

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Detekce a lokalizace estrogenových receptorů v samčí
reprodukční soustavě**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Pavlína Pernerová

Program nebo obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: MVDr. Romana Krejčířová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Detekce a lokalizace estrogenových receptorů v samčí reprodukční soustavě" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2022

Pavλίna Pernerová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé práce MVDr. Romaně Krejčířové, Ph.D. a konzultantce RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce a poskytnutí cenných rad.

Detekce a lokalizace estrogenových receptorů v samčí reprodukční soustavě

Souhrn:

Estrogeny představují jednu z hlavních skupin hormonů, které mají schopnost regulovat reprodukční procesy. Ačkoliv jsou považovány především za samičí hormony, mají také velmi důležitou úlohu v samčí reprodukci. Do značné míry řídí spermatogenezi, zrání spermií, jejich kapacitaci, akrozomální reakci a fúzi s oocytem. Účinek estrogenů je zprostředkován vazbou na estrogenové receptory (ERs) v buňkách cílových tkání. V současné době jsou známy 3 typy estrogenových receptorů – ESR1, ESR2 a GPER. Lokalizace těchto receptorů ve spermiích je klíčem k pochopení účinků estrogenů na jejich vývoj, zrání a funkci.

Tato práce byla zaměřena na detekci ERs ve spermiích v různých stádiích posttestikulárního zrání a v tkáni varlat a nadvarlat u dospělých kanců.

V této práci se nám podařilo detekovat ESR1 u ejakulovaných a kapacitovaných kančích spermií na akrozomu, krčku a bičíku. U spermií po akrozomální reakci (AR) pozitivní signál ESR1 na akrozomu zanikl, avšak nově se objevil signál v postakrozomální oblasti, pozitivní detekce na bičíku přetrvávala. Při detekci ESR2 bylo zjištěno nejsilnější značení u ejakulovaných a kapacitovaných spermií na akrozomu, ekvatoriálním segmentu a krčku. U spermií po AR přetrvával intenzivní signál ESR2 pouze na krčku. U epididymálních spermií jsme zaznamenali detekci GPER na hlavičce a bičíku spermie. Dále byl GPER lokalizován na akrozomu, krčku a bičíku u ejakulovaných a kapacitovaných spermií. U spermií po AR byl lokalizován GPER v postakrozomální oblasti, krčku a bičíku, avšak u další zvolené protilátky proti GPER u AR spermií byl zjištěn negativní výsledek. Obecně v detekci byly zaznamenány rozdíly mezi použitými protilátkami, jež jsou zaměřené proti různým epitopům. Ve tkáních varlat a nadvarlat se nepodařilo získat specifické výsledky značení ERs.

V proteinových extraktech ejakulovaných, kapacitovaných a AR spermií byla detekována jedna forma proteinu ESR1 o velikosti 52 kDa. ESR2 byl nalezen ve 3 zkrácených izoformách o molekulových hmotnostech 42 kDa, 35 kDa a 27 kDa. GPER byl detekován ve 4 izoformách o molekulových hmotnostech 80 kDa, 66 kDa, 43 kDa a 25 kDa. GPER byl detekován i v proteinových extraktech epididymálních spermiích, u kterých byly zjištěny 3 izoformy o molekulových hmotnostech 52 kDa, 43 kDa a 29 kDa.

Hypotéza o detekci a lokalizaci ERs v odlišných fázích vývoje spermatických buněk byla potvrzena jen částečně. Některé výsledky se shodují s již publikovanými výsledky. Zásadní význam pro detekci ERs má zvolená metodika a zejména použití vybraných protilátek. Tato problematika není zcela probádaná v souvislosti s vlivem hormonů a endokrinních disruptorů na vývoj a zrání spermií a z tohoto důvodu se jeví velmi perspektivní věnovat se tomuto tématu v budoucnu nadále.

Klíčová slova: estrogenový receptor, varle, nadvarle, spermie, Western blot, imunofluorescenční mikroskopie

Detection and localization of estrogen receptors in the male reproductive system

Summary:

Estrogens are one of the main groups of hormones that have the ability to regulate reproductive processes. Estrogens are primarily considered as female hormones, but they also play a very important role in male reproduction. They are controlling to a large extent spermatogenesis, sperm maturation, their capacitation, acrosome reaction and fusion with the oocyte. The effect of estrogens is mediated by binding to estrogen receptors (ERs) in target tissue cells. Currently, 3 types of estrogen receptors are known - ESR1, ESR2 and GPER. The localization of these receptors in sperm, is a key to understanding the effects of estrogens on their development, maturation and function.

This work was focused on the detection of ERs in sperm at various stages of post-testicular maturation and in testicular and epididymal tissue in adult boars.

In this work, we were able to detect ESR1 on the acrosome, neck and flagellum in ejaculated and capacitated boar sperm. In sperm after the acrosomal response (AR), the positive signal ESR1 on the acrosome disappeared, but a new signal appeared in the postacrosomal part, the positive detection on the flagellum persisted. Detection of ESR2 revealed the strongest staining in ejaculated and capacitated sperm on the acrosome, equatorial segment and neck. In sperm after AR, an intense ESR2 signal persisted only on the neck. In epididymal sperm, we detected GPER detection on the sperm head and flagellum. Furthermore, GPER was located on the acrosome, neck and flagellum in ejaculated and capacitated sperm. In sperm after AR, GPER was localized in the postacrosomal part, neck and flagellum, but another selected anti-GPER antibody in AR sperm was found to be negative. In general, differences have been noted in the detection between the antibodies used, which are focused against different epitopes. Specific test results for ERs could not be obtained in testicular and epididymal tissues.

One 52 kDa form of ESR1 protein was detected in ejaculated, capacitated, and AR sperm protein extracts. ESR2 was found in 3 reduced isoforms with molecular weights of 42 kDa, 35 kDa and 27 kDa. GPER was detected in 4 isoforms with molecular weights of 80 kDa, 66 kDa, 43 kDa and 25 kDa. GPER was also detected in epididymal sperm protein extracts, in which 3 isoforms with molecular weights of 52 kDa, 43 kDa and 29 kDa were found.

The hypothesis of detection and localization of ERs at different stages of sperm cell development was only partially confirmed. Some results match with the already published results. The chosen methodology and especially the use of selected antibodies is of fundamental importance for the detection of ERs. This issue is not fully explored in connection with the influence of hormones and endocrine disruptors on the development and maturation of sperm. For this reason it seems very promising to continue with this topic in the future.

Keywords: estrogen receptor, testis, epididymis, sperm, Western blot, immunofluorescence microscopy

Obsah

1 Úvod	7
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	7
3 Literární rešerše	8
3.1 Spermie	8
3.1.1 Spermatogeneze	8
3.1.2 Morfologie	9
3.1.3 Epididymální maturace spermií	11
3.1.4 Ejakulace.....	12
3.1.5 Kapacitace.....	12
3.1.6 Akrozomální reakce.....	13
3.1.7 Fúze gamet.....	13
3.2 Estrogeny	14
3.2.1 Estrogenové receptory	15
4 Materiál a metodika	22
4.1 Spermie	22
4.1.1 Zpracování vzorků	22
4.1.2 Kapacitace ejakulovaných spermií <i>in vitro</i>	23
4.1.3 Indukce akrozomální reakce u spermií kapacitovaných <i>in vitro</i>	24
4.2 Použité protilátky	24
4.3 Nepřímá imunofluorescence na spermích	25
4.3.1 Vlhká fixace preparátů spermií acetonem na skle	25
4.3.2 Lokalizace ERs ve spermích.....	25
4.4 Kryorezy	26
4.5 Nepřímá imunofluorescence na kryorezech	26
4.5.1 Lokalizace ER ve tkáních	26
4.6 Western blot analýza	27
4.6.1 Příprava proteinových extraktů ze spermií vzorků.....	27
4.6.2 SDS elektroforéza.....	27
4.6.3 Elektropřenos separovaných proteinů na NC membránu	28
4.6.4 Vizualizace separovaných proteinů na NC membráně barvením Ponceau.....	28
4.6.5 Imunodetekce proteinů na NC membráně	29
4.6.6 Odmytí NC membrány pro opakované použití.....	29
5 Výsledky	30
5.1 Lokalizace estrogenových receptorů ve spermích	30
5.1.1 Detekce ESR1 protilátkou ER α (C-311)	31
5.1.2 Detekce ESR1 protilátkou ER α (HC-20).....	34
5.1.3 Detekce ESR2 protilátkou ER β (H-150)	37

5.1.4	Detekce GPER protilátkou GPR30 (H-300).....	40
5.1.5	Detekce GPER protilátkou GPER/GPR30 NLS4271	43
5.2	Lokalizace estrogenových receptorů ve tkáni varlat a nadvarlat.....	49
5.3	Lokalizace estrogenových receptorů v proteinových extraktech ze spermii na NC membránách	50
5.3.1	Detekce ESR1 protilátkou ER α (HC-20).....	51
5.3.2	Detekce ESR2 protilátkou ER β (H-150)	52
5.3.3	Detekce GPER protilátkou GPER/GPR30 NLS4271	53
6	Diskuze	55
7	Závěr	60
	Literatura.....	61
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	69
9	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Vývoj a funkce reprodukční soustavy jsou regulovány pohlavními steroidními hormony. Vědecké studie v průběhu posledních dvou desetiletí prokázaly u samce fyziologický požadavek na estrogen. Estrogeny vznikají v reprodukčním traktu samic a samců aromatizací testosteronu (Hess 2003; Arkoun et al. 2014; Bidlingmaier 2019). U samců je aromatáza aktivní ve varlatech, hlavně v Sertoliho, Leydigových, zárodečných buňkách (Arkoun et al. 2014; Fietz et al. 2014; Bidlingmaier 2019; Cooke & Walker 2022), dále v nadvarlatech a prostatě (Arkoun et al. 2014). Fyziologická hladina estrogenů je nezbytná pro vývoj varlat a produkci spermií, avšak jejich vysoká nebo nízká hladina vede k narušení spermatogeneze (Cooke & Walker 2022). Estrogeny hrají důležitou roli téměř ve všech fyziologických procesech spermií od jejich vzniku v zárodečném epitelu varlat až po oplodnění oocyty spermií ve vejcovodu (Ded et al. 2013).

