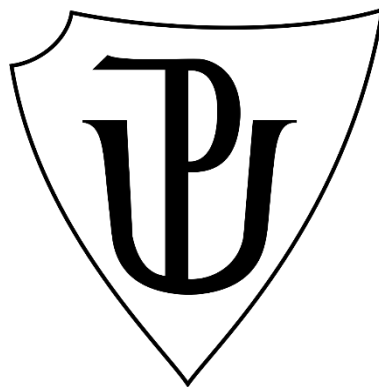


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



**Proteomická analýza semennej plazmy u obštrukčnej a  
neobštrukčnej azoospermie**

**BAKALÁRSKA PRÁCA**

Autor:	<b>Frederika Mihoková</b>
Študijný program:	B0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Špecializácia:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma štúdia:	Prezenční
Vedúci práce:	<b>Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.</b>
Rok:	2022

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstviem. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa .....

.....

Podpis študenta

### **Pod'akovanie**

Chcela by som sa veľmi pekne poďakovať vedúcemu tejto bakalárskej práce, Mgr Tomášovi Oždianovi, PhD. za jeho pomoc a ochotu, či už pri vykonávaní experimentov alebo pri písaní samotnej práce. Veľmi si vážim jeho trpezlivosť a cenné rady, ktoré mi dával pri práci v laboratóriu a najmä to, že si vždy našiel čas na to, aby sa mi venoval.

## Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Frederika Mihoková
Názov práce	Proteomická analýza semennej plazmy u obštrukčnej a neobštrukčnej azoospermie
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Ústav molekulárnej a translačnej medicíny
Vedúci práce	Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

### Abstrakt

Bakalárska práca rieši problematiku azoospermie a hľadania potenciálnych biomarkerov. Využíva metódy prečistenia proteínov s následným štiepením a na filtri a určením množstva proteínov pomocou HPLC-MS s následným štatistickým vyhodnotením výsledkov. Vďaka týmto metódam je možné identifikovať proteíny prítomné vo vzorke a zamerať sa na ich funkciu a vplyv v azoospermii.

Kľúčové slová	azoospermia, semenná plazma, reprodukčný trakt, spermatogenéza, mužská plodnosť, obštrukcia reprodukčného traktu, proteóm, HPLC-MS analýza
Počet strán	41
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

## **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname	Frederika Mihoková
Title	Proteomic analysis of seminal plasma in obstructive and non-obstructive azoospermia
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of molecular and translational medicine
Supervisor	Mgr. Tomáš Oždian, Ph.D.
The year of presentation	2022

### **Abstract**

This bachelor thesis focuses on azoospermia and search for potential biomarkers that could help diagnosing azoospermia. In this thesis, we use proteomic methods based on protein cleavage on the filter and purification methods followed by protein quantification performed by HPLC-MS. The results were subsequently statistically evaluated. With these methods, it is possible to identify the proteins present in the sample and focus on their function and potential influence on azoospermia.

Keywords	Azoospermia, seminal plasma, reproductive duct, spermatogenesis, male fertility, obstruction of reproductive tract, proteome, HPLC-MS analysis
Number of pages	41
Number of appendices	0
Language	Slovak

## OBSAH

<b>CIELE PRÁCE</b> .....	7
<b>1 ÚVOD</b> .....	1
<b>2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY</b> .....	2
<b>2.1 Mužské pohlavné orgány</b> .....	2
<b>2.2 Semenná plazma</b> .....	4
<b>2.2.1 Proteóm semennej plazmy</b> .....	4
<b>2.3 Azoospermia</b> .....	7
<b>2.3.1 Pôvod azoospermie a jej príčiny</b> .....	7
<b>2.3.2 Zhodnotenie príčin ochorenia</b> .....	10
<b>2.4 Diagnostika a liečba azoospermie</b> .....	12
<b>2.4.1 Histologická diagnostika v poruche spermatogenézy</b> .....	12
<b>2.4.2 Liečba poruchy v spermatogenéze</b> .....	12
<b>2.4.2.1 Endokrinná liečba</b> .....	12
<b>2.4.2.2 Empirická liečba</b> .....	13
<b>2.5 Štúdia zaoberajúca sa rozborom proteínov v semennej plazmy</b> .....	15
<b>3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b> .....	17
<b>3.1 Materiál</b> .....	17
<b>3.2 Metodika</b> .....	19
<b>3.2.1 Príprava semennej plazmy</b> .....	19
<b>3.2.2 Meranie koncentrácie proteínov pomocou BCA</b> .....	19
<b>3.2.3 Štiepenie na filtri</b> .....	20
<b>3.2.5 Meranie na HPLC-MS</b> .....	22
<b>3.2.6 Spracovanie Raw Dát</b> .....	22
<b>4 VÝSLEDKY</b> .....	24
<b>5 DISKUSIA</b> .....	27
<b>5.1 Porovnanie proteínov nájdených vo vzorke semennej plazmy s inými štúdiami</b> ...	27
<b>5.2 Charakteristika proteínov nájdených v semennej plazme</b> .....	28
<b>6 ZÁVER</b> .....	33
<b>7 ZOZNAM LITERATÚRY</b> .....	34
<b>8 ZOZNAM SKRATIEK</b> .....	40

## **CIELE PRÁCE**

Hlavné ciele tejto bakalárskej práce sú:

1. Optimalizácia protokolu pre spracovanie a meranie semennej plazmy pacientov s azoospermiou.
2. Analýza vzoriek pre spracovanie proteómu semennej plazmy.
3. Štatistické spracovanie výsledkov a vyhodnotenie proteómu.

## 1 ÚVOD

Ľudské telo je veľmi komplexným systémom, v ktorom prebieha množstvo rozmanitých procesov. Pozostáva zo živých a neživých zložiek, ktoré tvoria kompletnú štruktúru ľudského organizmu zahŕňajúc každú živú bunku, pletivo či orgán. Skladá sa z viacerých biologických sústav, z ktorých každá vykonáva špecifické funkcie potrebné pre každodenné fungovanie (Tortora & Derrickson, 2014).

Reprodukčný systém umožňujúci ľudské rozmnožovanie je sám o sebe veľmi zaujímavou sústavou a prebieha v nej veľa syntetických, katalytických a vývojových procesov. Rozmnožovacia sústava u mužov je významnou súčasťou celkového priebehu reprodukcie, pretože v nej prebieha jeden z najdôležitejších procesov potrebných pre ľudskú reprodukciu - spermatogenéza (Marty et al, 2003). Ak je nejakým spôsobom tento proces narušený, môže to viesť k negatívnym dôsledkom a v konečnom stave muž nemusí byť schopný nadobudnúť potomstvo prirodzenou cestou. Jednou z takýchto chorôb je aj azoospermia, kedy sa v mužskom ejakuláte nenachádzajú spermie z dôvodu prekážky v reprodukčnom trakte alebo sa spermie netvoria v dostatočnej miere (Schlegel, 2004).

Semenná plazma je tvorená kombináciou sekrétov zo semenných vezikúl, prostaty a bulbouretrálnych žliaz (Cheng et al, 2019). Jej dôležitosť spočíva v tom, že je nezastupiteľná pre prežitie spermií a oplodnenie (Caballero et al., 2012). Proteíny majú v semennej plazme najvyššie hmotnostné zastúpenie, čo tiež prispelo k tomu, že boli objektom veľkého záujmu, hlavne čo sa týka identifikácie špecifických proteínov alebo tých, ktoré sa po ejakulácii viažu na povrch spermie. Tieto proteíny sa analyzovali už vo viacerých štúdiách a potvrdilo sa, že proteóm semennej plazmy obsahuje aj také proteíny, ktoré môžu mať vplyv na mužskú plodnosť (Druart et al, 2019). Z tohto faktu sa dá usúdiť, že dôkladným preštudovaním týchto proteínov by bolo možné zistiť ich rolu pri vývine azoospermie, čo by poskytlo veľkú pomoc pri liečbe a diagnostike tohto ochorenia.

Táto práca sa zaoberá charakterizáciou azoospermie a spracovaním a meraním semennej plazmy pacientov s týmto chorením. Cieľom tejto práce je analýza vzoriek pre spracovanie proteómu semennej plazmy so zameraním sa na zistenie množstva proteínov v tejto plazme. Následne sa vzorky budú analyzovať prostredníctvom HPLC (High- performance liquid chromatography, vysokoúčinná kvapalinová chromatografia) prepojenou s hmotnostnou spektrometriou a vyhodnotenie bude prebiehať štatistickým spracovaním výsledkov, ktoré nám poskytnú informácie o proteóme v semennej plazme.



## 2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

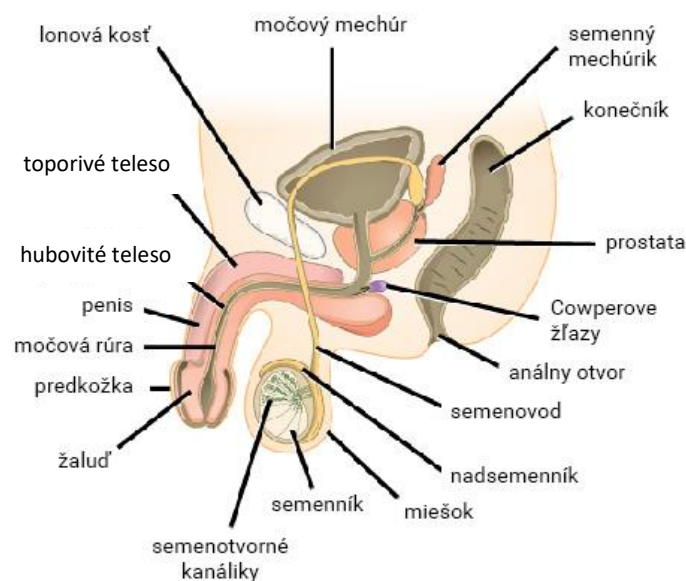
### 2.1 Mužské pohlavné orgány

Reprodukčný systém u mužov pozostáva zo skupiny orgánov, ktoré tvoria reprodukčnú a močovú sústavu muža. Penis a močová rúra sú súčasťou mužskej reprodukčnej aj močovej sústavy. Miešok, semenníky, nadsemenníky, semenovod, semenné vezikuly a prostata dopĺňajú zvyšok mužského rozmnožovacieho systému. Tieto orgány plnia svoje funkcie v rámci mužského tela: produkujú a transportujú spermie semeno, vylučujú spermie do reprodukčnej sústavy ženy a taktiež produkujú a sekretujú mužské pohlavné hormóny. Mužská rozmnožovacia sústava sa skladá z vonkajších a vnútorných rozmnožovacích orgánov (Obr.1 ) (Tortora & Derrickson, 2014).

Vonkajšie pohlavné orgány zahŕňajú penis, miešok a semenníky. Penis sa skladá z koreňa, tela a žalud'a. Koreň je spojený s dolnými brušnými svalmi a panvovými kosťami. Otvor močovej trubice, ktorá transportuje moč a spermie sa nachádza na konci žalud'a. Vo vnútri penisu nájdeme tri cylindrické komory erektilného tkaniva, ktoré sú naplnené krvou. Dve väčšie z nich (toporivé dutiny) sú umiestnené vedľa seba. Tretia komora, tvorená hubovitým tkanivom obklopuje väčšinu močovej trubice. Ak sa tieto komory naplnia krvou, tak dochádza k erekcii. Miešok je vačok s hrubou kožou, ktorý chráni semenníky. Má svoju úlohu ako regulátor teploty pre semenníky, keďže na to aby sa v nich normálne tvorili spermie, musia mať trochu nižšiu teplotu než zvyšok tela. V kremastre v stene mieška dochádza k uvoľneniu, aby mohli byť semenníky ďalej od tela, a tak sa ochladili. Slíži tiež ku kontrakcii, kedy sú semenníky pritiažené bližšie k telu a získavajú tak teplo a ochranu. Semenníky sú orgány oválneho tvaru s dĺžkou 4-7 cm a ich objem je približne 20-25 ml. Ľavý semenník je väčšinou nižšie umiestnený oproti pravému semenníku. Semenníky spĺňajú dve primárne funkcie: produkujú spermie, ktoré sú nositeľom mužskej genetickej informácie a tvoria testosterón, ktorý je hlavný mužský pohlavný hormón. Nadsemenníky sú tvorené jednozávitnicovým mikroskopickým kanálom, ktorý je takmer 6 metrov dlhý. Spermie zo semenníkov prichádzajú do nadsemenníkov, kde dozrievajú. Taktiež tam získavajú schopnosť pohybovať sa ženským reprodukčným systémom a oplodniť tak vajíčko. oproti každému semenníku leží jeden nadsemenník. Semenovod je pevná trubica, ktorá slúži na transport spermií z nadsemenníkov. Jeden takýto kanál vedie z každého nadsemenníka do zadnej časti prostaty a spája sa s jednou z dvoch semenných vezikúl. V miešku sa ďalšie

štruktúry ako svalové vlákna, cievy a nervy zhlukujú s každým semenovodom a spoločne vytvárajú prepletenú štruktúru - spermatickú šnúru (Tortora & Derrickson, 2014).

Močová trubica má u mužov dvojitú funkciu. Je súčasťou močových ciest transportujúcich moč z močového mechúra a zároveň tvorí reprodukčný systém, cez ktorý sa ejakuluje semeno. Prostata sa nachádza priamo pod močovým mechúrom a obklopuje močovú trubicu. U mladých mužov má veľkosť orecha, no s pribúdajúcim vekom sa zväčšuje. Ak sa prostata zväčší až príliš, tak môže zablokovať tok moču močovou trubicou a spôsobovať nutkanie na vymočenie sa. Semenné vezikuly sú umiestnené nad prostatou a spájajú sa so semenovodom, aby vytvorili ejakulačné kanály, ktoré prostatou prechádzajú. Prostata a semenné vezikuly tvoria tekutinu potrebnú na vyživovanie spermií. Táto tekutina sa nachádza vo väčšom objeme v semene, v ktorom sa spermie vylučujú počas ejakulácie. Ďalšia tekutina tvoriaca veľmi malé množstvo spermy, pochádza so semenovodov a Cowperových žliaz, ktoré sa nachádzajú v močovej trubici (Tortora & Derrickson, 2014).



Obrázok 1. Mužské pohlavné orgány. Upravené podľa: <https://biopedia.sk/clovek/pohlavna-sustava-muza> (23.10.2022).

