermií, nejmenší pak vitalita spermií (Alvarez et al. 2003) Hodnoty jsou samozřejmě závislé také na řadě parametrů, jako je doba sexuální abstinence či aktivita přídatných pohlavních žláz (Cooper et al. 2010). Referenční hodnoty spermogramu podle WHO z roku 2010 popisuje Tab. 2.

**Tab. 2.** Referenční hodnoty spermiogramu dle WHO (2010).

Parametry ejakulátu	Dolní hranice normy
Objem ejakulátu (ml)	1,5
Koncentrace spermií ( $10^6$ /ml)	15
Celkový počet spermií ( $10^6$ /ejakulát)	39
Celková motilita (PR + NP, %)	40
Progresivní motilita (PR, %)	32
Morfologie (%)	alespoň 4 % normálních forem
Vitalita (%)	58
pH	$\geq 7,2$

Vysvětlivky: PR – progresivní motilita, NP – neprogresivní motilita.

Většina uvedených hodnot je však výrazně nižší, než v předchozích letech (rok 1980, 1987, 1992 a 1999). V roce 2010 byli totiž do studie poprvé zařazeni pouze takoví muži, u kterých došlo k úspěšnému početí během 12 měsíců nechráněného pohlavního styku (Cooper et al. 2010). Tato studie je však problematická i z jiných hledisek. K analýze byl u všech subjektů použit pouze jeden vzorek ejakulátu, přesto, že sama WHO doporučuje analyzovat minimálně 2 vzorky. Do této studie navíc nebyli vůbec zahrnuti zástupci z některých oblastí (Afrika, Jižní Amerika, většina Asie apod.), i když se jedná o oblasti s poměrně vysokou hustotou populace (Esteves et al. 2012; Esteves 2014).

Na základě těchto referenčních hodnot se i výrazně posunula hranice toho, co je vnímáno jako normální spermioqram. Řada pacientů, kteří by dle parametrů z roku 1999 byli považováni za infertilní, by dnes již byli vyhodnoceni jako zcela normální (Centola 2012; Esteves et al. 2012; Murray et al. 2012; Esteves 2014; Cocuzza 2015).

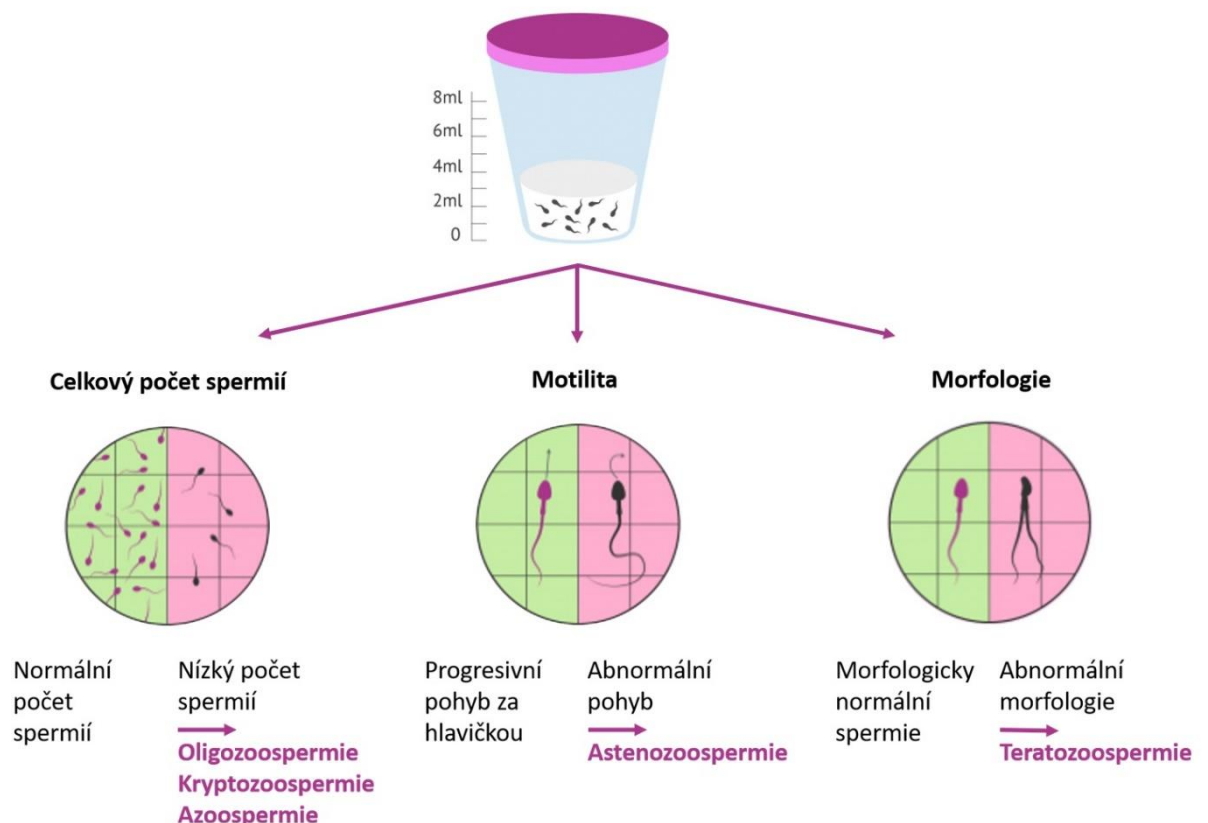
Otázkou tedy zůstává, jestli nové referenční hodnoty z roku 2010 skutečně odrážejí klesající úroveň plodnosti (např. v důsledku působení endokrinních disruptorů nebo jiných faktorů prostředí), či jestli je takto výrazná změna v parametrech ejakulátu zapříčiněna rozdílnou metodikou WHO (v porovnání s lety 1980, 1987, 1992 a 1999), vyšší přesností a vyššími standardy v andrologických laboratořích, či např. rozdíly v metodice mezi jednotlivými pracovišti, které na studii participovaly (Centola 2012; Esteves et al. 2012; Murray et al. 2012; Cocuzza 2015).

Pokud jsou parametry ejakulátu nižší, než je dolní hranice normy (viz Tab. 2), závěry spermioqramu mohou být následující:

- Oligozoospermie: koncentrace spermií  $< 15$  milionů spermií/ml
- Astenozoospermie: progresivní motilita  $< 32$  %
- Teratozoospermie:  $< 4$  % normálních forem
- Hemospermie: přítomnost erytrocytů v ejakulátu
- Pyospermie, leukocytospermie: koncentrace leukocytů  $> 1$  milion/ml
- Oligoastenozoospermie: koncentrace spermií  $< 15$  milionů spermií/ml a zároveň progresivní motilita  $< 32$  %

- Oligoteratozoospermie: koncentrace spermií < 15 milionů spermií/ml a zároveň < 4 % normálních forem
- Oligoastenoteratozoospermie: koncentrace spermií < 15 milionů spermií/ml, progresivní motilita < 32 % a < 4 % normálních forem
- Astenoteratozoospermie: progresivní motilita < 32 % a zároveň < 4 % normálních forem
- Nekrozoospermie: nízké procento živých spermií a zároveň vysoké procento nepohyblivých spermií v ejakulátu
- Hypospermie: objem ejakulátu < 1,5 ml
- Kryptozoospermie: spermie zdánlivě nejsou přítomny v čerstvém ejakulátu, ale jsou nalezeny až po následné centrifugaci vzorku
- Azoospermie: ejakulát zcela bez spermií (po vyloučení kryptozoospermie)
- Aspermie: žádná, případně retrográdní ejakulace

Pokud jsou všechny hodnoty spermioqramu vyšší nebo rovny dolní hranici normy, jedná se o tzv. normozoospermii. Základní hodnocení spermioqramu a jeho závěry v závislosti na sledovaných parametrech jsou znázorněny na Obr. 5



**Obr. 5.** Hodnocení spermioqramu. Převzato a upraveno podle: [www.clinicspots.com](http://www.clinicspots.com)

### 3.3.1 Přehled proteinových markerů pro jednotlivé patologie

Vzhledem k tomu, že analýza spermiogramu se při hodnocení neplodnosti jeví jako velmi nedostatečná, jsou proteiny semenné plazmy předmětem intenzivního výzkumu. Většina níže uvedených prací se zabývá nalezením proteinových markerů (nejčastěji pomocí hmotnostní spektrometrie), které by byly specifické pro konkrétní patologii. U drtivé většiny studií však nebyl nalezen marker, který by se vyskytoval výhradně u dané patologie, nebo který by naopak u dané patologie chyběl. U proteinů v rámci dané patologie však často docházelo ke snížení či zvýšení jejich množství.

Přehled proteinových markerů pro jednotlivé patologie je zpracován v kap. 10 (Samostatné přílohy, Přílohy 1-9).

Potenciální proteinové markery u astenozoospermiků v semenné plazmě blíže popisuje např. Wang et al. (2009) a Wu et al. (2019) (viz Příloha 1). Pro úplnost je v Příloze 2 uveden také přehled proteinových markerů ve spermiích, neboť řada těchto proteinů je v této diplomové práci zmiňována a řadí se mezi proteiny semenné plazmy (např. CLU, SEMG1, PIP). Markery oligozoospermie (viz Příloha 3), teratozoospermie (viz Příloha 4) a oligoteratozoospermie (viz Příloha 6) se zabýval Sharma et al. (2013). Dále byly zkoumány také markery v semenné plazmě specifické pro oligoastenozoospermiky (viz Příloha 5) a oligoastenoteratozoospermiky (viz Příloha 7) (Herwig et al. 2013; Giacomini et al. 2015; Liu et al. 2018). Na závěr jsou uvedeny ještě dvě studie – Milardi et al. (2012), kde byl sledován výskyt proteinů u fertálních pacientů (viz Příloha 8) a Cadavid et al. (2014), kde byly sledovány rozdíly v proteinovém profilu fertálních a infertálních mužů (viz Příloha 9).

Přehled markerů v souvislosti s azoospermii a úspěšnou extrakcí spermií z varlat je uveden níže v samostatných tabulkách (Tab. 3 a Tab. 4, kap. 3.3.2.3 Markery neobstrukční a obstrukční azoospermie).

### 3.3.2 Azoospermie

Azoospermie, tj. nepřítomnost spermií v ejakulátu, postihuje zhruba 15 % mužů trpících poruchami plodnosti (Jarow et al. 1989). Objem ejakulátu u azoospermiků bývá zpravidla v normě, u některých případů mohou být v pořádku i hladiny hormonů (FSH, LH, testosteron, estradiol), což výrazně komplikuje bližší diagnostiku. Před určením této diagnózy je však klíčové vyloučit tzv. kryptozoospermii, kdy lze spermie ve vzorku nalézt, ale až po centrifugaci ejakulátu při 3 000 x g. Analýzu spermiogramu se doporučuje provést opakovaně, a to alespoň dvakrát s intervalem minimálně 2 týdny mezi jednotlivými odběry, aby mohly být vyloučeny přechodné poruchy spermatogeneze způsobené např. toxickými látkami či jinými vlivy prostředí (World Health Organization 2010; Cocuzza et al. 2013).

#### 3.3.2.1 Neobstrukční azoospermie

Nejčastější formou azoospermie (cca 60 % případů) je neobstrukční azoospermie (NOA), jejíž příčinou je různý stupeň narušení spermatogenního epitelu a tím pádem i spermatogeneze. Pacienti s NOA mají typicky měkká, atrofická varlata, charakteristický je také pozměněný hormonální profil. Hladiny FSH, LH a testosteronu mohou být jak zvýšené, tak snížené,



v závislosti na konkrétním subtypu NOA. U řady pacientů se jedná o důsledek genetické poruchy, nicméně neobstrukční azoospermie může být i získaná.

Z hlediska příčin můžeme u neobstrukční azoospermie rozlišit primární testikulární selhání (testikulární příčiny neplodnosti, poruchy spermatogeneze) a sekundární testikulární selhání (pretestikulární příčiny, endokrinní poruchy) (Cocuzza et al. 2013; Wosnitzer et al. 2014; Esteves 2015).

### ***Primární testikulární selhání***

Při primárním testikulárním selhání dochází k přímému poškození varlat, za které může být zodpovědná řada patologických stavů – nesestouplá varlata (kryptorchismus), varikokéla aj. Časté jsou také získané poruchy, ať už se jedná např. o akutní torzi varlat, či o poškození parenchymu varlete v důsledku infekce (typicky plané neštovice během puberty) nebo medikace (chemoterapie, radioterapie) (Cocuzza et al. 2013). Dalším důležitým faktorem jsou genetické poruchy, které vysvětlují zhruba 15 % všech případů azoospermie a až 25 % případů NOA. Nejčastějším typem genetické poruchy je v případě NOA Klinefelterův syndrom, kdy v karyotypu pacienta přebývá jeden či více chromozomů X. Klinefelterův syndrom se může vyskytovat buď jako klasická forma (karyotyp 47 XXY, vzácněji 48 XXXY či dokonce 49 XXXXY), nebo jako tzv. mozaiková forma (karyotyp 46 XY/47 XXY). Obecně platí, že čím vyšší je počet chromozomů X v karyotypu, tím více je narušena spermatogeneze. NOA mohou ale způsobovat i jiné chromozomové aberace, např. syndrom 47 XYY (tzv. syndrom supermale) či syndrom XX male, kdy dojde k translokaci genu SRY, zodpovědného za vznik mužského pohlaví, z chromozomu Y na chromozom X. Takovýto jedinec má pak fenotypové znaky muže, ale z hlediska genotypu se jedná o ženu (Cocuzza et al. 2013; Wosnitzer et al. 2014).

Další častou genetickou poruchou, která postihuje zhruba 10 % pacientů s NOA a až 20 % pacientů s azoospermii, jsou mikrolece na chromozomu Y. Nejčastěji se pak jedná o delece v lokusu AZF (azoospermia factor region), který se nachází na dlouhém raménku chromozomu Y a kóduje řadu proteinů nutných pro správný průběh spermatogeneze (Wosnitzer et al. 2014; Esteves 2015). Region AZF lze rozdělit na tři menší subregiony, označované jako AZFa, AZFb a AZFc (Vogt et al. 1996), přičemž nejčastější je mikrolece AZFc. Mikrolece v AZF lokusu mohou být jak částečné, tak kompletní, s čímž souvisí i různý stupeň poškození spermatogeneze.

Pacienti s kompletní delecí AZFa bývají většinou postiženi tzv. Sertoli-cell only syndromem (Kamp et al. 2001), kdy ve varlatech nejsou přítomny žádné spermatogenní buňky a úspěšnost extrakce spermií z varlat je tím pádem velmi nízká. Naopak u jedinců s delecí v lokusu AZFc se úspěšnost extrakce spermií pohybuje až kolem 70 %, neboť při extrakci spermií lze často nalézt oblasti s reziduální spermatogenezí (Hopps et al. 2003; Park et al. 2013; Yu et al. 2016). Nízkou pravděpodobnost úspěšného získání spermií mají také pacienti s kompletní delecí AZFb a AZFbc, kteří bývají nejčastěji postiženi maturačním blokem (z angl. maturation arrest, MA) či již zmíněným SCO syndromem (Vogt et al. 1996; Hopps et al. 2003; Park et al. 2013). V případě MA bývají sice ve varlatech přítomny spermatogenní buňky, ale jejich zrání je narušeno, tudíž nemůže dojít k jejich vývoji do dalších stádií. Částečné delece v AZF lokusu bývají spojeny s hypospermatogenezí (Ferlin et al. 2007).

U řady pacientů však příčina testikulárního selhání není známa (idiopatické poruchy plodnosti). Předpokládá se, že tyto poruchy jsou taktéž genetického původu, ale zatím neznámého mechanismu. Pokud se u takovýchto pacientů podaří úspěšně provést asistovanou reprodukci, hrozí pak přenos této genetické abnormality do následující generace a snížená či úplná neplodnost u potomků (Cocuzza et al. 2013).

### ***Sekundární testikulární selhání***

Mezi nepříliš časté příčiny NOA řadíme také sekundární testikulární selhání, které je způsobeno endokrinními poruchami gonád. Ty se mohou projevovat např. jako hypogonadotropní hypogonadismus, pro který jsou typické snížené hladiny gonadotropních hormonů (FSH, LH) a s tím související opožděná puberta. Nedostatečná sekrece gonadotropinů může být způsobena např. genetickou poruchou (Kallmanův syndrom, rezistence proti androgenům aj.), případně chemoterapeutiky či určitými typy tumorů. Nejčastější příčinou hypogonadotropního hypogonadismu je Kallmanův syndrom. U pacientů dochází k narušené migraci neuronů hypotalamu sekretujících GnRH (z angl. gonadotropin releasing hormone, gonadotropin uvolňující hormon či gonadoliberin), v důsledku čehož hypofýza není dostatečně stimulovaná k tvorbě gonadotropních hormonů. Vzhledem k tomu, že gonadotropiny (především LH) působí stimulačně na produkci testosteronu, je při tomto onemocnění jeho hladina nízká. Syndrom se projevuje také vývojovými defekty (např. rozštěpem patra) či poruchami čichu (Cocuzza et al. 2013).

### ***Léčba neobstrukční azoospermie***

U pacientů s NOA je třeba vyšetřit objem a konzistenci varlat. Všímáme si celkového fyzického vzhledu, eunuchoidních rysů, gynekomastie. Důležitá je také anamnéza pacienta, sledujeme především, zda pacient prodělal poranění genitálu, infekční onemocnění s možným poškozením varlat nebo zda podstoupil chemoterapii či radioterapii. U pacientů s poruchami ejakulace je třeba provést vyšetření vzorku moči pro vyloučení retrográdní ejakulace. Dále provádíme genetické vyšetření karyotypu a vyšetření hormonálních hladin (Esteves et al. 2011; Cocuzza et al. 2013).

Pokud hormonální profil není v pořádku, může pacient podstoupit hormonální léčbu s cílem navození normální spermatogeneze. Její úspěšnost ale není příliš vysoká, a proto se k této léčbě přistupuje jen velmi zřídka, např. v případě hypogonadotropního hypogonadismu (Esteves 2015). Častěji se proto provádí extrakce spermií, které je možné buď kryokonzervovat nebo rovnou použít pro intracytoplazmatickou injekci spermií (z angl. intracytoplasmic sperm injection, ICSI). Přesnější diagnózu umožňuje určit také histopatologické vyšetření, jedná se však o vyšetření invazivní, a především značně nepřesné. Výsledky biopsie mohou poukazovat na různý stupeň poškození spermatogeneze – hypospermatogenezi, maturační blok, atrofii tubulů či Sertoli-cell only syndrom (SCOs). Možné jsou také různé přechody mezi těmito variantami, či přítomnost více zmíněných poruch současně (Cocuzza et al. 2013; Esteves 2015).

Až u 20-30 % případů SCOs však dojde k úspěšné extrakci spermií (Modarresi et al. 2015; Mehmood et al. 2019). Možnosti biopsie jsou totiž omezené, neboť je odebrán vždy jen určitý počet vzorků, který nemusí zcela přesně odrážet stav spermatogeneze v celém varletí. Ve varletí se tak mohou současně vyskytovat oblasti odpovídající SCOs

zároveň s oblastmi, kde ke spermatogenezi (byť v minimální míře) dochází – tzv. oblasti s fokální spermatogenezí (Cocuzza et al. 2013; Esteves 2015).

Extrakce spermií se provádí buď metodou TESE (z angl. testicular sperm extraction, testikulární extrakce spermií), kdy odebíráme několik vzorků tkáně z varlete, případně její bezpečnější a z hlediska šance na extrakci spermií i úspěšnější variantou – microTESE (z angl. microsurgical testicular sperm extraction, mikrochirurgická testikulární extrakce spermií) (Esteves 2015).

### 3.3.2.2 Obstrukční azoospermie

U zbylých 40 % pacientů je důvodem azoospermie obstrukce pohlavních cest, ke které může dojít kdekoliv od *rete testis* až po *ductus ejaculatorius*. Obstrukční azoospermie (OA) bývá také označována jako posttestikulární příčina neplodnosti. Pro OA jsou typické normální hladiny hormonů, spermatogeneze nebývá narušena. V pořádku je i objem a konzistence varlat, naopak nadvarlata bývají typicky tvrdší.

Obstrukční azoospermie může být získaná, ať už cíleným zákrokem (vasektomie) nebo jako důsledek nesprávně provedeného vyšetření či operace. K výše zmíněnému typicky dochází např. po operaci tříselné kýly či po vasografii, výjimkou však není ani vznik obstrukční azoospermie po zákrocích jako je biopsie nadvarlat či extrakce spermií metodami PESA (z angl. percutaneous epididymal sperm aspiration, perkutánní epididymální aspirace spermií) a MESA (z angl. microsurgical epididymal sperm aspiration, mikrochirurgická aspirace spermií z nadvarlete). Obstrukce může být také způsobena traumatem v oblasti pánve. V neposlední řadě se na vzniku OA podílejí i urogenitální infekce (Wosnitzer et al. 2014).

Důvodem obstrukční azoospermie jsou však i vrozené poruchy. Nejčastěji se jedná o unilaterální či bilaterální absenci chámovodu, která může být spojena i s nepřítomností určitých částí nadvarlete. Obstrukci mohou způsobit také cystické útvary na Müllerových či Wolffových vývodech během nitroděložního vývoje. Řada pacientů s absencí chámovodu má zároveň mutaci v genu *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), která zapříčiňuje vznik cystické fibrózy. Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění, projeví se tedy pouze, jsou-li v genotypu pacienta mutované obě alely. Pokud jsou oba rodiče nositeli mutované alely, hrozí ve 25 % případech narození postiženého dítěte. U jedinců pozitivních na tuto mutaci se proto doporučuje také genetické testování partnerky (Cocuzza et al. 2013; Wosnitzer & Goldstein 2014; Wosnitzer et al. 2014).

Možnou terapii představuje opětovné zprůchodnění vývodných pohlavních cest operačně. Pokud rekonstrukci nelze provést, např. v případě bilaterální absence chámovodů, přistupuje se k punkci spermií z nadvarlete metodou MESA, případně k TESE (Wosnitzer & Goldstein 2014; Wosnitzer et al. 2014).

### 3.3.2.3 Markery neobstrukční a obstrukční azoospermie

Nejspolehlivější metodou pro odlišení obstrukční a neobstrukční azoospermie je bohužel stále biopsie varlat (Dohle et al. 2012). V případě OA zůstává spermatogenní epitel zpravidla neporušený, opačný nález pak poukazuje na poruchy spermatogeneze a na neobstrukční azoospermii. Ačkoliv se jedná o poměrně rutinní zákrok, stále je to metoda invazivní a při nesprávném provedení může dojít i ke krvácení či k poškození varleční tkáně. V posledních

letech proto probíhá intenzivní výzkum markerů, které by byly absolutně specifické pro jednu či druhou skupinu, a pacienti by tak nebyli nuceni tento zákrok absolvovat.

Velký přínos by představovalo také nalezení markeru, který by odrážel pravděpodobnost úspěšné extrakce spermií u mužů s neobstrukční azoospermií. Jak již bylo uvedeno výše, u řady pacientů, jimž byl na základě biopsie varlat diagnostikován SCO syndrom, se setkáváme s úspěšnou extrakcí spermií, neboť biopsie je velmi nepřesná a ve většině případů nedokáže odhalit místa s fokální spermatogenezí (Modarresi et al. 2015). Přehled dosavadních studií týkajících se proteinových markerů azoospermie je uveden v Tab. 3. Mezi nejzajímavější práce na toto téma patří mj. studie Drabovich et al. (2013), kde je popsáno využití dvou proteinů (ECM1 a TEX101) pro diferenciální diagnostiku OA a NOA. Řada publikací se věnovala také studiu těchto markerů na úrovni mRNA, jejich přehled je uveden v Tab. 4. Velké množství potenciálních markerů azoospermie bylo charakterizováno v rámci velmi obsáhlých proteomických studií (Batruch et al. 2011, 2012), vzhledem k jejich rozsahu jsme je však do tabulky markerů nezahrnovali.

**Tab. 3.** Přehled proteinových markerů azoospermie v semenné plazmě.

Proteinový marker	Výsledek	Zdroj	Poznámka
prolactin-inducible protein (PIP)	absence u OA	Yamakawa 2007	ale absence i u některých NOA
epididymal secretory protein E1 (NPC2)	absence u OA		
testis expressed 101 (TEX101)	výrazně snížený u PV oproti FK	Drabovich 2011	
L-lactate dehydrogenase C chain (LDHC)	výrazně snížený u PV oproti FK		
prostaglandin-H2 D-isomerase (PTGDS)	výrazně snížený u PV oproti FK		
sperm-associated antigen 11B (SPAG11B)	mírně snížený u PV oproti FK		
mucin 15 (MUC15)	mírně snížený u PV oproti FK		
epididymal secretory protein E3-beta (HE3B, EDDM3B, FAM12B)	mírně snížený u PV oproti FK		
fibronectin (FINC)	zvýšený u A oproti N	Davalieva 2012	
prostatic acid phosphatase (PAP)	zvýšený u A oproti N, As, O		
proteasome subunit alpha type-3 (PSA3)	zvýšený u Azoo oproti N a As		
beta-2-microglobulin (B2MG)	zvýšený u A oproti N a As		
galectin-3-binding protein (LG3BP)	zvýšený u A oproti O		
prolactin-inducible protein (PIP)	zvýšený u A oproti O		
cytosolic non-specific dipeptidase (CNDP2)	zvýšený u A oproti As		
transketolase-like protein (TKTLI)	snížený u NOA, OA, PV oproti N	Rolland 2013	kontrolní (fertilní) jedinec byl pouze jeden!
L-lactate dehydrogenase C chain (LDHC)	snížený u NOA, OA, PV oproti N		
phosphoglycerate kinase 2 (PGK2)	snížený u NOA, OA, PV oproti N		
cysteine-rich secretory protein 1 (CRISP1)	snížený nebo absence u OA oproti N a NOA	Légaré 2013	
extracellular matrix protein 1 (ECM1) a testis expressed 101 (TEX101)	viz poznámka	Drabovich 2013, Korbakis 2017	využití těchto 2 markerů k odlišení OA a NOA (a následně jednotlivých subtypů NOA) na základě jejich koncentrace

*Vysvětlivky: A – azoospermie, As – astenozoospermie, FK – kontrolní (fertilní) jedinci, N – normozoospermie, NOA – neobstrukční azoospermie, PV – pacienti po provedené vasektomii, O – oligozoospermie, OA – obstrukční azoospermie*

**Tab. 4.** Přehled markerů azoospermie na úrovni mRNA.

Marker	Studovaný biologický materiál	Výsledek	Zdroj
CLU	testikulární tkáň	snížení u pacientů se spermatogenní poruchou (konstitutivní či idiopatickou)	Plotton 2006
SCF		snížení u pacientů se spermatogenní poruchou (konstitutivní či idiopatickou)	
DAZ a PRM2	semenná plazma	oba dva transkripty zároveň přítomny u pacientů, u kterých byly v testikulární tkáni nalezeny spermatogonie a spermaticy	Aslani 2011
DAZ, PRM2, PRM1 a AKAP4		nepřítomnost všech transkriptů u pacientů s SCO	
DDX4	semenná plazma	využití k identifikaci pacientů s SCO (přesnější než histopatologické vyšetření)	Yu 2016
poměr KDM3A a PRM1	testikulární tkáň	využití jako marker úspěšné TESE u pacientů s OA/NOA	Javadirad 2016

*Vysvětlivky: mRNA – mediátorová RNA (z angl. messenger RNA), NOA – neobstrukční azoospermie, OA – obstrukční azoospermie, SCO – z angl. Sertoli-cell only syndrom, TESE – testikulární extrakce spermií (z angl. testicular sperm extraction)*

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Materiál

Vzorky semenné plazmy byly poskytnuty několika níže uvedenými IVF centry po informovaném souhlasu pacientů.