Estrogenové receptory byly nalezeny v samčím reprodukčním traktu mnoha druhů savců (Hess 2003). Intracelulární receptory ESR1 a ESR2 nacházející se obvykle v jádře nebo cytosolu působí genomicky, to znamená, že mají funkci transkripčních faktorů. Tyto receptory jsou po aktivaci estrogenem schopny řídit transkripci cílových genů (Gunawan et al. 2011; Gunawan et al. 2012; Arkoun et al. 2014; Rago et al. 2014; Dumasia et al. 2016; Bidlingmaier 2019). Transmembránový receptor GPER se nachází v cytoplazmatické membráně a na endoplazmatickém retikulu, kde aktivuje rychlou protein kinázovou kaskádu. Jeho působení je tedy nengenomické (Lecomte et al. 2017, Prossnitz et al. 2007; Kang et al. 2010). Funkce ERs není stále objasněna a je nadále zkoumána. Je však potvrzeno, že ERs mají velmi významný účinek na reprodukční soustavu, a proto se tato práce zabývá detekcí a lokalizací ERs v reprodukčních tkáních a pohlavních buňkách u kance.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Estrogenové receptory jsou nezbytné pro vazbu estrogenů v cílových tkáních. Cílem práce byla detekce a lokalizace estrogenových receptorů ve spermiích a v tkáních varlete a nadvarlete kance.

Cíl práce byl založen na hypotéze, že estrogenové receptory ESR1, ESR2 a GPER budou detekovány v jednotlivých vývojových stádiích spermií a také ve tkáni varlete i nadvarlete.

3 Literární rešerše

3.1 Spermie

3.1.1 Spermatogeneze

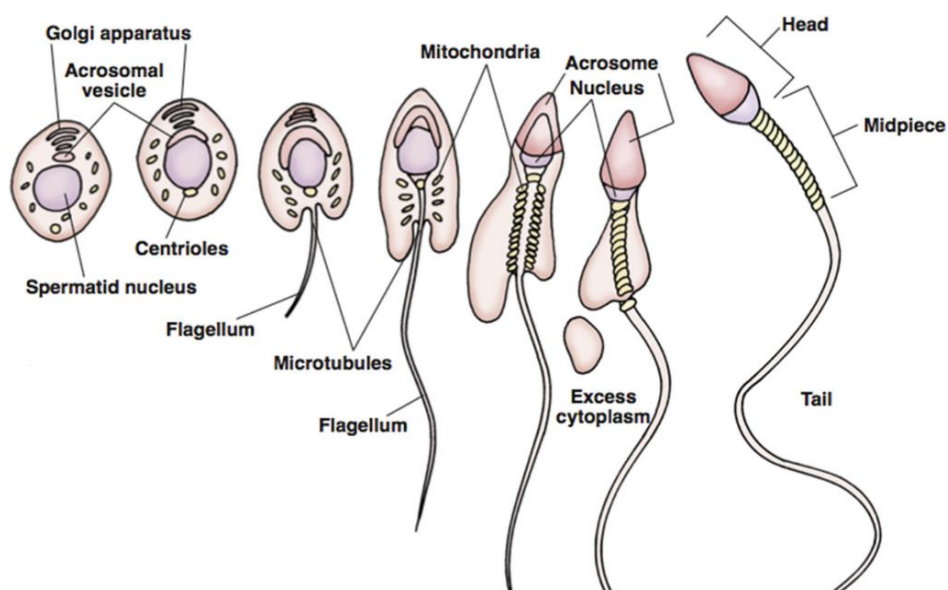
Vývoj spermií je vysoce organizovaný děj, který je zahájen v pubertě a probíhá v zárodečném epitelu semenotvorných stočených kanálků varlat po celý život samce (Weiss 2010; Dumasia et al. 2016; De Sousa et al. 2018; Teves & Roldan 2022).

Tento proces je členěn do dvou na sebe navazujících etap. První z nich je **spermatogeneze**, zahrnující vývoj spermií od spermatogonie po spermatidy (obrázek 2). Druhým obdobím je **spermiogeneze**, při které dochází k přeměně spermatid ve zralé spermie (obrázek 1) (Weiss 2010; Gunawan et al. 2011; Dumasia et al. 2016).

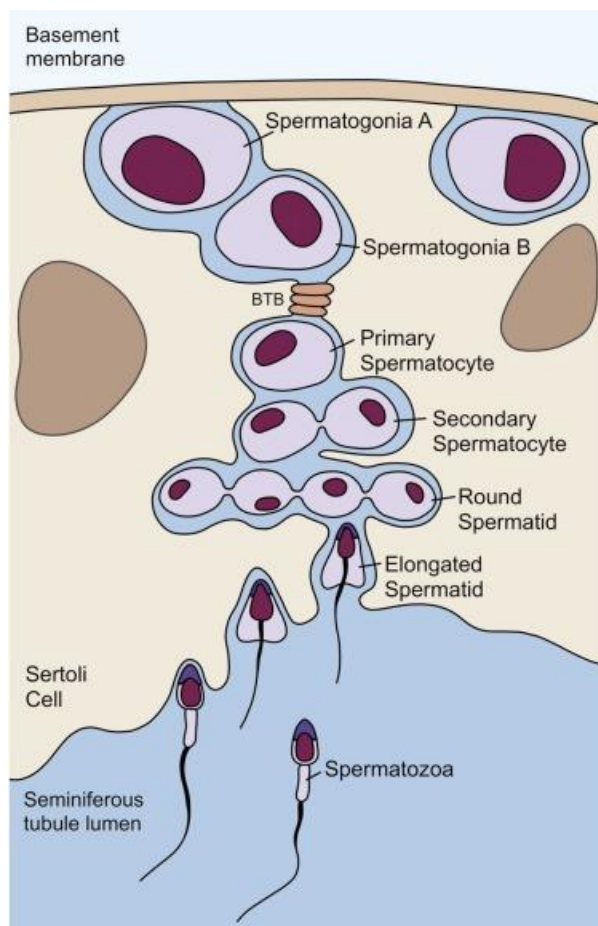
Spermatogonie jsou kulovité diploidní buňky nacházející se u bazální membrány semenotvorných kanálků. Tyto kmenové buňky se mitoticky dělí za vzniku dceřiných buněk spermatogonií A a spermatogonií B. Spermatogonie typu A setrvávají ve stadiu nediferencovaných buněk, spermatogonie typu B se mitoticky dělí a dále diferencují (Rooij 2001; Teves & Roldan 2022).

Ze spermatogonií B vznikají **primární spermatocyty**, které podstupují nejdříve první meiotické dělení za vzniku **sekundárních spermatocytů** s haploidním počtem chromozomů. Následuje druhé meiotické dělení, vznikají spermatidy (Moore & Persaud 2008; Weiss 2010; Teves & Roldan 2022).

Spermatidy se již dále nedělí. Mají jádro s kondenzovaným chromatinem. Procházejí dalším vývojem, který zahrnuje tvorbu akrozomu, bičíku a ztrátu většiny cytoplazmy. Během spermiogeneze se z kulovitých buněk postupně vyvíjejí spermie, které mají hlavičku a bičík spojené krčkem a jsou ze zárodečného epitelu uvolňované do lumen stočených kanálků (Sutovsky & Manandhar 2006; Dumasia et al. 2016; Teves & Roldan 2022).



Obrázek 1 – Vývoj spermie během spermiogeneze (Silber 2018).

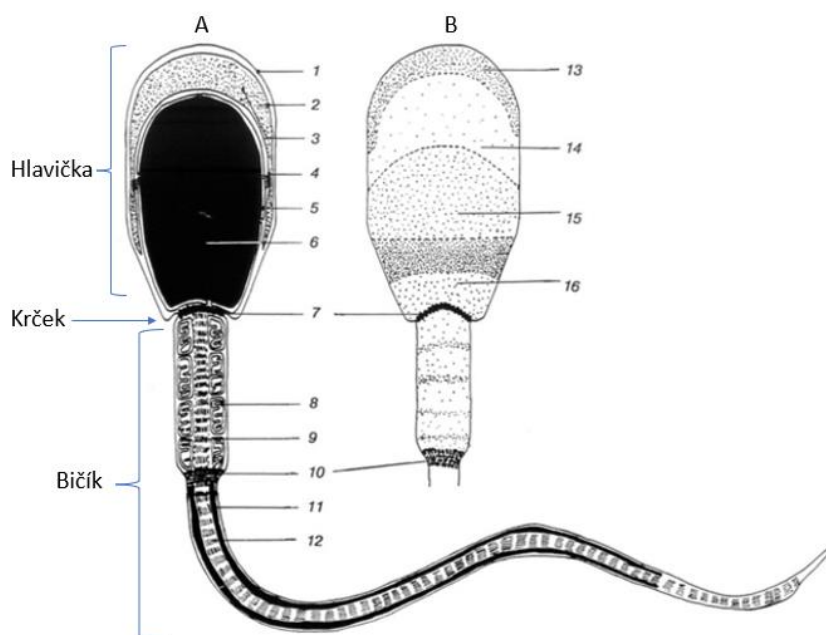


Obrázek 2 – Schematické znázornění spermatogeneze a spermioogeneze u savců (Guerra-Carvalho et al. 2021).

3.1.2 Morfologie

Spermie je složena ze 3 hlavních částí – hlavičky, krčku a bičíku (obrázek 3). Morfologie spermií se značně liší napříč druhy i plemeny (Sousa et al 2013; Hook et al. 2021). Většina savčích spermií jsou relativně jednoduché buňky s kulatými nebo lopatkovitými symetrickými hlavičkami, zatímco spermie hlodavců jsou složitější a u mnoha druhů mají nápadný apikální háček (Hook et al. 2021).

Délka spermie u muže a kance je 50–60 μm , u hřebce, psa a kocoura 60 μm , u kozla 60–70 μm , u berana 70–80 μm , u býka 75–90 μm (Pesch & Bergmann 2006). Teves & Roldan (2022) dokonce uvádí, že celková délka savčích spermií se pohybuje v rozmezí od 30 do 350 μm .



Obrázek 3 – Schématický nákres kančí spermie.

(A) Pohled na spermatickou buňku v řezu. 1 – plasmatická membrána; 2 – vnější akrozomální membrána; 3 – akrozomální enzymová matrice; 4 – vnitřní akrozomální membrána; 5 – jaderný obal; 6 – jádro; 7 – zadní prstenec a krček; 8 – mitochondrie; 9 – proximální část bičíku; 10 – prstenec; 11 – vláknité pouzdro; 12 – axonema + vnější hustá vlákna.