## 2.2 Semenná plazma

Semenná plazma je komplexná tekutina, ktorá sa skladá z výlučkov pochádzajúcich zo semenných vezikúl, prostaty, bulbouretrálnych žliaz a nadsemenníkov. Jej funkcia pozostáva v prenášaní, ochrane a výžive spermii od ejakulácie až do oplodnenia, ale taktiež vo funkčnej modulácii spermii. Semenná plazma je kľúčová a nezastúpiteľná pre prežitie spermii a oplodnenie. Kontakt semennej plazmy pri oplodnení umožňuje aktivovať expresiu endometriálneho génu a zmeny u buniek imunitného systému, ktoré sú potrebné pre silnú implementáciu, ovplyvňujúc tak nielen kvalitu nasledujúceho tehotenstva, ale aj zdravie potomstva. Jedným z hlavných komponentov semennej plazmy sú proteíny, ktoré modulujú funkčnosť spermii (Caballero et al., 2012). Sú schopné interagovať s rozličnými molekulami, aby reagovali a mohli meniť svoje prostredie počas kapacitácie spermii a počas interakcie spermie a vajíčka. Obsah plazmy pochádza z viacerých orgánov a pletív. Má úlohu v kontrole viacerých mechanizmov ako napríklad spúšťanie kapacitácie spermii, či interakcií s okolitými sekrétmi v ženskom reprodukčnom trakte. Zo semennej plazmy by sme dokonca mali vedieť predpovedať plodnosť mužov (Camargo et al., 2018).

### 2.2.1 Proteóm semennej plazmy

Tekutina, ktorá pochádza z nadsemenníkov prispieva k proteómu semennej plazmy, keďže tieto proteíny v nej dokážeme identifikovať. Aj keď celkové množstvo tejto tekutiny v ejakuláte je pomerne malé, vzhľadom na jej celkový objem, tak proteomická analýza semennej plazmy zdravých mužov oproti mužom po vazektómii preukázala, že takmer 12 % semennej plazmy je testikulárneho pôvodu (280 proteínov z umožňuje aktiváciu celkového počtu 2360). Pilch a Mann publikovali prvú štúdiu, v ktorej identifikovali veľký počet proteínov v semennej plazme. Celkovo našli 923 proteínov, z ktorých 90 % nebolo nikdy predtým v reprodukčnom trakte mužov charakterizovaných. Proteíny pochádzali najmä zo semenných vezikúl- fibronektín (FN1), semenogelín-1 (SEMG1) a semenogelín-2 (SEMG2) a všetky tri reťazce heterotrimerného laminínu boli v semennej plazme abundantné (Pilch & Mann, 2006). Tieto proteíny sa podieľajú na viazaní proteínov a katalytickej aktivite a nachádzali sa hlavne v cytoplazme alebo boli extracelulárne. Na druhej strane sa v semennej plazme nenachádzajú proteíny, ktoré viažu nukleové kyseliny, regulátory transkripcie a receptory membrán (Milardi et al., 2012). Semenogelín a fibronektín, ktoré sú vlastne v semennej plazme najviac abundantné, formujú sieť vlákien spôsobujúcich rôsolovatenie a nehybnosť spermii. Táto

sieť sa nachádza v cervikálnej dutine a dokáže sa opäť skvapalniť približne hodinu po pohlavnom styku. Proteolytické enzýmy semennej plazmy štiepia sieť fibronektínových a semenogelínových polymérov, s tým, že sa postupne uvoľňujú spermie. Primárna proteáza, zapojená do tohto procesu je špecifický antigén prostaty, ktorý je podporovaný metalloproteinázami (MMP-9 a MMP-2). Takto uvoľnené spermie ešte stále nie sú schopné oplodniť vajíčko. Penetrujú cez cervikálny hlien a dostávajú sa do dutiny maternice, čím sa môže začať kapacitácia spermií. Ide o kaskádové zmeny v bunkovej membráne, ktorých výsledkom je hyperaktívny pohyb spermií a získanie schopnosti pripojenia sa k glykoproteínovému obalu oocyta. Následkom toho je akrozomálna reakcia a finálna aktivácia mužských gamét, spôsobujúca štiepenie glykoproteínov oocyta a fúziu spermií a oocyta. To ďalej aktivuje mechanizmus znemožňujúci fúziu ďalších mužských gamiet s oocytom (Szczykutowicz et al., 2019).

Väčšina proteínov semennej plazmy sa delí do troch hlavných rodín: a. sekrečné proteíny bohaté na cysteín, b. proteíny s doménou fibronektínu typu II. c. spermadhezíny (Rodríguez-Martínez et al., 2011).

Sekrečné proteíny bohaté na cysteín sú typické tým, že obsahujú 16 konzervovaných cysteínových zbytkov, ktoré sú prepojené disulfidovými väzbami, čo delí molekuly na tri CRISP domény (Topfer-Petersen et al., 2005). CRISP proteíny sa v semennej plazme nachádzajú vo veľmi skorých fázach spermatogenézy a dajú sa pozorovať až do konca procesu oplodnenia. Napr. CRISP2 sa exprimuje v semenníkoch, nachádzajúci sa v rovných spermatídoch až po predĺžene spermatídy, s tým, že tvorí časť vyvíjajúceho sa akrozómu a bičiku spermie (Giese et al. 2002; Busso et al. 2005). Úloha tejto rodiny proteínov pri reprodukcii však stále nie je jasná. Začína sa ale formovať názor, že funkcia CRISP domény je v regulácii iónových kanálov (Koppers et al. 2011). Proteín CRISP1 môže mať funkciu pri dekapitácií spermií (Roberts et al., 2003). CRISP1 a CRISP2 proteíny sa ireverzibilne viažu na membránu spermií, ďalej putujú do fuzogénnej oblasti hlavičky spermie po kapacitácii a akrozomálnej reakcii (Da Ros et al., 2004). Dokonca sa pri *in vitro* oplodnení zistilo, že pri odhalení spermií CRISP1 a CRISP2 protilátkam sa redukuje schopnosť spermií preniknúť do vajíčka (Cohen et al. 2001; Busso et al. 2007).

V skupine proteínov s doménou fibronektínu typu II, majú proteíny nízku molekulárnu hmotnosť. Taktiež sa vyznačujú sekundárnou štruktúrou obsahujúcou dve tandemovo usporiadané domény fibronektínu 2. typu a aminoterminálne predĺženie, ktoré je premenlivé medzi jednotlivými proteínmi. Táto skupina proteínov má s vysokou

pravdepodobnosťou veľmi dôležitú funkciu pri reprodukcii. Ich biologická funkcia by totiž mala mať veľmi úzky súvis s ich väzobnými vlastnosťami. Biochemickým štúdiám sa podarilo odhaliť, že Fn-2 proteíny (proteíny s doménou fibronektínu typu II) dokážu viazať lipoproteíny s vysokou hustotou (HDL) a glykózaminoglykany (GAGs) ako heparín, heparánsulfát a chondroitín sulfát, ktoré sú prítomné vo folikulárnej a vajíčko - vodnej tekutine (Calvete & Sanz 2007). Tiež sa zistilo, že sa viažu na povrch spermíí, a to konkrétne na cholinové fosfolipidy plazmatickej membrány (Parks et al. 1987; Desnoyers and Manjunath 1992). HGH a GAG fyziologicky inudujú kapacitáciu. Pomocou štúdie štruktúry BSP- A1/A2 sa prišlo na to, že ktoré proteíny vedia urýchliť proces kapacitácie indukovanej heparínom a HDL a sprostredkujú odtok cholesterolu z membrány spermíí. Navrhlo sa, že BSP- A1/A2 sa v semennej plazme nachádza v čiastočne agregovanom stave. Väzba na cholinové lipidy plazmatickej membrány spermie vedie k disociácií agregovaného BSP-A1/A2 vyúsťujúcej v jeho integráciu do lipidovej dvojvrstvy. Interakcia heparínu s BSP-A1/A2 naviazaným na povrchu spermatickej membrány podporí agregáciu BSP- A1/A2, čo následne vedie k narušeniu plazmatickej membrány (Calvete & Sanz 2007).

V skupine spermadhezínov sa nachádzajú glykoproteíny s nízkou molekulárnou hmotnosťou zostavené z CUB singletovej domény. Táto skupina proteínov však nebola detegovaná v semennej plazme u človeka, ale u kopytníkov (Calvete & Sanz 2007; Melo et al. 2008). Jedná sa o multifunkčnú skupinu proteínov so širokou škálou možnosti ligandu, od heparínu cez fosfolipidy v membráne spermíí, čo sa mení s glykosyláciou a stavmi agregácie. Ich biologická úloha sa podobne ako pri Fn-2 proteínoch spája s ich schopnosťou viazať rozličné ligandy. Agregované spermadhezíny dokážu použiť prvú vrstvu spermadhezínov ako plášť na zakrytie membrány spermíí, čím poskytujú stabilizáciu od predčasnej reakcie akrozómu (Dosta`lova` et al. 1995; To`pfer-Petersen et al. 1998)

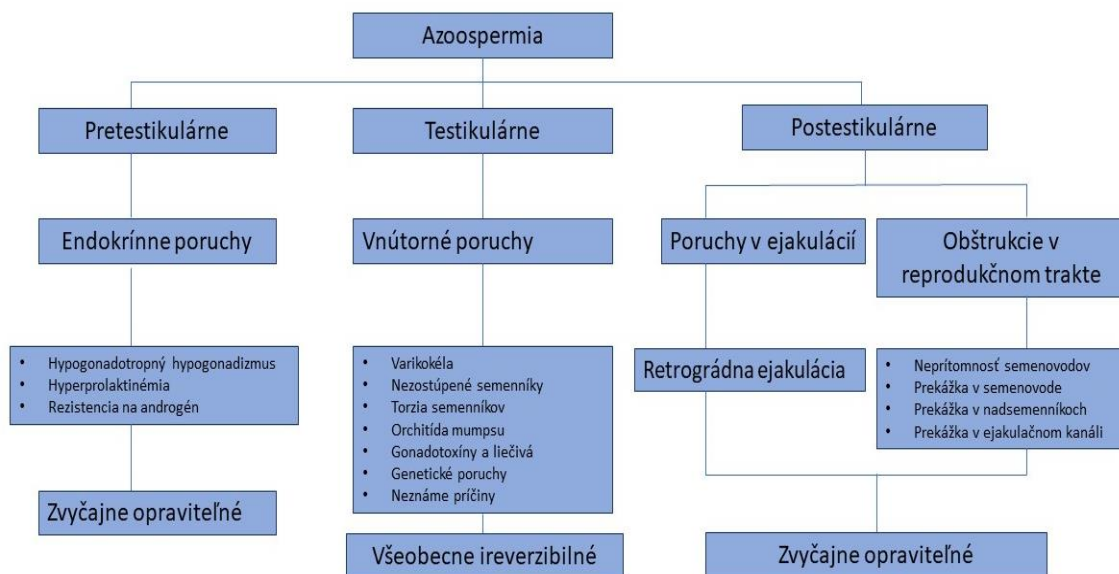
Nedospelé spermie priamo extrahované z nadsemenníkov dokážu za určitých podmienok oplodniť vajíčko. Tento postup sa využíva pri technikách asistovanej reprodukcie, vrátane *in vitro* oplodnenia a intracelulárnej injekcie spermíí (Bromfield, 2014 ;Silber et al., 1995;Caballero et al., 2012). Proteíny zo semennej plazmy sa dokážu absorbovať na povrch spermíí, s tým že pretvoria štruktúru proteínových domén membrány spermíí (To pfer-Petersen et al. 2005; Caballero et al. 2009).

## 2.3 Azoospermia

Azoospermia je charakterizovaná neprítomnosťou spermií v ejakuláte po analýze zcentrifugovanej vzorky. Táto porucha postihuje približne 1 % mužskej populácie a 10-15 % neplodných mužov. Príčina azoospermie môže byť v poruche spermatogenézy alebo kvôli obštrukcii odtoku spermií zo semenníkov. Veľké množstvo okolností, ktoré môžu byť vrodené alebo získané sú často považované za príčinu poruchy v spermatogenéze. Vrodené príčiny, ktoré zahŕňajú genetické ochorenia môžu byť napríklad Klinelfelterov syndróm, mikrodelecie chromozómu Y a poruchy v štruktúre chromozómov (Berookhim & Schlegel, 2014).

### 2.3.1 Pôvod azoospermie a jej príčiny

Hoci príčin azoospermie môže byť viacero, tak pôvody tejto choroby spadajú do týchto všeobecných kategórií: 1. pretestikulárny, 2. testikulárny, 3. post-testikulárny (Obr.2). Pretestikulárne prípady azoospermie pochádzajú z endokrinných abnormalít, ktoré nepriaznivo pôsobia na spermatogenézu. Testikulárny pôvod zahŕňa vnútorné poruchy spermatogenézy v semenníkoch. Posttestikulárne dôvody azoospermie sa týkajú obštrukcie v kanáliku na akomkoľvek mieste mužského reprodukčného traktu. Pretestikulárne a posttestikulárne abnormalnosti sa väčšinou dajú liečiť, čo môže uľahčiť obnovenie plodnosti. Poruchy semenníkov sú vo všeobecnosti nezvratné a úspech v intervenciách spojených s vnútornými abnormalitami semenníkov je vcelku nízky.



Obrázok 2:Príčiny,mechanizmy a prognózy azoospermie. Zdroj: Cocuzza et al. (2013), upravené

Pretestikulárne príčiny, ktoré sa inak nazývajú aj sekundárne zlyhanie u semenníkov väčšinou vychádzajú z ochorení endokrinných žliaz. Takýmto ochorením môže byť napríklad hypogonadotropný hypogonadizmus (HGH), ktorý zahŕňa Kallmanov syndróm, čo je vrodená príčina HGH spojená s deformáciou strednej lebečnej dutiny, nádormi hypofýzy či požívaním anabolických steroidov. HGH spôsobuje neplodnosť u mužov len vo vzácných prípadoch a môže byť vrodená alebo získaná. Rezistencia na androgén je ďalšou z pretestikulárnych príčin azoospermie. Ide o klinicky variabilný syndróm postihujúci ženy, ktoré majú necitlivosť na androgén a u mužov spôsobuje neplodnosť. Podstata spočíva v mutácií génu androgenného receptora (AGR). V závislosti na intenzite poruchy môže byť množstvo testosterónu v séru nízke, normálne či vysoké. U 40 % mužov so žiadnym či nízkym počtom spermíí je pravdepodobné, že tento problém je primárne spôsobený abnormalitou androgénnych receptorov. AGR sa skladá z 8 exónov, pričom rozhodujúci úsek repetitívneho CAG nukleotidu sa nachádza v prvom (Küpker et al., 1999). Predĺženie tohto úseku spôsobuje spinálnu a bulbulárnu svalovú dystrofiu spojenú s neplodnosťou. Pri testikulárnom pôvode vychádzame z priamych ochorení semenníkov, ktoré sú väčšinou spôsobené poškodením semenníkov indukovaným varikokélou, nezostúpenými semenníkmi, torziou semenníkov, či gonadotoxickým pôsobením liekov. Primárne zlyhanie semenníkov v spojení s azoospermia- neobštrukčná azoospermia- sa najlepšie dajú riešiť odberom spermíí so semenníkov pre prípadnú intracytoplazmatickú injekciu spermíí (ICSI).

Čo sa týka poškodenia semenníkov spôsobeného varikokélami, tak sa dokázalo, že varikokély majú progresívne škodlivý účinok na semenníky. Varikokelektómia môže slúžiť ako prevencia pred znížením funkcie semenníkov a poškodenie dokáže zvrátiť (Marmar & Benoff, 2006; Cocuzza, et al. 2008). Azoospermia v spojení s varikokélou sa vyskytuje u 5-10 % mužov (Kim et al., 1999). Doposiaľ sa neprišlo na to, prečo varikokély spôsobujú poškodenie vedúce k azoospermii u niektorých pacientov, zatiaľ čo 75 % mužov s varikokélami nemá poškodené spermie (Kadioğlu et al., 2001).