Vzorky semenné plazmy (viz Tab. 5) byly poskytnuty Sexuologickým ústavem 1. lékařské fakulty UK (Praha). Vzhledem k tomu, že se jednalo o starší vzorky, byly použity pouze pro prvotní screening proteinového profilu semenné plazmy (viz kap. 5.1). Vzorky semenné plazmy (viz Tab. 6) byly poskytnuty Imunologickou laboratoří IVF centra GENNET (Praha). Tyto novější vzorky byly použity k porovnání proteinového profilu a pro následnou detekci sacharidových struktur proteinů semenné plazmy (viz kap. 5.2-5.5). Vzorky semenné plazmy (viz Tab. 7) byly poskytnuty Embryologickou a andrologickou laboratoří Gynekologicko-porodnické kliniky LF MU a FN Brno. Tyto vzorky byly použity pro detekci epididymálního proteinu clusterinu (viz kap. 5.6).

Vzorky ejakulátu byly po ztekucení (cca 30 min) odstředěny v centrifuze (300 x g, 10 minut), čímž došlo k separaci spermií od semenné plazmy. Odebraná semenná plazma byla poté opět odstředěna v chlazené centrifuze (10 000 x g, 10 min, 4 °C) a zamražena.

**Tab. 5.** Vzorky semenné plazmy poskytnuté Sexuologickým ústavem 1. lékařské fakulty UK (Praha).

Vzorek č.1	N	Normozoospermie
Vzorek č.4	OAs	Oligoastenozoospermie
Vzorek č.6	As	Astenozoospermie
Vzorek č.9	OAsT	Oligoastenoteratozoospermie

**Tab. 6.** Vzorky semenné plazmy poskytnuté Imunologickou laboratoří IVF centra GENNET (Praha).

Normozoospermie	Astenozoospermie	Oligozoospermie
N 4969	As 5053	O 4664
N 5406	As 5146	O 5210
N 5552	As 5913	O 5248
N 5746	As 7148	O 5688
N 5880	As 7256	O 5813
N 5883		

**Tab. 7.** Vzorky semenné plazmy poskytnuté Embryologickou a andrologickou laboratoří Gynekologicko-porodnické kliniky LF MU a FN Brno.

N	Normozoospermie
NOA	Neobstrukční azoospermie
OA	Obstrukční azoospermie
V1	Azoospermie po vasektomii
V2	Azoospermie po vasektomii
VKR	Kryptozoospermie po vasektomii
KR	Kryptozoospermie

## 4.2 Metodika

Pokud není uvedeno jinak, byly použity chemikálie od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) či Merck (Darmstadt, Germany).

### 4.2.1 Příprava vzorků semenné plazmy

Vzorky semenné plazmy byly odstředěny v centrifuze (Hettich Mikro 22R, Hettich, Tuttlingen, Germany) při 10 000 x g po dobu 10 minut, při teplotě 4 °C. Do nové mikrozkuhavky bylo následně odebráno 50 µl vzniklého supernatantu, ke kterému bylo přidáno 300 µl vychlazeného acetonu. Vzorky byly poté umístěny do mrazáku na dobu 1 hodiny a během této doby byly vzorky několikrát protřepány. Po uplynutí 1 hodiny byly vzorky opět zcentrifugovány (7 000 x g, 5 minut, 4 °C). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant (aceton) a k vzniklé peletě bylo přidáno 80 µl (neredukujícího) vzorkového pufru pro SDS (0,5 M TRIS-HCl (Bio-Rad, Hercules, California, USA), pH 6,8; glycerol; 2% SDS; 0,05% bromfenolová modř).

Poměr supernatantu a vzorkového pufru byl zvolen tak, aby výsledná nanáška vzorku na gel odpovídala doporučené hodnotě 25 µg proteinu na jamku. U vzorků semenné plazmy byla odhadnuta průměrná koncentrace proteinů cca 40 mg/ml. Celkové množství proteinů ve vzorku pro denzitometrické analýzy (kap. 4.2.6) bylo stanoveno po barvení separovaných proteinů přenesených na nitrocelulózu (NC) membránu pomocí roztoku Ponceau (kap. 4.2.3).

Takto připravený vzorek byl opakovaně krátce inkubován při 100 °C na třepačce (Thermo-Shaker TS-100, Biosan SIA, Riga, Latvia) a promíchán (Vornado Vortex Mixer, Benchmark Scientific, USA), dokud nedošlo k úplnému rozpuštění pelety ve vzorkovém pufru.

### 4.2.2 SDS elektroforéza

Byla provedena vertikální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS). Nejprve byla sestavena aparatura dle návodu (Mini-PROTEAN Tetra, Bio-Rad, Hercules, California, USA). Následně byl připraven separační a zaostřovací gel. Uvedené objemy platí pro přípravu 2 polyakrylamidových gelů.

Jako první byl připraven 12% separační gel z těchto složek: 3,5 ml destilovaná voda, 4 ml 30% akrylamid/bis-akrylamid (Bio-Rad, Hercules, California, USA), 2,5 ml 1,5 M Tris. HCl pH 8,8 (Bio-Rad, Hercules, California, USA), 100 µl 10% SDS, 4,5 µl



tetramethylethylendiamin (TEMED), 70  $\mu$ l persíran amonný (APS). Takto připravený roztok byl pomocí pipety okamžitě nalit mezi skla aparatury a následně převrstven destilovanou vodou. Separační gel byl ponechán polymerovat 30 minut při laboratorní teplotě.

Dále následovala příprava zaostřovacího gelu z následujících složek: 1,52 ml destilovaná voda, 625  $\mu$ l 0,5 M Tris HCl pH 6,8 (Bio-Rad, Hercules, California, USA), 325  $\mu$ l 30% akrylamid/bis-akrylamid (Bio-Rad, Hercules, California, USA), 25  $\mu$ l 10% SDS, 3,8  $\mu$ l TEMED, 50  $\mu$ l 10% APS.

Destilovaná voda mezi skly byla po skončení polymerace separačního gelu odlita a místo ní byl pomocí pipety nalit zaostřovací gel. Okamžitě poté byly do zaostřovacího gelu vloženy hřebeny pro tvorbu jamek. Polymerace zaostřovacího gelu probíhala cca 10 minut.

Skla byla umístěna do aparatury dle návodu a přelita elektrodoým pufrem. Zásobní (5x koncentrovaný) elektrodoý pufř byl připraven z těchto složek: 15 g Tris, 72 g glycin, 5 g SDS, 1 l destilovaná voda, následně byl nařeďen destilovanou vodou v poměru 1:4. Po vyjmutí hřebíků byly do vzniklých jamek nanoseny 3  $\mu$ l proteinových hmotnostních standardů (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad, Hercules, California, USA) a 5  $\mu$ l připravených vzorků semenné plazmy. Po nanesení vzorků do jamek byla sestavená aparatura připojena ke zdroji stejnosměrného napětí. Separace proteinů probíhala nejprve 30 minut při 80 V, poté cca 1 hodinu 15 minut při 140 V.

Aparatura byla následně odpojena od zdroje napětí a rozebrána. Gely byly promyty v destilované vodě a následně obarveny na proteiny pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25 g Coomassie Blue R-250, 45 ml metanolu, 9 ml kyseliny octové do 100 ml destilované vody) nebo umístěny do transferového pufru pro Western blot (3,03 g Tris, 14,4 g glycin, 800 ml destilovaná voda, 200 ml methanol).

#### **4.2.3 Western blot**

Separované proteiny byly z gelu přeneseny na nitrocelulóзовou (NC) membránu (Amersham Protran, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) metodou elektropřenosu Western blot. Pro přenos jsme použili aparaturu firmy Bio-Rad (Hercules, California, USA). Houbičky, NC membrána a filtrační papíry Whatman (Whatman cellulose chromatography paper, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) byly nejprve po dobu cca 5 minut umístěny do transferového pufru. Poté byly do kazety pro Western blot umístěny následující komponenty: houbička, 2 filtrační papíry, gel, NC membrána, opět 2 filtrační papíry a houbička. Sestavená kazeta byla vložena do aparatury a zalita transferovým pufrem. Elektropřenos proteinů probíhal při 500 mA po dobu cca 75 minut, aparatura byla v průběhu přenosu chlazená ledem.

Po skončení elektropřenosu byla kazeta rozebrána, membrána byla opláchnuta v destilované vodě a na 1 minutu umístěna do roztoku barvy Ponceau. Poté byla obarvená membrána opět promyta v destilované vodě, byla provedena její fotodokumentace a poté byla umístěna do roztoku PBS (Phosphate-buffered saline, pH 7,4) s 0,1% Tweenem 20 (PBS-T).

#### **4.2.4 Detekce sacharidových struktur pomocí lektinů**

Membrána byla přenesena do roztoku 1% želatiny (Gelatin from cold water fish skin, Sigma, Canada) v PBS, čímž bylo dosaženo deaktivace volných míst. Inkubace s želatinou

probíhala po dobu 1 hodiny na lineární třepačce (SK-L180-E, DLAB Scientific, California, USA), následně byla membrána opět promyta v PBS-T. Membrána byla poté inkubována s biotinem značenými lektiny, uvedenými v Tab. 8.

**Tab. 8.** Použité biotinem značené lektiny.

Název lektinu	Výrobce	Specifita
<b>ConA</b> Concanavalin A	Sigma-Aldrich	$\alpha$ -D-manóza > $\alpha$ D-glukóza
<b>MAA</b> <i>Maackia amurensis</i> lectin		
<b>SNA</b> <i>Sambucus nigra</i> lectin	Vector laboratories	N-acetylneuraminová (sialová) kyselina ( $\alpha$ 2,6) D-galaktóza/N-acetyl-D- galaktosamin
<b>UEA</b> <i>Ulex europaeus</i> agglutinin		

Lektiny byly ředěny HEPES pufrém (10 mM HEPES, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,01 mM MnCl<sub>2</sub>) tak, abych jejich výsledná koncentrace byla 5 µg/ml. Jako negativní kontrola byla membrána s přenesenými proteiny inkubována pouze s HEPES pufrém. Inkubace probíhala přes noc v lednici. Druhý den byla membrána promývána 3krát po 10 minutách v PBS-T na rotační třepačce (MX-T6-Pro, DLAB Scientific, California, USA). Následovala inkubace membrány s avidinem konjugovaným s křenovou peroxidázou v koncentraci 1 µg/ml v PBS. Inkubace probíhala 1 hodinu na rotační třepačce, poté byla membrána promyta 6krát po 5 minutách v PBS-T.

Pro vizualizaci sacharidových struktur na membráně byl použit chemiluminiscenční substrát Super Signal West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), který slouží jako substrát pro křenovou peroxidázu. Ihned poté byla provedena detekce chemiluminiscence pomocí přístroje Azure (Azure c300 Gel Imaging System, Azure Biosystems, Dublin, California, USA).

#### 4.2.5 Detekce proteinů pomocí protilátky

Membrána byla umístěna do roztoku 5% sušeného mléka (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad, Hercules, California, USA) v PBS, čímž bylo dosaženo deaktivace volných míst. Inkubace s 5% roztokem mléka probíhala po dobu 1 hodiny na lineární třepačce (SK-L180-E, DLAB Scientific, California, USA), následně byla membrána opět promyta v PBS-T. Membrána byla inkubována přes noc v lednici s monoklonální myší protilátkou proti clusterinu Hs-3 (Čapková et al. 2002). Protilátka byla ředěna v PBS v poměru 1:250. Negativní kontrola byla inkubována pouze s PBS.

Druhý den byla membrána promývána 3krát po 10 minutách v PBS-T na rotační třepačce. Následovala inkubace membrány se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou (Goat Anti-Mouse IgG (H+L): HRP, Bio-Rad, Hercules, California, USA). Sekundární protilátka byla ředěna v PBS v poměru 1:3 000. Inkubace probíhala 1 hodinu

na rotační třepače, poté byla membrána promyta 6krát po 5 minutách v PBS-T. Pro vizualizaci proteinů na membráně byl použit chemiluminiscenční substrát Super Signal West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), který slouží jako substrát pro křenovou peroxidázu. Ihned poté byla provedena detekce chemiluminiscence pomocí přístroje Azure (Azure c300 Gel Imaging System, Azure Biosystems, Dublin, California, USA).

#### **4.2.6 Denzitometrická analýza**

U detekovaných sacharidových a proteinových struktur byla provedena denzitometrická analýza pomocí softwaru Image Studio Lite Ver 5.2 (LI-COR Biotechnology, Lincoln, Nebraska, USA). Výsledky denzitometrické analýzy byly dále vyhodnocovány v programu Microsoft Excel a normalizovány tak, aby hodnoty optické denzity byly vždy vztaženy k nejmenší hodnotě daného vzorku (při porovnávání vzorků se stejným spermioqramem) nebo k hodnotě odpovídající vzorku normozoospermika (při porovnávání vzorků s různým spermioqramem). Pro minimalizaci rozdílů v míře signálu v závislosti na nanášce, byla míra signálu daného lektinu (resp. protilátky) vztažena k celkovému signálu odpovídajícího barvení proteinů na membráně pomocí Ponceau.

V programu Microsoft Excel byly pomocí kalibračních křivek stanoveny přibližné molekulové hmotnosti glykoproteinových a proteinových proužků. Statistické šetření jsme prováděli pouze u porovnávání vzorků s různým spermioqramem pomocí jednofaktorového ANOVA testu v programu Microsoft Excel.

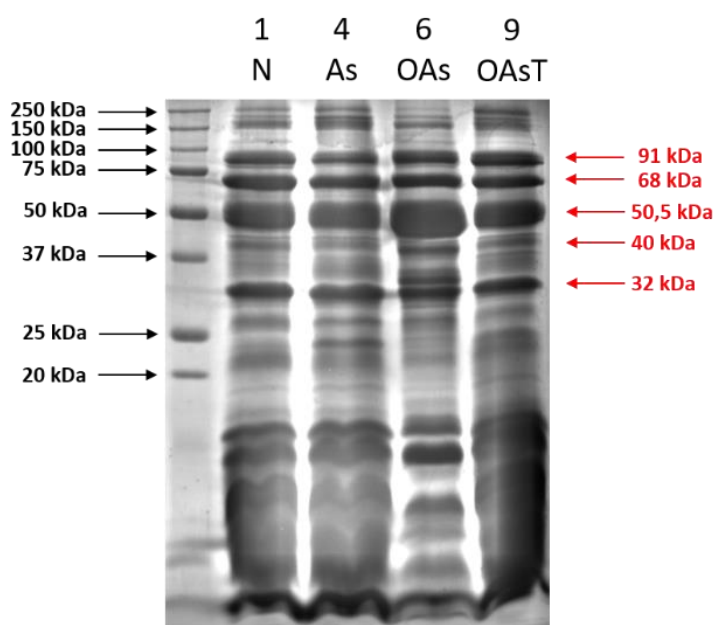
## 5 Výsledky

Byla sledována reaktivita vybraných lektinů (ConA, MAA, SNA a UEA) a protilátky proti clusterinu se vzorky semenné plazmy (SP) mužů s různým spermioqramem. Pokud není uvedeno jinak, byly pro každý lektin (resp. protilátku) provedeny 4 detekční analýzy, a to porovnání 3 vzorků s různým spermioqramem (N, As, O) a porovnání vždy 4 vzorků se stejným spermioqramem, tzn. 4x vzorek N, 4x As a 4x O. Porovnávání vzorků s různým spermioqramem bylo ve většině případů provedeno opakovaně, aby bylo možné výsledky statisticky vyhodnotit. U porovnávání vzorků s různým spermioqramem do výsledků uvádíme pouze jeden reprezentativní obrázek detekce sacharidových struktur glykoproteinů, resp. clusterinu na NC membráně. Porovnávání vzorků se stejným spermioqramem bylo provedeno pouze jednou. Densitometrická analýza míry vazby daného lektinu (resp. protilátky) byla vztažena k celkové nanášce proteinů ve vzorku.

V případě lektinů i protilátky proti clusterinu byla sledována jak celková reaktivita u daného vzorku (celková míra detekovaného signálu), tak reaktivita u vybraných glykoproteinových a proteinových proužků. Vybrané proteinové proužky a jejich molekulová hmotnost jsou označeny červenými šipkami s popisky.

### 5.1 Proteinový profil semenné plazmy

Vzorky SP byly elektroforeticky rozděleny a gel byl obarven pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 pro vizualizaci proteinů (viz kap. 4.2.2). Výsledky tohoto barvení jsou zobrazeny na Obr. 6. V proteinovém profilu semenné plazmy nebyly mezi vzorky pozorovány žádné výraznější rozdíly. Statistické hodnocení jsme však v tomto případě neprováděli (barvení na proteiny bylo provedeno pouze jednou). U nejvíce zastoupených proteinů, které byly všem vzorkům společné, jsme určili jejich přibližnou molekulovou hmotnost (91, 68, 50,5, 40 a 32 kDa).

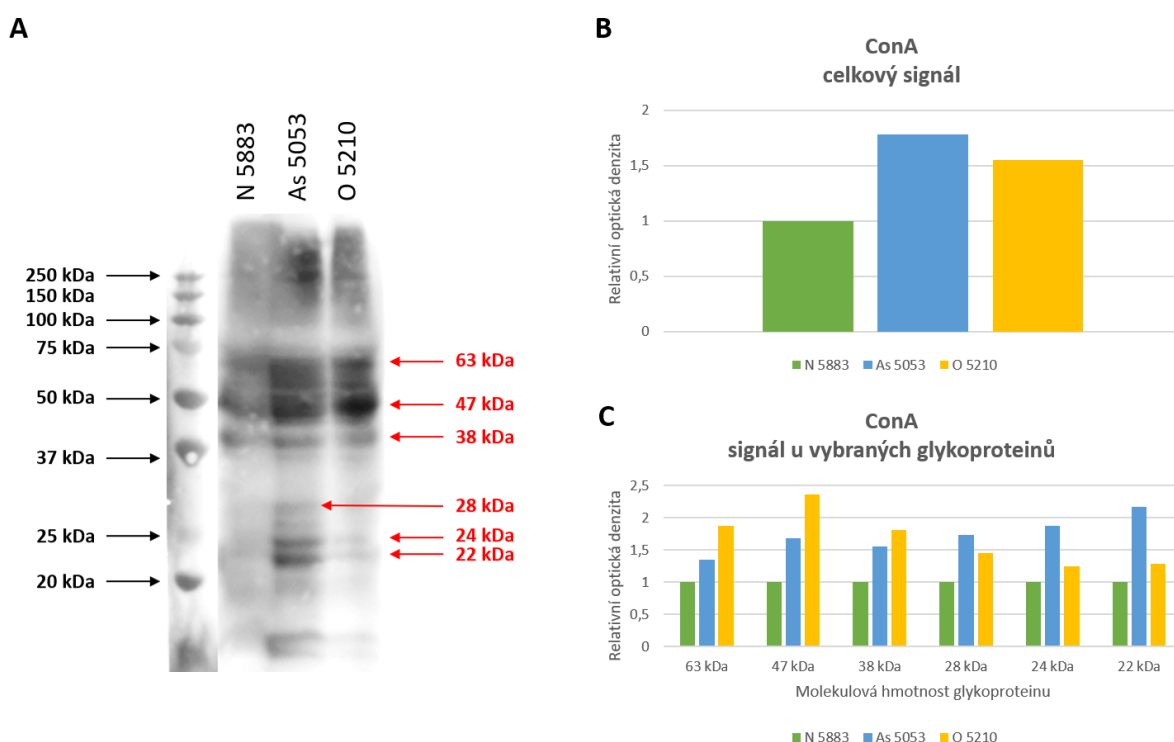


**Obr. 6.** Vizualizace proteinů semenné plazmy pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250. Přibližná molekulová hmotnost vybraných proteinů je znázorněna červenými šipkami. N – normozoospermie, As – astenozoospermie, OAs – oligoastenozoospermie, OAsT – oligoastenoteratozoospermie.

## 5.2 Detekce glykoproteinů pomocí ConA (Concanavalin A)

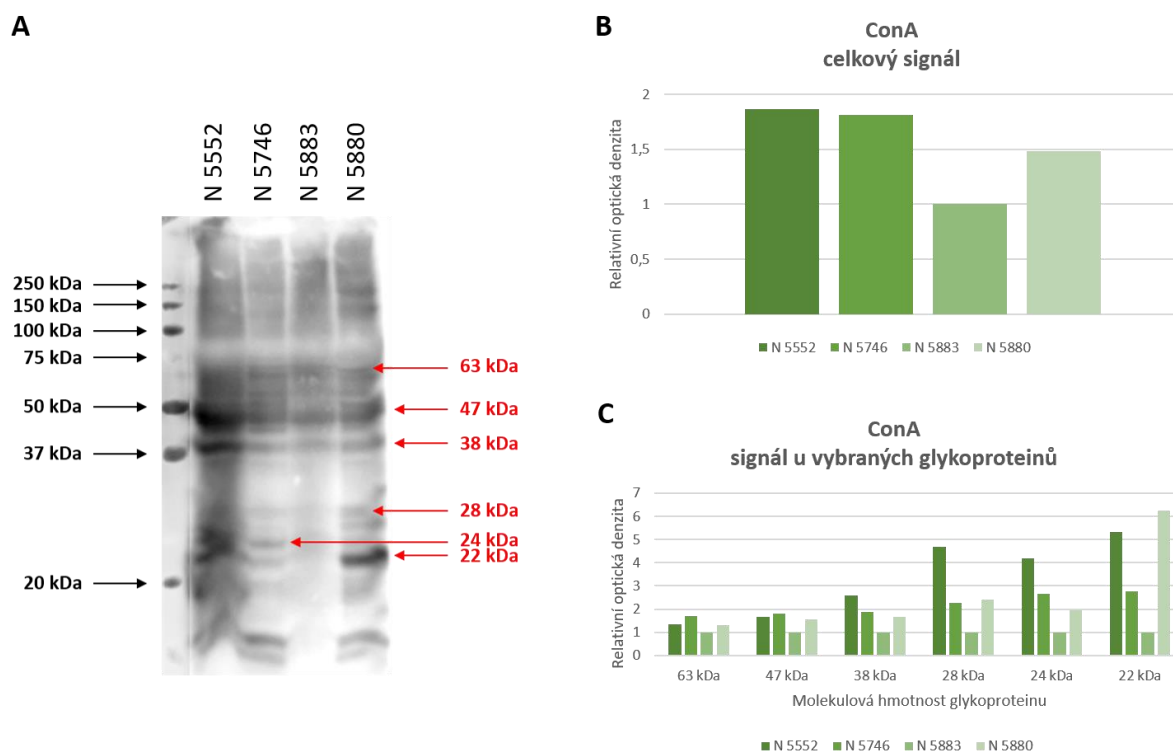
Byla provedena detekce sacharidových struktur v glykoproteinech SP (viz kap. 4.2.4) pomocí lektinu ConA, který specificky váže manózoové zbytky. Denzitometrická analýza míry vazby ConA byla vztažena k celkové nanášce proteinů ve vzorku. Mezi glykoproteinovým profilem specifickým pro ConA nebyly u použitých vzorků nalezeny žádné významnější rozdíly, a to jak pro celkovou míru detekovaného signálu, tak ani pro míru signálu u vybraných glykoproteinových proužků. ConA reagoval u všech vzorků s vybranými glykoproteiny o těchto molekulových hmotnostech – 63, 47, 38, 28, 24 a 22 kDa (Obr. 7A-10A). Porovnávání vzorků s různým spermioqramem bylo z časových důvodů provedeno pouze jednou, proto také nebylo v případě tohoto lektinu provedeno statistické šetření.

Při porovnávání vzorků s různým spermioqramem (Obr. 7) byla celková míra signálu vazby ConA nejvyšší u vzorku astenozoospermika (As 5053). Tento vzorek také vykazoval nejvyšší míru signálu u glykoproteinů v nižších mol. hm. (22-28 kDa). U glykoproteinů s vyššími mol. hm. (38-63 kDa) byla naopak nejvyšší míra signálu vazby ConA pozorována u vzorku oligozoospermika (O 5210). U glykoproteinů s mol. hm. 38 a 28 kDa byl signál v rámci vzorků (N 5883, As 5053, O 5210) podobné intenzity.



**Obr. 7.** Detekce glykoproteinů pomocí ConA – porovnávání vzorků s různým spermioqramem. A – detekce glykoproteinů na NC membráně pomocí ConA. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro ConA. C – míra signálu pro ConA u vybraných glykoproteinových proužků. N – normozoospermie, As – astenozoospermie, O – oligozoospermie.

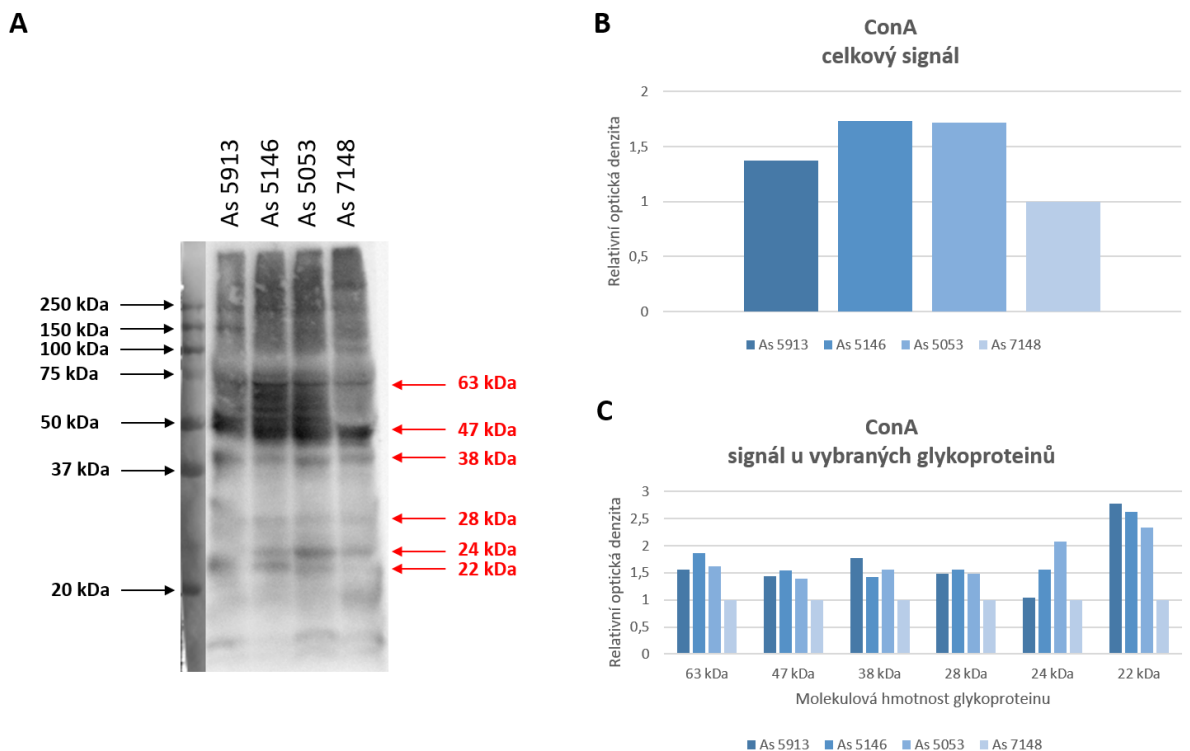
Při porovnávání vzorků se stejným spermioqramem (normozoospermici, Obr. 8) byla nejvyšší celková míra signálu ConA pozorována u vzorků N 5552 a N 5746 (u těchto vzorků byla míra signálu srovnatelná), nejnižší celková míra signálu byla zaznamenána u vzorku N 5883 (Obr. 8B). U vzorků normozoospermiků byly pozorovány největší rozdíly v míře signálu pro jednotlivé glykoproteiny u glykoproteinů v nižších mol. hm. 22-28 kDa. Naopak u glykoproteinů ve vyšších mol. hm. (63, 47 a 38 kDa) byl signál pro všechny 4 vzorky normozoospermiků srovnatelný. U glykoproteinů s mol. hm. 28 a 24 kDa byl pozorován výrazný signál u vzorku N 5552, u glykoproteinu s mol. hm. 22 kDa byl výrazný signál u vzorku N 5552 a N 5880. Nejnižší míru signálu s Con A u všech sledovaných glykoproteinů jsme zaznamenali u vzorku N 5883.