(B) Povrchový pohled na hlavičku spermie a střední část bičíku: 13 – akrozomální čepička; 14 – preekvatoriální oblast; 15 – ekvatoriální oblast; 16 – postekvatoriální oblast (postakrozomální oblast) (Gadella et al 2008).

Hlavička

Hlavička spermie se skládá z akrozomu a jádra, které jsou obklopeny plasmatickou membránou složenou z glykoproteinů a lipidů. Akrozom je pod plasmatickou membránou uložená buněčná organela podoby vaku, zaujímající přední část hlavičky spermie (Vacek 2006). Tvoří ho vnější a vnitřní akrozomální membrána (Toshimori & Ito 2003). Na akrozomu lze odlišit dvě hlavní části, akrozomální čepičku a ekvatoriální segment (Brener et al. 2003). Zadní část hlavičky mimo akrozom se nazývá postakrozomální oblast (Brener et al. 2003; Kierszenbaum et al. 2003). Akrozom obsahuje hydrolytické enzymy umožňující penetraci spermie přes zona pellucida oocyty, především akrosin a hyaluronidázu (Hirohashi & Yanagimachi 2018). Spermie s abnormálními akrozomy mají zhoršenou schopnost pronikat skrz vrstvy oocyty (Saacke 2008).

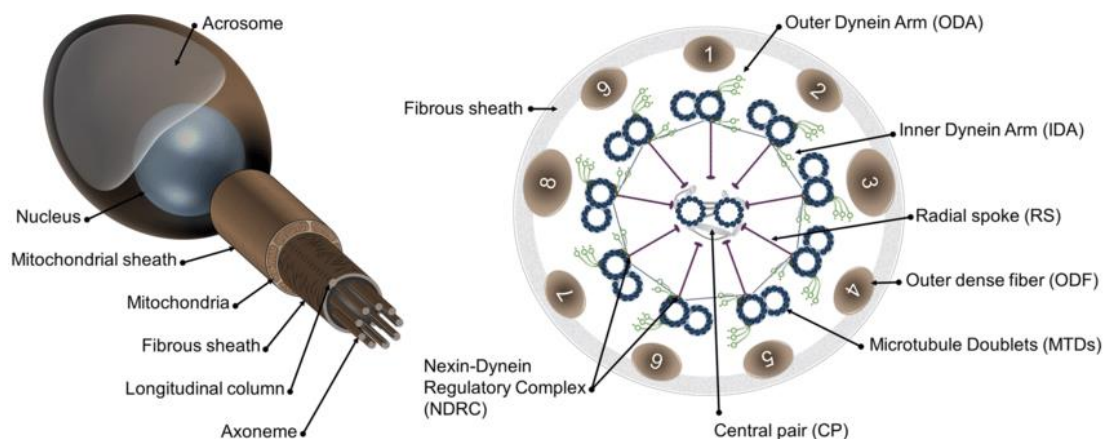
Jádro obsahuje kondenzovaný chromatin s haploidní genetickou výbavou (Pesch & Bergmann 2006). Velikost a tvar hlavičky spermie jsou určeny velikostí a tvarem buněčného jádra a akrozomu. Změny ve velikosti hlavičky spermie odrážejí anomálie v obsahu DNA (Lewis et al. 2003), mohou naznačovat narušenou strukturu chromatinu nebo změny na akrozomu (Pena et al. 2005). Abnormality chromatinu vznikají nejčastěji během spermatogeneze (Andrabi 2007).

Tvar hlavičky ovlivňuje motoriku spermie (Noorafshan & Karbalay-Doust 2010), konkrétně způsob a intenzitu pohybu (Gillies et al. 2009). Malo et al. (2006) uvádí, že spermie s prodlouženými hlavičkami se pohybují rychleji než spermie s hlavičkami zaoblenými. Spermie s vyššími hodnotami elipticity (délka hlavičky/šířka hlavičky) a širší střední částí mají nižší schopnost progresivního pohybu (Gil et al. 2009).

Górski et al. (2018) a Kondracki et al. (2020) uvádí, že tvar a rozměry spermií mohou souviset s jejich koncentrací. U prasečích spermií prokázali, že se zvyšující koncentrací spermií v ejakulátu se velikost hlaviček spermií zvětšovala a jejich tvar byl kulatější.

Bičík

Bičík je nejdelší částí spermie, která zajišťuje její pohyb. Skládá se z krčku spojujícího hlavičku s bičíkem, střední části tvořené mitochondriální pochvou, hlavní části a koncové části. Středem bičíku probíhá osové vlákno axonema, skládající se ze dvou centrálních mikrotubulů a kruhově uspořádaných devíti dvojic mikrotubulů (obrázek 4) (Yanagimachi 1994; Eddy 2006).



Obrázek 4 - Schematické znázornění hlavních struktur bičíku. Pravé schéma znázorňuje příčný řez hlavní částí bičíku ukazující organizaci axonemy (Touré et al. 2021).

3.1.3 Epididymální maturace spermií

Spermie jsou na výstupu z varlete morfologicky kompletní, ale nepohyblivé a neschopné oplodnit oocyt (Dacheux & Dacheux 2014). Po uvolnění ze semenotvorného epitelu varlat postupují systémem vývodných kanálků varlete do nadvarlete, a teprve v nadvarletí funkčně dozrávají. Zde spermie podstupují řadu biochemických změn (Gunawan et al. 2011; Gunawan et al. 2012; Menad et al. 2020). Jedná se především o zabudování cholesterolu a proteinů do plazmatické membrány, čímž se spermie stává odolnou proti indukci předčasné akrozomální reakce. Dochází rovněž ke změnám v jádře, akrozomu a bičíku. Tyto procesy jsou regulovány především proteiny sekretovanými varlaty a nadvarlaty. Mnoho z nich se váže na povrch spermií, jiné podporují maturaci (Cornwall 2014; De Sousa et al. 2018). Nadvarletní tekutina obsahuje mimo proteinů i glykoproteiny, enzymy a ionty (Dacheux & Dacheux 2014). Ve vývodu nadvarlete dochází k reabsorpci vody, téměř 80–90 % testikulární tekutiny je reabsorbováno prostřednictvím akvaporinových kanálů (Hess & Cooke 2018).

Zrání spermií v ocasu nadvarlete trvá 1 až 2 týdny (Dacheux & Dacheux 2014; De Sousa et al. 2018). Po maturaci samčí gameta získává schopnost pohybu a migrace v samičím traktu, může podstoupit kapacitaci, vázat se na membránu oocyty a fúzovat s ním (Dacheux & Dacheux 2014).

3.1.4 Ejakulace

Během ejakulace jsou epididymální spermie obohaceny sekrety přídatných pohlavních žláz. Semenná plasma obsahuje dekapacitační faktory, které zabraňují předčasné kapacitaci a akrozomální reakci, zároveň tedy zamezují schopnosti spermiím rozpoznat oocyt. Semenná plasma prodlužuje životnost spermií a látky v ní obsažené podporují schopnost se vázat na epitel vejcovodu. Ejakulované spermie procházející pohlavním traktem samice jsou ve svém postupu zpomaleny mukoidním prostředím a jsou zachycovány řasinkovými epiteliálními buňkami vejcovodu v tzv. rezervoáru. V tomto rezervoáru dochází k zadržení spermií, nejpohyblivější, funkčně a morfologicky intaktní spermie jsou z něj postupně uvolňovány ve vlnách, čímž se snižuje pravděpodobnost polyspermického oplodnění a zároveň prodlužuje životnost spermií do doby, než dojde k ovulaci oocyty. Rezervoár je také místem, kde dochází ke kapacitaci a hyperaktivaci spermií (Hunter 2007; Pereira-Lourenço et al. 2019; Zigo et al. 2020).

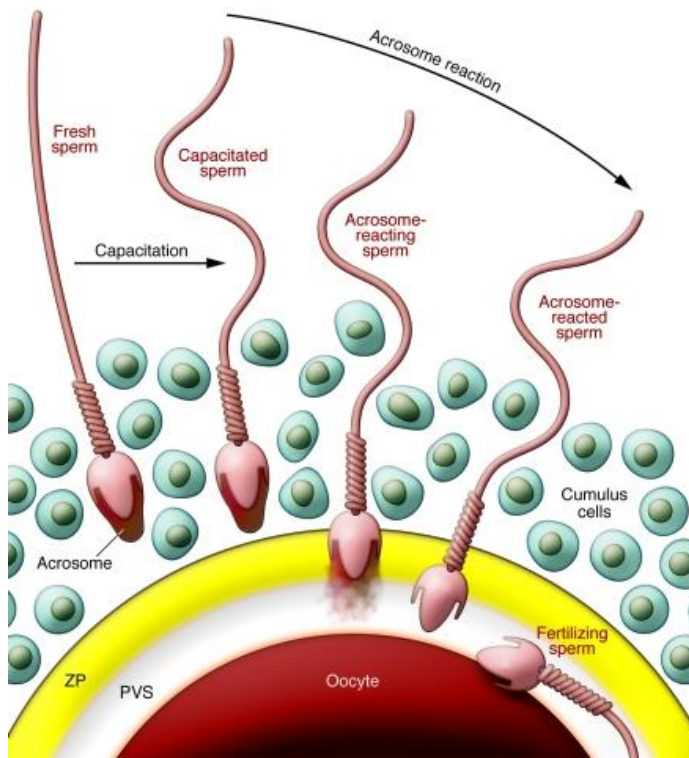
3.1.5 Kapacitace

Aby byla spermie schopná oplodnit oocyt, musí po ejakulaci podstoupit proces kapacitace (Macků & Čech 2002; Sebkova et al. 2012; Ded et al. 2013). Kapacitace zahrnuje řadu fyzikálně chemických změn. Jedná se o molekulární změny na plazmatické membráně, odstranění stabilizačního (ochranného) obalu spermie, změnu metabolismu (zvýšení produkce energie v mitochondriích), zvýšení pH, zvýšení koncentrace intracelulárních iontů vápníku a hydrogenuhličitanů, fosforylaci proteinů, aktivaci systému cAMP/PKA, změnu charakteru pohybu (hyperaktivaci) (Darszon et al. 2006; Ded et al. 2010; Megnagi et al. 2015; Bernecic et al. 2019; Zigo et al. 2020). Lipidy hrají zásadní roli ve strukturní a funkční organizaci plazmatické membrány spermií. Hlavní změny se týkají efluxu cholesterolu, což vede k poklesu poměru cholesterol/fosfolipidy a tím se zvyšuje fluidita membrány. Tyto lipidové a proteinové modifikace na membráně se pravděpodobně podílejí na expresi signálních drah. Zapojené signální dráhy mají za následek kaskádovou tvorbu fosforylací proteinů řízených několika kinázami (Travert et al. 2009; Sebkova et al. 2012). Kapacitované, hyperaktivované spermie putují za oocyt do místa oplození (horní třetina vejcovodu) (Darszon et al. 2006; Megnagi et al. 2015; Bernecic et al. 2019; Zigo et al. 2020).