Poškodenie semenníkov ich torziou požaduje okamžitý chirurgický zákrok (Kadioğlu et al., 2001). Semenníky vedia ostať nepoškodené, ak sa zákrok podnikne 6 hodín od nástupu symptómov. Najväčšiu komplikáciu pri tomto stave tvorí strata semenníkov vedúca k poškodenej plodnosti (Visser & Heyns 2003). Závažná oligospermia alebo azoospermia je po jednostrannej torzii semenníkov zriedkavá, môže sa však objaviť, ak sa vyskytla abnormalita kontralaterálneho semenníka, napr. orchiopexia pre nezostúpený semenník (Arap et al., 2007). Pri nezostúpených

semenníkoch je podstatné odlíšiť kryptorchidové semenníky od zatiahnutých semenníkov, čo znamená, že semenníky sa nachádzajú v iguinálnom kanáli alebo vysokom miešku. Subfertilita vyvolaná kryptochorizmom môže byť spôsobená testikulárnou dysgenézou, narušenou endokrinnou sústavou či imunologickými poškodeniami. Včasná liečba dokáže znížiť riziko neplodnosti a jej úspech závisí od pôvodnej polohy semenníka (Pettersson et al., 2009). Pri orchiopexií sa považujú za rozhodujúce faktory predpokladu plodnosti a získavania spermii vek a objem semenníkov (Raman & Schlegel, 2003). Neliečené jednostranné a dvojstranné nezostúpené semenníky sú príčinou azoospermie u 30-80 %.

Posttestikulárne príčiny zahŕňajú obštrukciu v prenose spermii či dysfunkciu ejakulácie. Liečba obštrukčnej azoospermie je závislá od príčiny a ohľad sa berie aj na možnú neplodnosť partnerky. Pacienti s týmto ochorením môžu mať deti vďaka chirurgickej oprave obštrukcie alebo získaním spermii priamo zo semenníkov či nadsemenníkov s následnou asistovanou reprodukciou (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Male Reproduction and Urology, 2008). Typ operácie pri obštrukčnej azoospermii sa líši na základe miesta obštrukcie a závisí od patologických porúch ako sú absencia semenovodov, obštrukcia semeniovodu a obštrukcia ejakulačného kanála. Vrodená obojstranná absencia semenovodov sa vyskytuje u 1 % neplodných mužov a 6 % mužov s obštrukčnou azoospermiou (Ferlin et al., 2007). Môže mať 2 príčiny, a to mutáciu génu transmembránového regulátora cystickej fibrózy alebo vyskytujúce sa abnormality v diferenciácii Wollfovho kanála. Veľkosť semenníkov je v tomto prípade normálna a prebieha v nich spermatogenéza. Semenné vezikuly chýbajú alebo sú zakrpatené a môžu byť aj zväčšené. Ejakulát má pH 6.5 a má malý objem. Spermie sa pri tejto obštrukcii dajú získať z nadsemenníkov v spojení s ICSI.

Obštrukcia semenovodu je najčastejšie spôsobená neúmyselným zranením pri liečbe pruhu. To, že daný muž trpí touto obštrukciou je pravdepodobné, ak sa pri vyšetrení zistí normálna veľkosť semenníkov, s tým, že nadsemenník je plný a pevný (D et al., 2005). Najčastejšou príčinou obštrukcie semenovodu je vazektómia, ktorú človek podstúpi dobrovoľne.

Hovoriac o poruche ejakulačného kanála, tak obštrukcia jedného alebo oboch týchto kanálov môže byť vrodená, ale aj získaná. V roku 1973, Farley a Barnes prvýkrát opísali túto poruchu, ktorá je zodpovedná za 1-5 % neplodnosti mužov (Farley & Barnes 1973). Môže sa prejavovať viacerými spôsobmi, ako napríklad azoospermiou



a oligoastenospermiou (Smith et al., 2008). Muži s touto obštrukciou majú nízkoobjemovú azoospermiu a rozšírené semenné vezikuly, s tým, že sekundárne pohlavné znaky sú u nich v norme (Hopps et al, 2002).

### **2.3.2 Zhodnotenie príčin ochorenia**

Muži s azoospermiou boli v minulosti považovaní za neplodných a problém počatia dieťaťa sa väčšinou riešil darcovstvom spermií. V súčasnosti sa však veľa prípadov azoospermie dokáže určitým spôsobom liečiť. Pri diagnostike tohto ochorenia, aj keď urológ nemusí byť odborníkom v oblasti neplodnosti, tak by mal vedieť primerane vyhodnotiť, diagnostikovať a liečiť tento stav vždy ,keď je to možné, nie len vtedy ,keď získal spermie zo semenníkov alebo nadsemenníkov (Cocuzza et al, 2013). Azoospermia sa diagnostikuje centrifugáciou vzoriek spermií pri izbovej teplote s vysokovýkonným mikroskopickým vyšetrením peletu. Ak sa zistí, čo i len malé množstvo spermií v centrifugovanej vzorke, tak môžeme vylúčiť úplnú obštrukciu priechodu spermií a ponúka sa riešenie v okamžitej kryoprezervácií spermií s intracytoplazmatickou injekciou spermií (ICSI). Ron-El et al. (1997) preukázal možnosť detekcie spermií u 35 % mužov, ktorí boli pôvodne diagnostikovaní s neobštrukčnou azoospermiou pri dôslednej rutinnej analýze vzorky spermií (Ron-El et al. 1997).

Pri zhodnotení pacientov s azoospermiou je potrebné vykonať podrobnú analýzu všetkých možných príčin. Dôležité je podrobiť pacienta kompletnej lekárskej a chirurgickej anamnéze, vyhodnotiť anamnézu detských chorôb, pozrieť sa aj na vplyv liekov alebo alergií. Nesmieme zabudnúť ani na kontrolu infekcií, ktorými pacient v minulosti trpel, akými sú napríklad sexuálne prenosné choroby. Diagnostika azoospermie sa sústreďí hlavne na fyzické vyšetrenie a zhodnotenie fungovania hormonálnej sústavy. Počas telesného vyšetrenia sa zisťuje prítomnosť klinickej varikokély, ktorá by sa mala klasifikovať, pretože niektoré štúdie ukázali, že stupeň varikokély má súvis s prognózou liečby (Cocuzza et al., 2012). Vyšetruje sa aj stupeň vývinu mužských pohlavných orgánov.

Vyšetrenie endokrinných žliaz zahŕňa screening hormonálnej sústavy mužov, ktorí majú počet spermií menší než 10 miliónov/ml na základe hladín testosterónu v tele a hladiny folikulo - stimulačného hormónu (FSH). Tento postup by mal odhaliť väčšinu klinicky významných endokrinopatií. Pri diagnostike azoospermie sa vykonáva aj biopsia

semenníkov, ktorá je rozhodujúcou pri určení tejto choroby. Avšak, tkanivo semenníkov je heterogénne a spermatogenéza prebieha iba fokálne, teda v konkrétnych ústredných oblastiach, a preto sa biopsia vykonáva iba zriedkavo (Schlegel, 1999). Charakteristika semenníkov a laboratórne vyšetrenia väčšinou určia neobštrukčnú azoospermiu. U niektorých pacientov s normálnou veľkosťou semenníkov, viditeľným semenovodom a normálnymi hladinami FSH v sére môže biopsia semenníkov odlíšiť obštrukciu od porúch v spermatogenéze (Schlegel, 2004).

Pacienti s azoospermiou, ktorí majú normálny objem ejakulátu pravdepodobne trpia obštrukciou reprodukčného systému alebo ich spermatogenéza je sprevádzaná abnormalitami. Na druhej strane, muži s malým objemom spermií a normálnou veľkosťou semenníkov môžu mať dysfunkciu v ejakulácií alebo obštrukciu v ejakulačnom kanáli. Objem ejakulátu je neodmysliteľným určujúcim parametrom pri hodnotení azoospermických pacientov (Coccuzza et al, 2013).

## **2.4 Diagnostika a liečba azoospermie**

### **2.4.1 Histologická diagnostika v poruche spermatogenézy**

Histologické nálezy pri biopsií semenníkov sa klasifikujú podľa modelu spermatogenézy na základe vzhľadu a môžeme klasifikovať hypospermatogenézu, zastavenie dozrievania spermii a syndróm Sertolliho buniek (McLachlan et al., 2007). Hypospermatogenézu môžeme charakterizovať ako prítomnosť dozretých spermatídov v akejkoľvek tubule, a preto tam môžeme rozoznať v rôznej miere všetky štádiá spermatogenézy. Zastavenie dozrievania spermii sa používa na opis patologického stavu vtedy, ak dochádza k úplnému prerušeniu spermatogenézy vo všetkých semenných tubulách, pričom spermatogenéza sa zastavila vo všetkých tubulách počas rovnakého štádia (Hung et al., 2007). Poznáme dva typy zastavenia dozrievania - skoré, kedy sa spermatogenéza zastaví už počas štádia spermatogónie alebo spermatocytu a neskoré, ktoré je charakteristické tým, že v ejakuláte sa nachádzajú spermatidy, ale nie spermie. Naproti tomu syndróm Sertolliho buniek sa definuje ako absencia akýchkoľvek zárodočných buniek v semenotvorných tubulách.

### **2.4.2 Liečba poruchy v spermatogenéze**

Pri liečbe zlyhania spermatogenézy sa kvôli dôležitosti stimulácie hormónov pre úplnú spermatogenézu využíva lekárska liečba so špecifickým cieľom, ktorá je schopná liečiť nízke hladiny testosterónu. Liečba použitá pri riešení tohto problému môže byť špecifická alebo empirická (Berookhim & Schlegel, 2014).

#### **2.4.2.1 Endokrinná liečba**

Do špecifickej endokrínnej liečby radíme náhradu gonadotropínu. Gonadotropín sa nahrádza jedným z obmedzeného počtu gonadotropínových liekov. Ľudský choriový gonadotropín sa podáva do svalu alebo do podkožia 2-3-krát do týždňa, aby sa najprv upravil nedostatok tohto hormónu a upravuje sa tak, aby hladiny testosterónu boli v stredných hodnotách. Keď sa hladiny testosterónu znormalizujú alebo sa spustí spermatogenéza, tak sa začne pridávať folikulostimulačný hormón 2-3 týždenne formou podkožnej injekcie alebo rekombinantný ľudský folikulostimulačný hormón taktiež podkožne 2-5 do týždňa (Berookhim & Schlegel, 2014) Liečba kombinovanou náhradou gonadotropínu sa ukázala ako efektívna na vyvolanie spermatogenézy u viac ako 84 % pacientov z kombinovanej analýzy dát, ktorej sa podrobilo 81 pacientov (Warne et al, 2009).

Zvýšená hladina prolaktínu v krvi by sa mala liečiť protagonistom dopamínového receptora. Hyperprolaktonémia potláča uvoľňovanie gonadoliberínu z hypotalamu. Väčšinou sa na liečbu tejto poruchy používa kabergolín alebo bromokriptín. Požívanie kabergolínu sa uprednostňuje kvôli jeho zvýšenej účinnosti a zníženému riziku vedľajších účinkov. Dokonca sa preukázalo, že u mužov s hyperprolaktóniou tento liek zlepšuje plodnosť, keďže dokáže znormlizovať kvalitu spermií.

#### **2.4.2.2 Empirická liečba**

Empirická endokrinná liečba bola pôvodne považovaná za neúčinnú u pacientov so zlyhaním v spermatogenéze. Avšak, muži s nízkou hladinou testosterónu v krvi môžu mať zníženú hladinu tohto hormónu aj vo vnútri semenníkov, a preto by sa pre zvýšenie hladiny semenníkov a spustenie spermatogenézy mohla u týchto mužov použiť aj empirická endokrinná terapia.

Aj pri tomto druhu terapie sa porucha v spermatogenéze lieči nahradzovaním gonadotropínu. U pacientov s poruchou spermatogenézy pramení záujem o využitie ľudského rekombinantného folikulo - stimulačného hormónu (rFSH) z toho, že pacientom s neobštrukčnou azospermiovou obnovil prítomnosť spermií v ejakuláte (Selman et al., 2004). U pacientov s oligospermiovou na rozličnej úrovni liečba gonadotropínmi spôsobila vyššiu mieru tehotenstva v porovnaní s ľuďmi, ktorí boli na placebe alebo sa vôbec neliečili (Attia et al., 2007). Pri empirickej endokrinnej terapii sa používa aj klomiféncitrát a tamofexín. Klomiféncitrát a tamofexín sú nesteroidné estrogénne modulátory receptorov blokujúce negatívny vplyv vyvolaný estrogénom v hypofýze a hypotalame, čím za zvyšuje hormón uvoľňujúci gonadotropín (GnRH) a veľkosť uvoľňovania luteinizačného hormónu/ folikulo-stimulačného hormónu (LH/FSH). Pri štúdií, ktorej sa zúčastnili pacienti s neobštrukčnou azospermiovou, sa potom 5,2 mesiacov liečili klomiféncitrátom, ktorého dávky sa titrovali kvôli dosiahnutiu istej úrovne testosterónu, sa našla prítomnosť spermií v ejakuláte pri 64 % pacientov a u zvyšných pacientov sa preukázali pozitívne zmeny v histológii semenníkov pri extrahovaní semenných spermií (Hussein et al, 2005). Ďalšia štúdia hodnotila prínos klomifénu s alebo bez prídavku choriového gonadotropínu (hCG) a menopauzálného gonadotropínu (hMG) u neobštrukčných azospermikov. Pacienti buď podstúpili medikálnu liečbu pozostávajúcu z kombinácie klomifénu, hCG a hMG alebo nebrali žiadne lieky . U 11 % pacientov sa zaznamenala prítomnosť spermií po podstúpení tejto liečby a vlastnosti potrebné na mikrochirurgickú extrakciu spermií so semenníkov

(microTESE) v rôznych liečebných skupinách boli od 52-58 % v porovnaní so skupinou, ktorá nepodliehala medikálnej liečbe, kde to bolo len 4 % (Hussein et al, 2013).

V prípade pôsobenia aromatázy je potrebné inhibovať jej funkciu blokátormi, ktoré znemožňujú premenu testosterónu na estradiol a androstendiónu na estrón. Týmto dokážeme znižovať negatívnu spätnú väzbu estradiolu na hypotalamus, čím sa zvyšuje úroveň enzýmov GnRH, LH a FSH. Pri pacientoch s poruchou v spermatogenéze spojenou s nízkou hladinou testosterónu v krvi sa často na liečbu používa testolaktón, anastrozól a letrozól. Jedna zo štúdií skúmala 4 neobštrukčných azoospermikov, ktorí mali úroveň FS hormónu nižšiu než 10 UI/l empiricky liečených letrozólom. Všetkým pacientom zaznamenali v ejakuláte znovu prítomnosť spermií, s koncentráciou 40 000-90 000 spermií/ml 3 mesiace po liečbe. Dokonca sa u týchto pacientov zvýšil obsah FSH, LH a testosterónu (Berookhim & Schlegel, 2014).