**Obr. 8.** Detekce glykoproteinů pomocí ConA – porovnávání vzorků se stejným spermioqramem (N – normozoospermici). A – detekce glykoproteinů na NC membráně pomocí ConA. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro ConA u vybraných vzorků normozoospermiků. C – míra signálu pro ConA u vybraných glykoproteinových proužků.

Při porovnávání vzorků astenozoospermiků (Obr. 9) byla nejvyšší celková míra signálu s Con A pozorována u vzorků As 5146 a As 5053, kdy míra signálu byla u těchto dvou vzorků srovnatelná, nejnižší celková míra signálu byla zaznamenána u vzorku As 7148. Podobně jako u normozoospermiků byly i u astenozoospermiků pozorovány největší rozdíly v míře signálu pro jednotlivé glykoproteiny v nižších mol. hm. (24 a 22 kDa). Tento rozdíl byl nejvýraznější u glykoproteinu s mol. hm. 22 kDa, kde vzorky As 5913, As 5146 a As 5053 vykazovaly cca 2,5krát vyšší míru signálu, než vzorek As 7148 (Obr. 9C). Celková míra signálu i míra signálu pro jednotlivé glykoproteiny obsahující manózoové zbytky byla u vzorků astenozoospermiků výrazně vyrovnanější, než mezi normozoospermiky a oligozoospermiky.

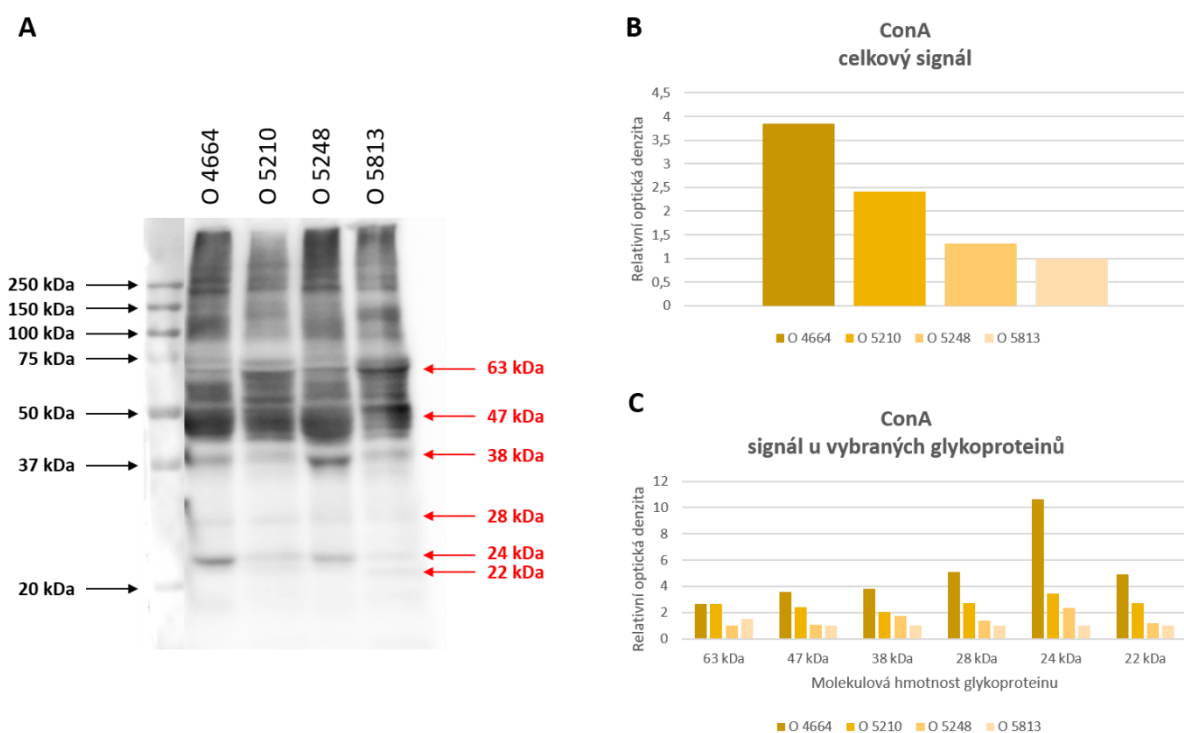
Nejnižší míra signálu u všech sledovaných glykoproteinů byla u astenozoospermiků pozorována u vzorku As 7148 (tj. stejně jako v případě celkové míry signálu).



**Obr. 9.** Detekce glykoproteinů pomocí ConA – porovnávání vzorků se stejným spermioqramem (As – astenozoospermici). A – detekce glykoproteinů na NC membráně pomocí ConA. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro ConA u vybraných vzorků astenozoospermiků. C – míra signálu pro ConA u vybraných glykoproteinových proužků.

Při porovnávání vzorků oligozoospermiků (Obr. 10) byla ve vazbě ConA pozorována nejvyšší variabilita ve srovnání se skupinami normozoospermiků a astenozoospermiků, a to jak v míře celkového signálu, tak v míře signálu pro jednotlivé glykoproteiny.

Nejvyšší celková míra signálu byla u oligozoospermiků zaznamenána u vzorku O 4664. U tohoto vzorku dosahoval signál téměř čtyřnásobných hodnot oproti vzorku O 5813, kde byla celková míra signálu nejnižší. Nejvyšší míra signálu u vzorku O 4664 byla u oligozoospermiků zaznamenána také u všech sledovaných glykoproteinů, naopak nejslabší vazba s ConA byla u oligozoospermiků pozorována u vzorku O 5813 (Obr. 10B), a to s výjimkou glykoproteinu s mol. hm. 63 kDa. U něj byla nejnižší míra signálu pozorována u vzorku O 5248. Nejvýraznější variabilita v míře signálu byla u oligozoospermiků zaznamenána u glykoproteinu s mol. hm. 24 kDa, kde signál u O 4664 dosahoval více než 10násobných hodnot, než u vzorku O 5813 (Obr.10C).



**Obr. 10.** Detekce glykoproteinů pomocí ConA – porovnávání vzorků se stejným spermioqramem (O – oligozoospermici). A – detekce glykoproteinů na NC membráně pomocí ConA. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro ConA u vybraných vzorků oligozoospermiků. C – míra signálu pro ConA u vybraných glykoproteinových proužků.

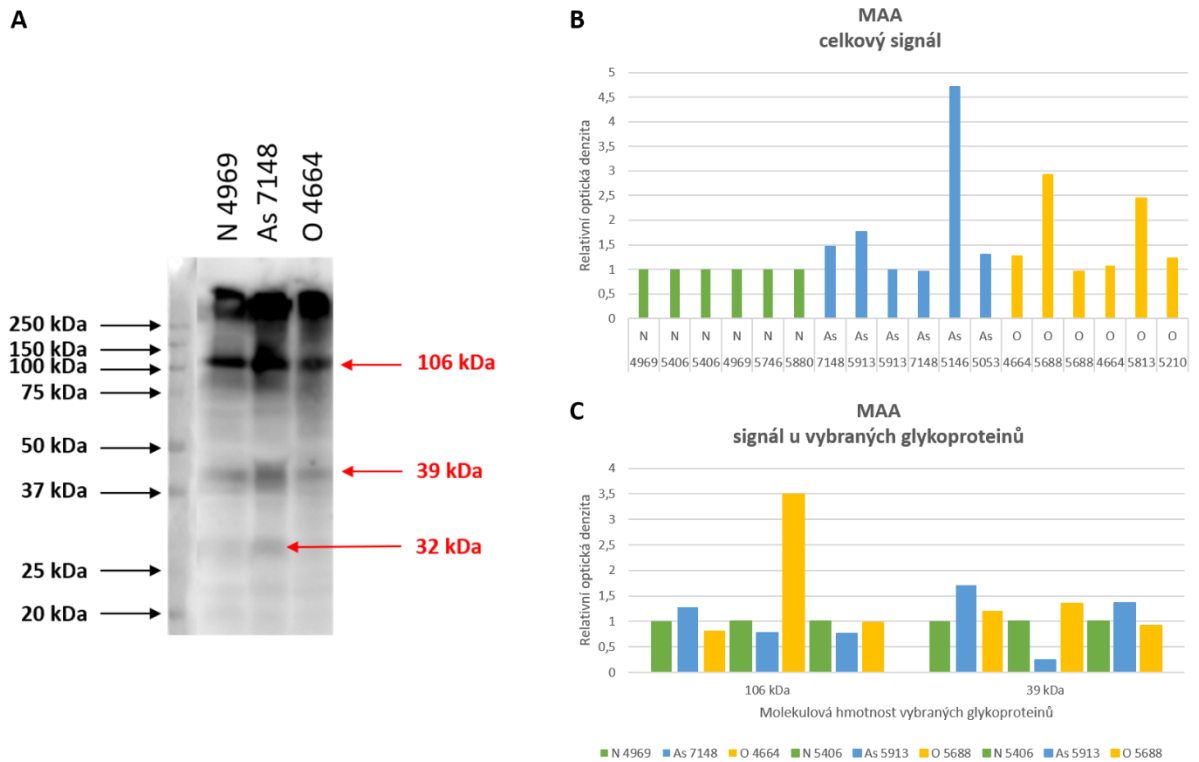
### 5.3 Detekce glykoproteinů pomocí MAA (*Maackia amurensis*)

Byla provedena detekce sacharidových struktur v glykoproteinech SP (viz kap. 4.2.4) pomocí lektinu MAA, který specificky rozpoznává kyselinu sialovou vázanou  $\alpha$ 2,3. Denzitometrická analýza míry vazby MAA byla vztažena k celkové nanášce proteinů ve vzorku. V celkové míře detekovaného signálu nebyly mezi glykoproteinovými profily specifickými pro MAA u námi zkoumaných vzorků SP nalezeny žádné statisticky významné rozdíly ( $p > 0,05$ ). Míra vazby s MAA byla stanovena u glykoproteinových proužků o molekulových hmotnostech 106 a 39 kDa. V míře signálu vazby MAA na tyto glykoproteinové proužky nebyl mezi vzorky nalezen žádný statisticky významný rozdíl ( $p > 0,05$ ). Lektin MAA reagoval i s dalšími glykoproteiny, nejčastěji např. s glykoproteinem o molekulové hmotnosti cca 32 kDa. Ostatní glykoproteiny nebyly do denzitometrické analýzy zařazeny, protože z jednotlivých detekcí nebylo možné jednoznačně určit jejich molekulové hmotnosti.

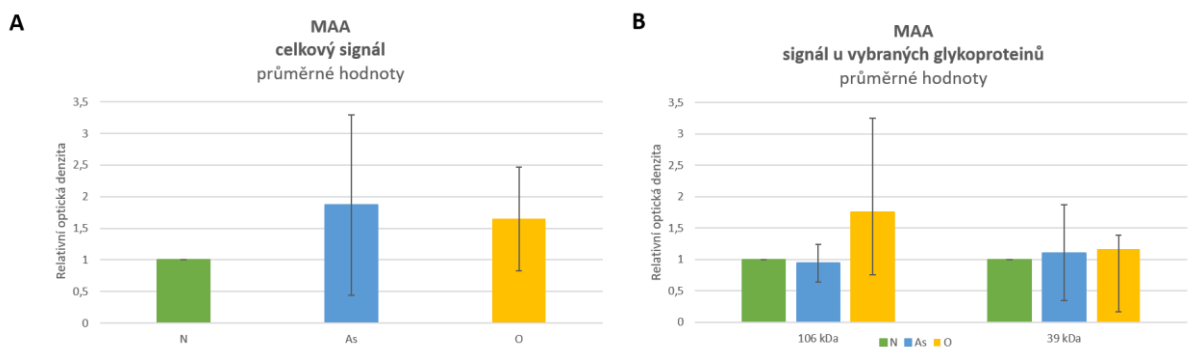
Porovnávání vzorků s různým spermioqramem (Obr. 11) bylo provedeno opakovaně, tj. celkem šestkrát. Statistické vyhodnocení míry vazby s MAA ve vzorcích je zobrazeno na Obr. 12. Vzorky N 5406, As 5913 a O 5688 pak byly použity dvakrát, přesto však výsledky těchto dvou detekcí nebyly identické, jak lze vidět na Obr. 11B a 11C. Glykoproteinové proužky byly však jasně patrné pouze u třech detekcí (z provedených šesti). Výsledky detekce glykoproteinů pomocí MAA jsou znázorněny na Obr. 11-15.



Vzhledem k výrazné reakci u vzorku As 5146, byla v celkové míře signálu pro vazbu s MAA pozorována nejvyšší variabilita právě u astenozoospermiků (Obr. 11B a 12A). Míra signálu pro jednotlivé glykoproteiny byla u vzorků astenozoospermiků vyrovnanější u glykoproteinu s mol. hm. 39 kDa. Větší variabilita byla u astenozoospermiků pozorována u glykoproteinu s mol. hm. 106 kDa, a to díky výrazné reakci MAA se vzorkem O 5688, jehož signál představoval cca 3,5násobek signálu ostatních vzorků.

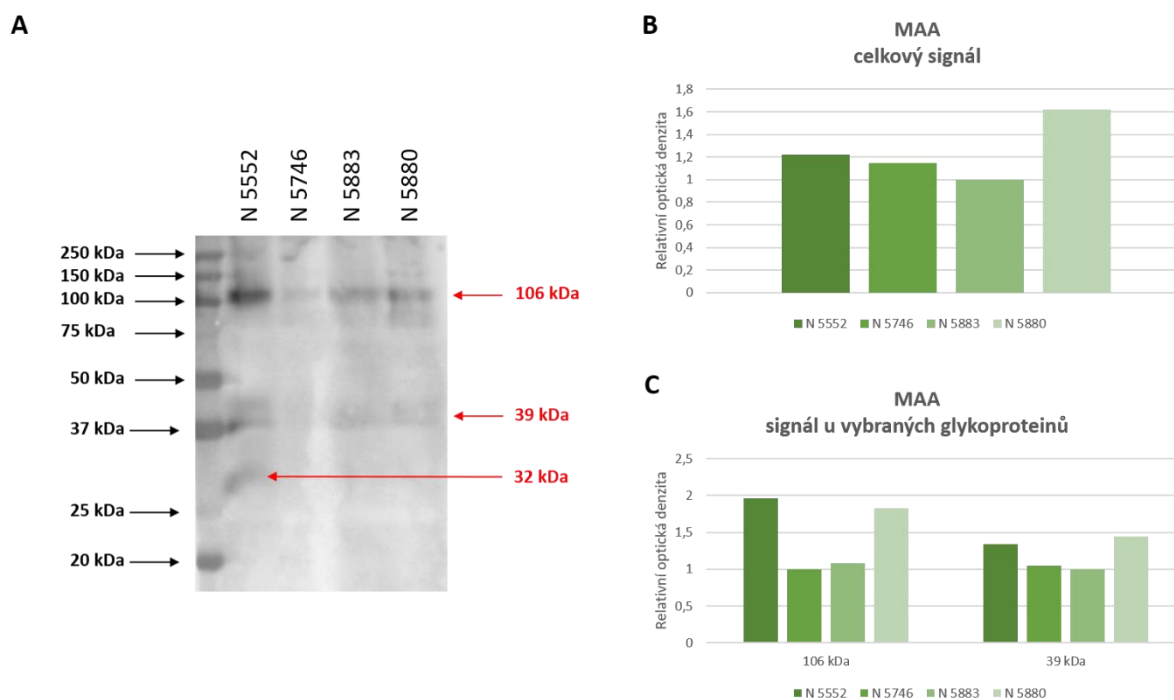


**Obr. 11.** Detekce glykoproteinů pomocí MAA – porovnávání vzorků s různým spermioqramem. A – reprezentativní obrázek detekce glykoproteinů na NC membráně pomocí MAA. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro MAA. C – míra signálu pro MAA u vybraných glykoproteinových proužků. N – normozoospermie, As – astenozoospermie, O – oligozoospermie.



**Obr. 12.** Detekce glykoproteinů pomocí MAA – porovnávání vzorků s různým spermioqramem. V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty signálu pro dané typy spermioqramů (N – normozoospermie, As – astenozoospermie, O – oligozoospermie) společně s příslušnými směrodatnými odchylkami. Tato data byla použita pro statistické šetření. A – průměrné hodnoty celkového signálu pro MAA. B – průměrné hodnoty signálu pro MAA u vybraných glykoproteinových proužků.

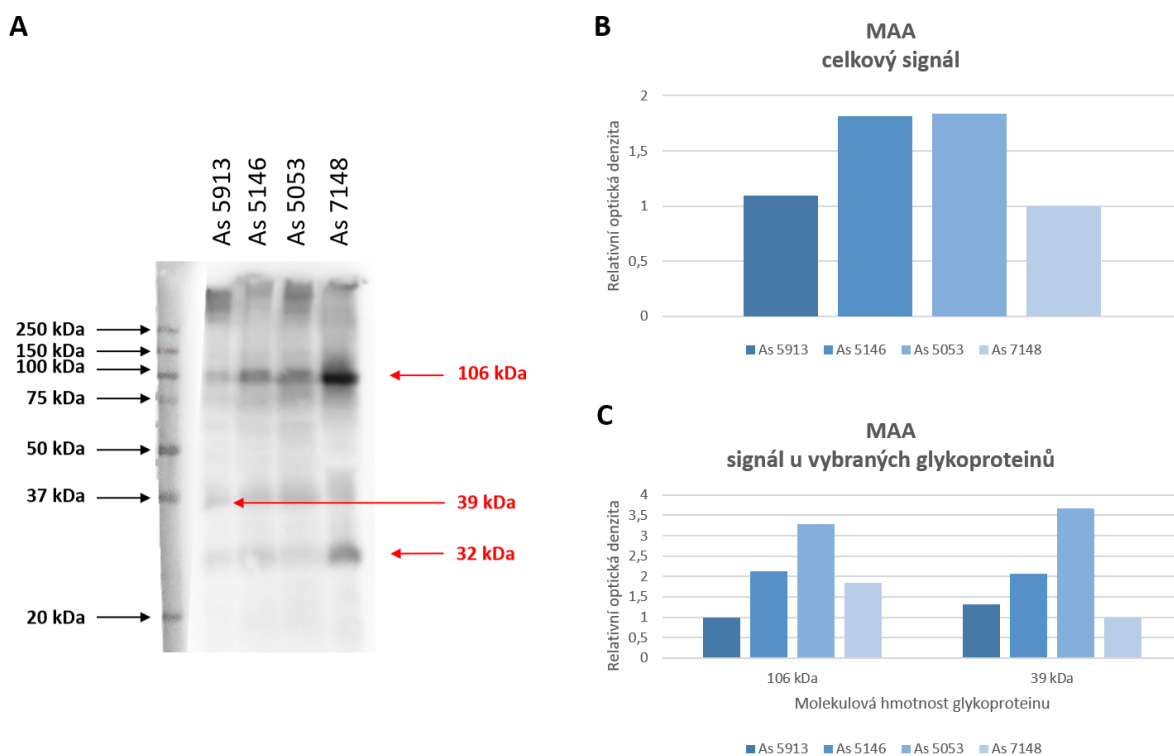
Při porovnávání vzorků se stejným spermioqramem (normozoospermici, Obr. 13) byla celková míra signálu detekce sialových kyselin pomocí MAA nejvyšší u vzorku N 5880 a nejnižší u vzorku N 5883. Opět byl zaznamenán srovnatelný signál mezi vzorky u glykoproteinu s mol. hm. 39 kDa. Míra signálu pro vazbu MAA byla u tohoto glykoproteinu nejméně variabilní právě u normozoospermiků (Obr. 13) ve srovnání s astenozoospermikou a oligozoospermikou (Obr. 14 a 15).



**Obr. 13.** Detekce glykoproteinů pomocí MAA – porovnávání vzorků se stejným spermioqramem (N – normozoospermici). A – detekce glykoproteinů na NC membráně pomocí MAA. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro MAA u vybraných vzorků normozoospermiků. C – míra signálu pro MAA u vybraných glykoproteinových proužků.

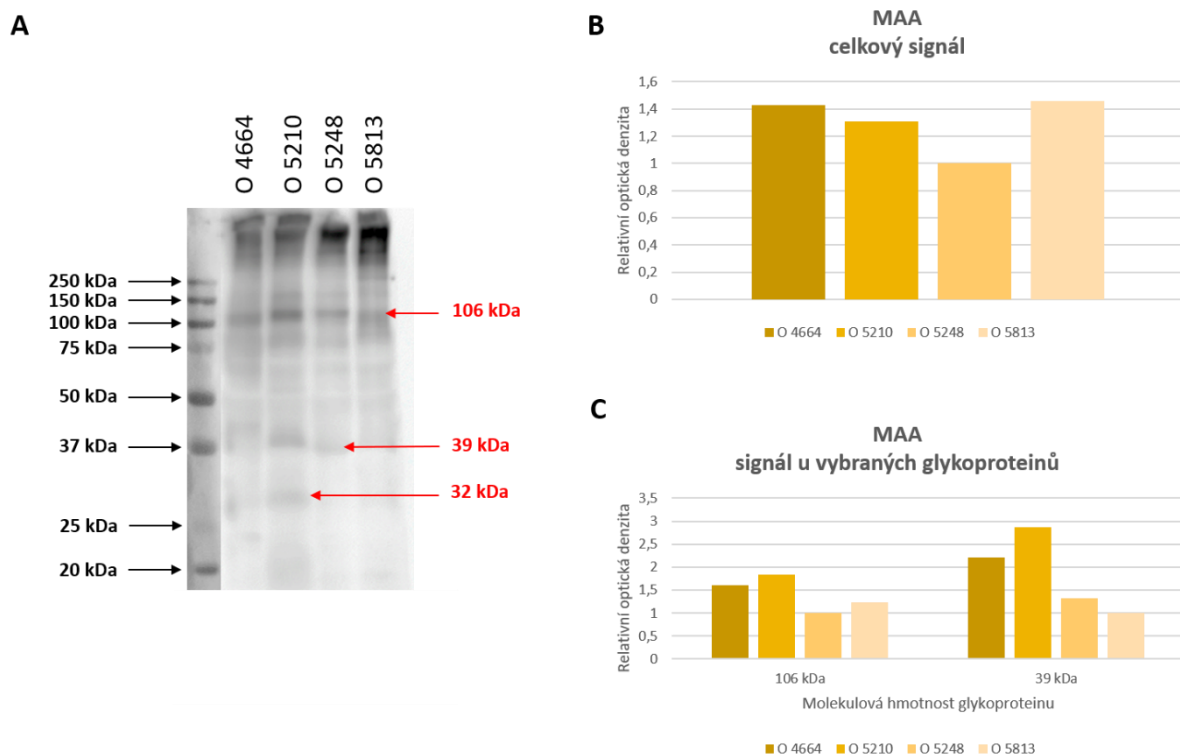
Největší rozdíly v míře celkového signálu pro vazbu MAA na glykoproteiny SP byly pozorovány v rámci skupiny astenozoospermiků (Obr. 14), a to jak při porovnávání vzorků s různým spermioqramem (Obr. 11B), tak při porovnávání vzorků se stejným spermioqramem (Obr. 14B).

Nejvýraznější celkový signál pro MAA byl u astenozoospermiků zaznamenán u vzorků As 5146 a As 5053, nejnižší signál pak u vzorku As 7148. U astenozoospermiků byla také pozorována nejvyšší variabilita v míře signálu u obou sledovaných glykoproteinových proužků. Společným rysem pro oba tyto glykoproteiny byl nejvyšší signál u vzorku As 5053. Nejnižší míra signálu pro MAA byla u astenozoospermiků pozorována pro glykoprotein s mol. hm. 106 kDa u vzorku As 5913, pro glykoprotein s mol. hm. 39 kDa u vzorku As 7148 (Obr. 14C).



**Obr. 14.** Detekce glykoproteinů pomocí MAA – porovnávání vzorků se stejným spermioqramem (As – astenozoospermici). A – detekce glykoproteinů na NC membráně pomocí MAA. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro MAA u vybraných vzorků astenozoospermiků. C – míra signálu pro MAA u vybraných glykoproteinových proužků.

Při porovnávání vzorků se stejným spermioqramem, byla u oligozoospermiků (Obr. 15), oproti normozoospermikům a astenozoospermikům, pozorována nejmenší variabilita v celkové míře signálu, celková míra signálu byla tedy u všech 4 vzorků relativně vyrovnaná. Nicméně v míře signálu pro sledované glykoproteiny byly již mezi vzorky oligozoospermiků zaznamenány výraznější rozdíly. U obou glykoproteinů byla u oligozoospermiků pozorována nejvyšší míra signálu MAA u vzorku O 5210. Nižší míra signálu byla u oligozoospermiků pozorována pro oba sledované glykoproteiny s mol. hm. 106 a 39 kDa u vzorku O 5248 a O 5813 (Obr. 15C).

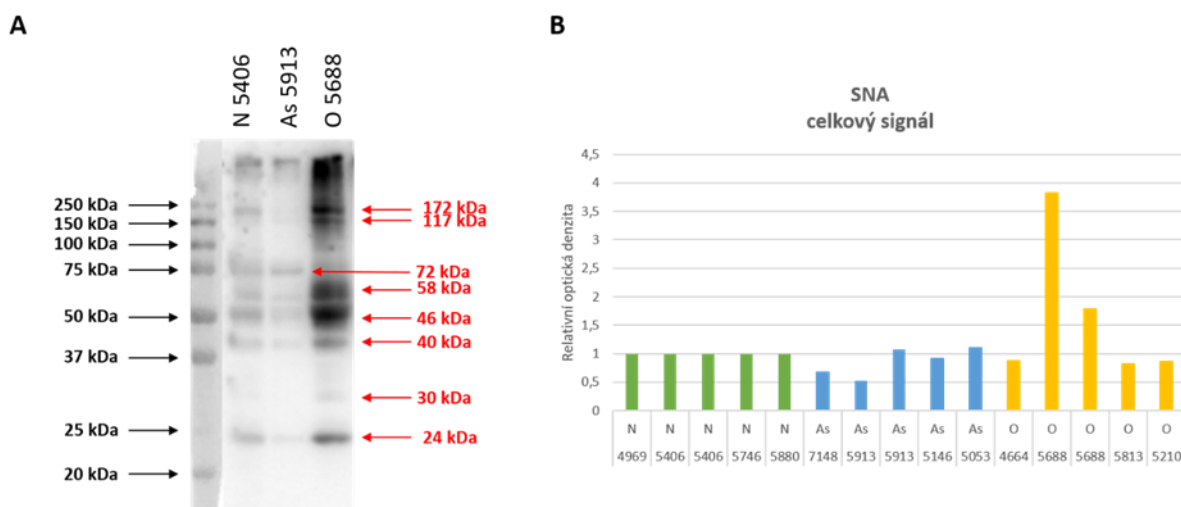


**Obr. 15.** Detekce glykoproteinů pomocí MAA – porovnávání vzorků se stejným spermioqramem (O – oligozoospermici). A – detekce glykoproteinů na NC membráně pomocí MAA. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro MAA u vybraných vzorků oligozoospermiků. C – míra signálu pro MAA u vybraných glykoproteinových proužků.