Kapacitace může být také provedena *in vitro* pomocí specifických médií, která tento proces podporují (Ded et al. 2010). Kapacitace *in vitro* vyžaduje přítomnost tří klíčových složek: vápníku, hydrogenuhličitanových iontů a bovinního sérového albuminu (BSA) (Darszon et al. 2006).

3.1.6 Akrozomální reakce

Akrozomální reakce je exocytární děj zahájený bezprostředně po primární vazbě spermie na oocyt (Gadella et al. 2001). Nejprve dochází k fúzi plazmatické membrány spermie s vnější akrozomální membránou, po které následuje vylití obsahu akrozomálních enzymů. Tyto enzymy napomáhají k průniku spermie skrz buněčnou vrstvu oocytu cumulus oophorus a přes glykoproteinový obal zona pellucida (obrázek 5) (Gadella et al. 2001; Pesch & Bergmann 2006; Hirohashi & Yanagimachi 2018). Uvolněné hydrolytické enzymy jsou nutné k rozpuštění zony pellucidy při penetraci spermií a umožňují jejich vstup do perivitelinního prostoru. S oocyty splývají pouze spermie se zreagovanými akrozomy (Ikawa et al. 2010). Pokud je však akrozomální reakce zahájena příliš brzy před navázáním na zonu pellucidu, dojde ke ztrátě enzymů a spermie pozbývají schopnost průniku skrz zonu, a tedy nejsou schopné oplodnění (Gadella et al. 2001). Progesteron a zona pellucida spouštějí akrozomální reakci tím, že ovlivňují toky iontů. Dochází k dalšímu zvyšování koncentrace vápenatých iontů, zvýšení pH, ovlivnění metabolismu fosfolipidů, hladin cAMP a fosforylaci proteinů (Gadella et al. 2001; Darszon et al. 2006)



Obrázek 5 - Mechanismus interakce spermie s oocytem. V samčím reprodukčním traktu spermie podléhají kapacitaci, která umožňuje akrozomální reakci. Spermie exocytózou uvolňují svůj akrozomální obsah a pronikají přes zonu pellucidu do perivitelinního prostoru (Ikawa et al. 2010).

3.1.7 Fúze gamet

Oplození neboli fertilizace je proces spojení dvou gamet (oocytu a spermie) (Gadella et al. 2001; Wassarman et al. 2001). Z populace milionů spermií se k oocyту dostanou jen desítky či stovky spermií a pouze jedna spermie dokáže oocyt úspěšně oplodnit (Ded et al. 2013). Před oplozením se ovulovaný oocyt nachází v meiotickém bloku metafáze II buněčného cyklu. Ekvatoriální segment hlavičky spermie těsně přilehá k oocyту a fúzuje s jeho obalem. Po fúzi se uvolňují aktivační faktory, které využívají vnitřní vápníkové signální dráhy ke spuštění reaktivace meiotického cyklu oocytu a aktivaci antipolyspermické obrany oocytu. Tato signální

kaskáda vynutí dokončení meiózy oocyty a vypuzení druhého polárního tělíska. Tyto události podporují vznik prvojader a replikaci zygotické DNA. Mísení chromozomů je obecně považováno za konec oplození a začátek embryonálního vývoje (Gadella et al. 2001; Zigo et al. 2020).

3.2 Estrogeny

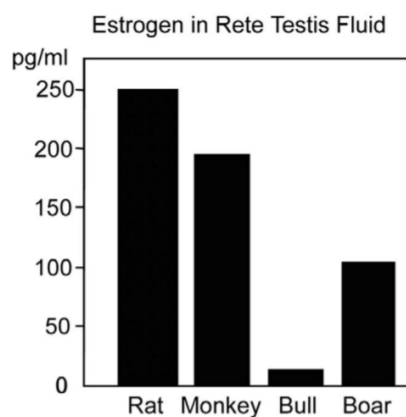
Estrogeny jsou steroidní hormony s pleiotrofními účinky. Jejich nejznámější úlohou je kontrola říjového/menstruačního cyklu u samic/žen (Dostalova et al. 2017). Ačkoli jsou estrogeny především považovány za samičí hormony, mají také důležitou roli v samčím reprodukčním traktu (Gunawan et al. 2012; Bidlingmaier 2019).

Estrogeny vznikají v reprodukční soustavě samic a samců aromatizací testosteronu (Hess 2003; Arkoun et al. 2014; Bidlingmaier 2019). Cytochrom P450 aromatáza neboli estrogen syntáza je enzym, který katalyzuje aromatizaci androgenů za vzniku estrogenů (Hess 2003; Fietz et al. 2014).

U samic syntéza aromatázy probíhá především v granulózních buňkách předovulačních Graafových folikulů, později ve žlutém tělísku a během gravidity také v placentě (Bidlingmaier 2019). Estrogeny jsou nezbytné pro vývoj samičích reprodukčních orgánů a sekundárních pohlavních znaků (Luo & Liu 2020). Během pohlavního cyklu hrají estrogeny klíčovou roli v sekreci luteinizačního hormonu (LH) a folikuly stimulujícího hormonu (FSH) a následně regulaci zrání folikulů. Estrogeny mají také vliv na strukturu endometria a konzistenci hlenu v děložním čípku (Bidlingmaier 2019).

U samců se aromatáza vyskytuje ve varlatech, hlavně v Sertoliho, Leydigových, zárodečných buňkách (Arkoun et al. 2014; Fietz et al. 2014; Bidlingmaier 2019; Cooke & Walker 2022), dále v nadvarlatech a prostatě (Arkoun et al. 2014). Estrogeny hrají důležitou roli téměř ve všech fyziologických procesech spermií od produkce spermií ve varlatech až po oplodnění v vejcovodu (Ded et al. 2013). Uvádí se, že estrogeny se podílí na regulaci motility spermie a jsou nezbytné pro ejakulaci spermií ovlivněním stahů hladkého svalstva nadvarlete (Gunawan et al. 2011).

Je dobře zdokumentováno, že ve varleti jsou přítomny relativně vysoké hladiny estrogenů, které jsou dokonce vyšší než hladiny v krevním séru samic. Například u potkanů se hladina 17β -estradiolu v séru samic potkanů pohybuje mezi 30 a 90 pg/ml (v závislosti na fázi estrálního cyklu), zatímco v tekutině varlete samců je jeho koncentrace 250 pg/ml. Podobně u netěhotných žen se koncentrace 17β -estradiolu v krevní plazmě pohybuje v rozmezí 50 až 400 pg/ml, zatímco ve spermatické žíle samců je jeho koncentrace kolem 1000 pg/ml (Dostalova et al. 2017). Estrogen je přítomen v mimořádně vysoké koncentraci i ve spermatu (Hess 2003, Gunawan et al. 2011).



Obrázek 6 – Průměrné koncentrace estrogenů (pg/ml) ve varleční tekutině u potkana, opice, býka a kance (Hess 2003).

3.2.1 Estrogenové receptory

Účinek estrogenů na cílové buňky je zprostředkován estrogenovými receptory (ERs). V současné době jsou známy tři typy estrogenových receptorů (tabulka 1). ERs jsou zásadní pro vývoj, zrání, kapacitaci a akrozomální reakci spermií. Modulují intracelulární hladinu vápníku. Absence ERs v reprodukčních tkáních má za následek negativní účinky na produkci hormonů, spermatogenezi, koncentraci spermií, motilitu spermií a celkovou plodnost (Siriani et al. 2008; Cooke & Walker 2022).

Estrogenové receptory jsou přítomny ve varlatech, eferentních kanálcích a nadvarletech u většiny druhů (Hess 2003), byly nalezeny v různých buněčných strukturách: v cytosolu, jádru, plazmatické membráně, endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu (Levin 2009).

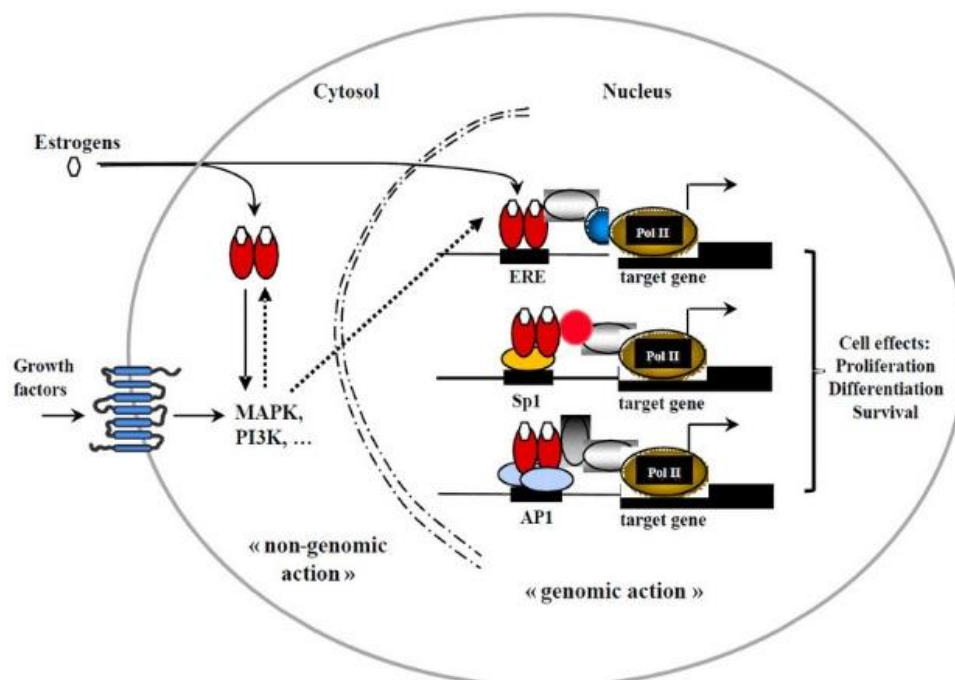
Estrogenová signalizace je komplexní proces, který závisí na buněčném prostředí a přítomnosti receptorů (Dostalova et al. 2017). Estrogenové receptory působí jako transkripční faktory v jádře buňky (obrázek 7). Po navázání hormonu na receptor se receptor spojí s DNA regulující transkripci genu a následně ovlivňuje buněčnou aktivitu (ESR1, ESR2). Avšak receptor GPER působí tak, že indukuje rychlé negenomické dráhy prostřednictvím intracelulárních sekundárních posílů (Gunawan et al. 2011; Gunawan et al. 2012; Arkoun et al. 2014; Rago et al. 2014; Dumasia et al. 2016; Bidlingmaier 2019). Negenomický způsob působení je ve srovnání s genomickým velmi rychlý a trvá několik sekund až minut (Gruber et al. 2002; Heldring et al. 2007; Prossnitz et al. 2007).