## 2.5 Štúdiá zaoberajúca sa rozborom proteínov v semennej plazmy

V súčasnosti sa dajú typy azoospermie rozpoznať na základe toho, že sa vyšetruje prítomnosť spermií v semenníkoch, na čo je ale potrebný chirurgický zákrok. V tejto štúdií od Drabovicha et al. (2013) identifikovali dva proteínové biomarkery v semennej plazme, ktoré by mohli pomôcť odlíšiť rozličné typy azoospermie a pacienti by sa mohli vyhnúť invazívnym chirurgickým vyšetreniam (Drabovich et al., 2013).

Ako sme už vyššie spomínali tak jediným spoľahlivým spôsobom na odlišenie obštrukčnej a neobštrukčnej azoospermie je biopsia semenníkov. Toto vyšetrenie však obzvlášť zasahuje do semenníkov mužov trpiacich azoospermiou je značne nepríjemné. Dokonca ani nemusí presne vyhodnotiť histopatológiu u neobštrukčnej azoospermie, keďže genéza spermií je priestorovo rozdelená. Bolo vykonaných aj viacero štúdií ,kde sa snažili predpokladať typ azoospermie z objemu semenníkov alebo využitím biomarkerov z krvi (folikulo -stimulačný hormón, inhibín B a anti -Mulleriánný hormón), avšak tieto markery neboli dostatočne špecifické (Carpi et al.2009; Muttukrishna 2007;C. Tsametis 2011). V tejto štúdií autori hovoria o zmeraní 18 „kandidátov“ na biomarkery zo 119 vzoriek semennej plazmy, kedy sa im podarilo identifikovať dva proteíny - proteín extracelulárnej matrix 1 (ECM1), ktorý sa exprimuje v nadsemenníkoch a proteín exprimovaný semenníkmi 101 (TEX101). Tieto proteíny by mali mať potenciál rozoznať obštrukčnú azoospermiu od neobštrukčnej s vysokou senzitivitou a špecifitou (Batruch 2010; Batruch 2012). V nadväzujúcej štúdií overili 30 potenciálnych biomarkerov a ich počet zredukovali na 18 (Drabovich et al., 2011). Následne v tejto štúdií pokračovali v zhodnotení týchto 18 biomarkerov pomocou analýzy sledujúcej vybrané reakcie (SRM assay). Zmeraním dvoch jedinečných proteotypických peptidov na proteín nachádzajúci sa v semennej plazme, prišli na to, že množstvo týchto 18 biomarkerov je znížené vo vzorkách od mužov po vazektómií. Ako ďalšie použili sériové riedenia izotopom značených štandardov peptidov, aby mohli určiť hraničné hodnoty detekcie a kvantifikácie. Potom zmerali kandidátov na biomarkery a 2 kontrolné proteíny charakteristické pre prostatu.

Týmito metódami mohli identifikovať už vyššie spomínané ECM1 a TEX101, ktoré ďalej analyzovali. Množstvo TEX101 bolo vysoké u mužov s normálnou spermatogenezou, ale pod hodnotami detekcie u mužov po vazektómií a u neobštrukčných azoospermikov. ECM1 proteín bol tiež znížený pri pacientoch s azoospermiou. Ďalej zistili, že TEX101 sa exprimuje v spermatocytoch, spermatídoch a v spermiiach, ale neexprimoval sa (alebo len vo veľmi malom množstve) v bazálnych,

Sertoliho a Leydigových bunkách. Nízke množstvo tohto proteínu bolo pozorované v tkanive s hypospermatogenezou a v tkanive, kde bunky mali zastavené dozrievanie. Pomocou senzitivnejšej metódy následne merali množstvo TEX101 u jednotlivých skupín pacientov. Najnižšie množstvá tohto proteínu boli zaznamenané u mužov s hypospermatogenezou, u obštrukčných azoospermikov a u mužov po vazektómií. Tento membránový proteín má monošpecifickú expresiu v zárodočných bunkách, avšak v žiadnom ďalšom ľudskom pletive sa neexprimuje. Myšia TEX101 sa exprimuje v semenníkoch, ale počas zrenia v nadsemenníkoch je enzýmami odštiepená z povrchu spermii. Taktiež je rozpustným činiteľom sprostredkujúcou akrozómnu reakciu tým, že spúšťa uvoľňovanie progesterónu v kumulárnych bunkách (Yin et al. 2009; Sun et al. 2011). Kvôli tomu sa TEX101 ťažko deteguje u mužov s obštrukčnou azoospermiou, u mužov po vazektómií a u mužov, ktorí majú Sertoliho bunky. V bunkách so zastavením dozrievania a u mužov s hypospermatogenezou sa tento proteín exprimuje, ale spermatocyty nedozrievajú v spermie. Koncentrácia TEX101 v semennej plazme umožňuje rozlišovať histopatologické podtypy neobštrukčnej azoospermie. Ešte viac senzitivna metóda by mala uľahčiť odlišenie medzi mužmi s normálnou spermatogenezou a mužmi s hypospermatogenezou, tými čo majú zastavené dozrievanie buniek, a taktiež mužmi so Sertoliho bunkami a obštrukčnou azoospermiou (Drabovich et al., 2013).

Táto štúdia nám poskytuje náhľad možností akými by sa semenná plazma dala skúmať a potvrdzuje predpoklady o tom, že obsahuje určité markery vo forme proteínov. Úloha týchto proteínov a ich množstvo u pacientov s jednotlivými typmi azoospermie má potenciál rozlíšiť, to o aký typ azoospermie sa jedná len zo vzorky semennej plazmy od muža, a môže sa tým pádom predísť veľmi invazívnym a nekomfortným metódam vyšetrovania týchto mužov ako napríklad biopsiou semenníkov alebo inými chirurgickými zákrokmi.

### **3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ**

#### **3.1 Materiál**

##### **3.1.1 Chemikálie**

Acetonitril (SupelCo, kat. č. 10029)

Hydrogenuhlíčan amonný (Fluka-Analytical, 09830-500 G)

Jódacetamid (Sigma-Aldrich, kat. č. I1149)

Kyselina octová (Fluka- Analytical, kat. č. 49199- 50ML-F)

Kyselina trifluoroctová (Sigma- Aldrich, kat .č. 14264)

Metanol (J. T. Baker, kat. č. 9822)

Močovina (Sigma-Aldrich, kat. č. U5378)

MS voda (Merck Milipore)

Tris (2-amino-2 hydroxymetyl)-1,3-propándiol (Roche, kat. č. 10708976001)

Trypsín/ Lysyl endopeptidáza (Lys C) Mix (Progema, kat. č. U5378)

##### **3.1.2 Roztoky**

0,1 mol.l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8,5)

0,05 mol.l<sup>-1</sup> Hydrogenuhlíčitanu amonného (ABC) v MS H<sub>2</sub>O

Jódacetamid (IAA) - 0,05 mol.l<sup>-1</sup> jódacetamidu v kyseline močovej

8 mol. l<sup>-1</sup> močovina (UA) v 0,1 mol.l<sup>-1</sup> Tris/HCl s pH 8,5

0,05 mol.l<sup>-1</sup> hydrogenuhlíčitanu amonného (ABC) v MS H<sub>2</sub>O

80 % roztok acetonitrilu s 0,1 % kyselinou octovou

0,1 % roztok kyseliny octovej

0,1 % roztok kyseliny trifluoroctovej

##### **3.1.3 Súpravy**

Pre- Diluted Protein Standards: BSA Set v rozmedzí koncentrácií 125-2000 µg/ml (Thermo Scientific<sup>TM</sup>, kat. č. 23208)

Pierce BCA Protein Assay



Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A (Thermo Scientific™, kat. č. 23223)

Pierce™ BCA Protein Assay Reagent B (Thermo Scientific™, kat. č. 23224)

### **3.1.4 Biologický materiál**

15 vzoriek semennej plazmy:

- 6 vzoriek od normozoospermikov, 4 vzorky od mužov po vazektómií, 5 vzoriek od kryptozoospermikov

### **3.1.5 Prístroje**

Analytické váhy SBC21 (Scaltec, USA)

Centrifúga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Nemecko)

Centrifúga Rotina 4202R (Scholler, Česko)

Hmotnostný spektrometer Thermo Orbitrap Exploris 480 (ThermoFischer, USA)

Chromatograf Dionex Ultimate 3000 (ThermoFisher, USA)

Inkubátor na báze vodného kúpeľa SUB Aqua 12 Plus (Grant, UK)

MS Inkubátor hybridizic (Biotech, Česko)

Spektrofotometer PerkinElver Envision (PerkinElmer, USA)

Trepačka Vortex Vitrum 3144515 (Heidolph, Nemecko)

Vakuová odparka koncentrátor 5301 (Eppendorf, Nemecko)

Zásobník deionizovanej vody MilliQ (Milipore, USA)

### **3.1.6 Software**

Microsoft Office 356

Proteome Discoverer 2.4.0.305

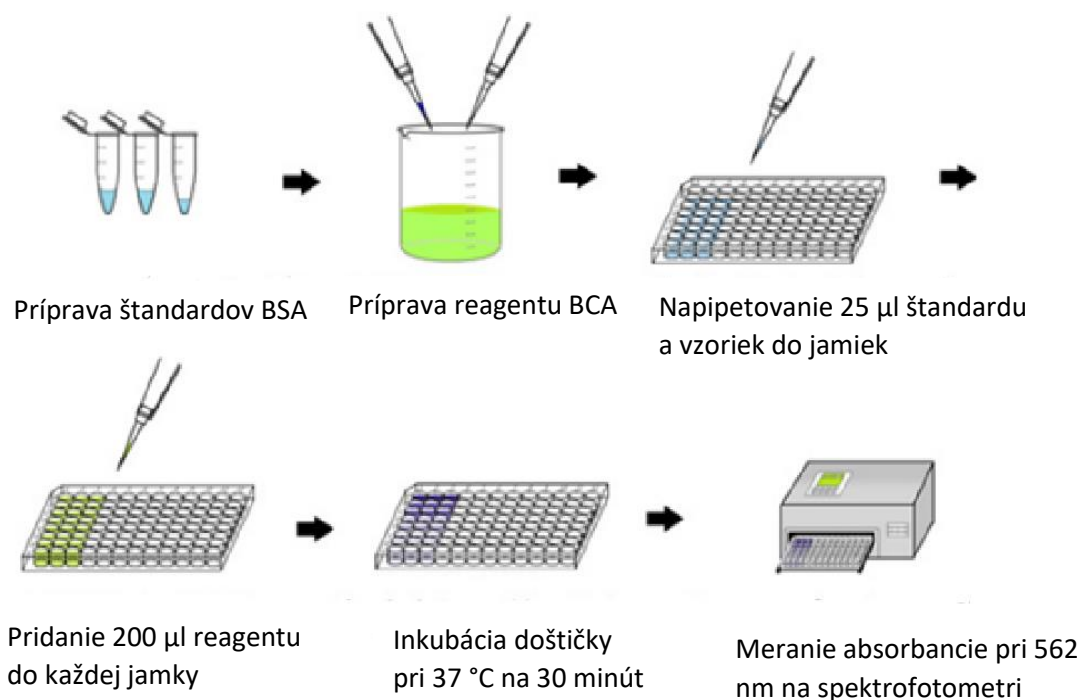
## **3.2 Metodika**

### **3.2.1 Príprava semennej plazmy**

Bolo nám dodaných 15 vzoriek semennej plazmy, ktorá sa vopred scentrifugovala. Plazmu sme uchovávali pri  $-80^{\circ}\text{C}$  aby sme zabezpečili, čo najmenšiu degradáciu vzoriek. Následne sme vzorky alikvotovali na menšie objemy. Z každej vzorky sme si pripravili jeden alikvot, aby sa predišlo znehodnoteniu vzorky neustálym zmrazovaním a rozmrazovaním a ktorý sa riedil 50 x (2  $\mu\text{l}$  plazmy 98  $\mu\text{l}$  vody) a 100 x ( 1  $\mu\text{l}$  plazmy a 99  $\mu\text{l}$  vody). Plazma sa riedila týmto spôsobom, kvôli tomu, aby bola v takej koncentrácii, v ktorej je možné detegovať prítomnosť proteínov.

### **3.2.2 Meranie koncentrácie proteínov pomocou BCA**

Bolo potrebné zistiť, aké množstvo proteínov, sa nachádza v semennej plazme. Táto metóda sa vykonávala pomocou použitia 96 jamkovej mikrodoštičky, ktorú môžeme vidieť aj na obrázku (Obr.3 ). Štandardy, blank aj vzorky sa pipetovali v objeme 25  $\mu\text{l}$ . Do prvých troch jamiek sa napipetoval blank- použila sa MS voda. Ďalej sa pipetovali štandardy hovädzieho sérového albumínu (BSA) v rozmedzí koncentrácií 125 - 2000  $\mu\text{g/ml}$ - každá koncentrácia sa napipetovala v troch opakovaniach. Ako neznáme vzorky sa použili vopred zriedené alikvoty (50 a 100 x) semennej plazmy. Každá vzorka semennej plazmy sa na doštičku pipetovala v dvoch opakovaniach. Pripravil sa roztok kyseliny bicínchoninovej (BCA) pomocou súpravy Pierce BCA Protein Assay. Roztok bol v pomere 50 dielov reagentu A na 1 diel reagentu B. Do každej jamky sa potom napipetovalo 200  $\mu\text{l}$  tohto roztoku. Doštička sa následne inkubovala 30 minút pri teplote  $37^{\circ}\text{C}$ . Po skončení inkubácie sa na spektrofotometri zmerala absorbancia pri vlnovej dĺžke  $\lambda = 562 \text{ nm}$ . Z nameraných hodnôt sa v programe Excel zostavila kalibračná krivka z absorbancie štandardov BSA. Podľa rovnice regresie sa vypočítalo množstvo proteínov v 1 ml. Podľa vypočítaných hodnôt koncentrácie sa vybrali dve vzorky, s ktorými sa ďalej pracovalo.



Obrázok 3. Schéma metódy BCA. Upravené podľa: [https://www.abcam.co.jp/products/253/ab253410/documents/BCA-Protein-Assay-Kit-protocol-book-ab253410%20\(website\).pdf](https://www.abcam.co.jp/products/253/ab253410/documents/BCA-Protein-Assay-Kit-protocol-book-ab253410%20(website).pdf) (20.3.2022).