#### 5.4 Detekce glykoproteinů pomocí SNA (*Sambucus nigra*)

Byla provedena detekce sacharidových struktur v glykoproteinech SP (viz kap. 4.2.4) pomocí lektinu SNA, který specificky rozpoznává kyselinu sialovou vázanou  $\alpha 2,6$ . Denzitometrická analýza míry vazby daného lektinu byla vztažena k celkové nanášce proteinů ve vzorku. V celkové míře detekovaného signálu nebyly mezi glykoproteinovými profily specifickými pro SNA u námi zkoumaných vzorků SP nalezeny žádné statisticky významné rozdíly ( $p > 0,05$ ). Statisticky významně se nelišila ani reaktivita SNA s vybranými glykoproteiny ( $p > 0,05$ ). Porovnávání vzorků SP ve skupině s různým spermioqramem bylo provedeno opakovaně, tj. celkem pětkrát. Vyhodnocení je shrnuto v grafu na Obr. 18.

Při porovnávání vzorků s různým spermioqramem byla pro celkovou míru signálu pozorována nejvyšší variabilita u vzorků oligozoospermiků, nejvýraznější signál byl zaznamenán u vzorku O 5688. Signál u vzorků astenozoospermiků byl oproti oligozoospermikům výrazně vyrovnanější. Nejnižší míra celkového signálu byla pozorována u vzorku As 5193 (Obr. 16B).

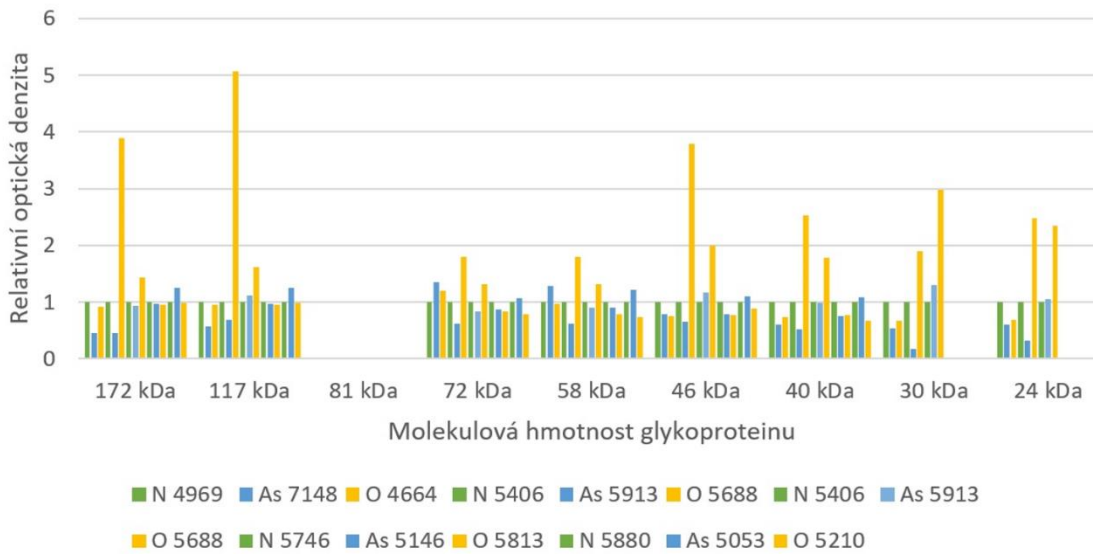


**Obr. 16.** Detekce glykoproteinů pomocí SNA – porovnávání vzorků s různým spermioqramem. A – reprezentativní obrázek detekce glykoproteinů na NC membráně pomocí SNA. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro SNA. N – normozoospermie, As – astenozoospermie, O – oligozoospermie.

Signál s lektinem SNA byl měřen u glykoproteinových proužků o těchto molekulových hmotnostech – 170, 117, 81, 72, 58, 46, 40, 30 a 24 kDa (Obr. 17). Glykoproteinové proužky o mol. hm. 30 a 24 kDa nebyly u vzorků N 5746, N 5880, As 5146, As 5053, O 5813 a O 5210 detekovány – elektropřenos proteinů v tomto případě probíhal zřejmě kratší dobu, neboť k rozdělení těchto nízkomolekulárních proteinů vůbec nedošlo. Vzorky N 5406, As 5913 a O 5688 pak byly použity dvakrát, přesto však výsledky těchto dvou detekcí nebyly identické, jak lze vidět na Obr. 16B a 17. Glykoproteinové proužky o molekulové hmotnosti 58 a 46 kDa bylo v některých případech možné identifikovat po imunodetekční analýze jako dva zřetelné proužky (viz Obr. 16), jindy došlo zřejmě v průběhu elektroforézy k lepšímu rozdělení glykoproteinů a v oblasti o této molekulové hmotnosti pak bylo možné rozlišit více glykoproteinových proužků (viz Obr. 21).

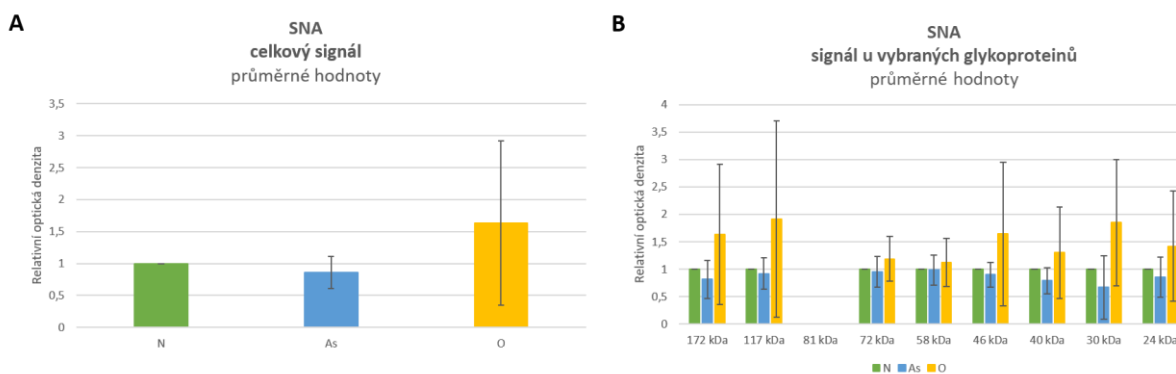
Z Obr. 17 je patrné, že při porovnávání vzorků s různým spermioqramem byla největší variabilita v signálu u vybraných glykoproteinů pozorována také u oligozoospermiků, tj. stejně jako v případě celkového signálu (Obr. 16B). U všech glykoproteinů byla pozorována nejvyšší míra signálu opět u vzorku O 5688. Glykoprotein s mol. hm. 81 kDa nebyl do denzitometrické analýzy zařazen, neboť jsme jej u některých vzorků nedetekovali.

## SNA signál u vybraných glykoproteinů



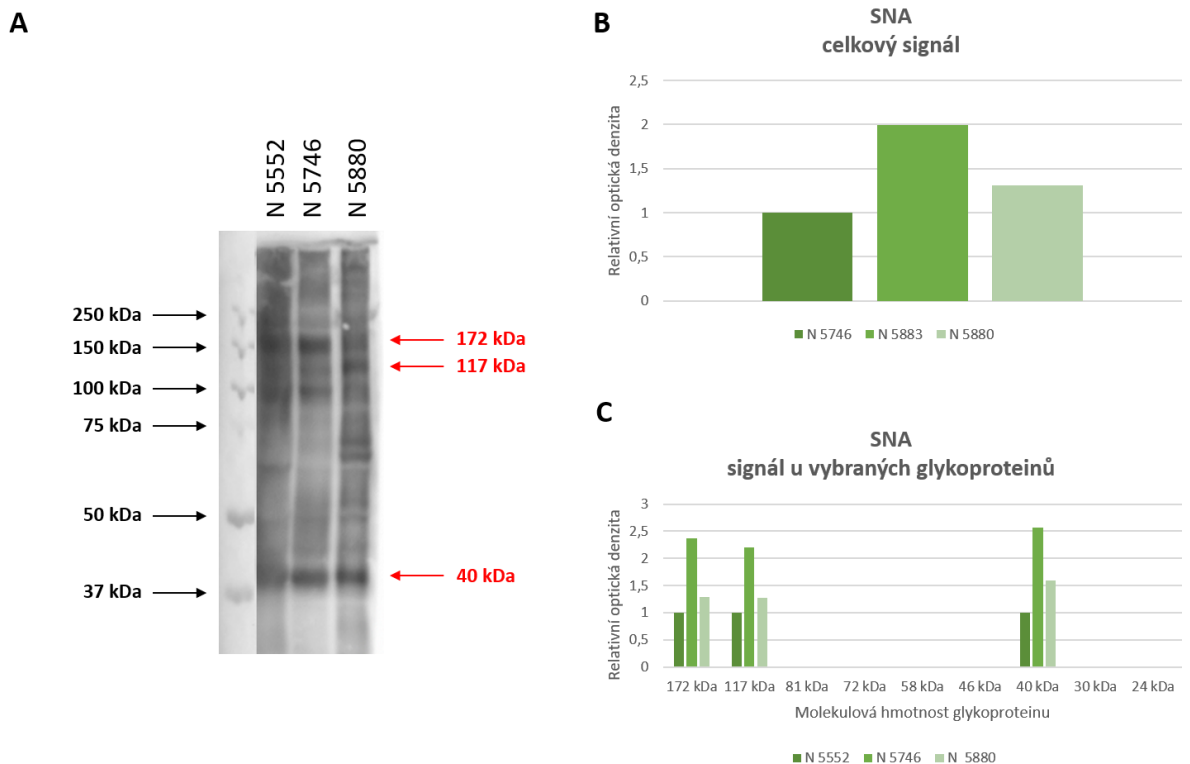
**Obr. 17.** Detekce glykoproteinů pomocí SNA – porovnávání vzorků s různým spermogramem. C – míra signálu pro SNA u vybraných glykoproteinových proužků. N – normozoospermie, As – astenozoospermie, O – oligozoospermie.

Na Obr. 18A a 18B lze vidět, že průměrné hodnoty signálu (jak celkového, tak pro jednotlivé glykoproteiny) byly při srovnávání vzorků s různým spermogramem nejnižší u vzorků astenozoospermiků oproti normozoospermikům a oligozoospermikům. Tento rozdíl však nebyl statisticky významný ( $p > 0,05$ ).



**Obr. 18.** Detekce glykoproteinů pomocí SNA – porovnávání vzorků s různým spermogramem. V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty signálu pro dané typy spermogramů (N – normozoospermie, As – astenozoospermie, O – oligozoospermie) společně s příslušnými směrodatnými odchylkami. Tato data byla použita pro statistické šetření. A – průměrné hodnoty celkového signálu pro SNA. B – průměrné hodnoty signálu pro SNA u vybraných glykoproteinových proužků.

Pro porovnání vzorků normozoospermiků mezi sebou (Obr. 19) byly u vazby s SNA použity pouze 3 vzorky. V celkové míře signálu byly u normozoospermiků pozorovány nejvyšší hodnoty u vzorku N 5883, nejnižší u vzorku N 5746. Obdobně tomu bylo i u signálu pro jednotlivé glykoproteiny. Některé glykoproteiny nebyly u normozoospermiků do denzitometrické analýzy zařazeny, protože z jednotlivých detekcí nebylo možné jednoznačně určit jejich molekulové hmotnosti.

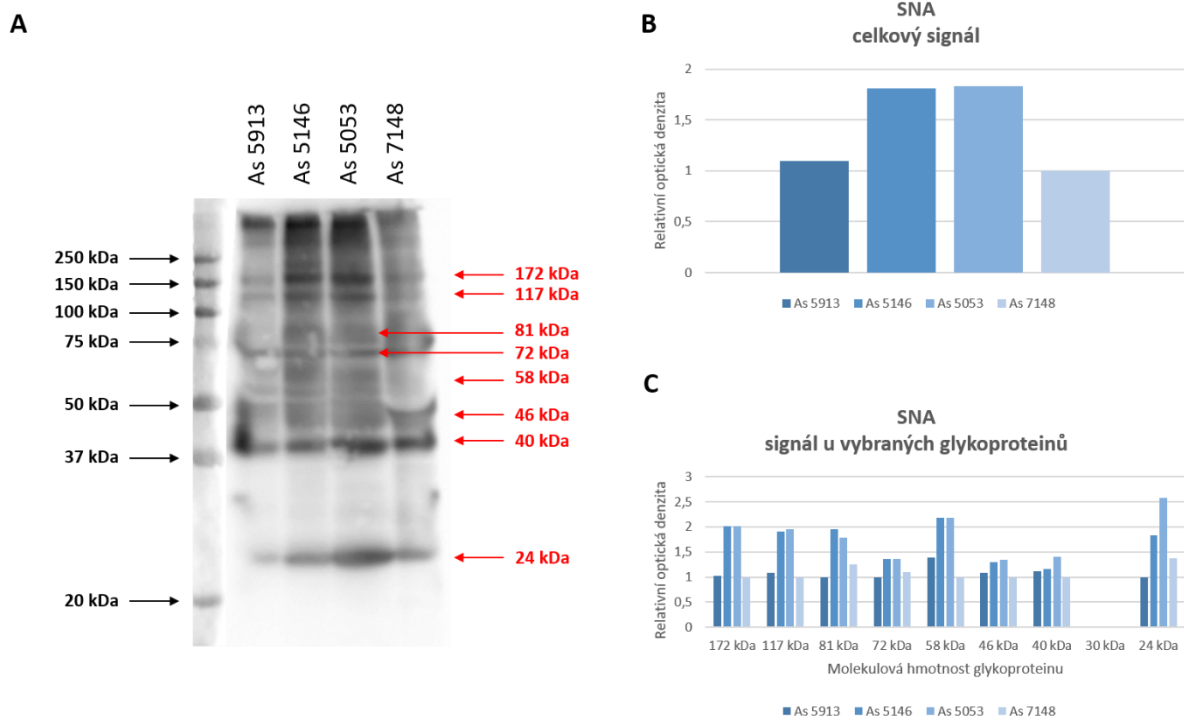


**Obr. 19.** Detekce glykoproteinů pomocí SNA – porovnávání vzorků se stejným spermioqramem (N – normozoospermici). A – detekce glykoproteinů na NC membráně pomocí SNA. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro SNA u vybraných vzorků normozoospermiků. C – míra signálu pro SNA u vybraných glykoproteinových proužků.

V rámci skupiny astenozoospermiků (Obr. 20) byla v celkové míře signálu SNA pozorována nejnižší variabilita oproti normozoospermikům a oligozoospermikům. Vyšší míra celkového signálu byla u astenozoospermiků zaznamenána u vzorků As 5146 a As 5053, nižší pak u vzorků As 5913 a As 7148.

U všech sledovaných glykoproteinů byl u astenozoospermiků pozorován nejvyšší signál u vzorku As 5053 nebo As 5146 (Obr. 20C). Míra signálu u těchto vzorků se téměř nelišila (s výjimkou glykoproteinu s mol. hm. 24 kDa), bylo tomu tedy podobně jako v případě celkového signálu (Obr. 20B). Největší rozdíly v míře signálu byly u astenozoospermiků zaznamenány u glykoproteinu s mol. hm. 24 kDa, míra signálu u vzorku As 5053 zde dosahovala cca 2,5násobných hodnot oproti vzorku As 5913, jehož míra signálu byla nejnižší. Glykoprotein s mol. hm. 30 kDa nebyl do denzitometrické analýzy zařazen, neboť jsme jej u vzorků astenozoospermiků nedetekovali.



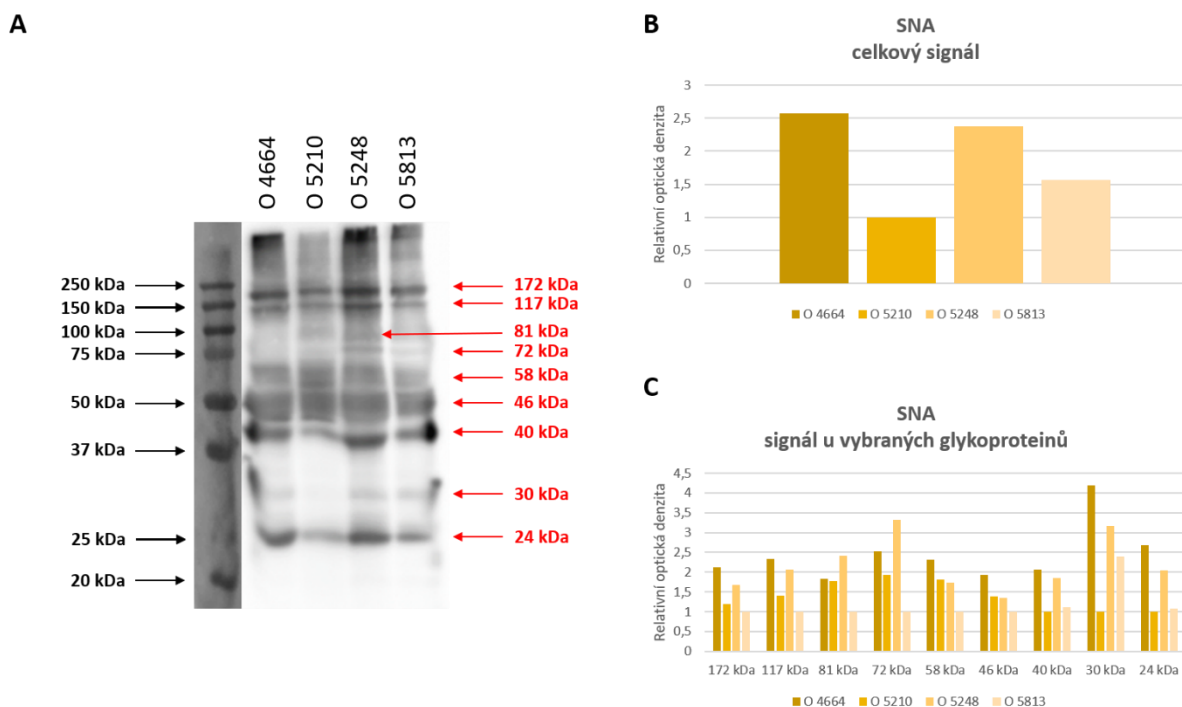


**Obr. 20.** Detekce glykoproteinů pomocí SNA – porovnávání vzorků se stejným spermioqramem (*As* – astenozoospermici). A – detekce glykoproteinů na NC membráně pomocí SNA. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro SNA u vybraných vzorků astenozoospermiků. C – míra signálu pro SNA u vybraných glykoproteinových proužků

Při porovnávání vzorků se stejným spermioqramem (oligozoospermici, Obr. 21) byla v celkové míře signálu pro vazbu s SNA pozorována nejvyšší variabilita, a to oproti normozoospermikům a astenozoospermikům. Vyšší míra celkového signálu byla u oligozoospermiků zaznamenána u vzorků O 4664 a O 5248, nejnižší u vzorku O 5210 (Obr. 21B).

U všech sledovaných glykoproteinů byl u oligozoospermiků pozorován nejvyšší signál s SNA u vzorku O 4664 nebo O 5248. Největší rozdíly v míře signálu byly u oligozoospermiků zaznamenány u glykoproteinu s mol. hm. 30 kDa, kdy míra signálu u vzorku O 4664 dosahovala více než 4násobných hodnot oproti vzorku O 5210, jehož celková míra signálu SNA byla nejnižší.



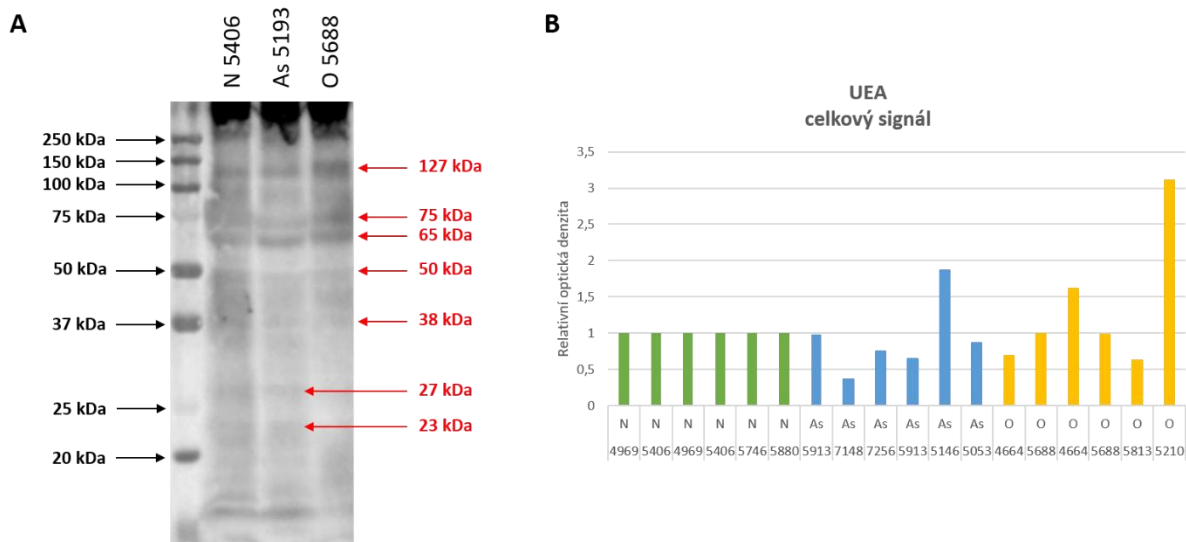


**Obr. 21.** Detekce glykoproteinů pomocí SNA – porovnávání vzorků se stejným spermioqramem (O – oligozoospermici). A – detekce glykoproteinů na NC membráně pomocí SNA. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro SNA u vybraných vzorků oligozoospermiků. C – míra signálu pro SNA u vybraných glykoproteinových proužků.

## 5.5 Detekce glykoproteinů pomocí UEA (*Ulex europaeus agglutinin*)

Byla provedena detekce sacharidových struktur v glykoproteinech SP (viz kap. 4.2.4) pomocí lektinu UEA. Lektin UEA specificky rozpoznává fukózu vázanou  $\alpha$ 1,2. Denzitometrická analýza míry vazby UEA byla vztažena k celkové nanašce proteinů ve vzorku SP. Reaktivita vzorků s lektinem UEA vykazovala vysokou variabilitu. Zatímco u některých vzorků se lektin navázal s vysokou intenzitou a bylo možné rozlišit několik glykoproteinových proužků, u jiných vzorků (např. N 5886, N 5552, As 5053, O 5813) se lektin UEA nenavázal vůbec, nebo pouze minimálně. Vzhledem k těmto výrazným rozdílům jsme u vybraných glykoproteinových proužků neprováděli denzitometrickou analýzu, neboť u některých vzorků nebylo možné glykoproteinové proužky identifikovat. Molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů (127, 75, 65, 50, 38, 27 a 23 kDa) byly odhadnuty na základě analýzy vzorků, kde byly tyto glykoproteinové proužky znatelné (N 5406, As 5193, O 5688) (Obr. 22A).

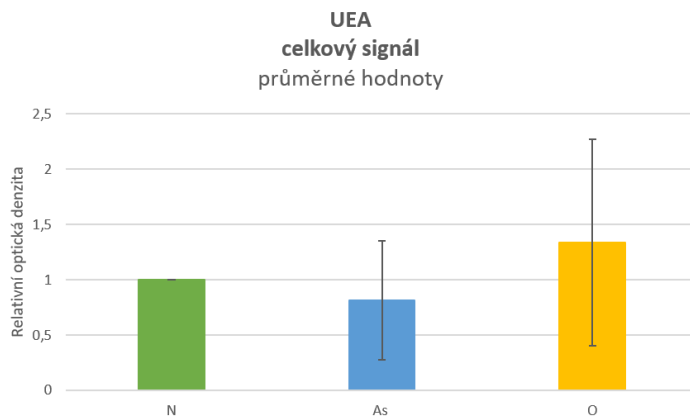
Při porovnávání vzorků s různým spermioqramem (N, O a As) byla pozorována nejvyšší míra signálu UEA u vzorku O 5210, nejnižší u vzorku As 7148. Nejvyšší variabilita byla pozorována u oligozoospermiků (Obr. 22B a 23).



**Obr. 22.** Detekce glykoproteinů pomocí UEA – porovnávání vzorků s různým spermioqramem. A – reprezentativní obrázek detekce glykoproteinů na NC membráně pomocí UEA. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro UEA. N – normozoospermie, As – astenozoospermie, O – oligozoospermie.

Pokud došlo u vzorků SP alespoň k minimálnímu navázání UEA, společným rysem byl ve většině případů proteinový proužek o velikosti cca 75 kDa. U některých vzorků se jevil jako jednolitý proužek, u jiných pak bylo patrné rozdělení na dva proužky o molekulové hmotnosti cca 75 a 65 kDa. Podobně tomu bylo i u některých vzorků oligozoospermiků v rozmezí 50–38 kDa, kdy bylo detekováno několik dalších glykoproteinů, označených na obrázku oranžovými šipkami (Obr. 26, str. 53). U těchto vzorků zřejmě došlo k lepšímu rozdělení (glyko)proteinů během elektroforézy. Z obrázků níže (Obr. 24A, 25A a 26A) je také patrné, že lektin UEA výrazně reaguje také s nízkomolekulárními proteiny o molekulové hmotnosti menší než 30 kDa. Porovnávání vzorků s různým spermioqramem bylo provedeno opakovaně, tj. celkem šestkrát.

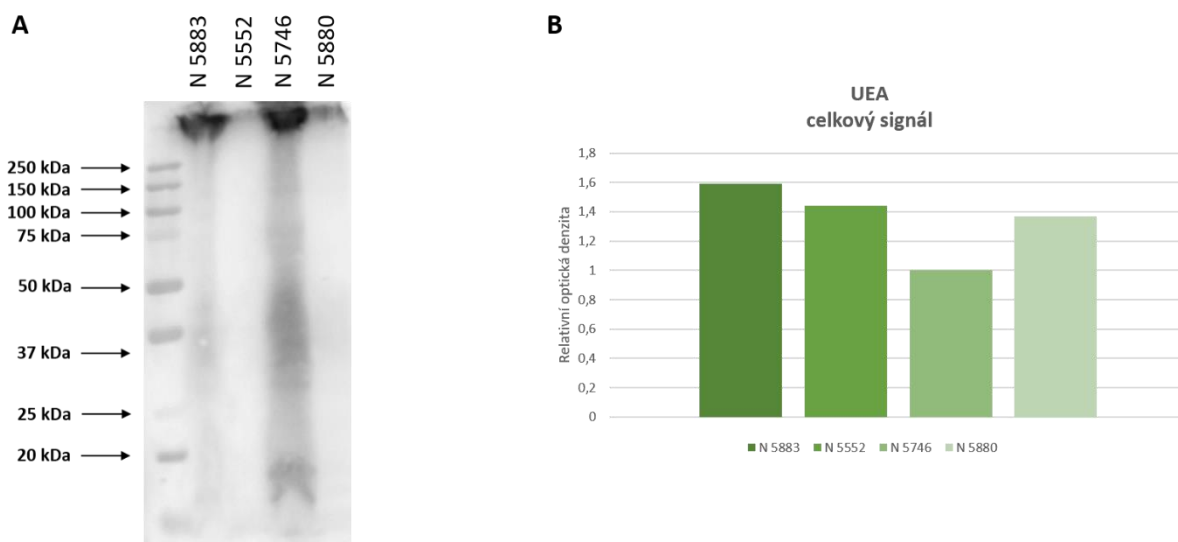
V celkové míře detekovaného signálu nebyly mezi glykoproteinovými profily specifickými pro UEA u námi zkoumaných vzorků SP nalezeny žádné statisticky významné rozdíly ( $p > 0,05$ ), a to i přes výraznou variabilitu v síle signálu vazby UEA u jednotlivých vzorků (Obr. 23).