Kinetické chování ERs v buňkách umožňuje rychle interagovat s různými proteiny, chromatinem a DNA. ERs se přesouvají na různá místa v buňkách, aby korigovaly aktivaci nebo potlačovaly exprese cílových genů (Kumar et al. 2011.) Estrogenové receptory ESR1 a ESR2 jsou steroidní receptory, které se po navázání ligandu translokují do jádra (Zimmerman et al. 2016). Jsou složeny z odlišných, ale funkčně interagujících domén: N-koncové domény, domény vázající DNA a domény vázající ligand (Zhao et al. 2008; Kumar et al. 2011).

Tabulka 1 – Charakteristika estrogenových receptorů

Receptor	ESR1	ESR 2	GPER
Kategorie	superrodina jaderných receptorů steroidních hormonů	superrodina jaderných receptorů steroidních hormonů	superrodina receptorů spřažených s G proteinem
Umístění	jádro	jádro	membrána
Počet aminokyselin	595	530	375
Počet izoform	3	5	1
Oblast chromozomu	6q25.1	14q23.2	7p22.3
Struktura	DNA – vazebná doména, ligand – vazebná doména, N – terminální doména	DNA – vazebná doména, ligand – vazebná doména, N – terminální doména	7 transmembránových α – helikálních oblastí, 4 extracelulární, 4 cytosolové segmenty
Distribuce ve tkáních	hypotalamus, hippocampus, varlata, nadvarlata, prostata, vaječníky, děloha, ledviny, játra, mléčná žláza, svalová a tuková tkáň	varlata, prostata, vaječníky, močový měchýř, tlusté střevo, nadledviny, slinivka, vaskulární endotel, svalová a tuková tkáň	centrální periferní a nervový systém, varlata, vaječníky, děloha, mléčná žláza, slinivka, játra, nadledviny, hypofýza, kardiovaskulární systém, tuková tkáň

(Luo & Liu 2020)



Obrázek 7 - Mechanismus účinku estrogenových receptorů (Lecomte et al. 2017).

Estradiol (E2) zprostředkovává fenotypové změny v buňkách vazbou na svůj receptor. E2 vstupuje do buňky přes lipidové membrány a váže se na ERs v cytoplazmě nebo v jádře. ERs zprostředkovává E2 účinky prostřednictvím různých transkripčních mechanismů. V jádře aktivovaný ERs tvoří dimer v těsné blízkosti DNA přímo v místech ERE nebo nepřímo v místech Sp1 nebo Ap1. Aktivovaný ERs je schopen řídit kofaktory a RNA polymerázu II, která umožňuje transkripci cílových genů (genomové působení ERs). Kromě toho mohou ERs využívat rychlé negenomické působení prostřednictvím aktivace intracelulárních kináz souvisejících se signalizací růstového faktoru (Lecomte et al. 2017).

Estrogenový receptor 1 (ESR1; ER α)

ESR1 je zapojený do spermatogeneze a spermiogeneze. Podílí se na regulaci zrání spermií (Gunawan et al. 2011). ESR1 zajišťuje kvalitu spermií a plodnost (Lazaros et al. 2010; Safarinejad et al. 2010), naopak ztráta ESR1 je příčinou neplodnosti (Cooke & Walker 2022). ESR1 je pravděpodobně jediným estrogenovým receptorem potřebným pro normální vývoj a funkci samčího reprodukčního traktu (Cooke & Walker 2022).

ESR1 v samčích reprodukčních tkáních

V odborné literatuře jsou často uváděny o lokalizaci ESR1 ve tkáních reprodukčních orgánů samců velmi protichůdné informace. Gunawan et al. (2011) například zjistili, že ESR1 je ve **varlatech** prasat přítomen pouze v cytoplazmě Sertoliho buněk. Receptor ESR1 ve varlatech dospělých kanců prokázali také Rago et al (2004), avšak pouze v zárodečných buňkách. Ve spermatidách a Sertoliho buňkách nebyl tento receptor detekován. Stejní autoři shledali tkáň varlat u tříměsíčních kanečků pro tento receptor jako negativní. ESR1 byl také detekován v Leydigových buňkách varlete u hřebečků před pubertou a u prepubertálních a dospívajících hřebců v Sertoliho buňkách (Arkoun et al. 2014). U mnoha druhů savců byl ESR1 prokázán v Leydigových buňkách a epitelu vývodných kanálků varlat (Carreau & Hess 2010). Přítomnost ESR1 v hlavě **nadvarlete** je vysoce důležitá, protože estrogen hraje klíčovou funkci v reabsorpci tekutiny během transportu spermií z varlete do hlavy nadvarlete. Tato reabsorpce tekutiny je nezbytná pro přežití a zrání spermií během jejich deponování v nadvarlatech (Gunawan et al. 2011; Menad et al. 2020). Předpokládá se, že ESR1 je zodpovědný za regulaci koncentrace spermatu a může se podílet na přežití a motilitě spermií (Rago et al. 2007). Gunawan et al. (2011) identifikovali výrazný signál ESR1 ve vrstvě hladkého svalstva v hlavě, těle i ocasu nadvarlete kance. ESR1 v nadvarletu moduluje sekreci oscilinu, který podporuje zralost a životaschopnost spermií (Gunawan et al. 2011). Přestože byly nalezeny rozdíly v lokalizaci ESR1 v nadvarletu různých druhů savců, jeho přítomnost v epitelu eferentních kanálků se ukázala napříč sledovanými druhy savců jako velmi konstantní (Hess 2003; Hess et al. 2011; Hess & Cooke 2018). Gunawan et al. (2011) a Menad et al. (2020) uvádějí, že v epitelu eferentních kanálků nadvarlete se exprimuje velké množství estrogenových receptorů obecně.

ESR1 ve spermích

Gunawan et al. (2011) a Dostalova et al. (2017) popisují lokalizaci ESR1 v epididymálních a ejakulovaných spermích v postakrozomální oblasti a ve střední části bičíku u lidí a prasat. Lokalizace ESR1 v postakrozomální oblasti implikuje jeho zapojení do procesu oplodnění. Je důležité poznamenat, že v postakrozomální oblasti spermích jsou identifikovány další proteiny, jako je equatorin a oscilin, které se také podílejí na procesu oplodnění. Antalíková et al. (2020) lokalizovali ESR1 u býků v ejakulovaných a kapacitovaných spermích na akrozomu, u akrozomálních spermích byl ESR1 lokalizován v ekvatoriální a postakrozomální oblasti (obrázek 8). Arkoun et al. (2014) zjistili lokalizaci ESR1 u koní především na bičíku ejakulovaných spermích.

Proteinová databáze uvádí molekulovou hmotnost proteinu ESR1 u kance 66 kDa (UniProt 2022a). U kančích ejakulovaných spermích byl detekován protein o molekulové hmotnosti 67 kDa (Rago et al. 2007). Použitím různých protilátek proti ESR1 byl v lidských ejakulovaných spermích detekován protein molekulové hmotnosti 66 kDa a jeho zkrácená varianta 46 kDa (Dostalova et al. 2017). U býčích epididymálních, ejakulovaných, kapacitovaných a AR spermích byly nalezeny dvě izoformy ESR1 70 a 30 kDa (Antalíková et al. 2020). Arkoun et al. (2014) detekovali u hřebčích ejakulovaných spermích protein o hmotnosti 66 kDa.

Estrogenový receptor 2 (ESR2; ER β)

ESR2 je zapojen do procesů od vývoje spermích až po oplodnění oocyty. ESR2 byl u samců některých sledovaných druhů savců lokalizován v zárodečných buňkách, Leydigových a Sertoliho buňkách varlat, nadvarletních epiteliálních buňkách a spermích, což ukazuje na důležitou roli ESR2 v procesu spermatogeneze (Gunawan et al. 2012; Arkoun et al. 2014; Dumasia et al. 2016). ESR2 hraje roli nejspíše v regulaci prvního meiotického dělení nebo ve zvýhodnění vstupu primárních spermatocytů do apoptotické dráhy (Gunawan et al. 2012).

Gunawan et al. (2012) a Dumasia et al. (2016) uvedli, že ESR2 reguluje apoptózu spermích a spermatocytů. Před dosažením pohlavní zralosti podstupuje řada zárodečných buněk fyziologickou apoptotickou smrt, která je řízena velkým počtem genů, včetně genu souvisejícího s ESR2. Nadměrná exprese ESR2 vede k zástavě cyklu vývoje zárodečných buněk nebo apoptóze a následné neplodnosti. V důsledku toho dochází k bloádě růstu zárodečných buněk (Gunawan et al. 2012; Dumasia et al. 2016). Samci postrádající ESR2 jsou však plodní bez významných reprodukčních abnormalit (Antonson et al. 2020).

ESR2 v samčích reprodukčních tkáních

ESR2 byl prokázán ve varlatech, vývodných kanálcích, nadvarlatech a prostatě u většiny zkoumaných druhů savců (Hess 2003; Rago et al. 2004). Ve tkáni **varlat** je převládající variantou estrogenových receptorů (Shaha 2008). Například Carrera et al. (2010) u myši tento receptor detekovali ve varleti v Leydigových a Sertoliho buňkách i spermatocytech. Rago et al. (2004) prokázali pozitivní signál pro ESR2 v Leydigových buňkách a spermatogoniích kanečků ve věku 3 měsíců, u dospělých kanců v zárodečných buňkách semenotvorných kanálků, ale v Leydigových a Sertoliho buňkách ESR2 kanců prokázán nebyl. Gunawan et al. (2012) detekovali ESR2 u kanců v cytoplasmě Leydigových a Sertoliho buněk, slaběji pak v cytoplasmě buněk zárodečných. ESR2 byl lokalizován v hlavě, těle i ocasu **nadvarlete** hřebců (Arkoun et al. 2014) i kanců především v epitelálních buňkách (Gunawan et al. 2012). U býků Pearl et al. (2007) dokladují ESR2 ve všech částech nadvarlete. Stejnou lokalizaci ESR2, tedy ve tkáni hlavy, těla i ocasu nadvarlete uvádí u několika savčích druhů i Hess et al. (2011). ESR2 má výraznou expresi v eferentních kanálcích, podobně jako ESR1. Expres ESR2 se zdá být relativně slabší v hlavě nadvarlete, ale silnější v těle, ocasu a chámovodu (Hess 2003).