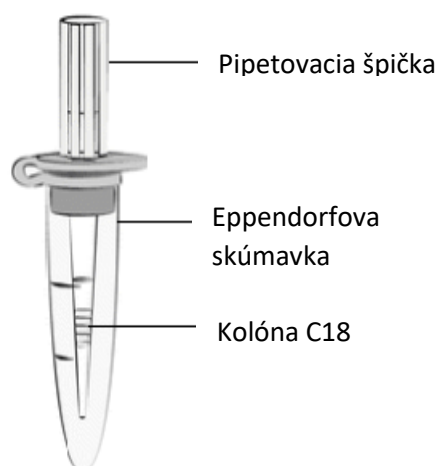
### 3.2.3 Štiepenie na filtri

Touto metódou sa vzorky semennej plazmy prečistili a všetok ďalší biologický odpad sa zo semennej plazmy odstránil, aby sa následne mohlo zisťovať zastúpenie jednotlivých proteínov v semennej plazme. Pripravili sa potrebné roztoky- 2 ml  $8 \text{ mol.l}^{-1}$  močoviny (UA) v 20 ml  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  Tris HCl, 25 ml  $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  hydrogenuhličitanu amonného a 0,2 ml  $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  jódacetamidu. Na filter mikroskúmavky sa napepitovalo 30 µl semennej plazmy a 200 µl UA. Takto pripravené mikroskúmavky sa centrifugovali 15 minút pri  $13\,000 \times g$ . Po tejto centrifugácii sa do centrifugačných skúmaviek napipetovalo 200 µl UA a znovu prebehla centrifugácia. Obsah, ktorý v mikroskúmavke prešiel cez filter sa vylial a následne sa pridalo 100 µl  $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  jódacetamidu v UA. Mikroskúmavky sa nechali pretrepať pri 600 rpm na termomixére po dobu jednej minúty a inkubovali sa 20 minút v tme. Po ukončení inkubácie sa znovu mikroskúmavky scentrifugovali pri  $13\,000 \times g$  na 15 minút. Pridalo sa 100 µl UA na filter a znovu prebehla centrifugácia pri  $13\,000 \times g$  na 15 minút. Tento krok sa zopakoval dvakrát. Na filter mikroskúmavky sa potom pridalo 100 µl hydrogenuhličitanu amonného a nechalo sa scentrifugovať pri  $13\,000 \times g$  po dobu 15 minút , s tým ,že tento postup sa dvakrát zopakoval. Do mikroskúmaviek sa potom pridalo 200 µl hydrogenuhličitanu amonného s trypsínom a mikroskúmavky sa

dali trepať na termoximér pri 600 rpm na 1 minútu. Vzorky sa nechali inkubovať pri 37°C na noc (18 hodín). Filtre sa následne premiestnili do nových skúmaviek. Mikroskúmavky sa dali scentrifugovať pri 13 000 x g na 10 minút. Pridalo sa 40 µl ABC a znovu sa mikroskúmavky scentrifugovali pri 13 000 x g na 10 minút. Opäť sa vykonala metóda BCA pomocou ktorej sa zistila koncentrácia peptidov. Do 96- jamkovej mikrodoštičky sa napipetovali štandardy BSA v rozmedzí koncentrácií 125-2000 µg/ml, každá koncentrácia sa napipetovala 3-krát. Ako blank sa použila MS voda , ktorá sa tiež napipetovala 3-krát. Následne sa v duplikátoch napipetovali vzorky semennej plazmy v objeme 10 µl. BCA činidlo sa pripravilo v pomere 50:1 (reagent A:reagent B) a napipetovalo sa do všetkých použitých jamiek v objeme 200 µl. Doštička sa inkubovala 30 minút pri 37°C. Následne sa zmerala absorbancia pomocou spektrofotometra a v programe Excel sa vytvorila kalibračná krivka, podľa ktorej sa vypočítali koncentrácie peptidov. Potom sa vypočítal objem vzoriek na 10 µg peptidu. V jednej vzorke bolo ale veľmi malé množstvo peptidov a preto sa už s ňou ďalej nepracovalo.

#### **3.2.4 Prečistenie cez Stage Tip**

Týmto spôsobom sa peptidy purifikovali na C18 „Stage tips“, ktoré sa najprv museli aktivovať. Kolóny sa premývali a aktivovali tieto roztoky: 100 µl metanolu, 100 µl 80% acetonitrilu (AcN) s 0,1 % kyselinou octovou (AA), 100 µl 0,1 % kyseliny octovej. Kolóna sa aktivovala metanolom skúmavky sa scentrifugovali pri 3000 x g po dobu 2 minút. Potom sa skúmavky prepláchli 100 µl 80 % AcN s 0,1 % AA a znovu sa skúmavky centrifugovali. Opäť prebehol preplach kolóny roztokom 0,1 % AA. Skúmavky sa dali scentrifugovať pri 3000 x g na dve minúty. Následne sa na filter naniesla vzorka, v ktorej sa nachádzalo 10 µg peptidov a scentrifugovala sa pri 3000 x g na dobu 2 minút. Kolóny aj so vzorkou sa prepláchli 100 µl 0,1 % AA a znovu sa vykonala centrifugácia ( 3000 x g, 2 minúty). Obsah mikroskúmaviek sa premiestnil do novej eppendorfovej skúmavky, kde sa eluoval 100 µl 80 % AcN s 0,1 % AA. Mikroskúmavky sa premiestnili do vákuovej sušičky zhruba na 30-45 minút, až pokým sa neodparil tekutý obsah a nezostali vysušené peptidy. Vzorky sa následne rozpustili v 50 µl 0,1 % kyseliny trifluoroctovej. týmto spôsobom pripravené vzorky sa preniesli do vialiek, čím sa pripravili na MS analýzu.<sup>7</sup>



Obrázok 4: Stage tips kolóna zostavená z mikroskúmavky a pipetovacej špičky na purifikáciu peptidov. Zdroj: Kroupová, 2020

### 3.2.5 Meranie na HPLC-MS

Na zmeranie vzoriek sa použil chromatograf Dionex UltiMate 3000 a LC-MS/MS analýza sa vykonala použitím hmotnostného spektrometra Thermo Orbitrap Exploris 480. HPLC separácia zahŕňala odsolenie na Acclaim PrepMap 100 kolóne (100  $\mu\text{m}$  x 2 cm, C18, 5  $\mu\text{m}$ , 100 Å). Následne sa vykonala analytická separácia pomocou PrepMap RSLC (75  $\mu\text{m}$  x 25 cm, C18, 2  $\mu\text{m}$ , 100 Å). Vzorky sa naniesli na kolónu a odsolili sa, na čo sa využila HPLC nanášacia pumpa s prietokom 6  $\mu\text{l}/\text{min}$  a 1 % acetonitril s 0,05 % kyselinou trifluoroctovou. Po 10 minútach od naniesenia prebehla separácia. Ako mobilná fáza A sa použila 0,1 % kyselina mravčia vo vode a mobilná fáza B bola tvorená 0,1 % kyselinou mravčou v acetonitrile. Na Orbitrape sa vzorky merali pri rozlíšení 120 000 a hmotnostný rozsah bol nastavený na 350- 1500. Fragmentácia sa vykonávala pomocou lineárnej iónovej pasce využívajúcej CID fragmentačný mód.

### 3.2.6 Spracovanie Raw Dát

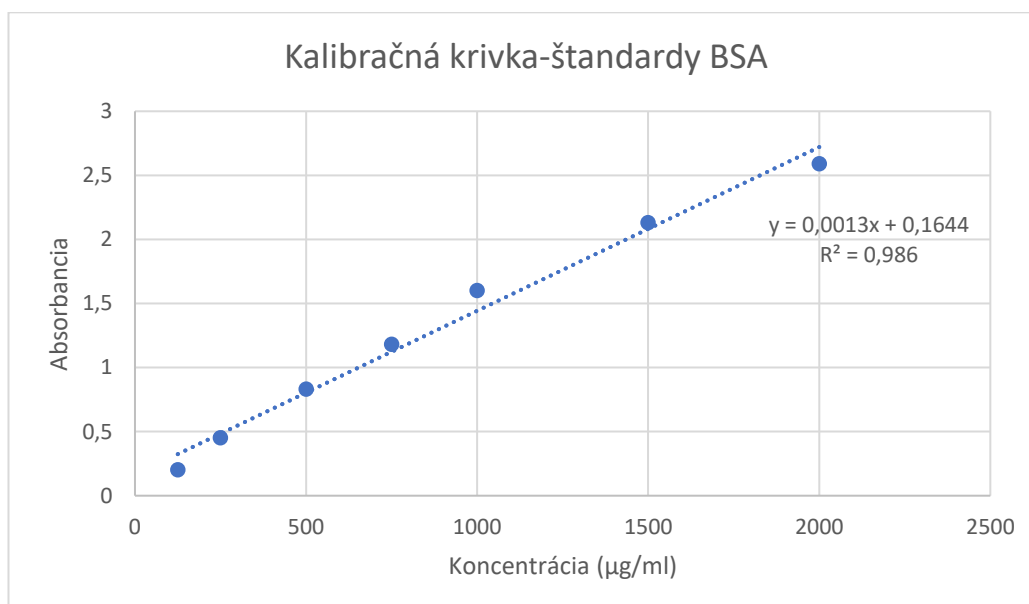
Dáta z hmotnostného spektrofotometra sa analyzovali v programe Thermo Protein Discoverer 2.4.0305. V rámci funkcie „Spectrum file re - calibration“ sa vybrala databáza UniProt (Uniprot-organism\_human\_2019) s trypsínom ako štiepiacim enzýmom. Následne sa nastavili parametre pre očakávané modifikácie. Ako štatistická modifikácia sa nastavila karabimidometylácia cysteínu a ako dynamické modifikácie sa určili oxidácia metionínu a acetylácia na N- konci proteínu. Minimálna dĺžka peptidu sa zvolila na 6 aminokyselín. Na zvolenie prekurzora u funkcie „Spectrum Selector“ sa určilo rozpätie 300 - 5000 Da, najnižší náboj sa zvolil na hodnotu 2 a najvyšší náboj na hodnotu 4, „treshold“ intenzita sa nastavila na 2000. Prehľadávanie sa vykonávalo

s vybraným algoritmom Sequest HT, s tým že sa nastavilo vynechávanie maximálne 2 štiepných miest. Minimálna dĺžka peptidu sa nastavila na 6 aminokyselín a maximálna dĺžka bola určená na 144 aminokyselín. Hmotnostná tolerancia prekurzora bola zvolená na 10 ppm a hmotnostná tolerancia fragmentu na 0,6 Da. Validita vyhľadávania sa overila podľa funkcie „Percolator“, pričom sa založila na q-value. Vlastnosti chromatografu sa zhodnotili použitím funkcie „Minora Feature Detection“. Po tomto prehľadávaní sa zahájil konsenzuálny protokol extrakciou identifikovaných alebo kvantifikovaných peptidov z „MSM Files“. Funkcia „Feature Mapper“ sa v prvej vetve využila na vyrovnanie retenčného času s maximálnym posunom 10 min a s hodnotou 5 pre minimálny signál/šum „treshold“. Label-free kvantifikácia na základe unikátnych peptidov sa vykonala pomocou funkcie „Percursor Ion Quantifier“, s tým, že sa venovala pozornosť proteínovým skupinám a zdieľaným kvalifikačným výsledkom. Druhá vetva konsenzuálneho postupu sa začala z „MSF“ Files. Zamerala sa na validáciu peptidov a proteínov. Prvou funkciou, ktorá sa použila bola „PSM Grouper“ so „Site Probability Treshold“ s hodnotou 95. Ďalej sa použil „Peptide Validator“ s automatickým validačným módom so „Strict Target FDR“ 0,01 a „Relaxed Target FDR“ 0,05. Validované peptidy sa spracovali využitím „Peptide and Protein filter“, kde sa minimálna dĺžka peptidu nastavila na 6 aminokyselín s vysokou istotou. Zahrnuli sa výsledky, kde bola nízka hustota a vynechali sa peptidy bez referencie, toto zahrnutie sa nastavilo na „False“. Minimálny počet peptidových sekvencií sa nastavil na 2. Následne sa použila funkcia „Protein Scorer“ spojená s „Protein FDR Validator“, ktorý bol nastavený na „Strict FDR“ 0,01 a „Relaxed FDR“ 0,05 s funkciou „Protein Grouping“ využívajúcou „Apply Strict parsimony“.

## 4 VÝSLEDKY

Zamerali sme sa na charakterizáciu proteómu semennej plazmy a nájdenie proteínov ,ktoré by mohli mať úlohu pri diagnostike a liečbe azoospermie. Vzorky semennej plazmy boli po riedení 50 x a 100 x podrobené hmotnostnej analýze merajúcej koncentráciu proteínov vo vzorkách pomocou metódy BCA s následným meraním absorbancie vzoriek v spektrofometri. Tabuľka č.1 zobrazuje hodnoty absorbancie štandardov BSA v rozmedzí koncentrácií 125- 2000 µg/ml. Podľa týchto hodnôt sa zostavila kalibračná krivka (Obr.2).

Tab. 1: Namerané absorbancie štandardov BSA



Obrázok 4. Graf závislosti absorbancie na koncentrácii proteínu získaný zmeraním štandardných roztokov BSA o známych koncentráciách. Predpis priamky:  $y = 0,0013x + 0,1644$ ,  $R^2 = 0,986$

Na základe hodnôt kalibračnej krivky a rovnice, ktorá nám touto kalibračnou krivkou vznikla sme boli schopní pomocou nameranej absorbancie vzoriek semennej plazmy vypočítať koncentráciu proteínov v týchto vzorkách. Výpočet sa vykonával použitím rovnice z grafu, kde sa dosadili potrebné hodnoty, z ktorých sa odvodila hodnota x, vyjadrujúca koncentráciu proteínov (Tab.2). Týmto spôsobom sme mohli zistiť konkrétne množstvo proteínov prítomných v jednotlivých vzorkách.