**Obr. 23.** Detekce glykoproteinů pomocí UEA – porovnávání vzorků s různým spermogramem. V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty celkového signálu pro UEA pro dané typy spermogramů (N – normozoospermie, As – astenozoospermie, O – oligozoospermie) společně s příslušnými směrodatnými odchylkami. Tato data byla použita pro statistické šetření.

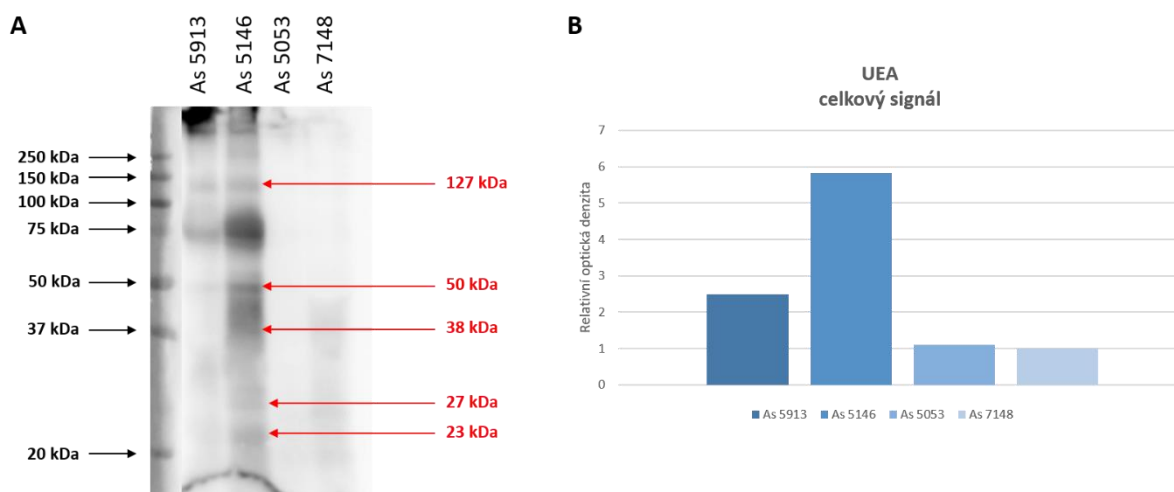
Je tomu tak pravděpodobně proto, že výsledky detekce glykoproteinů byly často velmi odlišné. U všech sledovaných typů spermogramu docházelo k tomu, že s lektinem UEA reagovaly pouze některé vzorky, zatímco jiné téměř nereagovaly. Variabilita v detekci tedy nebyla vázána na konkrétní spermogram (viz Obr. 24A, 25A a 26A).

V rámci porovnávání vzorků SP se stejným spermogramem byla v celkové míře signálu zaznamenána u normozoospermiků (Obr. 24) nejnížší variabilita v porovnání se vzorky astenozoospermiků a oligozoospermiků. Nejvyšší míra celkového signálu byla u normozoospermiků zaznamenána u vzorku N 5883, nejnížší u vzorku N 5746.



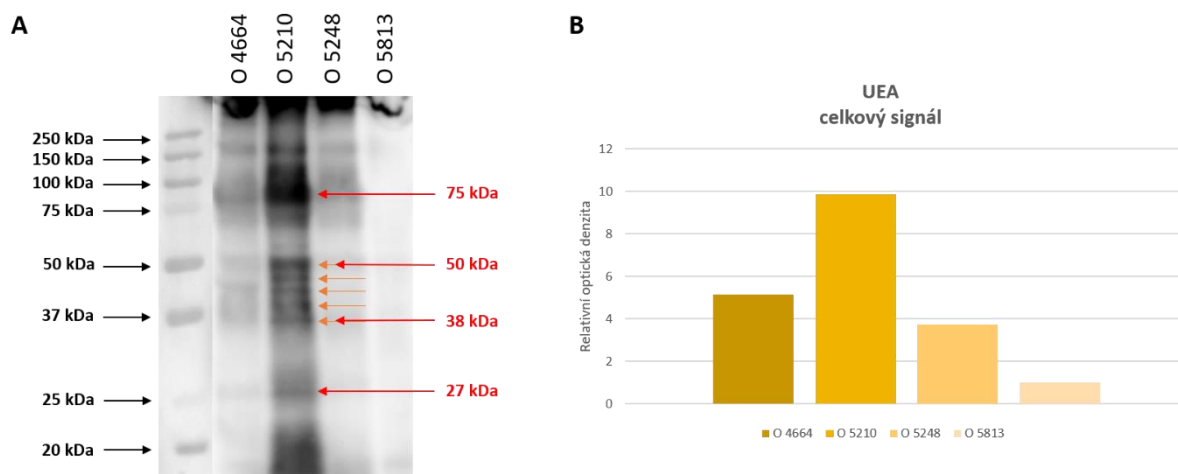
**Obr. 24.** Detekce glykoproteinů pomocí UEA – porovnávání vzorků se stejným spermogramem (N – normozoospermici). A – detekce glykoproteinů na NC membráně pomocí UEA. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro UEA u vybraných vzorků normozoospermiků. C – míra signálu pro UEA u vybraných glykoproteinových proužků.

Při porovnávání vzorků SP se stejným spermioqramem (astenozoospermici, Obr. 25) byla nejvyšší míra celkového signálu s UEA zaznamenána u vzorku As 5146. Hodnoty signálu u tohoto vzorku dosahovaly téměř šestinásobku oproti vzorku As 7148, u kterého byla míra celkového signálu nejnižší. Variabilita v míře signálu vazby lektinu UEA byla tedy u vzorků astenozoospermiků výrazně vyšší než v případě vzorků normozoospermiků.



**Obr. 25.** Detekce glykoproteinů pomocí UEA – porovnávání vzorků se stejným spermioqramem (As – astenozoospermici). A – detekce glykoproteinů na NC membráně pomocí UEA. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro UEA u vybraných vzorků astenozoospermiků. C – míra signálu pro UEA u vybraných glykoproteinových proužků.

V rámci skupiny vzorků oligozoospermiků (Obr. 26) byla nejvyšší míra celkového signálu s UEA zaznamenána u vzorku O 5210. Hodnoty signálu u tohoto vzorku dosahovaly téměř desetinásobku oproti vzorku O 5813, u kterého byla míra celkového signálu nejnižší. Variabilita v celkové míře signálu vazby s UEA byla u oligozoospermiků v porovnání s normozoospermiky a astenozoospermiky nejvyšší.

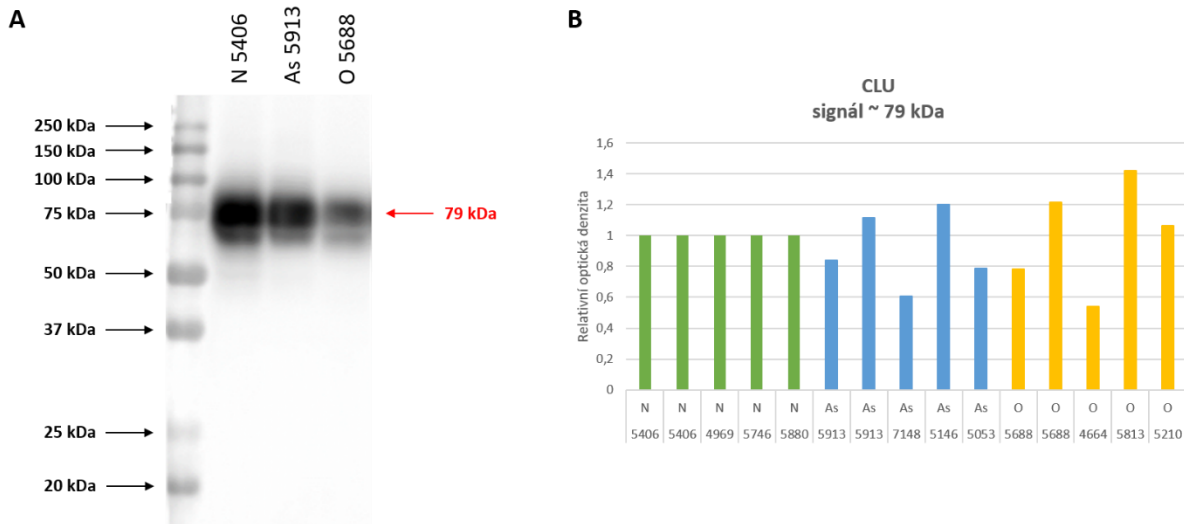


**Obr. 26.** Detekce glykoproteinů pomocí UEA – porovnávání vzorků se stejným spermioqramem (O – oligozoospermici). A – detekce glykoproteinů na NC membráně pomocí UEA. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti u vybraných glykoproteinů jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro UEA u vybraných vzorků oligozoospermiků. C – míra signálu pro UEA u vybraných glykoproteinových proužků.

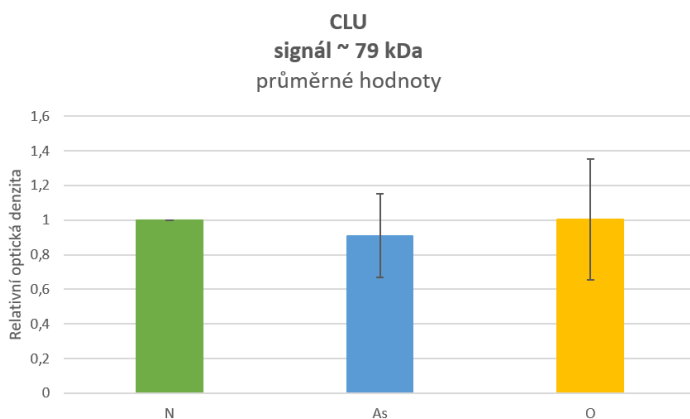
## 5.6 Detekce clusterinu

Byla provedena detekce clusterinu v SP (viz kap. 4.2.5) pomocí specifické protilátky Hs-3. Denzitometrická analýza míry vazby daného lektinu byla vztažena k celkové nanášce proteinů ve vzorku. Protilátka proti clusterinu reagovala s proteinovým proužkem o molekulové hmotnosti 79 kDa, což odpovídá molekulové hmotnosti tohoto proteinu. Po imunodetekční analýze bylo u některých vzorků možné pozorovat v této molekulové hmotnosti více či méně znatelný dvojproužek, což je v souladu s heterodimerní strukturou clusterinu. U některých vzorků pak protilátka reagovala také s proteinovým proužkem o molekulové hmotnosti cca 52 kDa. Porovnávání vzorků s různým spermioqramem bylo provedeno opakovaně, tj. celkem pětkrát. Mezi jednotlivými vzorky nebyly v množství detekovaného clusterinu pozorovány žádné statisticky významné rozdíly ( $p > 0,05$ ).

Při porovnávání vzorků s různým spermioqramem (N, As, O) jsme zaznamenali poměrně vyrovnanou míru reaktivity všech vzorků s protilátkou proti clusterinu, jak je patrné z Obr. 27B a 28. Nejvyšší variabilita v míře signálu byla zaznamenána u vzorků oligozoospermiků (Obr. 28). Největší množství clusterinu bylo detekováno ve vzorku O 5813, nejnižší ve vzorku O 4664 (Obr. 27B).

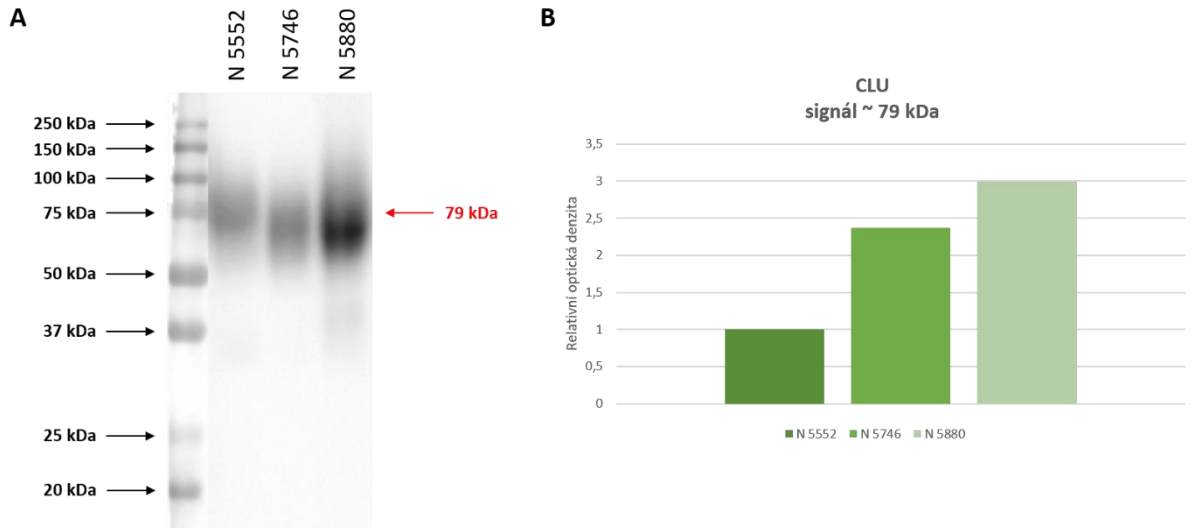


**Obr. 27.** Imunodetekce clusterinu – porovnávání vzorků s různým spermiogramem. A – reprezentativní obrázek detekce clusterinu na NC membráně pomocí specifické protilátky. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližná molekulová hmotnost clusterinu je znázorněna červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro clusterin. N – normozoospermie, As – astenozoospermie, O – oligozoospermie.



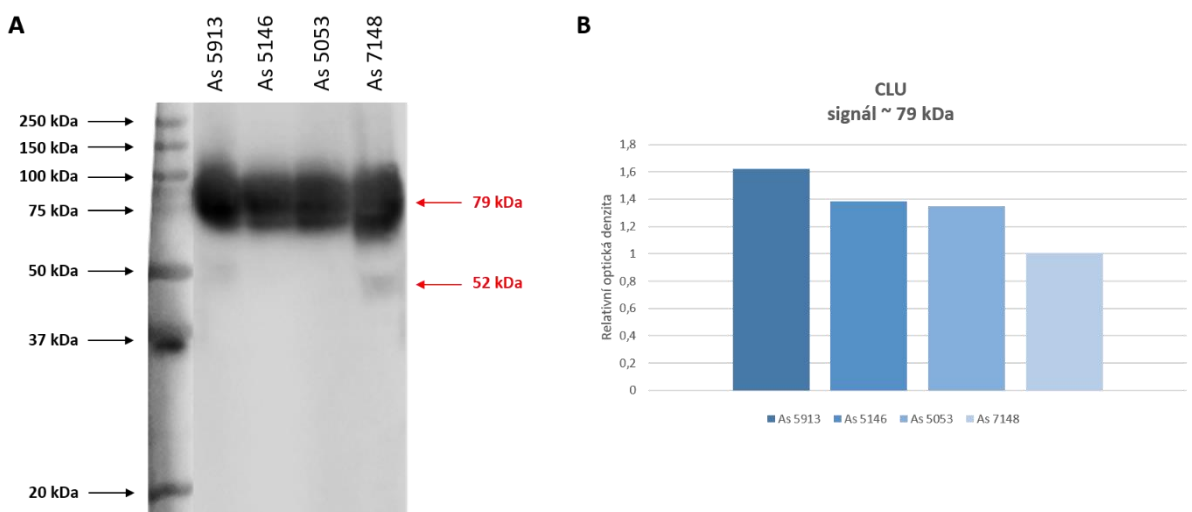
**Obr. 28.** Imunodetekce clusterinu – porovnávání vzorků s různým spermiogramem. V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty signálu pro clusterin pro dané typy spermiogramů (N – normozoospermie, As – astenozoospermie, O – oligozoospermie) společně s příslušnými směrodatnými odchylkami. Tato data byla použita pro statistické šetření.

V rámci skupiny normozoospermiků (Obr. 29) byly pro detekci clusterinu v SP použity pouze 3 vzorky. V míře signálu pro clusterin byla u normozoospermiků pozorována v porovnání se vzorky astenozoospermiků a oligozoospermiků nejvyšší variabilita. Největší množství clusterinu bylo u normozoospermiků detekováno ve vzorku N 5880, nejnižší pak ve vzorku N 5552.



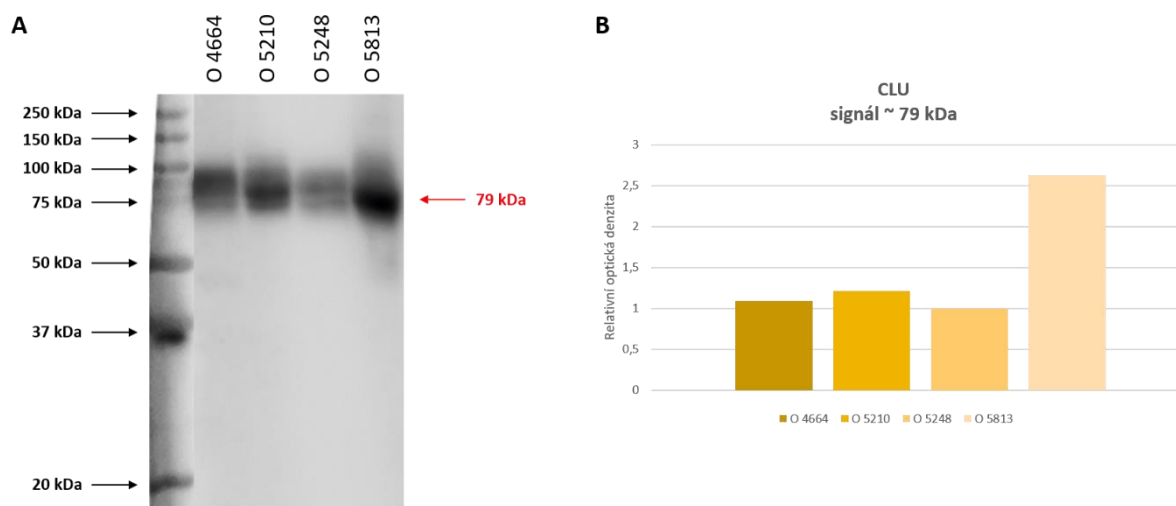
**Obr. 29.** Imunodetekce clusterinu – porovnávání vzorků se stejným spermiogramem (N – normozoospermici). A – detekce clusterinu na NC membráně pomocí specifické protilátky. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližná molekulová hmotnost clusterinu je znázorněna červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro clusterin u vybraných vzorků normozoospermiků.

Při porovnávání vzorků se stejným spermiogramem byla v případě astenozoospermiků (Obr. 30) pozorována nejnižší variabilita (v porovnání s normozoospermiky a oligozoospermiky) v množství detekovaného clusterinu. Nejvyšší míra signálu byla u astenozoospermiků pozorována u vzorku As 5913, nejnižší pak u vzorku As 7148. U těchto dvou vzorků byla navíc pozorována reakce s protilátkou proti clusterinu také v mol. hm. 52 kDa (Obr. 30A).



**Obr. 30.** Imunodetekce clusterinu – porovnávání vzorků se stejným spermiogramem (As – astenozoospermici). A – detekce clusterinu na NC membráně pomocí specifické protilátky. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližná molekulová hmotnost clusterinu je znázorněna červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro clusterin u vybraných vzorků astenozoospermiků.

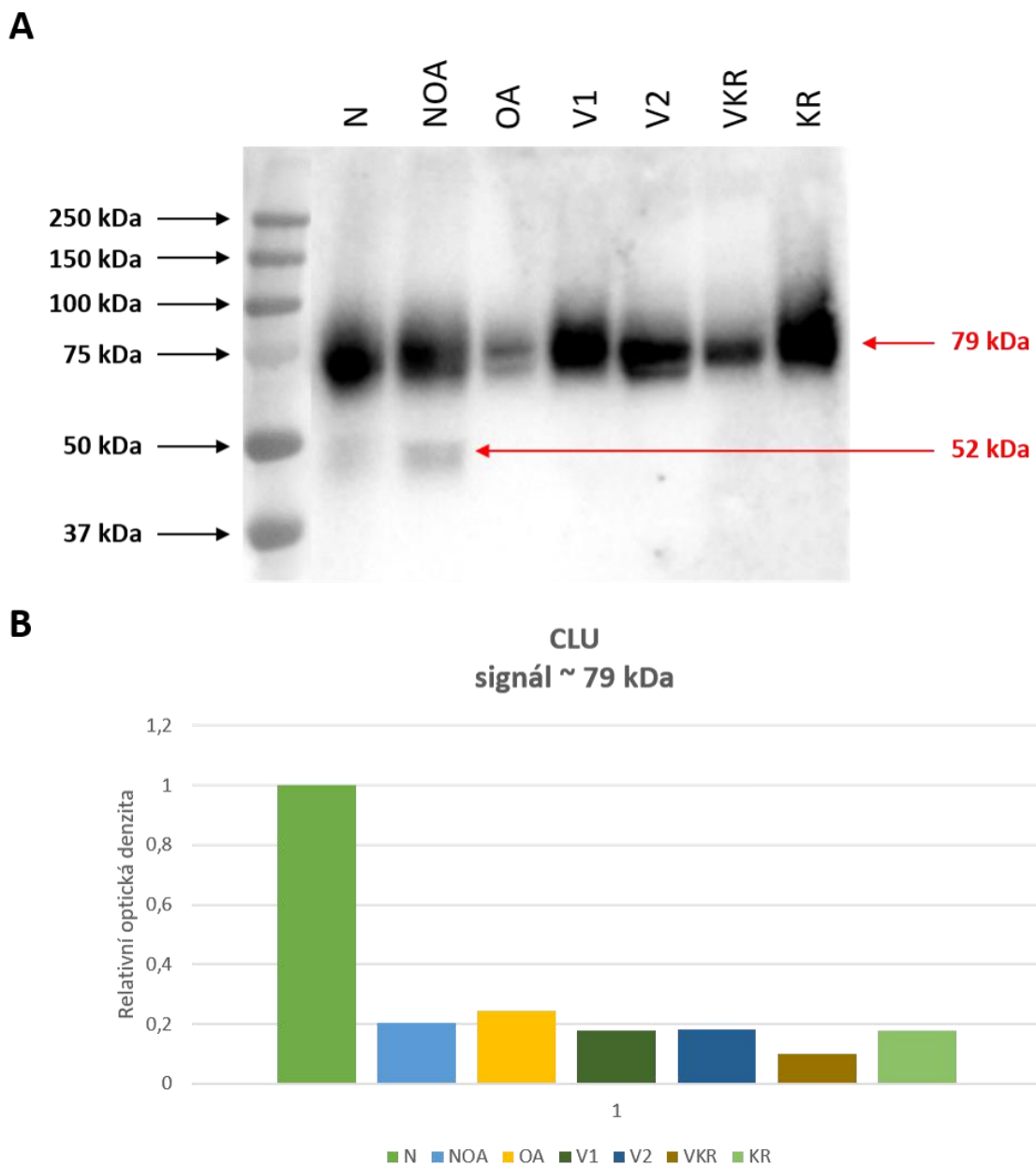
Při porovnávání vzorků SP oligozoospermiků byla nejvyšší míra reakce s protilátkou proti clusterinu pozorována u vzorku O 5813. Míra signálu u vzorku O 5183 byla cca 2,5krát vyšší než u ostatních vzorků oligozoospermiků, jejichž míra signálu byla srovnatelná (Obr. 31).



**Obr. 31.** Imunodetekce clusterinu – porovnávání vzorků se stejným spermiogramem (O – oligozoospermici). A – detekce clusterinu na NC membráně pomocí specifické protilátky. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližná molekulová hmotnost clusterinu je znázorněna červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro clusterin u vybraných vzorků oligozoospermiků.

U protilátky proti clusterinu jsme sledovali také její reaktivitu s SP mužů po vasektomii, mužů s azoospermii (neobstrukční i obstrukční) a kryptozoospermii. U všech výše uvedených vzorků SP byla ve srovnání s normozoospermikem pozorována výrazně nižší reaktivita s protilátkou proti clusterinu ukazující na snížené množství tohoto proteinu u zmíněných patologických spermiogramů. Míra reaktivity protilátky byla u všech těchto vzorků srovnatelná, nicméně nejnížší množství clusterinu bylo detekováno u vzorku kryptozoospermie po provedené vasektomii (VKR). Tento experiment byl proveden pouze jednou, tudíž nelze jednoznačně říci, zdali je tento rozdíl v míře signálu mezi normozoospermikem a ostatními uvedenými patologiemi statisticky významný (Obr. 32).





**Obr. 32.** Imunodetekce clusterinu – porovnávání vzorků s různým spermiogramem. A – detekce clusterinu na NC membráně pomocí specifické protilátky. Molekulové hmotnosti hmotnostního standardu jsou znázorněny černými šipkami, přibližné molekulové hmotnosti proteinových proužků reagujících s protilátkou proti clusterinu jsou znázorněny červenými šipkami. B – míra celkového signálu pro clusterin. N – normozoospermie, NOA – neobstrukční azoospermie, OA – obstrukční azoospermie, V1 – azoospermie po provedené vasektomii, V2 – azoospermie po provedené vasektomii, VKR – kryptozoospermie po provedené vasektomii, KR – kryptozoospermie.

## 6 Diskuze

Semenná plazma obsahuje velké množství proteinů, které se mimo jiné podílejí na interakci mezi spermii a oocytem. Z tohoto důvodu je na proteiny semenné plazmy často pohlíženo jako na potenciální markery fertility. Ačkoliv je proteomu semenné plazmy v posledních letech věnována poměrně velká pozornost, stále se nedaří najít takové markery, které by odrážely oplození schopnost spermii lépe než hodnocení spermioqramu. Problémem také zůstává nalezení markeru, který by spolehlivě prokazoval přítomnost spermii vhodných pro ICSI u pacientů s neobstrukční azoospermii. Vzhledem k tomu, že proteiny semenné plazmy jsou bohatě glykosylovány a glykosylace je velmi citlivá na sebemenší vlivy prostředí, zdá se, že pro zachování fertility spermii jsou klíčové nejen samotné proteiny, ale také jejich sacharidové modifikace.