ESR2 ve spermích

U myších ejakulovaných spermích byl ESR2 lokalizován na hlavičce spermie (Gunawan et al. 2012). Sebkova et al. (2012) rovněž identifikovali ESR2 na hlavičce myších spermích, konkrétně v akrozomální oblasti. U prasečích ejakulovaných spermích byl ESR2 přítomen v akrozomu (Rago et al. 2007). U býčích spermích byl ESR2 detekován na akrozomu, v ekvatoriální a postakrozomální oblasti, nicméně dle fáze maturace spermích byly pozorovány změny v lokalizaci (obrázek 8) (Antalíková et al. 2020). U hřebčích ejakulovaných spermích byl ESR2 lokalizován na bičíku, autoři udávají toto zjištění do souvislosti s možností modulace motility spermích (Arkoun et al. 2014). U lidských ejakulovaných spermích byl ESR2 rovněž detekován v bičíku spermie (Dostalova et al. 2017).

Podle databáze UniProt (2022b) je vypočtená molekulová hmotnost klasické formy ESR2 59 kDa pro člověka, kance a myš. Aquila et al. (2004) v ejakulovaných spermích člověka udávají molekulovou hmotnost 55 kDa. Lambardovi et al. (2004) se podařilo detekovat dva pruhy o hmotnosti 50 a 60 kDa pouze v kulatých spermatidách člověka, nikoli ve zralých spermích. Obdobně byl protein ESR2 o molekulové hmotnosti 50 a 59 kDa nalezen také v kancích ejakulovaných spermích (Rago et al. 2007). U myši byl detekován protein odpovídající molekulové hmotnosti 64 kDa (Sebkova et al. 2012; Dostalova et al. 2017). U býků se ve spermích (EP, EJ, KAP a AR) našly dvě izofomy ESR2, a to jedna o molekulové hmotnosti 47 kDa a druhá 30 kDa (Antalíková et al. 2020). Arkoun et al. (2014) detekovali protein ESR2 molekulové hmotnosti 61 kDa v ejakulovaných spermích hřebců.

Estrogenový receptor spřažený s G proteinem (GPER, GPR30)

GPER je 7-transmembránový protein, který patří do superrodiny G protein-coupled receptor (GPCR). Nenachází se v plazmatické membráně, ale byl také detekován v membránových organelách jako je endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát (Prossnitz et al. 2007; Dostalova et al. 2017). GPER je kódovaný genem GPER1 (Otto et al. 2009). Strukturálně nesouvisí s klasickými receptory ESR1 a ESR2. Je považován za receptor, který se podílí pouze na negenomickém působení estrogenu bez zapojení transkripčních mechanismů. Estradiol se váže na GPER s vysokou afinitou a zprostředkovává rychlé účinky, včetně aktivace kinázy, mobilizace intracelulárního vápníku a stimulace intracelulárního cAMP (cyklický adenosin monofosfát) (Prossnitz et al. 2007; Kang et al. 2010). Také bylo prokázáno zapojení receptoru GPER do regulace proliferace spermatogonií a apoptózy spermatocytů, spermatid a Sertoliho buněk (Dostalova et al. 2017).

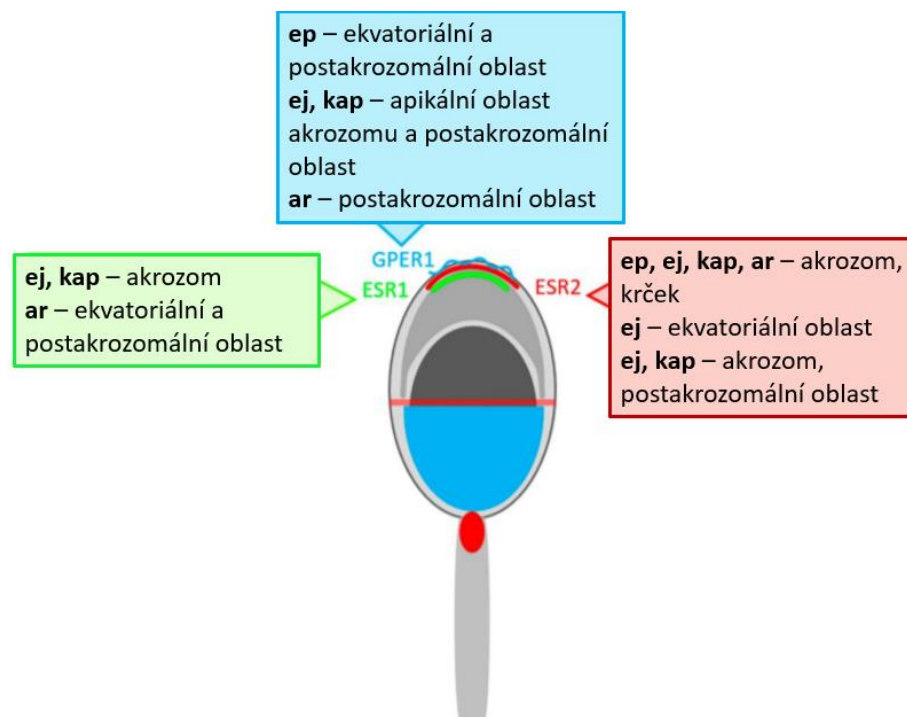
GPER v samčích reprodukčních tkáních

Informace o lokalizaci receptoru GPER ve tkáni reprodukčních orgánů samců nejsou příliš rozsáhlé. Rago et al. (2011) detekovali tento receptor v Leydigových a Sertoliho buňkách **varlat** člověka. Rago et al. (2014) pozitivní značení detekovali v zárodečných buňkách varlat u myši. V práci Krejčířové et al. (2018) byl nalezen GPER ve varletní tkáni kanců v Leydigových buňkách a spermatických buňkách. Také byl lokalizován ve všech částech tkáně **nadvarlat**, což naznačuje, že přítomnost GPER pravděpodobně hraje roli při zrání a deponování spermií do nadvarlete (Krejčířové et al. 2018).

GPER ve spermiích

Rago et al. (2014) identifikovali GPER výhradně ve střední části bičíku lidských ejakulovaných spermií. Přítomnost GPER by z tohoto důvodu mohla znamenat zapojení do estrogenové signalizace související s energetickým stavem spermií, což moduluje hlavní funkční vlastnosti spermií. Pokud jde o kančí spermie, GPER byl identifikován v akrozomální oblasti a ekvatoriálním segmentu, což může souviset se získáním fertilizační schopnosti. Dále byl GPER u kanců prokázán i ve střední části bičíku (Rago et al. 2014). Krejčířová et al. (2018) našli GPER v bičíku epididymálních kančích spermiích ze všech zkoumaných částí nadvarlete. U býků byl GPER lokalizován u ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomálních spermií v postakrozomální oblasti, navíc bylo pozitivní značení detekováno ještě u epididymálních spermií v ekvatoriální oblasti a u ejakulovaných a kapacitovaných spermií na apikální části akrozomu (obrázek 8) (Antalíková et al. 2020). Lokalizace GPER v apikální části akrozomu býčích ejakulovaných spermií naznačuje, že tento receptor se uplatňuje v rychlé signalizaci včetně toků iontů a funkci sekundárních posílů, které vedou ke kinázové aktivitě ovlivňující kapacitaci spermatu a akrozomální reakci. GPER je tedy zřejmě úzce spojen s oběma procesy, podílí se na změnách týkajících se úrovně hladiny vápníku (Rago et al. 2014). U ejakulovaných spermií hřebců byl GPER nalezen v krčku, ve střední části bičíku a hlavičce (Arkoun et al. 2014; Gautier et al. 2016).

Proteinová databáze uvádí molekulovou hmotnost proteinu GPER pro kance 39 kDa (UniProt 2022c). U kančích a lidských ejakulovaných spermii byly detekovány proteiny o velikosti 42 kDa (Rago et al. 2014), u hřebce Arkoun et al. (2014) uvádějí proteiny o molekulové hmotnosti 38 a 41 kDa. Krejčířová et al. (2018) detekovali u kance protein s molekulovou hmotností 42 kDa v extraktech epididymálních spermii pocházejících z hlavy a těla nadvarlete. V extraktu spermii z ocasu nadvarlete byly stanoveny molekulové hmotnostmi 30, 38 a 48 kDa. Antalíková et al. (2020) potvrdili přítomnost receptoru GPER v proteinových extraktech nadvarlete, u ejakulovaných, kapacitovaných a AR spermii u býků v molekulové hmotnosti 18 a 38 kDa.



Obrázek 8 – Grafické schéma lokalizace estrogenových receptorů na spermii býka (Antalíková et al. 2020).

4 Materiál a metodika

4.1 Spermie

Inseminační a nativní dávky pocházely od plemenných kanců z inseminační stanice LIPRA PORK a.s. Skršín. Nativní dávky obsahovaly spermie pouze od jednoho kance, kdežto inseminační dávky mohly být také od jednoho kance nebo obsahovaly směs spermií od dvou až tří kanců – tzv. heterogenní dávky. Nativní ejakulát byl během dopravy uchováván v boxu z polystyrenu, aby nedošlo k přílišným výkyvům teploty vzorků. Spermie byly zpracovány jen s krátkým odstupem po doručení do laboratoře KVD ČZU. Konzervované inseminační dávky byly převáženy a v laboratoři uchovávány v temperovaném boxu při teplotě 17 °C do druhého dne, kdy byly spermie zpracovány.

4.1.1 Zpracování vzorků

Kvalita vzorků, především pohyblivost, morfologie a koncentrace spermií, byla kontrolována mikroskopicky prostřednictvím stolního mikroskopu Nikon Eclipse E200 (Japonsko) při zvětšení 100×.

Získávání epididymálních spermií z nadvarlete

Nadvarletní tkáň pro získání epididymálních spermií pocházela od dospělých kanců miniprasat chovaných v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. v Liběchově.