Tab. 2: Koncentrácia proteínov v jednotlivých vzorkách semennej plazmy

Označenie vzorky	Riedenie	Absorbancia		Priemer	Koncentrácia (mg/ml)		Priemer	SD
N211155	50x	0,54	0,64	0,59	14,48	18,37	16,43	2,75
	100x	0,34	0,37	0,36	13,58	15,74	14,66	1,52
N211142	50x	0,67	0,73	0,70	19,75	21,72	20,73	1,38
	100x	0,42	0,40	0,41	19,66	18,04	18,85	1,14
N211141	50x	0,77	0,85	0,82	23,6	26,56	25,08	2,09
	100x	0,44	0,50	0,47	21,89	25,43	23,66	2,50
3790	50x	0,71	0,80	0,76	21,33	24,25	22,79	2,07
	100x	0,49	0,53	0,51	25,58	27,82	26,70	1,57
N211145	50x	0,69	0,68	0,69	20,56	19,52	20,04	0,73
	100x	0,33	0,36	0,35	13,35	14,74	14,05	0,98
N0909961	50x	0,40	0,41	0,41	9,10	9,45	9,27	0,24
	100x	0,25	0,27	0,26	7,20	7,74	7,47	0,38
K200512	50x	0,60	0,65	0,62	16,87	18,48	17,68	1,14
	100x	0,32	0,37	0,35	12,04	15,82	13,93	2,66
K190509	50x	0,73	0,84	0,78	21,75	25,91	23,83	2,94
	100x	0,29	0,40	0,35	10,05	18,20	14,12	5,77
A210108	50x	0,80	0,84	0,82	24,45	26,06	25,25	1,14
	100x	0,46	0,50	0,48	23,04	25,66	24,35	1,85
5776 K	50x	0,50	0,55	0,52	12,90	14,75	13,83	1,30
	100x	0,33	0,35	0,34	13,20	14,35	13,78	0,82
5087 K	50x	0,60	0,62	0,61	16,79	17,37	17,08	0,41
	100x	0,27	0,30	0,29	8,20	10,43	9,31	1,58
4416 V	50x	0,52	0,55	0,54	13,87	14,87	14,37	0,71
	100x	0,29	0,34	0,32	9,74	6,79	8,27	2,08
N0909162	50x	0,50	0,45	0,48	13,14	10,95	12,04	1,55
	100x	0,28	0,30	0,29	9,13	10,43	9,77	0,93
N21	50x	0,72	0,75	0,73	21,18	22,40	21,79	0,87
	100x	0,43	0,43	0,43	20,27	20,05	20,16	0,16
5890	50x	0,71	0,80	0,76	20,95	24,60	22,77	2,59
	100x	0,48	0,52	0,50	24,50	27,51	26,00	2,12



Spomedzi všetkých vzoriek boli na základe koncentrácie proteínov v týchto vzorkách vybrané dve vzorky, s ktorými sme ďalej pracovali. Vzorky N211141 a N211155 boli následne spracované pomocou štiepenia na filtri (FASP). Pracovalo sa však s nenariedenými alikvotmi, aby sme boli schopní zistiť presné koncentrácie proteínov vo vzorkách. Po štiepení na filtri znova prebehla metóda BCA, kde sme zistili koncentráciu peptidov (Tab. 3), podľa ktorej sa určilo množstvo vzorky, s ktorou sa pracovalo v „Stage Tips“.

Tab. 3: Koncentrácia peptidov vo vzorkách semennej plazmy

Označenie vzorky	Absorbancia	Koncentrácia (µg/ml)	Koncentrácia (10 µg/ml)
N211141	0,29	272,17	36,74
N211155	0,12	-17,84	-560,75

Metódou BCA sa zistilo, že vzorka N211155 neobsahovala žiadne peptidy. Na prečistenie cez Stage Tips sa teda použila len vzorka N211141. Vzorka sa spolu s rovnakou vzorkou, ktorá bola k dispozícii z predošlej digescie preniesli do vialiek a následne sa zmerali na HPLC - MS.

V danej vzorke sme pomocou HPLC- MS merania a následného štatistického spracovania boli schopní identifikovať proteíny nachádzajúce sa vo vzorke N211141. Nájdené sekvencie proteínov sa porovnávali s databázou UniProt. Použitím tejto databázy dokázal program Thermo Protein Discoverer 2.4.0305 zistiť o aké konkrétne proteíny sa jedná. Pomocou prehľadávania v databáze UniProt sa teda zistilo, že vzorka N211141 z novej digescie obsahovala 287 proteínov. Pri každom proteíne sa určilo sekvenčné pokrytie, veľkosť proteínu, jeho izoelektrický bod, počet unikátnych peptidov, počet aminokyselín, a to čo bolo pre nás najzaujímavejšie - abundancia daného proteínu. Zoznam nájdených proteínov sa porovnal s ďalšími štúdiami zaoberajúcimi sa identifikáciou proteínov v semennej plazme. 20 najviac abundantných proteínov sa následne charakterizovalo z hľadiska funkcie a potenciálneho vplyvu na tvorbu a transport spermií. Tri najzastúpenejšie proteíny boli semenogelín 1, kalikrelín 3 a sérový albumín.

## 5 DISKUSIA

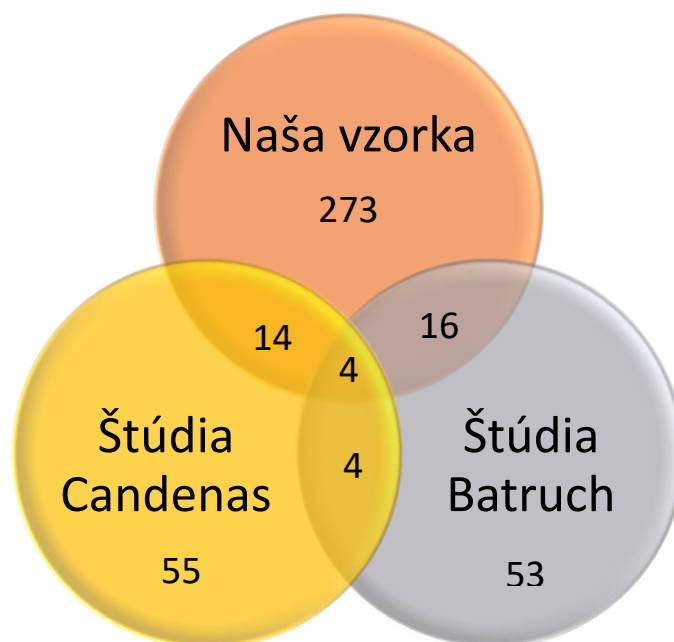
### 5.1 Porovnanie proteínov nájdených vo vzorke semennej plazmy s inými štúdiami

Proteíny, ktoré sa identifikovali v proteóme semennej plazmy vzorky N211141 zmeranej na HPCL - MS sa porovnali s výsledkami iných štúdií, ktoré sa tiež zaoberali proteómom semennej plazmy. Podarilo sa nám identifikovať proteíny, ktoré boli spomínané v štúdií od Pilcha a Manna (2006). Konkrétne sme našli fibronektín, semenogelín 1 a semenogelín 2. Tieto proteíny sú schopné viazať iné proteíny, s tým že majú vplyv na ich katalytickú aktivitu. Fibronektín a semenogelín 1 formujú sieť vlákien, ktorá spôsobuje rôsolovatenie a nehybnosť spermíí (Pilch & Mann, 2006). Je možné predpokladať, že tým, že tieto proteíny znehybňujú spermie, tak môžu vytvárať prekážku pre ďalší pohyb spermíí v reprodukčnom trakte. Fibronektín má vysoké väzbové vlastnosti- dokáže viazať lipoproteíny (Calvete & Sanz 2007).

Následne sme zisťovali to, aké proteíny boli nájdené vo vzorkách semennej plazmy v iných výskumoch a na koľko sa zhodujú nami nájdené proteíny s tými, ktoré sa našli vo vzorkách plazmy v týchto výskumoch.

Štúdia od Candenas hovorí o doteraz zistených znalostiach o proteóme semennej plazmy, a taktiež o tom ako potenciálne môže slúžiť pri diagnostike rozličných stupňov mužskej neplodnosti (Candenas & Chianese, 2020). Na vizualizáciu rozdielu v počte proteínov zahrnutých v tejto štúdií a proteínov nájdených v našej vzorke plazmy bol vytvorený Vennov diagram (Obr. č 5). Taktiež sa porovnával počet proteínov nájdených v štúdií od Batrucha, kde identifikovali vysoké množstvo proteínov vo vzorke plazmy s neobštrukčnou azoospermou ,z ktorých boli vytvorené kratšie zoznamy proteínov, v ktorých sa zameriavali na zistenie ich expresie alebo boli porovnané s predošlými štúdiami (Batruch et al, 2012). S tými sa následne porovnali naše výsledky. Po prehliadnutí Vennovho diagramu je možné povedať, že vo všetkých troch experimentoch boli rovnaké 4 proteíny: klasterín, semenogelín 1 a 2 a L -laktát dehydrogenázu C. Tieto proteíny sa taktiež nachádzali v štúdií od Batrucha. S touto štúdiou sme zároveň zaznamenali najviac spoločných proteínov. Konkrétne šlo o týchto 16 proteínov: klasterín, nukleobindín 2, prolaktínový indukibilný proteín, L -laktát dehydrogenázu C, dipeptidázu, cystatín -C, cystatín - S, semenogelín -1 a 2, A - kináza kotvový proteín, kolagén, laminín s podjednotkou  $\alpha 5$ , IgGfc väzbový proteín, peroxiredoxín - 6, plastín 2 a anexín 5A .V štúdií od Candenas sa našiel prekryv v týchto 14 proteínoch: semenogelín 1 a 2, klasterín, membránovú metaloendopeptidázu, kalikrelín 2, peroxiredoxín 1,

glykoproteín 1 alfa -kyseliny, glykoproteín 2 alfa-kyseliny, katepsín L1, heatschock proteín 70, L - laktát dehydrogenázu C, syntázu mastných kyselín a proteín indukovateľný prolaktínom a fibronektín 1.



Obrázok 5. Vennov diagram na porovnanie počtu proteínov v semennej plazme nami zmeranou vzorkou a inými štúdiami

## 5.2 Charakteristika proteínov nájdených v semennej plazme

Zo zoznamu nájdených proteínov sa vybralo 20 takých, ktoré sa vo vzorke nachádzali v najvyššom množstve a charakterizovala sa ich funkcia.

Proteín semenogelín, ktorý mal najvyššiu abundanciu má veľmi dôležitú úlohu pre imobilizáciu spermií v semennom koaguláte. Pochádza so semenných vezikúl a je hlavným komponentom semenného koagulátu. Má vplyv na viaceré parametre spermií, či už sa nachádza v intaktnom alebo v degradovanom stave. Purifikovaný semenogelín sa vie zosieťovať transglutaminázou alebo je fosforylovaný kinázami. Výskyt týchto reakcií v reprodukčnom trakte však nie je úplne jasný a preskúmaný (De Lamirande, 2007). Druhý najviac zastúpený proteín bol kalikrelín 3, ktorý je veľmi užitočný ako marker pri adenokarcinóme prostaty (Darling *et al.* 2006). Nazýva sa aj špecifický antigén prostaty, ktorý sa podľa R&D Systems využíva pri diagnostike, určovaní štádia a ďalšom sledovaní rakoviny prostaty (<https://www.rndsystems.com>) .

Sérový albumín je v ľudskej krvi najviac zastúpený a je taktiež nosičom voľných mastných kyselín v krvi. Reguluje objem plazmy a tiež rovnováhu v tkanivových

tekutinách. Tento proteín sa môže nešpecificky viazať na steroidy, hormóny štítnej žľazy hemín a ďalšie molekuly (Stillwell, 2016).

Ďalším vysoko zastúpeným proteínom bola kyslá fosfatáza prostaty, ktorá je diferenčným antigénom špecifickým pre epitel prostaty. Má úlohu v objasnení molekulárneho mechanizmu prepojenia medzi androgénmi a signalizáciou fosforylácie tyrozínu, ktorá je zahrnutá v regulácii rastu buniek karcinómu prostaty. Kyslá fosfatáza prostaty môže slúžiť aj pri skúmaní biologickej aktivity histidín- dependentných kyslých fosfatázach a ich vzťahu v rámci evolúcie (Muniyan et al 2013).

Klasterín má úlohu ako extracelulárny čaperón, ktorý chráni pred agregáciou nenatívnych proteínov. Zabraňuje aj tomu aby prebiehala stresom indukovaná agregácia krvných proteínov. Keď sa naviaže na receptory na povrchu buniek, tak sa spustí internalizácia komplexu čaperón- klient s nasledujúcou lyzozomálnou a proteozomálnou degradáciou (<https://www.uniprot.org> ).

Proteín testikulárneho pletiva Li 227 bol nájdený v semennej plazme s celkom vysokou abundanciou. Jeho sekvencia či podobnosť s inými proteínmi je viacmenej známa, ale jeho funkcia ešte nebola celkom objasnená (<https://www.uniprot.org> ).

Laktoferín, ktorý mal v meranej vzorke semennej plazmy tiež vysoké zastúpenie, je multifunkčným glykoproteínom nachádzajúcim sa najmä v mlieku cicavcov, ale taktiež ho vieme nájsť aj v iných telesných tekutinách. Tento transportný proteín viaže železo, s tým, že môže naviazať 2 ióny  $Fe^{3+}$  v spojení s aniónom, najčastejšie bikarbonátom (<https://www.uniprot.org>). Tento proteín má viacero biologických funkcií ako napríklad podpora proliferácie a diferenciácie buniek a taktiež sa správa ako antibakteriálny, antivirálny a antiparazitický proteín (Karav et al., 2017).

Prolaktínom indukovaný proteín je malým glykoproteínom nesúcim niekoľko sacharidových reťazcov, ktoré sú naviazané na dusík. Tento proteín sa exprimuje iba v apokrinných žľazách a môže sa viazať na viacero proteínov, ale väčšinou nie je biologický význam týchto interakcií veľmi objasnený. Viaže sa na C4 receptory, ktoré sú prítomné na povrchu T lymfocytov, makrofágov a spermií. Získané informácie o tomto proteíne naznačujú, že by mohol mať imunomodulačnú funkciu a pravdepodobne je dôležité jeho zastúpenie pri adoptívnej imunite sprostredkovanej bunkou. Taktiež sa dokáže viazať na viacero druhov baktérií , čo naznačuje, že je súčasťou vrodenej imunity a dokáže ochrániť hostiteľa pred mikrobiálnymi infekciami. (Urbaniak et al., 2018).

Funkcia semenogelínu 2 je vo vytváraní gélovej matrix, ktorá má úlohu v zachytávaní sektrétov prídavných žliaz a ejakulovaných spermií

(<https://www.uniprot.org>). Spoločne so semenogelínom 1 je dominantným komponentom koagulátu tvoreného čerstvo koagulovaným semenom. Vzniká v žľazovom epiteli semenných vezikúl, kde je sekretovaný v celkom vysokých koncentráciách. Produkuje sa aj v epiteli nadsemenníkov, avšak v nižších koncentráciách. Semenogelín 2 funguje ako substrát transglutaminázy, pravdepodobne kvôli opakovanej štruktúre s množstvom glutamínu a lyzínu (Lundwall et al., 2002).

Fibronektín je proteínom viažúcim heparín. Do jeho biologickej funkcie spadá odozva na akútny stav v organizme, bunková adhézia a regulácia bunkového tvaru. (<https://www.uniprot.org>). Nachádza sa v krvi a v spojivových pletivách. Jeho podporná aktivita pri prichytávaní buniek je závislá od toho, či sú tam prítomné špecifické sekvencie aminokyselín v jeho štruktúre, pretože tie sú schopné interakcie s integrínovými receptormi buniek a od toho, či je schopný tvoriť komplexy s inými makromolekulami (Santin, 2010).

Proteín mucín 6 sa tvorí v špecializovaných sekretovaných bunkách, ide buď o pohárikovité bunky alebo hlienové bunky. Glykány mucínu môžu pôsobiť ako väzobné miesta pre mikróby, a to že sa mucín značne glykozuluje v centrálnej oblasti ho chráni pred proteázovou degradáciou. V oblasti mucínu, kde sa nachádzajú sekvencie bohaté na prolín, treonín a serín sú rozptýlené domény bohaté na cysteín, ktoré majú neobjasnenú funkciu, ale predpokladá sa, že sú miestami prechodných krížových väzieb medzi mucínmi (McGuckin et al., 2015).