Pro detekci vybraných sacharidových struktur glykoproteinů semenné plazmy mužů s různým spermioqramem byly v naší studii využity 4 různé lektiny – ConA, MAA, SNA a UEA. Concanavalin A (ConA) je lektin specificky vázající manóзовé zbytky, které se v semenné plazmě hojně vyskytují jako součást „core“ u N-glykanů. Navíc se jedná o lektin, který se běžně využívá k izolaci a detekci glykoproteinů. ConA reagoval u všech vzorků semenné plazmy s glykoproteiny o těchto molekulových hmotnostech – 63, 47, 38, 28, 24 a 22 kDa. Na základě studie Tomar et al. (2011) se lze domnívat, že glykoproteinové proužky odpovídají následujícím glykoproteinům:

63 kDa – laktoferrin, resp. laktotransferrin isoform 1 precursor

47 kDa – prostatická kyselá fosfatáza (PAP, prostatic acid phosphatase)

38 kDa – Human zinc-alpha-2 glycoprotein (AZGP1)

V naší studii jsme se především zaměřili na detekci glykoproteinů s obsahem kyseliny sialové pomocí lektinů MAA (specifického pro kyselinu sialovou s vazbou  $\alpha 2,3$ ) a SNA (specifického pro kyselinu sialovou s vazbou  $\alpha 2,6$ ). Význam kyseliny sialové v semenné plazmě nebyl dosud příliš prostudován. Kyselina sialová má ale zásadní roli v sacharidových řetězcích glykoproteinů spermii, kde se podílí na řadě důležitých dějů. Patří mezi ně např. migrace spermii skrz cervikální hlen, tvorba ovidukálního rezervoáru, kapacitace a regulace imunitní odpovědi samice na přítomnost spermii (Tecele et al. 2019). Kyselina sialová dává proteinům negativní náboj, který umožňuje snadnější průchod spermii cervikálním hlenem. Odstranění kyseliny sialové z býčích spermii způsobilo snížení jejich motility a sníženou schopnost průchodu cervikálním hlenem (Fernandez-Fuertes et al. 2018). Během kapacitace dochází k odstranění kyseliny sialové ze spermatických glykoproteinů pomocí sialidáz a spermie, které byly zbaveny kyseliny sialové vykazovaly vyšší schopnost vazby na *zona pellucida* oocytu. Kyselina sialová je tedy důležitá jakožto inhibitor předčasné kapacitace (Tecele & Gagneux 2015; Fernandez-Fuertes et al. 2018). Dá se tedy předpokládat, že kyselina sialová bude mít klíčovou funkci i v semenné plazmě.

V odborné literatuře byla popsána velká variabilita v množství kyseliny sialové u fertilních mužů (Pang et al. 2009), na druhou stranu však byly změny v sialylaci spojovány s konkrétními patologiemi. Např. u astenozoospermiků bylo pozorováno snížené množství  $\alpha 2,6$  vázané kyseliny sialové ve srovnání s infertilními i fertilními normozoospermiky a oligozoospermiky (Kratz et al. 2015). Snížená hladina  $\alpha 2,6$  vázané kyseliny sialové také pozitivně korelovala s motilitou spermii (Kratz et al. 2015). Kałuža et al. (2019) popisuje

snížené množství  $\alpha$ 2,6 vázané kyseliny sialové u infertilních normozoospermiků (IF N), astenozoospermiků (As) a oligoastenozoospermiků (OAs), ale pouze u glykoproteinu o molekulové hmotnosti 70 kDa. Nižší množství kyseliny sialové s vazbou  $\alpha$ 2,3 bylo popsáno u oligozoospermiků (Kratz et al. 2015). Naopak Kažuza et al. (2019) popisuje u většiny glykoproteinů sníženou reaktivitu s MAA u astenozoospermiků ve srovnání s ostatními skupinami (IF N, O, As a OAs). Metodou MALDI-TOF byla zjištěna snížená sialylace u O, OAs a nejvíce u As, naopak byla ale zvýšená u IF N (Kažuza et al. 2016). V případě této metody však byla sledována celková sialylace, nehledě na způsob vazby kyseliny sialové, zatímco u předchozích dvou experimentů (Kratz et al. 2015; Kažuza et al. 2019) byl ke studiu sialylace použit lektin MAA, který specificky rozpoznává pouze kyselinou sialovou s vazbou  $\alpha$ 2,3.

Při našich vazebných studiích jsme však tyto rozdíly v expresi kyseliny sialové nepozorovali, tj. v množství kyseliny sialové nebyl mezi jednotlivými vzorky nalezen žádný statisticky významný rozdíl, a to ani pro jeden z těchto lektinů. V případě MAA jsme u vzorků astenozoospermiků (As), u nichž je snížena motilita spermií, pozorovali nejvýraznější variabilitu v celkové míře signálu mezi jednotlivými pacienty. V případě SNA byla nejvýraznější variabilita pozorována u oligozoospermiků (O), tedy u pacientů se sníženým počtem spermií v ejakulátu.

Glykoproteinový profil byl pro oba použité lektiny odlišný. U MAA jsme identifikovali méně glykoproteinových proužků než u SNA, což ale do jisté míry může být způsobeno odlišnou efektivitou při rozdělování proteinů během elektroforézy. V případě SNA bylo detekováno 8 glykoproteinových proužků. Kažuza et al. (2019) však popisuje reaktivitu s SNA pouze u 6 glykoproteinů. Důvodem tohoto pozorování může být použití „polosuchého“ (semi-dry) elektropřenosu proteinů v této studii, při kterém dochází k horšímu přenosu vysokomolekulárních proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu. Glykoproteinový profil získaný po vazbě lektinu SNA se velmi podobal glykoproteinovému profilu detekovaného po vazbě ConA. Některé odhadnuté molekulové hmotnosti glykoproteinů (46, 38 a 24 kDa) byly v případě obou těchto lektinů téměř totožné, oba lektiny tedy pravděpodobně reagují se stejnými proteiny. Glykoproteinové proužky o molekulové hmotnosti 46 a 38 kDa by mohly odpovídat kyselé prostatické fosfatáze a AZGP1 (Tomar et al. 2011).

Dalším sledovaným sacharidem byla fukóza, která se v semenné plazmě vyskytuje velmi hojně jako součást Lewis epitopů. Pang et al. (2009) dokonce hovoří o extrémní míře fukosylace v semenné plazmě a zvýšená fukosylace se zdá být typická pro pacienty se sníženou plodností (Olejnik et al. 2015b). Pro hodnocení míry fukosylace jsme použili lektin UEA, který rozpoznává fukózu vázanou  $\alpha$ 1,2 a bifukosylované Lewis epitopy (Kažuza et al. 2019). Původním záměrem bylo také použití lektinu AAL (specifický pro  $\alpha$ 1,6 vázanou fukózu), ale vazebnou studii s tímto lektinem se nám nepodařilo vhodně optimalizovat – reakce glykoproteinů semenné plazmy s AAL byla přes opakované vyředění lektinu natolik výrazná, že nebylo možné rozlišit jednotlivé glykoproteinové proužky.

Výsledky při použití lektinu UEA byly velmi variabilní, u některých vzorků se lektin navázal pouze minimálně či vůbec, zatímco u jiných bylo možné rozlišit řadu glykoproteinových proužků (127, 75, 65, 50, 38, 27 a 23 kDa). Pokud k navázání lektinu došlo, společným rysem byl nejčastěji glykoproteinový proužek o velikosti 75 kDa, případně i 65 kDa. V případě glykoproteinů o molekulové hmotnosti 50, 38 a 23 kDa se opět může jednat o stejné glykoproteiny, které reagovaly také s lektiny SNA a ConA. Lektin UEA také poměrně výrazně

reagoval s proteiny o nižší molekulové hmotnosti (pod 30 kDa), což je ve shodě s výsledky studie Kažuza et al. (2019). Vzhledem k výrazné fukosylaci clusterinu, by námi detekovaný glykoproteinový proužek o molekulové hmotnosti kolem 75 kDa mohl odpovídat právě tomuto námi studovanému proteinu (de Silva et al. 1990b; Sabatte et al. 2011).

Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami vzorků SP nebyly nalezeny, zřejmě proto, že rozdíly v míře vazby lektinu na glykoproteiny byly velmi výrazné nejen mezi jednotlivými vzorky s různým spermioqramem, ale taktéž v rámci skupiny. Vzhledem k tomu, že v našich experimentech velmi často docházelo jen k minimální reakci UEA se semennou plazmou, můžeme se domnívat, že  $\alpha$ 1,2 vázaná fukóza není v semenné plazmě tak častá, jako např. fukóza s vazbou  $\alpha$ 1,6 rozpoznávána AAL, protože vazba s tímto lektinem byla u námi provedených experimentů velmi silná (viz výše). Je také možné, že  $\alpha$ 1,2 vázaná fukóza je typičtější spíše pro proteiny s nižší molekulovou hmotností, jak popisuje Kažuza et al. (2019), než jaká byla sledována u našich experimentů, kde jsme se zaměřili na proteiny větší než 20 kDa.

U všech použitých lektinů jsme identifikovali glykoproteinový proužek o molekulové hmotnosti kolem 40 kDa (resp. 38 kDa u ConA, 39 kDa u MAA, 40 kDa u SNA a 38 kDa u UEA), lze se tedy domnívat, že se jedná o tentýž protein, zřejmě o již zmíněný AZGP1. Glykoproteinový proužek o přibližně stejné molekulové hmotnosti (cca 23 kDa) jsme také detekovali u třech použitých lektinů (ConA, SNA a UEA).

Dále jsme se zaměřili na detekci clusterinu u pacientů s obstrukční (OA) a neobstrukční azoospermii (NOA), popř. kryptozoospermii, neboť se jedná o nejvíce zastoupený epididymální protein. Vzhledem k tomu, že místo obstrukce se u pacientů s OA většinou nachází až za nadvarletem (typicky se jedná o obstrukci chámovodu), předpokládali jsme, že v případě OA bude množství epididymálního clusterinu v SP výrazně sníženo oproti normozoospermikům i oproti pacientům s NOA.

Protilátka proti clusterinu Hs-3 reagovala u všech vzorků s proteinovým dvojproužkem o molekulové hmotnosti cca 79 kDa, což je v souladu s publikovanými daty a s heterodimerní strukturou tohoto proteinu (de Silva et al. 1990b, 1990c). U některých vzorků jsme také pozorovali reakci s proteinovým proužkem o molekulové hmotnosti cca 52 kDa. Podobné výsledky byly již také publikovány dříve (Sahlén et al. 2010), avšak v této studii byly pro SDS-PAGE použity sekrety ze semenných váčků, nikoliv semenná plazma. Otázkou nicméně zůstává, jestli je clusterin (CLU) nalezený v semenných váčcích shodný s izoformou sCLU (sekreční izoforma 1) detekovanou v SP. Výsledkem elektroforetické separace proteinů ze semenných váčků byl proteinový proužek o molekulové hmotnosti 55 kDa, který zároveň pozitivně reagoval s protilátkou proti CLU (Sahlén et al. 2010). Molekulová hmotnost sCLU, který byl detekován v semenné plazmě, by se však měla pohybovat mezi 70-80 kDa (O'Bryan et al. 1990).

U vzorků N, As a O jsme v množství CLU nepozorovali žádný statisticky významný rozdíl. Salehi et al. (2013) ale popisuje snížené množství CLU u infertilních mužů, v jiné studii bylo zaznamenáno snížení u oligozoospermiků (Sharma et al. 2013). U obou studií však byla použita jiná metodika (ELISA, resp. kapalínová chromatografie s hmotnostní spektrometrií), než v naší studii. My jsme při porovnávání vzorků s různým spermioqramem u oligozoospermiků (O) zaznamenali nejvyšší variabilitu v míře signálu vazby protilátky. Při porovnávání vzorků se stejným spermioqramem by se však u oligozoospermiků dalo hovořit

o snížených hodnotách, pokud bychom z hodnocení odstranili vzorek O 5813, který vykazoval výrazně vyšší signál než ostatní vzorky, a je možné, že se jedná o odlehlou hodnotu, která by do statistického hodnocení neměla být zahrnuta. Z tohoto hlediska by bylo zajímavé tento pokus zopakovat s vyšším počtem vzorků, aby bylo zřejmé, zdali je tento vyšší signál u některých vzorků statisticky nevýznamný, nebo je skutečně dán natolik velkou variabilitou proteinového profilu semenné plazmy mezi jednotlivými vzorky. Dále je třeba uvést, že u námi použitých vzorků nemáme informace o fertilitě pacientů a známe pouze výsledek jejich spermioqramu. Přestože tito pacienti navštívili IVF centrum za cílem léčby neplodnosti, nemůžeme např. vyloučit, že se jednalo o neplodnost ze strany partnerky. Tito pacienti tedy mohou být fertilní i přesto, že mají zhoršené parametry spermioqramu.

Co se týče funkce clusterinu, jakožto potenciálního markeru mužské neplodnosti, výsledky odborných studií jsou velice variabilní, mnohdy až protichůdné, a to jak mezi jednotlivými živočišnými druhy, tak v rámci druhu (viz Literární rešerše, kap. 3.2.3.1 Clusterin). Závěry se také velmi liší v závislosti na tom, zdali je analyzován clusterin v semenné plazmě nebo na spermiích, případně na tom, jestli byla provedena proteomická studie nebo analýza transkriptu tohoto proteinu. Další otázkou zůstává, jestli je clusterin opravdu přítomný i v jiných přídatných pohlavních žlázách a případně do jaké míry.

Např. O'Bryan et al. (1990) zaznamenal snížené množství CLU v semenné plazmě u mužů s OA a s poruchami spermatogeneze ve srovnání s oligozoospermiky a normozoospermiky. Úplnou absenci tohoto proteinu ale popisuje pouze u jedinců s agenezí chámovodu, a tudíž i s absencí semenných váčků. Na základě těchto informací se domnívá, že CLU je produkován (kromě varlat a nadvarlat) také semennými váčky. Tuto teorii dále podporuje skutečnost, že autor detekoval značné množství toho proteinu právě v tekutině pocházející pouze ze semenných váčků (O'Bryan et al. 1990), tedy podobně jako ve své pozdější práci Sahlén et al. (2010). Přítomnost proteinu v lidských semenných váčcích prokázal později také imunohistochemicky (O'Bryan et al. 1994a). Určité množství CLU bylo nalezeno také v prostatě, ale pouze u pacienta s benigní hypertrofií prostaty, nikoliv však ve zdravé prostatě (O'Bryan et al. 1994a). Je tedy možné, že semenná plazma pacientů s OA bude obsahovat CLU právě ze semenných váčků a prostaty.

Množství clusterinu jsme sledovali také u azoospermiků s neobstrukční azoospermii (NOA), obstrukční azoospermii (OA), azoospermii po provedené vasktomii (V) a kryptozoospermiků (KR). Vzhledem k tomu, že se jedná o nejvíce zastoupený epididymální protein a k jeho tvorbě dochází především ve varlatech a nadvarlatech, předpokládali jsme, že množství clusterinu bude u pacientů s OA či po vasktomii výrazně nižší. Hodnoty relativní optické denzity byly u všech těchto patologií, pro které je typická absence spermií v ejakulátu nebo pouze jejich stopové množství, velmi vyrovnané a výrazně nižší než relativní optická denzita naměřená u normozoospermika. Na základě získaných dat se domníváme, že nižší množství CLU souvisí s nižším počtem spermií v ejakulátu. Je např. možné, že většina CLU (pravděpodobně původem z epididymu) je nejprve navázána na spermie a až později je ze spermií opět uvolněna do semenné plazmy. Menší množství spermií v ejakulátu by tedy znamenalo také menší množství clusterinu uvolněného do SP. V tomto případě by pak bylo pravděpodobné, že clusterin detekovaný u pacientů s NOA, OA, V a KR pochází z jiných žláz nežli z nadvarlete, zřejmě ze semenných váčků.

Předpokládáme, že u proteinů SP by měly být vzorky pacientů s OA a pacientů po vasektomii podobné, neboť v obou případech je přítomna obstrukce ve vývodných pohlavních cestách. Vzhledem k tomu, že tento pokus nebyl zopakován a byl použit pouze jeden vzorek pacienta s OA a jeden vzorek pacienta s NOA, nebylo možné tato data statisticky vyhodnotit. Pro potvrzení těchto výsledků by bylo také nutné pokus několikrát zopakovat s větším počtem vzorků normozoospermiků, jakožto kontrol. Pokud by se tento výsledek potvrdil, bylo by možné se dále domnívat, že tvorba clusterinu v ostatních přídatných pohlavních žlázách (semenné vajíčky, prostata) je pouze minimální. Ideální by samozřejmě bylo také znát přesnou lokalizaci obstrukce, aby bylo jasné, sekrety kterých přídatných pohlavních žláz se podílejí na obsahu semenné plazmy. Předpokládali jsme, že nejběžnějším místem obstrukce je oblast chámovodu (jako je tomu i v případě vasektomovaných pacientů), nelze však vyloučit, že obstrukce byla v jiných částech vývodných cest, např. již v rámci nadvarlete a jeho vývodných kanálků.

Jelikož jsme měli k dispozici jen jediný vzorek semenné plazmy pacienta s neobstrukční azoospermií, nebylo nakonec možné vyhodnotit, zdali je nějaký statisticky významný rozdíl mezi množstvím CLU u pacientů s neobstrukční a obstrukční azoospermií. Z našich výsledků tomu nic nenasvědčuje, ale bylo by nutné pokus opakovat s větším množstvím vzorků pacientů s NOA. Zajímavé by také bylo porovnat větší množství vzorků pacientů s obstrukční azoospermií a pacientů s azoospermií po provedené vasektomii, zdali je nějaký rozdíl v obsahu proteinů či glykoproteinů u obstrukční azoospermie získané a vrozené.

Ústředním problémem u analýzy proteinového a glykoproteinového profilu semenné plazmy je nejen velmi vysoká míra variability mezi jedinci, ale také v rámci jednotlivých patologických skupin (tj. pro danou patologii bývá častá relativně vysoká hodnota směrodatné odchylky) (Olejnik et al. 2015b), což se potvrdilo i u našich experimentů. Studium proteinového profilu a glykomu semenné plazmy tedy vyžaduje analýzu velmi vysokého počtu vzorků (Kołodziejczyk et al. 2018). Např. k analýze glykomu u fertálních mužů byly použity pouze čtyři vzorky (Pang et al. 2009). Podobně je tomu i u některých studií, zabývajících se clusterinem.

Syntéza glykanů je navíc velmi citlivá i na drobné změny vnějšího prostředí (Ferens-Sieczkowska et al. 2013). Vliv na variabilitu může mít také např. rozdílná míra a doba ztekucování ejakulátu při přípravě vzorků semenné plazmy. Ta obsahuje velké množství proteáz, jejichž úkolem je ztekucení ejakulátu prostřednictvím štěpení proteinů na menší fragmenty. Typickým příkladem je např. semenogelin, jehož molekulová hmotnost se pohybuje kolem 75 kDa, nicméně vlivem proteáz je naštěpen na nízkomolekulární fragmenty, které byly viditelné po elektroforéze a obarvení gelu Coomassie Brilliant Blue jako proteinové proužky o velikosti menší než 20 kDa (Giacomini et al. 2015). Lze tedy předpokládat, že pokud u vzorků probíhalo nestejně ztekucování ejakulátu, proteiny semenné plazmy byly vystaveny činnosti proteáz po různě dlouhou dobu. Výsledkem tohoto štěpení pak mohou být fragmenty o různé velikosti, které se ve výsledku jeví jako variabilita v proteinovém profilu. Proto je při práci se semennou plazmou extrémně důležité, aby všechny vzorky byly zpracovány za jednotných podmínek, a výsledky je třeba interpretovat vždy ve vztahu k použité metodice.

Ve studiích, ve kterých využívali lektinové čipy nebo lektinové ELISA testy, bylo ve vzorcích SP nalezeno velké množství vysokomolekulárních glykoproteinů, pro které je typická O-glykosylace. Naopak u studií, které využívají Western blot, dochází při elektroforéze

k dělení proteinů o menší molekulové hmotnosti, a u těch převládá N-glykosylace (Kołodziejczyk et al. 2018). Většina publikovaných článků ohledně glykoproteinového profilu semenné plazmy se týká právě změn v N-glykosylaci. Zřejmě z tohoto důvodu jsou výsledky Olejnik et al. (2015b) opačné (viz Literární rešerše, kap. 3.1.3. Glykom semenné plazmy), než při použití lektinových mikročipů – tj. popisuje se zde zvýšená fukosylace u semenné plazmy mužů se sníženou plodností.

Semenná plazma je sice velmi komplexní tekutinou, nicméně může také snadno docházet k tomu, že proteiny, které se zde vyskytují ve velkém množství (např. opět semenogeliny) mohou maskovat přítomnost jiných, méně zastoupených proteinů. Ty mohou mít klíčový vliv na plodnost, ale je problematické je detekovat (Samanta et al. 2018).

Dalším problémem při hodnocení semenné plazmy je způsob zařazování vzorků do jednotlivých kategorií na základě určité patologie. Zatím nejčastějším způsobem je kategorizace vzorků na základě hodnocení spermioqramu. Spermioqram však nemusí vždy odrážet skutečnou plodnost pacienta, navíc nezohledňuje celé množství dalších faktorů (imunologické problémy, poškození DNA, míru oxidativního stresu, aj.), které mohou být za případnou neplodnost zodpovědné. Navíc je známo, že parametry ejakulátu mohou u stejného pacienta výrazně kolísat.

Někteří autoři používají jako kontrolní vzorky normozoospermiky (Olejnik et al. 2015b), jiní rozlišují normozoospermiky na fertílí (kontrola) a infertílí (Kratz et al. 2015). Další možností je brát jako referenční muže s prokázanou fertílitou v kombinaci s normálním spermioqramem (Pang et al. 2009) či nehledě na jejich spermioqram (Kołodziejczyk et al. 2018). Vzhledem k těmto odlišným přístupům je ale poměrně náročné se ve výsledcích těchto studií zorientovat.

My jsme bohužel v rámci experimentu neměli k dispozici žádná data o fertílité pacientů, což by hodnocení výsledků nepochybně usnadnilo.

Pro případné další experimenty by bylo vhodné mít detailnější informace ohledně fertílity/infertílity pacientů, hladin hormonů, výsledků genetického vyšetření či výsledků provedené IVF. Bližšímu pochopení problematiky by také výrazně přispěla znalost toho, zdali jsou u pacienta parametry ejakulátu zhoršené dlouhodobě, či zda se jedná pouze o akutní problémy.

## 7 Závěr

Cílem práce bylo porovnání proteinového a glykoproteinového profilu semenné plazmy (SP) u mužů s různým spermioqramem. Pro sledování glykoproteinového složení SP jsme použili lektiny specifické pro manózu (ConA), kyselinu sialovou (MAA a SNA) a fukózu (UEA). U pacientů s různým spermioqramem a u pacientů s azoospermii a kryptozoospermii jsme také sledovali množství nejvíce zastoupeného epididymálního proteinu clusterinu pomocí specifické protilátky.

Vycházeli jsme z hypotézy, že glykoproteinový profil mužů s normozoospermii bude odlišný v porovnání s pacienty s patologickými parametry ejakulátu (astenozoospermie, oligozoospermie). Tato hypotéza se nepotvrdila, neboť mezi jednotlivými vzorky (normozoospermici, astenozoospermici, oligozoospermici) nebyl, co se týče glykoproteinového profilu, nalezen žádný statisticky významný rozdíl ani pro jeden z použitých lektinů. Tento výsledek připisujeme vysoké míře intraindividuální i interindividuální variability v glykoproteinovém složení SP či rozdílné době a míře ztekucování SP před jejím zpracováním. Podobný glykoproteinový profil jsme pozorovali u ConA a SNA, dá se tedy předpokládat, že lektiny reagovaly se stejnými glykoproteiny. U všech lektinů jsme zaznamenali reaktivitu s glykoproteinovým proužkem o molekulové hmotnosti cca 40 kDa. Na základě publikované literatury se domníváme, že se jedná o protein AZGP1 (human zinc-alpha-2 glycoprotein).

Dále jsme předpokládali, že i množství clusterinu se bude lišit v závislosti na spermioqramu a že množství clusterinu bude výrazně sníženo v případě obstrukční azoospermie ve srovnání s normozoospermii a neobstrukční azoospermii. Rozdíl v množství clusterinu jsme však pozorovali pouze u vzorků azoospermie a kryptozoospermie při porovnání se vzorkem normozoospermika. Pacienti s těmito patologiemi měli oproti normozoospermikovi výrazně nižší množství clusterinu. Dá se tedy předpokládat, že nižší množství clusterinu souvisí s nižším počtem spermií v ejakulátu, např. že clusterin epididymálního původu je nejprve navázán na spermie a až později je z povrchu spermií uvolněn do SP. Clusterin detekovaný u pacientů s neobstrukční a obstrukční azoospermii, kryptozoospermii a clusterin u vasektomovaných pacientů by pak mohl pocházet z jiných reprodukčních orgánů např. ze semenných váčků.

Mezi pacienty s obstrukční a neobstrukční azoospermii jsme však v množství clusterinu nepozorovali žádný výrazný rozdíl. Tento pokus jsme ale provedli pouze jednou a pouze s jedním vzorkem pacienta s obstrukční a neobstrukční a azoospermii. Proto nebylo možné tato data statisticky vyhodnotit.

Námi stanovené hypotézy se tedy nepotvrdily. Vzhledem k výrazné komplexitě semenné plazmy a existenci velkých intraindividuálních i interindividuálních rozdílů v jejím složení, by bylo jistě zajímavé tyto experimenty zopakovat s co největším množstvím vzorků a s důrazem na zpracování všech vzorků jednotným způsobem. Přínosné by také bylo znát celkovou anamnézu pacientů a mít konkrétnější informace o jejich fertilitě.



## 8 Literatura

- Alvarez C, Castilla JA, Martínez L, Ramírez JP, Vergara F, Gaforio JJ. 2003. Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Human Reproduction* **18**:2082-2088.
- Amann RP, Howards SS. 1980. Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. *The Journal of Urology* **124**:211-215.
- Aslani F, Modarresi MH, Soltanghoraee H, Akhondi MM, Shabani A, Lakpour N, Sadeghi MR. 2011. Seminal molecular markers as a non-invasive diagnostic tool for the evaluation of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **57**:190-196.
- Atlas-White M, Murphy BF, Baker HW. 2000. Localisation of clusterin in normal human sperm by immunogold electron microscopy. *Pathology* **32**:258-261.
- Aumüller G, Riva A. 1992. Morphology and functions of the human seminal vesicle. *Andrologia* **24**:183-196.
- Bailey RW, Aronow B, Harmony JAK, Griswold MD. 2002. Heat shock-initiated apoptosis is accelerated and removal of damaged cells is delayed in the testis of clusterin/ApoJ knock-out mice. *Biology of Reproduction* **66**:1042-1053.
- Batruch I, Lecker I, Kagedan D, Smith CR, Mullen BJ, Grober E, Lo KC, Diamandis EP, Jarvi KA. 2011. Proteomic analysis of seminal plasma from normal volunteers and post-vasectomy patients identifies over 2000 proteins and candidate biomarkers of the urogenital system. *Journal of Proteome Research* **10**:941-953.
- Batruch I, Smith CR, Mullen BJ, Grober E, Lo KC, Diamandis EP, Jarvi KA. 2012. Analysis of seminal plasma from patients with non-obstructive azoospermia and identification of candidate biomarkers of male infertility. *Journal of Proteome Research* **11**:1503-1511.
- Bedford JM. 1994. The status and the state of the human epididymis. *Human Reproduction* **9**:2187-2199.
- Begley A, Quinn P. 1982. Decapacitation factors in semen. *Clinical reproduction and fertility* **1**:167-175.
- Belleannée C, Calvo É, Caballero J, Sullivan R. 2013. Epididymosomes convey different repertoires of microRNAs throughout the bovine epididymis. *Biology of Reproduction* **89**:30.
- Belleannée C, Labas V, Teixeira-Gomes A-P, Gatti JL, Dacheux J-L, Dacheux F. 2011. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *Journal of Proteomics* **74**:59-78.
- Blaschuk O, Burdzy K, Fritz IB. 1983. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *The Journal of Biological Chemistry* **258**:7714-7720.