Nadvarle bylo odděleno od varlete. Bylo rozděleno na 3 části – hlava, tělo a ocas. Pro obnažení kanálků se spermiemi bylo potřeba odstranit povrchovou vazivovou vrstvu. Jednotlivé úseky nadvarlete byly rozstříhány na části velikosti asi 0,5 cm a vloženy do zkumavky s roztokem PBS na buňky (roztok byl připraven rozmícháním 1 tablety v 200 ml destilované vody; Phosphate-buffered saline, Sigma-Aldrich, USA). Zkumavky byly vloženy do termostatu na 37 °C po dobu 30 minut. Došlo tak k vyplavání spermií z kanálků. Hrubé kousky tkáně byly přecezeny přes gázu a jemná tkáň byla odstraněna pomocí centrifugace (NF 400R, Merci, ČR) 5 minut při 50 × g. Supernatant byl přesát do čisté zkumavky a následovala další centrifugace 20 minut při 300 × g pro získání čisté suspenze spermií. Spermie byly dvakrát promyty v roztoku PBS na buňky a odstředovány 10 minut při 250 × g. Takto získané spermie byly použity pro přípravu vzorků spermií fixovaných na sklíčka pro imunofluorescenční mikroskopii a přípravu pelet spermií pro SDS elektroforézu.

Příprava vzorků ejakulovaných spermií

Do 15 ml zkumavky byl napipetován 1 ml suspenze ejakulovaných spermií a k němu bylo přidáno 5 ml roztoku PBS na buňky (Phosphate-buffered saline, Sigma-Aldrich, USA), který byl ohřátý na laboratorní teplotu. Poté byl vzorek jemně promíchán a odstředěn na centrifuze (NF 400R, Merci, ČR) při $300 \times g$ po dobu 10 minut. Z důvodu zachytávání spermií na stěnu zkumavky bylo provedeno odstředění na dvakrát po 5 minutách, po prvním odstředění byla zkumavka otočena o 180° . Následně byly spermie promyty dvakrát roztokem PBS na buňky a odstředěny za stejných podmínek, supernatant byl vždy odstraněn. Získaná peletka spermií byla označena a uložena v mrazáku pro pozdější SDS elektroforézu.

4.1.2 Kapacitace ejakulovaných spermií *in vitro*

Spermie určené ke kapacitaci byly promyty v PBS na buňky. Po odstředění (při $300 \times g$ po 10 minut) byly promyty v Basic Hepes mediu a znovu bylo provedeno odstředění. Po odstranění supernatantu bylo k peletce spermií přidáno kapacitační médium Basic Hepes v množství 10 ml. Kapacitace probíhala v termostatu s 5 % CO_2 při teplotě $38,5^\circ C$ po dobu 3,5 hodiny u nativních vzorků a 1,5 hodiny u inseminačních dávek. Do termostatu byly zkumavky uloženy tak, aby se ke spermiím volně dostal CO_2 . V průběhu kapacitace byla suspenze několikrát lehce promísena. Po kapacitaci byly spermie odstředěny při $300 \times g$ po 10 minutách, supernatant byl odstraněn. Po promytí $2 \times$ v PBS na buňky a odstředění byly peletky uloženy do mrazáku pro později provedenou SDS elektroforézu.

Média určená pro kapacitaci byla připravena z těchto komponent:

Basic Hepes	Kapacitační médium
1 l destilované H_2O	40 ml Basic Hepes
2,383 g Hepes	0,0792 g glukóza
6,6634 g NaCl	0,022 g pyruvát sodný
0,2386 g KCl	0,8 g BSA (bovinní sérum albumin)
0,0408 g NaH_2PO_4	0,00672 g $NaHCO_3$
1,4 ml laktát sodný	0,01176 g $CaCl_2$
0,10018 g $MgCl_2 \times 6H_2O$	
0,0220 g pyruvát sodný	
2,186 g sorbitol	
0,025 ml gentamicin	
0,065 g penicilin	
0,1 g PVA Poly (vinylalkohol)	

4.1.3 Indukce akrozomální reakce u spermií kapacitovaných *in vitro*

K suspenzi kapacitovaných spermií s PBS na buňky o objemu 10 ml bylo přidáno 10 μ l kalcia ionoforu (Sigma Aldrich, USA). Inkubace probíhala 1,5 hodiny v termostatu s 5% CO₂ při 38,5 °C za účelem indukce akrozomální reakce u spermií. Po vyjmutí suspenze z termostatu byly spermie odstředěny při 300 \times g po 10 minut, po odstranění supernatantu byly 2 \times promyty v PBS na buňky a vždy odstředěny, výsledná peleta byla uložena do mrazáku pro pozdější provedení SDS elektroforézy.

4.2 Použité protilátky

K detekci estrogenových receptorů byly použity následující protilátky:

PRIMÁRNÍ PROTILÁTKY

ER α (C-311): sc-787: myší monoklonální protilátka proti aminokyselinám 495–595 bovinního proteinu (Santa Cruz Biotechnology, USA)

ER α (HC-20): sc-543: králičí polyklonální protilátka proti C – konci aminokyselinové sekvence lidského proteinu (Santa Cruz Biotechnology, USA)

ER β (1531): sc-53494: myší monoklonální protilátka proti aminokyselinám 256–505 lidského proteinu (Santa Cruz Biotechnology, USA)

ER β (L-20): sc-6822: kozí polyklonální protilátka proti oblasti v blízkosti C – konce aminokyselinové sekvence lidského proteinu (Santa Cruz Biotechnology, USA)

ER β (H-150): sc-8974: králičí polyklonální protilátka proti aminokyselinám 1–150 lidského proteinu (Santa Cruz Biotechnology, USA)

GPR30 (H-300): sc-134576: králičí polyklonální protilátka proti aminokyselinám 76–375 lidského proteinu (Santa Cruz Biotechnology, USA)

GPER/GPR30 NBP1-31239: králičí polyklonální protilátka proti sekvenci v C – konci lidského GPR30 (Novus Biologicals, USA)

GPER/GPR30 NLS4271: polyklonální králičí protilátka proti peptidu ze 3. extracelulární domény lidského GPER/GPR30 (Novus Biologicals, USA)

SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKY

Imunofluorescence:

Anti – M: kozí proti myším IgG s FITC, Alexa Fluor 488 (GAM 488), Invitrogen, USA

Anti – M: kozí proti myším IgG s Cy5 (GAM Cy5), Invitrogen, USA

Anti – R: kozí proti králičím IgG s FITC, Alexa Fluor 488 (GAR 488), Invitrogen, USA

Anti – R: kozí proti králičím IgG, Alexa Fluor 555 (GAR 555), Invitrogen, USA

Anti – R: kozí proti králičím IgG s Cy5 (GAR Cy5), Invitrogen, USA

Anti – G: oslí proti kozím IgG s FITC, Alexa Fluor 488 (DAG 488), Invitrogen, USA

Western blot:

Anti – M: kozí proti myším IgG s křenovou peroxidázou (anti mouse HRP), Bio-Rad, USA

Anti – R: kozí proti králičím IgG s křenovou peroxidázou (anti rabbit HRP), Bio-Rad, USA

Anti – G: králičí proti kozím IgG s křenovou peroxidázou (anti goat HRP), Bio-Rad, USA

Použité ředění jednotlivých protilátek pro jednotlivé metody je uvedeno v příloze v tabulkách 3,4 a 6.

4.3 Nepřímá imunofluorescence na spermiích

4.3.1 Vlhká fixace preparátů spermií acetonem na skle

Na podložní sklo byly nakresleny hydrofobní fixou (Liquid Blocker, PAP – pen for immunostaining; Sigma-Aldrich, USA) 2 kroužky, do nakreslených kroužků byla napipetována suspenze spermií ředěná v PBS na buňky v množství 20 μ l.

Následně bylo přidáno k suspenzi spermií do obou kroužků 50 μ l vymraženého acetonu. Po inkubaci 5 minut následoval oplach skel PBS na buňky. Sklíčka byla ponechána při laboratorní teplotě do zaschnutí, poté byla uchovávána v lednici při 4°C do dalšího zpracování.

4.3.2 Lokalizace ERs ve spermiích

Sklíčka se spermiemi fixovanými acetonem byla po vyjmutí z lednice lehce omyta PBS a osušena. Poté byla skla přemístěna do vlhké komůrky. Do každého fixou nakresleného kroužku bylo napipetováno 150 μ l SuperBlocku (Thermo Fischer Scientific, USA) pro blokování nespecifických vazeb. Po inkubaci 30 minut následoval oplach PBS a osušení skel. Do levého kroužku byla nanесena zvolená primární protilátka v celkovém množství 100 μ l ředěná v PBS. Primární protilátka se ředila v poměrech 1:10 – 1:100 (v příloze tabulka 3). Do pravého kroužku bylo napipetováno pouze 100 μ l PBS jako negativní kontrola. Inkubace spermií s primární protilátkou probíhala ve vlhké komůrce v lednici při 4°C přes noc.

Druhý den byla sklíčka promyta v roztoku PBS. Po osušení byla do obou kroužků se spermiemi nanесena sekundární protilátka (anti-mouse, anti-rabbit nebo anti-goat) konjugovaná s FITC v objemu 100 μ l v ředění 1:300 v PBS. Sklíčka byla inkubována 30 minut ve tmě ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Po oplachu skel roztokem PBS a osušení skel byl na skla nanесen PNA lektinu (peanut agglutinin) s rhodaminem (červené barvy pro sledování integrity akrozomu; Vector Laboratories, USA) v poměru 1:1000 v PBS do obou kroužků. Po inkubaci 30 minut ve tmě ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě byla skla jemně opláchnuta roztokem PBS a destilovanou vodou. Po osušení skel byla skla zamontována pomocí VestaShieldu DAPI (4',6diamidin-2-fenylindol, modré barvy pro označení jaderné DNA; Vector Laboratories, USA) a překrytím krycím sklem. Vyhodnocení bylo provedeno prostřednictvím imunofluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E600 (Japonsko). Preparáty byly snímány kamerou Nikon Digital Sight DS-Fi1 (Japonsko) a pro analýzu obrazu byl využit počítačový software NIS Elements. Výsledky byly vyhodnoceny prostřednictvím programu Gimp, Microsoft Excel a Microsoft Powerpoint.