Sekrečný proteín nadsemenníkov vezúci spermie je receptorom so zoraďovacou funkciou, ktorý smeruje prohormóny k regulovanej sekrečnej dráhe. Má aj enzymatickú funkciu, kedy spracováva prohormóny nervových či endokrinných buniek. Ako katalyzátor pôsobí pri uvoľňovaní C -kocových arginínových alebo lyzínových zvyškov z polypeptidov (<https://www.uniprot.org>).

Proteín gastrinín je schopný hydrolyzovať viaceré proteíny. Je to kyslá endopeptidáza, ktorá sa nachádza najmä v žalúdočnej šťave stavovcov, ale je identifikovateľný aj v ľudskej semennej plazme či v nádorovom tkanive prsníka. Gastrinín má veľmi podobnú špecificitu ako pepsín, aj keď s nejakými odchýlkami. Tvorí sa v prostate a jeho funkcia spočíva hlavne v degradácii proteínov semennej plazmy, aby sa zabránilo imunogénnym reakciám (Tang, 2013).

Niemann- Pick C (NPC) intracelulárny transportér cholesterolu funguje už ako z názvu vyplýva ako transportér cholesterolu v rámci bunky. Pôsobí spoločne s proteínom NPC 1 a je dôležitý pri úniku cholesterolu z kompartmentu lyzozómu. Prenáša

neesterifikovaný cholesterol uvoľnený z lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL) v luméne neskorých endozómov alebo lyzozómov, s tým že sa naviaže na väzobné miesto pre cholesterol v N - terminálnej doméne NPC (<https://www.nextprot.org/>).

cDNA FLJ53478, ktorý je veľmi podobný s proteínom viažúcim galektín 3 má aktivitu vo vychytávaní receptorov (<https://www.uniprot.org/>).

Ďalším nájdeným proteínom s vysokou abundanciou bola izoforma 3 mesotelínu. Mesotelín je glykoproteínom ukotveným k povrchu. Exprimuje sa vo vajčkovode ale aj v mnohých ďalších ľudských tkanivách (<https://www.uniprot.org/>) Tam sa exprimuje v obmedzenom množstve, ale jeho abnormálna expresia bola zaznamenaná v rakovinových bunkách vaječníkov ako aj v adenokarcinóme ďalších orgánov (Muminova et al., 2004).

Ďalším proteínom je keratín typu 1, cytoskeletálny proteín, ktorý je aktívny v heterodidimerizácií proteínov. Taktiež tvorí základnú zložku pokožky (<https://www.uniprot.org/>). Keratínové proteíny majú funkciu v ochrane buniek epitelu pred mechanickým a nemechanickým stresom. Pred touto štúdiou však nebola zaznamenaná žiadna, ktorá by objasňovala vzťah týchto proteínov k reprodukcií (Pérez-Patiño et al., 2018).

Proteín tkaniva semenníkov Li 61 má funkciu pri vývoji chondrocytov, jeho úloha je významná pri endochondrálnom raste kostí a taktiež poskytuje odpoveď na zápal v organizme. Negatívne reguluje signálnu dráhu sprostredkovanú cytokínmi a podieľa sa aj na regulácií mineralizácie kostí (<https://www.uniprot.org/> )

Keratín 1 by mohol mať úlohu pri regulácií aktivity kináz ako napríklad PKC (proteínkináza C) a SRC (nereceptorová tyrozín kináza) prostredníctvom väzby na integrín beta-1 a receptor aktivovanej proteín kinázy C (RACK 1) ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org/)). Má katalytickú a receptorovú aktivitu, dokáže viazať proteíny a taktiež funguje ako štruktúrna molekula. Môže spôsobiť bunkovú smrť, ale taktiež má funkciu v biogenéze a organizácií buniek. Pôsobí aj pri proliferácií buniek (Yeung et al, 2022).

Posledným z tejto skupiny 20 proteínov bol cystatín C, ktorý inhibuje proteázy cysteínu. Domnieva sa, že tento proteín by mohol plniť dôležitú fyziologickú funkciu ako lokálny regulátor aktivity tohto enzýmu ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org/)). Reguluje proteázy vylučované alebo unikajúce z lyzozómov umierajúcich alebo chorých buniek. Takisto znižuje invazívnosť melanómov, čo je proces závisiaci od degradácie proteínov extracelulárnej matrix (Newman, 2002).

Pre vytvorenie úplného porovnania medzi obštrukčnými a neobštrukčnými azoospermikmi je potrebné prečistiť a odmerať na HPLC-MS všetky vzorky, aby sme mohli analyzovať rozdiely v semennej plazme medzi týmito dvoma typmi azoospermie. Taktiež je dôležité hlbšie preštudovať funkcie proteínov, najmä takých, ktoré ovplyvňujú tvorbu a prenos spermií, aby bolo možné identifikovať také proteíny, ktoré by potenciálne mohli slúžiť ako biomarkery pri diagnostike azoospermie.

## 6 ZÁVER

Hlavným cieľom tejto práce bolo porovnanie dvoch typov azoospermie - obštrukčnej a neobštrukčnej z hľadiska zloženia proteómu semennej plazmy pacientov s týmito ochoreniami. Funkcia semennej plazmy spočíva v transporte spermíí. Semenná plazma obsahuje predovšetkým sekréty z prostaty a semenných vezikúl. Vzájomná interakcia spermíí a semennej plazmy vyúsťuje vo väzbu medzi proteínmi semena a povrchom spermíí, čo môže spôsobiť prestavbu membrány a ovplyvniť transport a prežívanie spermíí (Druart et al, 2018). Keďže azoospermia sa diagnostikuje prevažne biopsiou semenníkov, ktorá je veľmi invazívnou metódou, táto interakcia a študovanie proteómu semennej plazmy by mohli zredukovať potrebu vykonávania biopsie a umožniť diagnostiku spôsobom skúmania proteínov semennej plazmy.

Pôvodným cieľom tejto práce bolo analyzovať vzorky od troch skupín mužských darcov- normozoospermikov, azoo - vazektomikov a kryptozoospermikov. Najprv sme zistili koncentráciu proteínov nachádzajúcich sa v jednotlivých vzorkách. Najmenej proteínov obsahovala vzorka zo skupiny kryptozoospermikov. Môžeme konštatovať, že v rámci jednotlivých skupín obsahovali vzorky podobný počet proteínov, až na jednu vzorku, v ktorej množstvo proteínov bolo o polovicu menšie než vo vzorke s najvyšším počtom proteínov. Na základe zmeranej koncentrácie proteínov v jednotlivých vzorkách sa vybrali dve, s ktorými sa ďalej pracovalo. Metódou štiepenia na filtri podstúpili tieto vzorky digesciu trypsínom Pomocou metódy BCA sme určili koncentráciu peptidov v týchto vzorkách.

Z dôvodu namerania zápornej koncentrácie peptidov v jednej z týchto vzoriek, podstúpila meranie na HPLC - MS len jedna vzorka. V tejto vzorke sa nám podarilo pomocou štatistickej analýzy nájsť 287 proteínov. Zistilo sa, že niektoré z nájdených proteínov mali vplyv na viaceré parametre spermíí ako aj na ich správnu funkciu a prenos. Z časových dôvodov sa nám však nepodarilo prečistiť ďalšie vzorky a určiť proteíny v nich prítomné pomocou merania na HPLC -MS. Pre vytvorenie uceleného porovnania medzi obštrukčnými a neobštrukčnými azoospermikmi bude potrebné zmerať zostávajúce vzorky a identifikovať proteíny majúce vplyv pri azoospermii, aby bolo vyhodnotenie proteómu semennej plazmy medzi týmito dvoma skupinami azoospermikov relevantné.



## 7 ZOZNAM LITERATÚRY

- Abcam. [https://www.abcam.co.jp/ps/products/253/ab253410/documents/BCA-Protein-Assay-Kit-protocol-book-ab253410%20\(website\).pdf](https://www.abcam.co.jp/ps/products/253/ab253410/documents/BCA-Protein-Assay-Kit-protocol-book-ab253410%20(website).pdf) (20.3.2022).
- Attia, A. M., Abou-Setta, A. M., & Al-Inany, H. G. (2013). Gonadotrophins for idiopathic male factor subfertility. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2013(8). 1-26. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005071.PUB4>
- Arap, M. A., Vicentini, F. C., Cocuzza, M., Hallak, J., Athayde, K., Lucon, A. M., Arap, S., & Srougi, M. (2007). Late hormonal levels, semen parameters, and presence of antisperm antibodies in patients treated for testicular torsion. *Journal of Andrology*, 28(4), 528–532. <https://doi.org/10.2164/JANDROL.106.002097>
- Batruch, I., Lecker, I., Kagedan, D., Smith, C. R., Mullen, B. J., Grober, E., Lo, K. C., Diamandis, E. P., & Jarvi, K. A. (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(3), 941–953. <https://doi.org/10.1021/PR100745U>
- Batruch, I., Smith, C. R., Mullen, B. J., Grober, E., Lo, K. C., Diamandis, E. P., Jarvi, K. A. (2012). Analysis of seminal plasma from patients with non-obstructive azoospermia and identification of candidate biomarkers of male infertility. *Journal of proteome research*, 11(3), 1503–1511. <https://doi.org/10.1021/pr200812p>
- Berookhim, B. M., & Schlegel, P. N. (2014). Azoospermia due to Spermatogenic Failure. *Urologic Clinics of North America*, 41(1), 97–113. <https://doi.org/10.1016/J.UCL.2013.08.004>
- Biopedia. <https://biopedia.sk/clovek/pohlavna-sustava-muza> (23.10.2022).
- Bromfield, J. J. (2014). Seminal fluid and reproduction: much more than previously thought. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(6), 627. <https://doi.org/10.1007/S10815-014-0243-Y>
- Busso, D., Cohen, D. J., Hayashi, M., Kasahara, M., Cuasnicú, P. S. (2005). Human testicular protein TPX1/CRISP-2: localization in spermatozoa, fate after capacitation and relevance for gamete interaction. *Molecular human reproduction*, 11(4), 299–305. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah156>
- Busso, D., Goldweic, N. M., Hayashi, M., Kasahara, M., Cuasnicú, P. S. (2007). Evidence for the involvement of testicular protein CRISP2 in mouse sperm-egg fusion. *Biology of reproduction*, 76(4), 701–708. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.056770>
- Caballero, I., Vazquez, J. M., Mayor, G. M., Almiñana, C., Calvete, J. J., Sanz, L., Roca, J., & Martinez, E. A. (2009). PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. *International journal of andrology*, 32(5), 505–513. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2008.00887.x>
- Caballero, I., Parrilla, I., Almiñana, C., Olmo, D. del, Roca, J., Martínez, E., Vázquez, J. (2012). Seminal Plasma Proteins as Modulators of the Sperm Function and Their Application in Sperm Biotechnologies. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(SUPPL.3), 12–21. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2012.02028.X>
- Calvete, J. J., Sanz, L. (2007). Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 65, 201–215. PMID: 17644963.
- Camargo, M., Intasqui, P., Bertolla, R. P. (2018). Understanding the seminal plasma proteome and its role in male fertility. *Basic and Clinical Andrology 2018 28:1*, 28(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12610-018-0071-5>
- Candenas, L., Chianese, R. (2020). Exosome Composition and Seminal Plasma Proteome: A Promising Source of Biomarkers of Male Infertility. *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 7022*, 21(19), 7022. <https://doi.org/10.3390/IJMS21197022>
- Carpi, A., Sabanegh, E., Mechanick, J. (2009). Controversies in the management of nonobstructive azoospermia. *Fertility and sterility*, 91(4), 963–970. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.083>
- Cocuzza, M., Cocuzza, M. A., Bragais, F. M. P., & Agarwal, A. (2008). The role of varicocele

- repair in the new era of assisted reproductive technology. *Clinics*, 63(3), 395–404. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322008000300018>
- Cocuzza, M., Athayde, K. S., Alvarenga, C., Srougi, M., Hallak, J. (2012). Grade 3 varicocele in fertile men: A different entity. *Journal of Urology*, 187(4), 1363–1368. <https://doi.org/10.1016/J.JURO.2011.11.114>
- Cocuzza, M., Alvarenga, C., Pagani, R. (2013). The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics*, 68(SUPPL. 1), 15–26. [https://doi.org/10.6061/CLINICS/2013\(SUP01\)03](https://doi.org/10.6061/CLINICS/2013(SUP01)03)
- Cohen, D. J., Ellerman, D. A., Busso, D., Morgenfeld, M. M., Piazza, A. D., Hayashi, M., Young, E. T., Kasahara, M., Cuasnicu, P. S. (2001). Evidence that human epididymal protein ARP plays a role in gamete fusion through complementary sites on the surface of the human egg. *Biology of reproduction*, 65(4), 1000–1005. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.4.1000>
- Committee of the American Society for Reproductive Medicine in collaboration with the Society for Male Reproduction, P. (2008). The management of infertility due to obstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*, 90(5), S121–S124. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2008.08.096>
- Darling, M. R., Tsai, S., Jackson-Boeters, L., Daley, T. D., Diamandis, E. P. (2006). Human kallikrein 3 (prostate specific antigen) and human kallikrein 5 expression in salivary gland tumors. *The International journal of biological markers*, 21(4), 201–205. <https://doi.org/10.5301/jbm.2008.2048>
- De Lamirande, E. (2007). Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 33(1), 60–68. <https://doi.org/10.1055/S-2006-958463>
- Desnoyers, L., Manjunath, P. (1992). Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *The Journal of biological chemistry*, 267(14), 10149–10155.
- Dostálová, Z., Calvete, J. J., Töpfer-Petersen, E. (1995). Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model for coating of spermadhesins to the sperm surface. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, 376(4), 237–242. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1995.376.4.237>
- Drabovich, A. P., Jarvi, K., Diamandis, E. P. (2011). Verification of male infertility biomarkers in seminal plasma by multiplex selected reaction monitoring assay. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 10(12), M110.004127. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.004127>
- Drabovich, A. P., Dimitromanolakis, A., Saraon, P., Soosaipillai, A., Batruch, I., Mullen, B., Jarvi, K., Diamandis, E. P. (2013). Differential diagnosis of azoospermia with proteomic biomarkers ECM1 and TEX101 quantified in seminal plasma. *Science Translational Medicine*, 5(212). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006260>
- Druart, X., & de Graaf, S. (2018). Seminal plasma proteomes and sperm fertility. *Animal reproduction science*, 194, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.061>
- Druart, X., Rickard, J. P., Tsikis, G., de Graaf, S. P. (2019). Seminal plasma proteins as markers of sperm fertility. *Theriogenology*, 137, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.034>
- Farley, S., Barnes, R. (1973). Stenosis of ejaculatory ducts treated by endoscopic resection. *The Journal of Urology*, 109(4), 664–666. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)60510-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)60510-X)
- Ferlin, A., Raicu, F., Gatta, V., Zuccarello, D., Palka, G., Foresta, C. (2007). 734-745 Reproductive BioMedicine Online; [www.rbmonline.com/Article/2782](http://www.rbmonline.com/Article/2782) on web. *Reproductive BioMedicine Online*, 14(6), 734–745. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60677-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60677-3)
- Giese, A., Jude, R., Kuiper, H., Raudsepp, T., Piumi, F., Schambony, A., Guérin, G., Chowdhary, B. P., Distl, O., Töpfer-Petersen, E., et al. (2002). Molecular characterization of the equine testis-specific protein 1 (TPX1) and acidic epididymal glycoprotein 2 (AEG2) genes encoding members of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Gene*, 299(1-2), 101–109. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(02\)01018-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(02)01018-1)