- Brody I, Ronquist G, Gottfries A. 1983. Ultrastructural localization of the prostasome – an organelle in human seminal plasma. *Upsala journal of medical sciences* **88**:63-80.
- Cadavid J AP, Alvarez A, Markert UR, Maya WC. 2014. Differential protein expression in seminal plasma from fertile and infertile males. *Journal of Human Reproductive Sciences* **7**:206-211.
- Calvete JJ, Mann K, Schäfer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, Raida M, Töpfer-Petersen E. 1995. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *The Biochemical Journal* **310 (Pt 2)**:615-622.
- Čapková J, Geussová G, Peknicová J. 2002. New monoclonal antibody to human apolipoprotein J. *Folia Biologica* **48**:40-42.
- Centola GM. 2012. Determination of male infertility: is the 2010 WHO reference range helpful or confusing? *Fertility and Sterility* **98**:1416-1417.
- Chabory E et al. 2009. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *The Journal of Clinical Investigation* **119**:2074-2085.
- Chandonnet L, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P. 1990. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development* **26**:313-318.
- Chen H. 2011. Lewis glyco-epitopes: structure, biosynthesis, and functions. *Advances in experimental medicine and biology* **705**:53-80.
- Chiu PCN, Chung M-K, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Ho P-C, Ng EHY, Lee K-F, Yeung WSB. 2007. Cumulus Oophorus-associated Glycodelin-C Displaces Sperm-bound Glycodelin-A and -F and Stimulates Spermatozoa-Zona Pellucida Binding. *Journal of Biological Chemistry* **282**:5378-5388.
- Chiu PCN, Chung M-K, Tsang H-Y, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Lee K-F, Yeung WSB. 2005. Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa. *The Journal of Biological Chemistry* **280**:25580-25589.
- Choi N-H, Tobe T, Hara K, Yoshida H, Tomita M. 1990. Sandwich ELISA assay for quantitative measurement of SP-40, 40 in seminal plasma and serum. *Journal of Immunological Methods* **131**:159-163.
- Chughtai B, Sawas A, O'Malley RL, Naik RR, Ali Khan S, Pentylala S. 2005. A neglected gland: a review of Cowper's gland. *International Journal of Andrology* **28**:74-77.
- Clark AM, Griswold MD. 1997. Expression of clusterin/sulfated glycoprotein-2 under conditions of heat stress in rat Sertoli cells and a mouse Sertoli cell line. *Journal of Andrology* **18**:257-263.
- Cocuzza M. 2015. RE: Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. *International Braz J Urol: Official Journal of the Brazilian Society of Urology* **41**:181-183.

- Cocuzza M, Alvarenga C, Pagani R. 2013. The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics* **68**:15-26.
- Cohen D, Maldera J, Weigel M, Ernesto J, Vasen G, Cuasnicu P. 2011. Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISP) and their role in mammalian fertilization. *Biological research* **44**:135-138.
- Collard MW, Griswold MD. 1987. Biosynthesis and molecular cloning of sulfated glycoprotein 2 secreted by rat Sertoli cells. *Biochemistry* **26**:3297-3303.
- Cooper TG et al. 2010. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update* **16**:231-245.
- Cosentino MJ, Cockett AT. 1986. Structure and function of the epididymis. *Urological Research* **14**:229-240.
- Dacheux JL, Belghazi M, Lanson Y, Dacheux F. 2006. Human epididymal secretome and proteome. *Molecular and Cellular Endocrinology* **250**:36-42.
- Dacheux J-L, Belleannée C, Guyonnet B, Labas V, Teixeira-Gomes A-P, Ecroyd H, Druart X, Gatti J-L, Dacheux F. 2012. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Systems biology in reproductive medicine* **58**:197-210.
- Dacheux J-L, Belleannée C, Jones R, Labas V, Belghazi M, Guyonnet B, Druart X, Gatti JL, Dacheux F. 2009. Mammalian epididymal proteome. *Molecular and Cellular Endocrinology* **306**:45-50.
- Dacheux J-L, Dacheux F. 2014. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction* **147**:27-42.
- Dacheux J-L, Dacheux F, Druart X. 2016. Epididymal protein markers and fertility. *Animal Reproduction Science* **169**:76-87.
- Davalieva K, Kiprijanovska S, Noveski P, Plaseski T, Kocevaska B, Broussard C, Plaseska-Karanfilska D. 2012. Proteomic analysis of seminal plasma in men with different spermatogenic impairment. *Andrologia* **44**:256–264.
- de Silva HV, Harmony JAK, Stuart WD, Gil CM, Robbins J. 1990a. Apolipoprotein J: structure and tissue distribution. *Biochemistry* **29**:5380-5389.
- de Silva HV, Stuart WD, Duvic CR, Wetterau JR, Ray MJ, Ferguson DG, Albers HW, Smith WR, Harmony JA. 1990b. A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* **265**:13240-13247.
- de Silva HV, Stuart WD, Park YB, Mao SJ, Gil CM, Wetterau JR, Busch SJ, Harmony JA. 1990c. Purification and characterization of apolipoprotein J. *The Journal of Biological Chemistry* **265**:14292-14297.
- Dohle GR, Elzanaty S, van Casteren NJ. 2012. Testicular biopsy: clinical practice and interpretation. *Asian Journal of Andrology* **14**:88-93.

- Drabovich AP, Dimitromanolakis A, Saraon P, Soosaipillai A, Batruch I, Mullen B, Jarvi K, Diamandis EP. 2013. Differential diagnosis of azoospermia with proteomic biomarkers ECM1 and TEX101 quantified in seminal plasma. *Science Translational Medicine* **5**:212ra160.
- Drabovich AP, Jarvi K, Diamandis EP. 2011. Verification of Male Infertility Biomarkers in Seminal Plasma by Multiplex Selected Reaction Monitoring Assay. *Molecular & Cellular Proteomics* **10**:1-13.
- Drabovich AP, Saraon P, Jarvi K, Diamandis EP. 2014. Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nature Reviews. Urology* **11**:278-288.
- Ecroyd H, Belghazi M, Dacheux J-L, Gatti J-L. 2005. The epididymal soluble prion protein forms a high-molecular-mass complex in association with hydrophobic proteins. *Biochemical Journal* **392**:211-219.
- Edström AML, Malm J, Frohm B, Martellini JA, Giwercman A, Mörgelin M, Cole AM, Sørensen OE. 2008. The major bactericidal activity of human seminal plasma is zinc-dependent and derived from fragmentation of the semenogelins. *Journal of Immunology* **181**:3413-3421.
- Esteves SC. 2014. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. *International Braz J Urol: Official Journal of the Brazilian Society of Urology* **40**:443-453.
- Esteves SC. 2015. Clinical management of infertile men with nonobstructive azoospermia. *Asian Journal of Andrology* **17**:459-470.
- Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. 2011. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics* **66**:691-700.
- Esteves SC, Zini A, Aziz N, Alvarez JG, Sabanegh ES, Agarwal A. 2012. Critical appraisal of World Health Organization's new reference values for human semen characteristics and effect on diagnosis and treatment of subfertile men. *Urology* **79**:16-22.
- Ferens-Sieczkowska M, Kowalska B, Kratz EM. 2013. Seminal plasma glycoproteins in male infertility and prostate diseases: is there a chance for glyco-biomarkers? *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals* **18**:10-22.
- Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, Lenzi A, Foresta C. 2007. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **92**:762-770.
- Fernandez-Fuertes B, Blanco-Fernandez A, Reid CJ, Meade KG, Fair S, Lonergan P. 2018. Removal of sialic acid from bull sperm decreases motility and mucus penetration ability but increases zona pellucida binding and polyspermic penetration in vitro. *Reproduction* **155**:481-492.

- Flint M, McAlister D, Agarwal A, Du Plessis S. 2015. Mammalian Endocrinology and Male Reproductive Biology (1st ed.). Pages 245-258 in Singh SK, editor. Male Accessory Sex Glands: Structure and Function. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Fouchécourt S, Métayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux JL. 2000. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biology of Reproduction* **62**:1790-1803.
- Frenette G, Lessard C, Sullivan R. 2002. Selected proteins of “prostasome-like particles” from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *Biology of Reproduction* **67**:308-313.
- Frenette G, Sullivan R. 2001. Prostasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Molecular Reproduction and Development* **59**:115-121.
- Fujimoto VY, Kane JP, Ishida BY, Bloom MS, Browne RW. 2010. High-density lipoprotein metabolism and the human embryo. *Human Reproduction Update* **16**:20-38.
- Gatti JL, Druart X, Guérin Y, Dacheux F, Dacheux JL. 1999. A 105- to 94-kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin I-converting enzyme (ACE); evidence that sperm are the source of this ACE. *Biology of Reproduction* **60**:937-945.
- Giacomini E, Ura B, Giolo E, Luppi S, Martinelli M, Garcia RC, Ricci G. 2015. Comparative analysis of the seminal plasma proteomes of oligoasthenozoospermic and normozoospermic men. *Reproductive BioMedicine Online* **30**:522-531.
- Gilany K, Minai-Tehrani A, Savadi-Shiraz E, Rezaeost H, Lakpour N. 2015. Exploring the Human Seminal Plasma Proteome: An Unexplored Gold Mine of Biomarker for Male Infertility and Male Reproduction Disorder. *Journal of Reproduction & Infertility* **16**:61-71.
- Gornik O, Wagner J, Pucić M, Knezević A, Redzic I, Lauc G. 2009. Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology* **19**:1547-1553.
- Gray S, Huggins C. 1942. Electrophoretic Analysis of Human Semen. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **50**:351-353.
- Griffiths GS, Galileo DS, Aravindan RG, Martin-DeLeon PA. 2009. Clusterin facilitates exchange of glycosyl phosphatidylinositol-linked SPAM1 between reproductive luminal fluids and mouse and human sperm membranes. *Biology of Reproduction* **81**:562-570.
- Haidl G, Opper C. 1997. Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. *Human Reproduction* **12**:2720-2723.
- Han Z, Wang Z, Cheng G, Liu B, Li P, Li J, Wang W, Yin C, Zhang W. 2012. Presence, localization, and origin of clusterin in normal human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **29**:751-757.

- Handrow RR, Lenz RW, Ax RL. 1982. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **107**:1326-1332.
- Harold D et al. 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics* **41**:1088-1093.
- Hermo L, Jacks D. 2002. Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Molecular Reproduction and Development* **63**:394-410.
- Herwig R, Knoll C, Planyavsky M, Pourbiabany A, Greilberger J, Bennett KL. 2013. Proteomic analysis of seminal plasma from infertile patients with oligoasthenoteratozoospermia due to oxidative stress and comparison with fertile volunteers. *Fertility and Sterility* **100**:355-366.
- Hikim A, Hoffer A. 1988. Duration of epididymal sperm transit in hamster: An autoradiographic study. *Gamete research* **19**:411-6.
- Hoffer AP, Hinton BT. 1984. Morphological evidence for a blood-epididymis barrier and the effects of gossypol on its integrity. *Biology of Reproduction* **30**:991-1004.
- Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. 2003. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Human Reproduction* **18**:1660-1665.
- Hu J, Merriner DJ, O'Connor AE, Houston BJ, Furic L, Hedger MP, O'Bryan MK. 2018. Epididymal cysteine-rich secretory proteins are required for epididymal sperm maturation and optimal sperm function. *Molecular Human Reproduction* **24**:111-122.
- Humphreys DT, Carver JA, Easterbrook-Smith SB, Wilson MR. 1999. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **274**:6875-6881.
- Ibrahim NM, Gilbert GR, Loseth KJ, Crabo BG. 2000. Correlation between clusterin-positive spermatozoa determined by flow cytometry in bull semen and fertility. *Journal of andrology* **21**:887-894.
- Ibrahim NM, Romano JE, Troedsson MHT, Crabo BG. 2001. Effect of Scrotal Insulation on Clusterin-Positive Cells in Ram Semen and Their Relationship to Semen Quality. *Journal of Andrology* **22**:863-877.
- Janiszewska E, Kratz EM. 2020. Could the glycosylation analysis of seminal plasma clusterin become a novel male infertility biomarker? *Molecular Reproduction and Development* **87**:515-524.
- Javadirad SM, Hojati Z, Ghaedi K, Nasr-Esfahani MH. 2016. Expression ratio of histone demethylase KDM3A to protamine-1 mRNA is predictive of successful testicular sperm extraction in men with obstructive and non-obstructive azoospermia. *Andrology* **4**:492-499.

- Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. 1989. Evaluation of the azoospermic patient. *The Journal of Urology* **142**:6-65.
- Jenne DE, Tschopp J. 1989. Molecular structure and functional characterization of a human complement cytotoxicity inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**:7123-7127.
- Johnson L. 1982. A re-evaluation of daily sperm output of men. *Fertility and Sterility* **37**:811-816.
- Johnson L, Varner DD. 1988. Effect of daily spermatozoan production but not age on transit time of spermatozoa through the human epididymis. *Biology of Reproduction* **39**:812-817.
- Jonáková V, Kraus M, Veselský L, Cechová D, Bezouska K, Tichá 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.
- Julkunen M, Rutanen EM, Koskimies A, Ranta T, Bohn H, Seppälä M. 1985. Distribution of placental protein 14 in tissues and body fluids during pregnancy. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* **92**:1145-1151.
- Juyena NS, Stelletta C. 2012. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology* **33**:536-551.
- Kagedan D, Lecker I, Batruch I, Smith C, Kaploun I, Lo K, Grober E, Diamandis EP, Jarvi KA. 2012. Characterization of the seminal plasma proteome in men with prostatitis by mass spectrometry. *Clinical Proteomics* **9**:2.
- Kałuża A, Ferens-Sieczkowska M, Olejnik B, Kołodziejczyk J, Zimmer M, Kratz EM. 2019. The content of immunomodulatory glycoepitopes in seminal plasma glycoproteins of fertile and infertile men. *Reproduction, Fertility and Development* **31**:579-589.
- Kałuża A, Jarzab A, Gamian A, Kratz EM, Zimmer M, Ferens-Sieczkowska M. 2016. Preliminary MALDI-TOF-MS analysis of seminal plasma N-glycome of infertile men. *Carbohydrate Research* **435**:19-25.
- Kamp C et al. 2001. High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoli-cell-only syndrome. *Molecular Human Reproduction* **7**:987-994.
- Kannejad Z, Ghareh-Fard B. 2019. Difference in the seminal plasma protein expression in unexplained infertile men with successful and unsuccessful in vitro fertilisation outcome. *Andrologia* (e13158). DOI: 10.1111/and.13158.
- Katnik-Prastowska I, Kratz EM, Faundez R, Chełmońska-Soyta A. 2006. Lower expression of the alpha2,3-sialylated fibronectin glycoform and appearance of the asialo-fibronectin glycoform are associated with high concentrations of fibronectin in human seminal plasma with abnormal semen parameters. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **44**:1119-1125.

- Khalaf AS, Merhish SM. 2010. Anatomical Study of the Accessory Genital Glands in Males Sheep (*Ovis aris*) and Goats (*Caprus hircus*). *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine* **34(2)**:1-8.
- Kirchhoff C. 1998. Molecular characterization of epididymal proteins. *Reviews of Reproduction* **3**:86-95.
- Kirchhoff C, Hale G. 1996. Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Molecular Human Reproduction* **2**:177-184.
- Kirchhoff C, Osterhoff C, Pera I, Schröter S. 1998. Function of human epididymal proteins in sperm maturation. *Andrologia* **30**:225-232.
- Kissinger C, Skinner MK, Griswold MD. 1982. Analysis of Sertoli cell-secreted proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Biology of Reproduction* **27**:233-240.
- Koistinen H, Easton RL, Chiu PCN, Chalabi S, Halttunen M, Dell A, Morris HR, Yeung WSB, Seppälä M, Koistinen R. 2003. Differences in Glycosylation and Sperm-Egg Binding Inhibition of Pregnancy-Related Glycodelin. *Biology of Reproduction* **69**:1545-1551.
- Koistinen H, Koistinen R, Dell A, Morris HR, Easton RL, Patankar MS, Oehninger S, Clark GF, Seppälä M. 1996. Glycodelin from seminal plasma is a differentially glycosylated form of contraceptive glycodelin-A. *Molecular Human Reproduction* **2**:759-765.
- Kołodziejczyk J, Blixt O, Olejnik B, Zimmer M, Ferens-Sieczkowska M. 2018. Application of lectin microarrays for the analysis of seminal plasma glycome. *Andrologia* (e13018). DOI: 10.1111/and.13018.
- Koppers AJ, Reddy T, O'Bryan MK. 2011. The role of cysteine-rich secretory proteins in male fertility. *Asian Journal of Andrology* **13**:111-117.
- Korbakis D et al. 2017. Preclinical evaluation of a TEX101 protein ELISA test for the differential diagnosis of male infertility. *BMC medicine* **15**:60.
- Kratz EM, Kałuża A, Zimmer M, Ferens-Sieczkowska M. 2015. The Analysis of Sialylation, N-Glycan Branching, and Expression of O-Glycans in Seminal Plasma of Infertile Men. *Disease Markers* (e13018). DOI:10.1111/and.13018.
- Krull N, Ivell R, Osterhoff C, Kirchhoff C. 1993. Region-specific variation of gene expression in the human epididymis as revealed by in situ hybridization with tissue-specific cDNAs. *Molecular Reproduction and Development* **34**:16-24.
- Kumar V, Hassan M, Kashav T, Singh T, Yadav S. 2008. Heparin-Binding Proteins of Human Seminal Plasma: Purification and Characterization. *Molecular reproduction and development* **75**:1767-74.
- Kumar V, Hassan MI, Tomar AK, Kashav T, Nautiyal J, Singh S, Singh TP, Yadav S. 2009. Proteomic analysis of heparin-binding proteins from human seminal plasma: a step towards identification of molecular markers of male fertility. *Journal of Biosciences* **34**:899-908.



- LaFlamme BA, Wolfner MF. 2013. Identification and Function of Proteolysis Regulators in Seminal Fluid. *Molecular reproduction and development* **80**:80-101.
- Lee C, Keefer M, Zhao ZW, Kroes R, Berg L, Liu XX, Sensibar J. 1989. Demonstration of the role of prostate-specific antigen in semen liquefaction by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Andrology* **10**:432-438.
- Lee CN, Ax RL. 1984. Concentrations and Composition of Glycosaminoglycans in the Female Bovine Reproductive Tract. *Journal of Dairy Science* **67**:2006-2009.
- Légaré C, Cloutier F, Makosso-Kallyth S, Laflamme N, Jarvi K, Tremblay RR, Sullivan R. 2013. Cysteine-rich secretory protein 1 in seminal plasma: potential biomarker for the distinction between obstructive and nonobstructive azoospermia. *Fertility and Sterility* **100**:1253-1260.
- Leskov KS, Klokov DY, Li J, Kinsella TJ, Boothman DA. 2003. Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *The Journal of Biological Chemistry* **278**:11590-11600.
- Levine N, Marsh DJ. 1971. Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *The Journal of Physiology* **213**:557-570.
- Lilja H. 1985. A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *The Journal of Clinical Investigation* **76**:1899-1903.
- Lilja H, Abrahamsson PA, Lundwall A. 1989. Semenogelin, the predominant protein in human semen. Primary structure and identification of closely related proteins in the male accessory sex glands and on the spermatozoa. *The Journal of Biological Chemistry* **264**:1894-1900.
- Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, Laurell CB. 1987. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *The Journal of Clinical Investigation* **80**:281-285.
- Liu X et al. 2018. In-depth quantitative proteome analysis of seminal plasma from men with oligoasthenozoospermia and normozoospermia. *Reproductive BioMedicine Online* **37**:467-479. DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.06.025.
- Lyons J, Milner J, Rosenzweig S. 2015. Glycans Instructing Immunity: The Emerging Role of Altered Glycosylation in Clinical Immunology. *Frontiers in Pediatrics* **3**:54.
- Maegawa M, Kamada M, Irahara M, Yamamoto S, Yoshikawa S, Kasai Y, Ohmoto Y, Gima H, Thaler CJ, Aono T. 2002. A repertoire of cytokines in human seminal plasma. *Journal of Reproductive Immunology* **54**:33-42.
- Manásková P, Mészárosová A, Liberda J, Voburka Z, Tichá M, Jonáková V. 1999. Aggregated forms of heparin-binding and non-heparin-binding proteins of boar seminal plasma and their binding properties. *Folia Biologica* **45**:193-201.
- Martins JAM, Souza CEA, Silva FDA, Cadavid VG, Nogueira FC, Domont GB, de Oliveira JTA, Moura AA. 2013. Major heparin-binding proteins of the seminal plasma from Morada Nova rams. *Small Ruminant Research* **113**:115-127.

- Martínez-Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R. 2008. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Human Reproduction* **23**:783-791.
- Marvan F. 2017. *Morfologie hospodářských zvířat*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Mathieu C, Guérin J-F, Cognat M, Lejeune H, Pinatel M-C, Lornage J. 1992. Motility and fertilizing capacity of epididymal human spermatozoa in normal and pathological cases. *Fertility and Sterility* **57**:871-876.
- Matsushita K, Miyake H, Fujisawa M. 2014. Clusterin produced by Sertoli cells inhibits heat stress-induced apoptosis in the rat testis. *The Journal of Urology* **191** (e743). DOI: 10.1016/j.juro.2014.02.2055.
- McKenzie FF, Frederick F, Miller JC, Bauguess LC, Lyle C. 1938. *The reproductive organs and semen of the boar*. University of Missouri, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station, Columbia, Missouri.
- Mehmood S, Aldaweesh S, Junejo NN, Altaweel WM, Kattan SA, Alhathal N. 2019. Microdissection testicular sperm extraction: Overall results and impact of preoperative testosterone level on sperm retrieval rate in patients with nonobstructive azoospermia. *Urology Annals* **11**:287-293.
- Merlotti A, Dantas E, Remes Lenicov F, Ceballos A, Jancic C, Varese A, Rubione J, Stover S, Geffner J, Sabatté J. 2015. Fucosylated clusterin in semen promotes the uptake of stress-damaged proteins by dendritic cells via DC-SIGN. *Human Reproduction* **30**:1545-1556.
- Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Messana I, Pontecorvi A, Marinis LD, Castagnola M, Marana R. 2012. Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertility and Sterility* **97**:67-73.
- Miller DJ, Winer MA, Ax RL. 1990. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biology of Reproduction* **42**:899-915.
- Modarresi T, Hosseinifar H, Daliri Hampa A, Chehrazi M, Hosseini J, Farrahi F, Dadkhah F, Sabbaghian M, Sadighi Gilani MA. 2015. Predictive Factors of Successful Microdissection Testicular Sperm Extraction in Patients with Presumed Sertoli Cell-Only Syndrome. *International Journal of Fertility & Sterility* **9**:107-112.
- 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.
- Muciaccia B, Pensini S, Culasso F, Padula F, Paoli D, Gandini L, Di Veroli C, Bianchini G, Stefanini M, D'Agostino A. 2012. Higher clusterin immunolabeling and sperm DNA damage levels in hypertensive men compared with controls. *Human Reproduction (Oxford, England)* **27**:2267-2276.

- Murray KS, James A, McGeady JB, Reed ML, Kuang WW, Nangia AK. 2012. The effect of the new 2010 World Health Organization criteria for semen analyses on male infertility. *Fertility and Sterility* **98**:1428-1431.
- Nizard P, Tetley S, Le Dréan Y, Watrin T, Le Goff P, Wilson MR, Michel D. 2007. Stress-induced retrotranslocation of clusterin/ApoJ into the cytosol. *Traffic* **8**:554-565.
- 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.
- O'Bryan MK, Baker HW, Saunders JR, Kirszbaum L, Walker ID, Hudson P, Liu DY, Glew MD, d'Apice AJ, Murphy BF. 1990. Human seminal clusterin (SP-40,40). Isolation and characterization. *The Journal of Clinical Investigation* **85**:1477-1486.
- O'Bryan MK, Mallidis C, Murphy BF, Baker HW. 1994a. Immunohistological localization of clusterin in the male genital tract in humans and marmosets. *Biology of Reproduction* **50**:502-509.
- O'Bryan MK, Murphy BF, Liu DY, Clarke GN, Baker HW. 1994b. The use of anticlusterin monoclonal antibodies for the combined assessment of human sperm morphology and acrosome integrity. *Human Reproduction* **9**:1490-1496.
- Olejnik B, Jarząb A, Kratz EM, Zimmer M, Gamian A, Ferens-Sieczkowska M. 2015a. Terminal Mannose Residues in Seminal Plasma Glycoproteins of Infertile Men Compared to Fertile Donors. *International Journal of Molecular Sciences* **16**:14933-14950.
- Olejnik B, Kratz EM, Zimmer M, Ferens-Sieczkowska M. 2015b. Glycoprotein fucosylation is increased in seminal plasma of subfertile men. *Asian Journal of Andrology* **17**:274-280.
- Pang P-C et al. 2011. Human sperm binding is mediated by the sialyl-Lewis(x) oligosaccharide on the zona pellucida. *Science* **333**:1761-1764.
- Pang P-C, Tissot B, Drobnis EZ, Morris HR, Dell A, Clark GF. 2009. Analysis of the human seminal plasma glycome reveals the presence of immunomodulatory carbohydrate functional groups. *Journal of Proteome Research* **8**:4906-4915.
- Pang P-C, Tissot B, Drobnis EZ, Sutovsky P, Morris HR, Clark GF, Dell A. 2007. Expression of bisecting type and Lewisx/Lewis y terminated N-glycans on human sperm. *The Journal of Biological Chemistry* **282**:36593-36602.
- Pankhurst GJ, Bennett CA, Easterbrook-Smith SB. 1998. Characterization of the heparin-binding properties of human clusterin. *Biochemistry* **37**:4823-4830.
- Park SH, Lee HS, Choe JH, Lee JS, Seo JT. 2013. Success Rate of Microsurgical Multiple Testicular Sperm Extraction and Sperm Presence in the Ejaculate in Korean Men With Y Chromosome Microdeletions. *Korean Journal of Urology* **54**:536-540.
- Patankar MS, Ozgur K, Oehninger S, Dell A, Morris H, Seppala M, Clark GF. 1997. Expression of glycans linked to natural killer cell inhibition on the human zona pellucida. *Molecular Human Reproduction* **3**:501-505.

- Pilch B, Mann M. 2006. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biology* **7**:R40. DOI: 10.1186/gb-2006-7-5-r40.
- Plotton I, Sanchez P, Durand P, Lejeune H. 2006. Decrease of both stem cell factor and clusterin mRNA levels in testicular biopsies of azoospermic patients with constitutive or idiopathic but not acquired spermatogenic failure. *Human Reproduction* **21**:2340-2345.
- Poon S, Easterbrook-Smith SB, Rybchyn MS, Carver JA, Wilson MR. 2000. Clusterin Is an ATP-Independent Chaperone with Very Broad Substrate Specificity that Stabilizes Stressed Proteins in a Folding-Competent State. *Biochemistry* **39**:15953-15960.
- Potts RJ, Jefferies TM, Notarianni LJ. 1999. Antioxidant capacity of the epididymis. *Human Reproduction* **14**:2513-2516.
- Prochnow H, Gollan R, Rohne P, Hassemer M, Koch-Brandt C, Baiersdörfer M. 2013. Non-secreted clusterin isoforms are translated in rare amounts from distinct human mRNA variants and do not affect Bax-mediated apoptosis or the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *PloS One* **8** (e75303). DOI: 10.1371/journal.pone.0075303.
- Punab M, Poolamets O, Paju P, Vihljajev V, Pomm K, Ladva R, Korrovits P, Laan M. 2017. Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Human Reproduction* **32**:18-31.
- Purrello M, Bettuzzi S, Di Pietro C, Mirabile E, Di Blasi M, Rimini R, Grzeschik KH, Ingletti C, Corti A, Sichel G. 1991. The gene for SP-40,40, human homolog of rat sulfated glycoprotein 2, rat clusterin, and rat testosterone-repressed prostate message 2, maps to chromosome 8. *Genomics* **10**:151-156.
- Quinlivan WLG. 1968. Analysis of the proteins in human seminal plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **127**:680-687.
- Reyes A, Chavarría ME. 1981. Interference with epididymal physiology as possible site of male contraception. *Archives of Andrology* **7**:159-168.
- Ricardo LHJ. 2018. Male Accessory Glands and Sperm Function. *Spermatozoa - Facts and Perspectives*. IntechOpen Limited, London.
- Rizzi F, Bettuzzi S. 2010. The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis. *Endocrine-Related Cancer* **17**:R1-R17.
- Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ. 2011. Seminal plasma proteins: what role do they play? *American Journal of Reproductive Immunology* **66 Suppl 1**:11-22.
- Rohne P, Prochnow H, Koch-Brandt C. 2015. The CLU-files: disentanglement of a mystery. *Biomolecular Concepts* **7**:1-15.
- Rohne P, Prochnow H, Wolf S, Renner B, Koch-Brandt C. 2014. The chaperone activity of clusterin is dependent on glycosylation and redox environment. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* **34**:1626-1639.

- Rolland AD, Lavigne R, Dauly C, Calvel P, Kervarrec C, Freour T, Evrard B, Rioux-Leclercq N, Auger J, Pineau C. 2013. Identification of genital tract markers in the human seminal plasma using an integrative genomics approach. *Human Reproduction* **28**:199-209.
- Ross V, Moore DH, Miller EG. 1942. Proteins of Human Seminal Plasma. *Journal of Biological Chemistry* **144**:667-677.
- Saalmann A, Münz S, Ellerbrock K, Ivell R, Kirchhoff C. 2001. Novel sperm-binding proteins of epididymal origin contain four fibronectin type II-modules. *Molecular Reproduction and Development* **58**:88-100.
- Sabatte J et al. 2011. Semen clusterin is a novel DC-SIGN ligand. *Journal of Immunology* **187**:5299-5309.
- Sahlén G, Nilsson O, Larsson A, Carlsson L, Norlén BJ, Ronquist G. 2010. Secretions from seminal vesicles lack characteristic markers for prostasomes. *Upsala Journal of Medical Sciences* **115**:107-112.
- Salehi M et al. 2013. Correlation between human clusterin in seminal plasma with sperm protamine deficiency and DNA fragmentation. *Molecular Reproduction and Development* **80**:718-724.
- Samanta L, Parida R, Dias TR, Agarwal A. 2018. The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* **16**:41.
- Saraswat M, Joenväärä S, Tomar AK, Singh S, Yadav S, Renkonen R. 2016. N-Glycoproteomics of Human Seminal Plasma Glycoproteins. *Journal of Proteome Research* **15**:991-1001.
- Schwaab V, Lareyre JJ, Vernet P, Pons E, Faure J, Dufaure JP, Drevet JR. 1998. Characterization, regulation of the expression and putative roles of two glutathione peroxidase proteins found in the mouse epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* **53**:157-162.
- Shapiro B, Tocci P, Haase G, Gavert N, Ben-Ze'ev A. 2015. Clusterin, a gene enriched in intestinal stem cells, is required for L1-mediated colon cancer metastasis. *Oncotarget* **6**:34389-34401.
- Sharma R, Agarwal A, Mohanty G, Jesudasan R, Gopalan B, Willard B, Yadav SP, Sabanegh E. 2013. Functional proteomic analysis of seminal plasma proteins in men with various semen parameters. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E* **11**:38.
- Sipilä P, Jalkanen J, Huhtaniemi IT, Poutanen M. 2009. Novel epididymal proteins as targets for the development of post-testicular male contraception. *Reproduction* **137**:379-389.
- Souza APB de, Schorr-Lenz ÂM, Lucca F, Bustamante-Filho IC. 2017. The epididymis and its role on sperm quality and male fertility. *Animal Reproduction* **14**:1235-1244.
- Sullivan R, Frenette G, Girouard J. 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian Journal of Andrology* **9**:483-491.

- Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE, Schatten G. 2001. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *Journal of Cell Science* **114**:1665-1675.
- Sylvester SR, Morales C, Oko R, Griswold MD. 1991. Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. *Biology of Reproduction* **45**:195-207.
- Sylvester SR, Skinner MK, Griswold MD. 1984. A sulfated glycoprotein synthesized by Sertoli cells and by epididymal cells is a component of the sperm membrane. *Biology of Reproduction* **31**:1087-1101.
- Syntin P, Dacheux F, Druart X, Gatti JL, Okamura N, Dacheux JL. 1996. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biology of Reproduction* **55**:956-974.
- Syntin P, Dacheux JL, Dacheux F. 1999. Postnatal development and regulation of proteins secreted in the boar epididymis. *Biology of Reproduction* **61**:1622-1635.
- Tarter TH, Alexander NJ. 1984. Complement-inhibiting activity of seminal plasma. *American journal of reproductive immunology: AJRI: official journal of the American Society for the Immunology of Reproduction and the International Coordination Committee for Immunology of Reproduction* **6**:28-32.
- Teclé E, Gagneux P. 2015. Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Molecular Reproduction and Development* **82**:635-650.
- Teclé E, Reynoso HS, Wang R, Gagneux P. 2019. The female reproductive tract contains multiple innate sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (Siglecs) that facilitate sperm survival. *Journal of Biological Chemistry* **294**:11910-11919.
- Testa-Riva F, Riva A, Congiu T, De Lisa A, Motta PM. 1994. Human Bulbourethral and Urethral Glands. Pages 163–176 in A. Riva, F. T. Riva, and P. Motta. *Ultrastructure of the Male Urogenital Glands: Prostate, Seminal Vesicles, Urethral, and Bulbourethral Glands*. Springer US, Boston, MA.
- Thacker S, Yadav SP, Sharma RK, Kashou A, Willard B, Zhang D, Agarwal A. 2011. Evaluation of sperm proteins in infertile men: a proteomic approach. *Fertility and Sterility* **95**:2745-2748.
- Tomar A, Sooch B, Raj I, Singh S, Singh T, Yadav S. 2011. Isolation and Identification of Concanavalin A Binding Glycoproteins from Human Seminal Plasma: A Step Towards Identification of Male Infertility Marker Proteins. *Disease markers* **31**:379-86.
- Tse JYM, Chiu PCN, Lee KF, Seppala M, Koistinen H, Koistinen R, Yao YQ, Yeung WSB. 2002. The synthesis and fate of glycodelin in human ovary during folliculogenesis. *Molecular Human Reproduction* **8**:142-148.
- Turner TT. 1995. On the Epididymis and its Role in the Development of the Fertile Ejaculate. *Journal of Andrology* **16**:292-298.

- Turner TT. 2008. De Graaf's Thread: The Human Epididymis. *Journal of Andrology* **29**:237-250.
- Turner TT, Cesarini DM. 1983. The ability of the rat epididymis to concentrate spermatozoa. Responsiveness to aldosterone. *Journal of Andrology* **4**:197-202.
- Uchida H, Maruyama T, Nishikawa-Uchida S, Miyazaki K, Masuda H, Yoshimura Y. 2013. Glycodelin in reproduction. *Reproductive Medicine and Biology* **12**:79-84.
- Viard I, Wehrli P, Jornot L, Bullani R, Vechietti JL, Schifferli JA, Tschopp J, French LE. 1999. Clusterin gene expression mediates resistance to apoptotic cell death induced by heat shock and oxidative stress. *The Journal of Investigative Dermatology* **112**:290-296.
- Vogt PH et al. 1996. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics* **5**:933-943.
- Wang J, Wang J, Zhang H-R, Shi H-J, Ma D, Zhao H-X, Lin B, Li R-S. 2009. Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality. *Asian Journal of Andrology* **11**:484-491.
- Weigel Muñoz M, Carvajal G, Curci L, Gonzalez SN, Cuasnicu PS. 2019. Relevance of CRISP proteins for epididymal physiology, fertilization, and fertility. *Andrology* **7**:610-617.
- White KY, Rodemich L, Nyalwidhe JO, Comunale MA, Clements MA, Lance RS, Schellhammer PF, Mehta AS, Semmes OJ, Drake RR. 2009. Glycomic characterization of prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase in prostate cancer and benign disease seminal plasma fluids. *Journal of Proteome Research* **8**:620-630.
- Whitney KM. 2018. Male Accessory Sex Glands. Pages 579–587 in A. W. Suttie, editor. *Boorman's Pathology of the Rat (Second Edition)*. Academic Press, Boston.
- Wolters-Everhardt E, Dony JMJ, Lemmens WAJG, Doesburg WH, De Pont J-JHHM. 1986. Buffering capacity of human semen. *Fertility and Sterility* **46**:114-119.
- World Health Organization. 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. World Health Organization.
- Wosnitzer M, Goldstein M, Hardy MP. 2014. Review of Azoospermia. *Spermatogenesis* **4** (e28218). DOI: 10.4161/spmg.28218.
- Wosnitzer MS, Goldstein M. 2014. Obstructive azoospermia. *The Urologic Clinics of North America* **41**:83-95.
- Wu Y et al. 2019. Quantitative Proteomic Analysis of Human Seminal Plasma from Normozoospermic and Asthenozoospermic Individuals. *BioMed Research International* **2019** (e2735038). DOI: 10.1155/2019/2735038.
- Yamakawa K, Yoshida K, Nishikawa H, Kato T, Iwamoto T. 2007. Comparative analysis of interindividual variations in the seminal plasma proteome of fertile men with identification of potential markers for azoospermia in infertile patients. *Journal of Andrology* **28**:858-865.

- Yanagimachi R, Kamiguchi Y, Mikamo K, Suzuki F, Yanagimachi H. 1985. Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. *American Journal of Anatomy* **172**:317-330.
- Yu Q, Gu X, Shang X, Li H, Xiong C. 2016. Discrimination and characterization of Sertoli cell-only syndrome in non-obstructive azoospermia using cell-free seminal DDX4. *Reproductive Biomedicine Online* **33**:189-196.
- Zalata A, El-Samanoudy AZ, Shaalan D, El-Baiomy Y, Mostafa T. 2015. In Vitro Effect of Cell Phone Radiation on Motility, DNA Fragmentation and Clusterin Gene Expression in Human Sperm. *International Journal of Fertility & Sterility* **9**:129-136.
- Zalata A, El-Samanoudy AZ, Shaalan D, El-Baiomy Y, Taymour M, Mostafa T. 2012. Seminal clusterin gene expression associated with seminal variables in fertile and infertile men. *The Journal of Urology* **188**:1260-1264.
- Zannoni A, Bernardini C, Zaniboni A, Ferlizza E, Ventrella D, Bacci ML, Forni M. 2017. Relative abundance of heat shock proteins and clusterin transcripts in spermatozoa collected from boar routinely utilised in an artificial insemination centre: preliminary results. *Veterinary Research Communications* **41**:233-239.
- Zhang H, Kim JK, Edwards CA, Xu Z, Taichman R, Wang C-Y. 2005. Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nature Cell Biology* **7**:909-915.
- Zhao H, Lee W-H, Shen J-H, Li H, Zhang Y. 2008. Identification of novel semenogelin I-derived antimicrobial peptide from liquefied human seminal plasma. *Peptides* **29**:505-511.
- Zini A, Schlegel PN. 1997. Identification and characterization of antioxidant enzyme mRNAs in the rat epididymis. *International Journal of Andrology* **20**:86-91.
- <https://www.clinicspots.com/what-is-in-vitro-fertilization-ivf>
- <https://www.uniprot.org/uniprot/P10909>



## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

A	azoospermie
A1AT	$\alpha$ -1-antitrypsin
AAL	<i>Aleuria aurantia</i> lektin
ACE	enzym konvertující angiotenzin (z angl. angiotensin I converting enzyme)
ADAM	z angl. a disintegrin and metalloproteinase
AGP	z angl. $\alpha$ -1-acid glycoprotein
AIL	<i>Artocarpus integrifolia</i> lektin
ApoJ	apolipoprotein J
APS	persíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
AR	akrozomální reakce
As	astenoazoospermie
AsT	astenoteratozoospermie
ATP	adenosintrifosfát (z angl. adenosine triphosphate)
AZF	z angl. azoospermia factor
AZGP1	z angl. human zinc-alpha-2 glycoprotein
BHP	benigní hyperplázie prostaty
CASA	počítačem řízená analýza spermií (z angl. computer-assisted sperm analysis)
CFTR gen	z angl. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CLI	z angl. complement cytolysis inhibitor
CLU	z angl. clusterin
ConA	concanavalin A
CRISP	z angl. cysteine-rich secretory protein
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
ECM1	z angl. extracellular matrix protein 1
ELISA	z angl. enzyme-linked immunosorbent assay
ENOA	enoláza
F	fertilní jedinec
FK	fertilní kontrolní jedinec
F N	fertilní normozoospermik
FN/FINC	fibronektin
FN1	z angl. fibronectin 1 isoform b precursor
FnII	fibronektinová doména typu II
FSH	folikulostimulační hormon (z angl. follicle-stimulating hormone)
GAG	glykosaminoglykan
Gd	z angl. glycodeilin
GnRH	gonadotropin uvolňující hormon, gonadoliberin (z angl. gonadotropin-releasing hormone)
GPI kotva	glykosylfosfatidylinositolová kotva

GPX5	glutathion peroxidáza 5 (z angl. glutathione peroxidase 5)
HBP	protein vázající heparin (z angl. heparin binding protein)
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou (z angl. high density lipoprotein)
HE1/NPC2	z angl. human epididymis-specific protein 1, epididymal secretory protein E1, Niemann-Pick disease type C2
HE12/ESPB1	z angl. human epididymis-specific protein 12, epididymal sperm-binding protein 1
HE2/SPAG11B	z angl. human epididymis-specific protein 2, sperm-associated antigen 11B
HE3/EDDM31	z angl. human epididymis-specific protein 3- $\alpha$ , epididymal secretory protein E3- $\alpha$
HE4	z angl. human epididymis-specific protein 4, epididymal secretory protein E4
HE5/CD52	z angl. human epididymis-specific protein 5, epididymal secretory protein E5
HSA	lidský sérový albumin (z angl. human serum albumin)
ICSI	intracytoplazmatická injekce spermií (z angl. <i>intracytoplasmic sperm injection</i> )
IF N	infertilní normozoospermik
IF	infertilní jedinec
iOAT	idiopatická oligoastenoteratozoospermie
IVF	in vitro fertilizace (z angl. in vitro fertilization)
KLK	z angl. kallikrein
KLK3/PSA	z angl. kallikrein-3, prostate-specific antigen
KR	kryptozoospermie
LH	luteinizační hormon (z angl. luteinizing hormone)
LTA	<i>Lotus tetragonolobus</i> lektin
LTF	laktoferin, laktotransferin
MA	maturační blok (z angl. maturation arrest)
MAA	<i>Maackia amurensis</i> lektin
MALDI-TOF	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (z angl. matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)
MESA	mikrochirurgická aspirace spermií z nadvarlete (z angl. microsurgical epididymal sperm aspiration)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. major histocompatibility complex)
microTESE	mikrochirurgická testikulární extrakce spermií (z angl. microsurgical testicular sperm extraction)
miRNA	mikroRNA
mol. hm.	molekulová hmotnost
mRNA	mediátorová RNA (z angl. messenger RNA)
N	normozoospermie
NC	nitrocelulóza

nCLU	jaderná forma clusterinu (z angl. nuclear clusterin)
NK buňky	přírození zabíječi (z angl. natural killer cells)
NOA	neobstrukční azoospermie
non-HBP	proteiny nevážající heparin (z angl. non-heparin binding proteins)
NP	neprogresivní pohyb/neprogresivní motilita
O	oligozoospermie
OA	obstrukční azoospermie
OAs	oligoastenozoospermie
OAsT	oligoastenoteratozoospermie
OT	oligoteratozoospermie
PAP	prostatická kyselá fosfatáza (z angl. prostatic acid phosphatase)
PBS	fosfátem pufovaný solný roztok (z angl. phosphate-buffered saline)
PBS-T	fosfátem pufovaný solný roztok s 0,1% Tweenem 20
PESA	perkutánní epididymální aspirace spermií (z angl. percutaneous epididymal sperm aspiration)
PGDS/PTGDS	prostaglandin D2-syntáza (z angl. prostaglandin D2 synthase), prostaglandin-H2 D-izomeráza (z angl. prostaglandin-H2 D-isomerase)
PHHUPN	purin-nukleosid fosforyláza (z angl. purine-nucleoside phosphorylase)
PIP	z angl. prolactin-inducible protein
PNA	z angl. peanut agglutinin lektin
PR	progresivní pohyb/motilita
PSA	prostatický specifický antigen
PV	pacienti po provedené vasktomii
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
sCLU	sekreční forma clusterinu (z angl. secreted clusterin)
SCO	z angl. Sertoli-cell only syndrome
SDS	dodecylsírán sodný (z angl. sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsíránu sodného (z angl. sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)
SG	z angl. semenogelin
SGP-2	sulfatovaný glykoprotein 2
SNA	<i>Sambucus nigra</i> lektin
SP	semenná plazma
SP-40	z angl. complement-associated protein SP-40
sRNA	malé RNA (z angl. small RNA)
SRY gen	z angl. sex-determining region Y
T	teratozoospermie
TEMED	tetramethylethylendiamin
TESE	testikulární extrakce spermií (z angl. testicular sperm extraction)
TEX	z angl. testis-expressed protein
TEX101	z angl. testis-expressed protein 101
UEA	<i>Ulex europaeus</i> agglutinin lektin

WFL	<i>Wisteria floribunda</i> lektin
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)
ZnF protein	protein s motivem zinkového prstu (z angl. zinc finger)
ZP	zona pellucida

## 10 Samostatné přílohy

V rámci této kapitoly je formou tabulek zpracován přehled studovaných proteinových markerů ve vztahu ke konkrétním patologickým spermiogramům. Níže jsou uvedeny proteinové markery astenozoospermie v SP (Příloha 1), proteinové markery astenozoospermie ve spermích (Příloha 2), proteinové markery oligozoospermie (Příloha 3), teratoospermie (Příloha 4), oligoastenozoospermie (Příloha 5), oligoteratoospermie (Příloha 6) a oligoastenoteratoospermie (Příloha 7) v SP. V Příloze 8 je uveden seznam vybraných proteinů vyskytujících se u fertálních pacientů, v Příloze 9 pak seznam vybraných proteinů vyskytujících se u infertálních pacientů v SP.

Přehled markerů v souvislosti s azoospermií a úspěšnou extrakcí spermií z testes je uveden v samostatných tabulkách (Tab. 3 a Tab. 4, kap. 3.3.2.3 Markery neobstrukční a obstrukční azoospermie).

Názvy proteinů v tabulkách odpovídají názvům proteinů uvedených v citovaných publikacích.



**Příloha 1.** Přehled proteinových markerů astenozoospermie v semenné plazmě.

<b>Proteinový marker</b>	<b>Studovaný biologický materiál</b>	<b>Výsledek</b>	<b>Zdroj</b>
DJ-1 protein	semenná plazma	snížený u As oproti FK	Wang 2009
lactate dehydrogenase C	semenná plazma	snížený u As oproti N	Wu 2019

*Vysvětlivky: As – astenozoospermie, FK – kontrolní (fertilní) jedinci, N – normozoospermie*

**Příloha 2.** Přehled proteinových markerů astenozoospermie ve spermích.

Proteinový marker	Studovaný biologický materiál	Výsledek	Zdroj
clusterin precursor (CLUpre)	spermie	zvýšený u As oproti N	Martínez-Heredia 2008
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor (DLDpre)	spermie	zvýšený u As oproti N	
fumarate hydratase precursor (FHpre)	spermie	zvýšený u As oproti N	
heat shock protein-HSPA2 (HSPA2)	spermie	zvýšený u As oproti N	
inositol-1 monophosphatase (IMPA1)	spermie	zvýšený u As oproti N	
3-mercaptopyruvate sulfurtransferase/delta 3,5-delta 2,4-dienoyl-CoA isomerase precursor (MPST/ECH1pre)	spermie	zvýšený u As oproti N	
proteasome-subunit-PSMB3 (PSMB3)	spermie	zvýšený u As oproti N	
semenogelin 1 protein precursor (SEMG1pre)	spermie	zvýšený u As oproti N	
testis-expressed sequence 12 protein (TEX12)	spermie	zvýšený u As oproti N	
cytoskeletal actin-B (ACTB)	spermie	snížený u As oproti N	
annexin-A5 (ANXA5)	spermie	snížený u As oproti N	
cytochrome-C oxidase subunit-6B (COX6B)	spermie	snížený u As oproti N	
histone H2A (H2A)	spermie	snížený u As oproti N	
prolactin-inducible protein (PIP)	spermie	snížený u As oproti N	
prolactin-inducible protein precursor (PIPpre)	spermie	snížený u As oproti N	
calcium binding protein-S100A9 (S100A9)	spermie	snížený u As oproti N	

*Vysvětlivky: As – astenozoospermie, N – normozoospermie*



**Příloha 3.** Přehled proteinových markerů oligozoospermie v semenné plazmě.

Proteinový marker	Studovaný biologický materiál	Výsledek	Zdroj
zinc alpha-2 glycoprotein 1 (AZGP1)	semenná plazma	zvýšený u O oproti N	Sharma 2013
tissue inhibitor of metalloproteinase 1 precursor	semenná plazma	zvýšený u O oproti N	
DJ-1 protein	semenná plazma	zvýšený u O oproti N	
ankyrin repeat domain 11	semenná plazma	zvýšený u O, chybí u N	
beta 2 microglobulin precursor (B2M)	semenná plazma	zvýšený u O oproti N	
serine proteinase inhibitor clade A, member 1	semenná plazma	zvýšený u O oproti N	
protein tyrosin phosphatase receptor type, sigma isoform 1 precursor	semenná plazma	zvýšený u O oproti N	
galectin 3 binding protein (M2BP)	semenná plazma	snížený u O oproti N	
prostatic acid phosphatase precursor	semenná plazma	snížený u O oproti N	
cystatin S precursor	semenná plazma	snížený u O oproti N	
clusterin isoform 1	semenná plazma	snížený u O oproti N	

*Vysvětlivky: N – normozoospermie, O – oligozoospermie*

**Příloha 4.** Přehled proteinových markerů teratozoospermie v semenné plazmě.

Proteinový marker	Studovaný biologický materiál	Výsledek	Zdroj
DJ-1 protein	semenná plazma	zvýšený u T oproti N	Sharma 2013
serine proteinase inhibitor clade A, member 1	semenná plazma	zvýšený u T oproti N	
transferrin	semenná plazma	zvýšený u T oproti N	
secretory leukocyte peptidase inhibitor precursor-1 peptide	semenná plazma	zvýšený u T oproti N	
protein tyrosin phosphatase receptor type, sigma isoform 1 precursor	semenná plazma	zvýšený u T oproti N	
prostatic acid phosphatase, receptor type, sigma isoform 1 precursor	semenná plazma	snížený u T oproti N	
cystatin S precursor	semenná plazma	snížený u T oproti N	
ubiquitin and ribosomal protein S27a precursor	semenná plazma	snížený u T oproti N	
orosomucoid 1 precursor	semenná plazma	snížený u T oproti N	
mucin 6, gastric	semenná plazma	snížený u T oproti N	
acidic epididymal glycoprotein-like isoform 1 precursor	semenná plazma	snížený u T oproti N	

*Vysvětlivky: N – normozoospermie, T – teratozoospermie*

**Příloha 5.** Přehled proteinových markerů oligoastenozoospermie v semenné plazmě.

Proteinový marker	Studovaný biologický materiál	Výsledek	Zdroj
lipocalin-1	semenná plazma	zvýšený u OAs oproti N	Giacomini 2015
prolactin-inducible protein (PIP)	semenná plazma	zvýšený u OAs oproti N	
epididymal secretory protein E1 (HE1, NPC2)	semenná plazma	více než 3x snížený u OAs oproti N	
galectin-3-binding protein (M2BP)	semenná plazma	více než 3x snížený u OAs oproti N	
lactotransferrin (LTF)	semenná plazma	zvýšená u OAs oproti N	Liu 2018
prolactin-inducible protein (PIP)	semenná plazma	zvýšená u OAs oproti N	
prostate-specific antigen (KLK3)	semenná plazma	snížený u OAs oproti N	
extracelullar matrix protein 1 (ECM1)	semenná plazma	snížený u OAs oproti N	
epididymal secretory protein E1 (HE1, NPC2)	semenná plazma	snížený u OAs oproti N	
prostaglandin-H2 D-isomerase (PTGDS)	semenná plazma	snížený u OAs oproti N	
CD177	semenná plazma	snížený u OAs oproti N	

*Vysvětlivky: N – normozoospermie, OAs – oligoastenozoospermie*

**Příloha 6.** Přehled proteinových markerů oligoteratozoospermie v semenné plazmě.

Proteinový marker	Studovaný biologický materiál	Výsledek	Zdroj
DJ-1 protein	semenná plazma	absence u OT	Sharma 2013
ankyrin repeat domain 11	semenná plazma	zvýšený u OT oproti N	
prostate specific antigen isoform 1 preprotein	semenná plazma	zvýšený u OT oproti N	
semenogelin I isoform b preprotein	semenná plazma	zvýšený u OT oproti N	
transferrin	semenná plazma	zvýšený u OT oproti N	
secretory leukocyte peptidase inhibitor precursor	semenná plazma	zvýšený u OT oproti N	
cystatin C precursor	semenná plazma	snížený u OT oproti N	
galectin 3 binding protein	semenná plazma	snížený u OT oproti N	
cystatin S precursor	semenná plazma	snížený u OT oproti N	
beta 2 microglobulin precursor	semenná plazma	snížený u OT oproti N	
serine proteinase inhibitor clade A, member 1	semenná plazma	snížený u OT oproti N	
ubiquitin and ribosomal protein S27a precursor	semenná plazma	snížený u OT oproti N	

*Vysvětlivky: N – normozoospermie, OT – oligoteratozoospermie*

**Příloha 7.** Přehled proteinových markerů oligoastenoteratozoospermie v semenné plazmě.

Proteinový marker	Studovaný biologický materiál	Výsledek	Zdroj
$\alpha$ -1-antichymotrypsin (AACT)	semenná plazma	zvýšený u iOAT oproti FK	Herwig 2013
aldose reductase (ALDR)	semenná plazma	zvýšený u iOAT oproti FK	

*Vysvětlivky: iOAT – idiopatická oligoastenoteratozoospermie, FK – kontrolní (fertilní) jedinci*

**Příloha 8.** Přehled proteinových markerů v semenné plazmě vyskytujících se u fertálních jedinců.

Proteinový marker	Studovaný biologický materiál	Výsledek	Zdroj	Poznámka
semenogelin I (SEMG1)	semenná plazma	výskyt u F	Milardi 2012	analýza zahrnovala pouze F jedince, výskyt tedy nemusí být <u>výhradně jen</u> u F jedinců!
semenogelin II (SEMG2)	semenná plazma	výskyt u F		
olfactory receptor 5R1 (OR5R1)	semenná plazma	výskyt u F		
lactotransferrin (LTF)	semenná plazma	výskyt u F		
human cationic antimicrobial protein (hCAP18)	semenná plazma	výskyt u F		
spindlin-1 (SPIN1)	semenná plazma	výskyt u F		
clusterin (CLU)	semenná plazma	výskyt u F		

*Vysvětlivky: F – fertální jedinci*

**Příloha 9.** Přehled proteinových markerů v semenné plazmě vyskytujících se u infertálních jedinců.

Proteinový marker	Studovaný biologický materiál	Výsledek	Zdroj
ubiquitin-activating enzymes (E2)	semenná plazma	zvýšený u IF oproti F	Cadavid 2014
cysteine protease inhibitor cystatin A	semenná plazma	zvýšený u IF oproti F	
ceruloplasmin	semenná plazma	zvýšený u IF oproti F	

*Vysvětlivky: F – fertální jedinci, IF – infertální jedinci*