- Hopps, C. V., Goldstein, M., Schlegel, P. N. (2002). The diagnosis and treatment of the azoospermic patient in the age of intracytoplasmic sperm injection. *Urologic Clinics*, 29(4), 895–911. [https://doi.org/10.1016/S0094-0143\(02\)00083-6](https://doi.org/10.1016/S0094-0143(02)00083-6)
- Hung, A. J., King, P., Schlegel, P. N. (2007). Uniform Testicular Maturation Arrest: A Unique Subset of Men With Nonobstructive Azoospermia. *Journal of Urology*, 178(2), 608–612. <https://doi.org/10.1016/J.JURO.2007.03.125>
- Hussein, A., Ozgok, Y., Ross, L., Niederberger, C. (2005). Clomiphene administration for cases of nonobstructive azoospermia: a multicenter study. *Journal of andrology*, 26(6), 787–793. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04180>
- Hussein, A., Ozgok, Y., Ross, L., Rao, P., Niederberger, C. (2013). Optimization of spermatogenesis-regulating hormones in patients with non-obstructive azoospermia and its impact on sperm retrieval: a multicentre study. *BJU international*, 111(3 Pt B), E110–E114. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11485.x>
- Jarow, J. P., Espeland, M. A., Lipshultz, L. I. (1989). Evaluation of the azoospermic patient. *The Journal of urology*, 142(1), 62–65. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)38662-7](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)38662-7)
- Kadioğlu, A., Tefekli, A., Cayan, S., Kandirali, E., Erdemir, F., Tellaloğlu, S. (2001). Microsurgical inguinal varicocele repair in azoospermic men. *Urology*, 57(2), 328–333. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(00\)00908-0](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(00)00908-0)
- Karav, S., German, J. B., Rouquié, C., Le Parc, A., Barile, D. (2017). Studying Lactoferrin N-Glycosylation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS18040870>
- Kim, E. D., Leibman, B. B., Grinblat, D. M., Lipshultz, L. I. (1999). Varicocele repair improves semen parameters in azoospermic men with spermatogenic failure. *Journal of Urology*, 162(3 I), 737–740. <https://doi.org/10.1097/00005392-199909010-00031>
- Koppers, A. J., Reddy, T., O'Bryan, M. K. (2011). The role of cysteine-rich secretory proteins in male fertility. *Asian journal of andrology*, 13(1), 111–117. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.77>
- Kroupová D. (2020). *Automatizace trypsinového štěpení v proteomice*. [Bakalárska práca]. UP Olomouc, Česká republika
- Küpker, W., Schwinger, E., Hiort, O., Ludwig, M., Nikolettos, N., Schlegel, P. N., Diedrich, K. (1999). Genetics of male subfertility: consequences for the clinical work-up. *Human Reproduction*, 14(suppl\_1), 24–37. [https://doi.org/10.1093/HUMREP/14.SUPPL\\_1.24](https://doi.org/10.1093/HUMREP/14.SUPPL_1.24)
- Lundwall, A., Bjartell, A., Olsson, A. Y., Malm, J. (2002). Semenogelin I and II, the predominant human seminal plasma proteins, are also expressed in non-genital tissues. *Molecular human reproduction*, 8(9), 805–810. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.9.805>
- Marmar, J. L., Benoff, S. (2006). Varicoceles. *Journal of Urology*, 175(3), 818–819. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)00831-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)00831-1)
- McGuckin, M. A., Thornton, D. J., Whitsett, J. A. (2015). Mucins and Mucus. *Mucosal Immunology: Fourth Edition*, 1–2, 231–250. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00014-8>
- McLachlan, R. I., Rajpert-De Meyts, E., Hoesi-Hansen, C. E., de Kretser, D. M., Skakkebaek, N. E. (2007). Histological evaluation of the human testis—approaches to optimizing the clinical value of the assessment: Mini Review. *Human Reproduction*, 22(1), 2–16. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEL279>
- Melo, L. M., Teixeira, D. I., Havt, A., da Cunha, R. M., Martins, D. B., Castelletti, C. H., de Souza, P. R., Filho, J. L., Freitas, V. J., Cavada, B. S., et al. (2008). Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. *Molecular reproduction and development*, 75(1), 8–16. <https://doi.org/10.1002/mrd.20757>
- Milardi, D., Grande, G., Vincenzoni, F., Messana, I., Pontecorvi, A., De Marinis, L., Castagnola, M., Marana, R. (2012). Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertility and Sterility*, 97(1), 67-73.e1. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2011.10.013>
- Muminova, Z. E., Strong, T. V., Shaw, D. R. (2004). Characterization of human mesothelin

- transcripts in ovarian and pancreatic cancer. *BMC Cancer*, 4, 19. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-4-19>
- Muniyan, S., Chaturvedi, N. K., Dwyer, J. G., Lagrange, C. A., Chaney, W. G., Lin, M. F. (2013). Human prostatic acid phosphatase: structure, function and regulation. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 10438–10464. <https://doi.org/10.3390/ijms140510438>
- Muttukrishna, S., Yussoff, H., Naidu, M., Barua, J., Arambage, K., Suharjono, H., Sathanandan, M. (2007). Serum anti-Müllerian hormone and inhibin B in disorders of spermatogenesis. *Fertility and sterility*, 88(2), 516–518. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.11.110>
- Newman, D. J. (2002). Cystatin C. *Annals of clinical biochemistry*, 39(2), 89–104. <https://doi.org/10.1258/0004563021901847>
- NexProt. [https://www.nextprot.org/entry/NX\\_P61916/](https://www.nextprot.org/entry/NX_P61916/) (30.4.2022).
- Parks, J. E., Arion, J. W., Foote, R. H. (1987). Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biology of reproduction*, 37(5), 1249–1258. <https://doi.org/10.1095/biolreprod37.5.1249>
- Pérez-Patiño, C., Parrilla, I., Barranco, I., Vergara-Barberán, M., Simó-Alfonso, E. F., Herrero-Martínez, J. M., Rodríguez-Martínez, H., Martínez, E. A., Roca, J. (2018). New In-Depth Analytical Approach of the Porcine Seminal Plasma Proteome Reveals Potential Fertility Biomarkers. *Journal of Proteome Research*, 17(3), 1065–1076. [https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.7B00728/SUPPL\\_FILE/PR7B00728\\_SI\\_002.XLSX](https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.7B00728/SUPPL_FILE/PR7B00728_SI_002.XLSX)
- Pettersson, A., Richiardi, L., Nordenskjold, A., Kaijser, M., Akre, O. (2007). Age at surgery for undescended testis and risk of testicular cancer. *The New England journal of medicine*, 356(18), 1835–1841. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa067588>
- Pilch, B., & Mann, M. (2006). Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biology* 2006 7:5, 7(5), 1–10. <https://doi.org/10.1186/GB-2006-7-5-R40>
- Ron-El, R., Strassburger, D., Friedler, S., Komarovski, D., Bern, O., Soffer, Y., Raziel, A. (1997). Extended sperm preparation: an alternative to testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia. *Human reproduction*, 12(6), 1222–1226. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.6.1222>
- Raman, J. D., Schlegel, P. N. (2003). Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection is successful for the treatment of nonobstructive azoospermia associated with cryptorchidism. *The Journal of urology*, 170, 1287–1290. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000080707.75753.ec>
- Roberts, K. P., Wamstad, J. A., Ensrud, K. M., Hamilton, D. W. (2003). Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein Crisp-1. *Biology of reproduction*, 69(2), 572–581. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.013771>
- Rodríguez-Martínez, H., Kvist, U., Ernerudh, J., Sanz, L., Calvete, J. J. (2011). Seminal plasma proteins: what role do they play?. *American journal of reproductive immunology*, 11–22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01033.x>
- Rolland, A. D., Lavigne, R., Daully, 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 (Oxford, England)*, 28(1), 199–209. <https://doi.org/10.1093/humrep/des360>
- RnD systems. <https://www.rndsystems.com/target/kallikrein-3-psa> (30.4.2022).
- Santin, M. (2010). Soft tissue applications of biocomposites. *Biomedical Composites*, 59–97. <https://doi.org/10.1533/9781845697372.1.59>
- Selman, H. A., Cipollone, G., Stuppia, L., De Santo, M., Sterzik, K., El-Danasouri, I. (2004). Gonadotropin treatment of an azoospermic patient with a Y-chromosome microdeletion. *Fertility and sterility*, 82(1), 218–219. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.11.055>

- Schlegel, P. N. (1999). Testicular sperm extraction: Microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Human Reproduction*, 14(1), 131–135. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/14.1.131>
- Schlegel, P. N. (2004). Causes of azoospermia and their management. *Reproduction, Fertility, and Development*, 16(5), 561–572. <https://doi.org/10.10371/RD03087>
- Shin, D., Lipshultz, L. I., Goldstein, M., Barmé, G. A., Fuchs, E. F., Nagler, H. M., McCallum, S. W., Niederberger, C. S., Schoor, R. A., Brugh, V. M., et al. (2005). Herniorrhaphy with polypropylene mesh causing inguinal vasal obstruction: a preventable cause of obstructive azoospermia. *Annals of Surgery*, 241(4), 553–558. <https://doi.org/10.1097/01.SLA.0000157318.13975.2A>
- Silber, S. J., Nagy, Z., Liu, J., Tournaye, H., Lissens, W., Ferec, C., Liebaers, I., Devroey, P., Van Steirteghem, A. C. (1995). Genetics: The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: The genetic implications for male infertility. *Human Reproduction*, 10(8), 2031–2043. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.HUMREP.A136231>
- Smith, J. F., Walsh, T. J., Turek, P. J. (2008). Ejaculatory Duct Obstruction. *Urologic Clinics of North America*, 35(2), 221–227. <https://doi.org/10.1016/J.UCL.2008.01.011>
- Stillwell, W. (2016). Membrane Biogenesis: Fatty Acids. *An Introduction to Biological Membranes*, 315–329. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63772-7.00014-2>
- Szczykutowicz, J., Kałuża, A., Kaźmierowska-Niemczuk, M., Ferens-Sieczkowska, M. (2019). The potential role of seminal plasma in the fertilization outcomes. 59-97. <https://doi.org/10.1155/2019/5397804>
- Sun, T. T., Chung, C. M., Chan, H. C. (2011). Acrosome reaction in the cumulus oophorus revisited: involvement of a novel sperm-released factor NYD-SP8. *Protein & cell*, 2(2), 92–98. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1022-5>
- Tang, J. (2013). Gastricsin. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 1, 49–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00007-7>
- Töpfer-Petersen, E., Ekhlasi-Hundrieser, M., Kirchoff, C., Leeb, T., Sieme, H. (2005). The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Animal reproduction science*, 89(1-4), 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.018>
- Tortora, J. G., Derrickson, B. (2014). *Introduction to the human body*. 10th edition, Wiley, New York, 640 strán.
- Tsametis, C., Mintziori, G., Iliadou, P. K., Tarlatzis, B. C., Papadimas, I., Goulis, D. G. (2011). Dynamic endocrine test of inhibin B and anti-Müllerian hormone in men with non-obstructive azoospermia. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 27(9), 661–665. <https://doi.org/10.3109/09513590.2010.521267>
- UniProt. <https://www.uniprot.org> (13.5.2022).
- Urbaniak, A., Jablonska, K., Podhorska-Okolow, M., Ugorski, M., & Dziegiel, P. (2018). Prolactin-induced protein (PIP)-characterization and role in breast cancer progression. *American Journal of Cancer Research*, 8(11), 2150. [/pmc/articles/PMC6291655/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/306291655/)
- Visser, A. J., Heyns, C. F. (2003). Testicular function after torsion of the spermatic cord. *BJU International*, 92(3), 200–203. <https://doi.org/10.1046/J.1464-410X.2003.04307.X>
- Warne, D. W., Decosterd, G., Okada, H., Yano, Y., Koide, N., Howles, C. M. (2009). A combined analysis of data to identify predictive factors for spermatogenesis in men with hypogonadotropic hypogonadism treated with recombinant human follicle-stimulating hormone and human chorionic gonadotropin. *Fertility and sterility*, 92(2), 594–604. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.07.1720>
- Yeung, V., Zhang, T. C., Yuan, L., Parekh, M., Cortinas, J. A., Delavogia, E., Hutcheon, A., Guo, X., Ciolino, J. B. (2022). Extracellular Vesicles Secreted by Corneal Myofibroblasts Promote Corneal Epithelial Cell Migration. *International journal of molecular sciences*, 23(6), 3136. <https://doi.org/10.3390/ijms23063136>
- Yin, L., Chung, C. M., Huo, R., Liu, H., Zhou, C., Xu, W., Zhu, H., Zhang, J., Shi, Q., Wong,

et al. (2009). A sperm GPI-anchored protein elicits sperm-cumulus cross-talk leading to the acrosome reaction. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(5), 900–908. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8482-2>

## 8 ZOZNAM SKRATIEK

AA	Kyselina octová
ABC	Hydrogenuhličitan amonný
AcN	Acetonitril
AGR	Gén androgénneho receptora
BCA	Bicinchoninic acid assay; metóda stanovenia kocntrácie proteínov použitím kyseliny bicinchoninovej
BSA	Bovine serin albumin;hovädzí sérový albumín
BSP	Hovädzí proteín semennej plazmy
ECM 1	Proteín extracelulárnej matrix 1
FN1	Fibronektín
Fn-2 proteíny	Proteíny s doménou fibronektínu typu II
FSH	Folikulo-stimulačný hormón
GAG	glukózaminoglykan
GnRH	Hormón uvoľňujúci gonadotropín
hCG	Choriový gonadotropín
HDL	Lipoproteín s vysokou hustotou
HGH	Hypogonadotropný hypogonadizmus
hMG	Menopauzálny gonadotropín
HPLC	High-performance liquid chromatography; vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
IAA	Jódacetamid
ISCI	Intracytoplazmatická spermatická injekcia
LDL	Lipopoteín s nízkou hustotou
LH	Luteinizačný hormón
Lys- C	Lysyl endopeptidáza
microTESE	Mirkochirurgická extrakcia spermií zo semenníkov
MS	Mass spectromerty; hmotnostná spektrometria
NPC	Niemann- Pick C
PKC	Proteín kináza C
rFSH	Ľudský rekombinantný folikulo-stimulačný hormón
RACK1	Receptor aktivovnanej proteínkinázy

SEMG1	Semenogelín 1
SEMG2	Semenogelín 2
SRC	Receptorová tyrozín kináza
SRM assay	Selected reaction monitoring assay; analýza sledujúca vybrané reakcie
TEX101	Proteín exprimovaný semenníkmi 101
UA	močovina