4.4 Kryořezy

Preparáty s fixovanými tkáněmi byly připraveny v laboratoři fyziologie a reprodukce Ústavu biochemie a genetiky živočichů Slovenské akademie věd a poskytnuty pro naše použití a provedení metody nepřímé imunofluorescence. Tkáně varlat a nadvarlat, ze kterých byly zhotoveny kryořezy, byly nakrájeny na kostičky o velikosti 1 cm³. Následně byly vloženy do formiček a byly ošetřeny přípravkem TissueTek (OCT Compound for Cryostat Sectioning, Austrálie). Bločky tkání byly uchovávány v tekutém dusíku při teplotě -80 °C. V dalším zpracování byly bločky nakrájeny na přístroji Cryo – cut (Leica, Biocev, Vestec) na tenké řezy tloušťky okolo 5 μm. Každý řez byl natažen a nalepen na vytemperované podložní sklo. Takto připravená skla s řezy byla skladována v mrazáku při teplotě -20 °C do dalšího zpracování. K detekci ERs byly kryořezy fixovány vymraženým acetonem na -20°C po dobu 10 minut.

4.5 Nepřímá imunofluorescence na kryořezech

4.5.1 Lokalizace ER ve tkáních

Skla s fixovanými kryořezy byly vyndány z mrazáku a nechala se vytemperovat. Poté byl proveden oplach PBS. Po oschnutí skel a ohrazení jednotlivých řezů hydrofobní fixou (Liquid Blocker, PAP – pen for immunostaining; Sigma-Aldrich, USA) byl do vytvořených kroužků aplikován SuperBlock (Thermo Fischer Scientific, USA) o objemu 100 μl. Po 30 minutové inkubaci následoval oplach PBS nebo 0,9% NaCl a osušení. Na jednotlivé vzorky tkání byly nanесeny primární protilátky (ERα (C-311): sc-787; ERβ (H-150): sc-8974; GPER/GPR30 NLS4271) ředěné 1:40 – 1:50 v PBS (v příloze tabulka 4) o celkovém objemu 50 μl do každého kroužku. Na preparát určený jako negativní kontrola bylo nanесeno stejné množství PBS. Tkáňové řezy byly inkubovány s primární protilátkou celou noc ve vlhké komůrce v lednici při 4°C. Druhý den byly řezy opláchnuty PBS (nebo 0,9% NaCl) a osušeny. Byla nanесena sekundární protilátka (FITC Alexa Fluor 488, Cy5, TRITC Alexa Fluor 555) ředěná 1:300 – 1:500 v PBS o celkovém objemu 50 μl na jeden kroužek. Inkubace probíhala při laboratorní teplotě 1 hodinu ve tmě ve vlhké komůrce. Následoval oplach PBS (nebo 0,9% NaCl) a destilovanou vodou. Skla byla po osušení zamontována pod krycí skla pomocí VestaShieldu s DAPI. Vyhodnocení bylo provedeno za použití imunofluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E600 (Japonsko). Preparáty byly snímány kamerou Nikon Digital Sight DS-Fi1 (Japonsko) a pro analýzu obrazu byl využit počítačový software NIS Elements.

4.6 Western blot analýza

SDS elektroforéza využívá polyakrylamidového gelu. Gel obsahuje detergent dodecylsírán sodný (SDS), který uděluje proteinům stejný záporný náboj a umožňuje tak separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Molekulová hmotnost separovaných proteinů byla porovnávána s předbarvenými molekulovými standardy Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards nebo Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, USA). Při SDS elektroforéze byla využita aparatura Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad, USA).

4.6.1 Příprava proteinových extraktů ze spermií vzorků

Z mrazáku byly vyndány připravené peletky spermií o objemu cca 50 μ l. Po jejich povolení na ledu k nim bylo přidáno 150 μ l vzorkového neredukujícího pufru. Takto připravená suspenze byla opakovaně po dobu 30 minut střídavě lyzována na ledu a protřepávána. Poté byly vzorky 5 minut povařeny v termobloku CH-100, Heating/Cooling dry Block (Biosan, Litva) při 100 °C a odstředěny na odstředivce 2 minuty při 10 000 \times g a 4 °C. Supernatant byl přepipetován do ependorfeek a bylo k němu přidáno 5 μ l merkaptoethanolu. Vzorky byly opětovně 5 minut povařeny při 100 °C. Takto připravené lyzáty byly použity na SDS elektroforézu.

4.6.2 SDS elektroforéza

Pro separaci extrahovaných proteinů pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu byl požit 12% separační gel a 4% zaostřovací gel.

Složení separačního gelu:

12% separační gel
2,5 ml 1.5 M Tris HCl (pH 8,8) (Bio-Rad, USA)
4 ml 30% akrylamid (Bio-Rad, USA)
3,5 ml destilovaná H ₂ O
100 μ l 10% SDS (dodecylsírán sodný) (P-Lab, ČR)
4,5 μ l TEMED (tetramethylethylendiamin; GE Healthcare, Švédsko)
35 μ l (až 70 μ l) 10% APS (peroxodisírán amonný; Merci, ČR)

Separací gel byl nanesen pomocí pipety mezi skla aparatury ukotvená do sestavy. Gel byl poté převrstven destilovanou vodou. Během 30 minut došlo k polymeraci gelu. Destilovaná voda byla slita. Na separační gel byl nanesen zaostřovací gel následujícího složení:

4% zaostřovací gel
625 μ l 0,5 M Tris HCl (pH 6,8) (Bio-Rad, USA)
325 μ l 30% akrylamid
1,52 ml destilovaná H ₂ O
25 μ l 10% SDS
3,8 μ l TEMED
35 μ l 10% APS

Vzápětí po nalití zaostřovacího gelu byl mezi skla vložen hřeben pro vytvarování jamek k nanesení vzorků. Po 30 minutách polymerace gelu byla sestava skel do nádoby aparatury s elektroforetickým pufrem. Po vyjmutí hřebenu byly do jamek nanесeny vzorky o objemu 12 μ l a standard o objemu 3 μ l pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky. Pořadí nanášek vzorků je uvedeno v příloze v tabulce 5. Elektroforéza probíhala nejdříve asi 30 minut při 80 V, po prostupu vzorků zaostřovacím gelem byla hodnota napětí zvýšena na 140 V po dobu 1 hodiny.

Složení pufru pro elektroforézu:

Elektroforetický pufr

7,5 g TRIS 2-amino-2-(hydroxymethyl) propan-1,3-diol

36 g glycin

2,5 g SDS (dodecyl síran sodný)

0,5 litru destilované vody – zásobní roztok

Pracovní roztok – 200 ml zásobního elektroforetického pufru + 800 ml destilované vody

4.6.3 Elektropřenos separovaných proteinů na NC membránu

Po dokončení SDS elektroforézy byly gely vyjmuty ze skel sestavy. Gel byl vložen do sendviče složeného z porézních houbiček, chromatografických papírů Whatman a nitrocelulózkové (NC) membrány (GE Healthcare Amersham Hybond-ECL, USA). Sendvič byl uzavřen v perforované kazetě a byl vložen do blotovací aparatury (Bio-Rad, USA). Nádoba byla zalita blotovacím pufrem a uzavřena víkem. Elektropřenos probíhal za průběžného chlazení při konstantním proudu 0,5 A a 200 V přibližně 1 hodinu.

Složení pufru pro Western blot:

Western blot pufr

3,03 g TRIS

14,4 g glycin

100 (200) ml metanol

doplnění do 1 litru destilovanou vodou

4.6.4 Vizualizace separovaných proteinů na NC membráně barvením Ponceau

Po zakončení elektropřenosu byl sendvič rozebrán. Membrána byla opláchnuta destilovanou vodou. Pro vizualizaci proteinů na nitrocelulózkové membráně a pro kontrolu účinnosti jejich odpovídajícího přenosu při dostatečné koncentraci v jednotlivých vzorcích bylo provedeno barvení Ponceau S red (0,1% Ponceau S v 5% kyselině octové, Sigma Aldrich, USA) po dobu přibližně 1 minuty. Po kontrole kvality přenosu proteinů byla membrána odbarvena v destilované vodě a poté PBS – T. Následovala blokáce vazebných míst na NC membráně pomocí 5% sušeného mléka (Blocking agent, Bio-rad, USA) v PBS na třepačce po 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po blokáci bylo provedeno 2 \times promytí po 5 minutách v PBS – T.

PBS – fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline) pH 7,2

90 g NaCl

12 g Na₂HPO₄ × 12 H₂O

2 g NaH₂PO₄ × 2 H₂O do 1 litru pro zásobní roztok.

Pracovní roztok: 1 díl PBS do 9 dílů destilované vody.

PBS – T

1 litr PBS

0,5 – 1 ml Tween

5 % mléko

2,5 g sušené mléko

50 ml PBS 1× koncentrované

Membrána byla vložena do kapsičky z parafilmu. Na její lícovou stranu s přenesenými proteiny byla nanášena primární protilátka proti estrogenovému receptoru o objemu 2 ml. Protílátka byla naředěna v poměrech 1:250–1:500 v PBS (v příloze tabulka 6). Pro srovnání nanášek vzorků a kontrolu v nich obsažených proteinů byla na kontrolní membránu (nebo na odmytou membránu již použitou) nanášena protilátka proti α tubulinu v ředění 1:10000 v PBS. Membrána, která sloužila jako negativní kontrola, byla inkubována pouze s PBS. Membrány byly uloženy v lednici přes noc při 4 °C.

Po inkubaci s primární protilátkou byla membrána promývána v PBS – T pro 10 minutách ve 3 opakováních. Poté byla na membránu nanášena sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou v ředění 1:3000 v celkovém objemu 3 ml v PBS. Použité byly sekundární protilátky proti myším, králičím nebo kozím IgG. Inkubace probíhala 1 hodinu na rotační třepačce. Poté byl proveden oplach 4× v PBS – T po 5 minutách a 2 × v PBS také v intervalu 5 minut.

4.6.5 Imunodetekce proteinů na NC membráně

Vizualizace studovaných proteinů byla provedena pomocí metody chemiluminiscence se substrátem SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Fischer Scientific, USA) a přístroje Azure c300 Gel Imaging System (Azure Biosystems, USA). Výsledky detekce byly vyhodnoceny denzitometricky v programu C-Digit Studio (LICOR, USA), Microsoft Excel a STATISTICA.

4.6.6 Odmytí NC membrány pro opakované použití

Po imunodetekci proteinů v přístroji Azure c300 Gel Imaging System (Azure Biosystems, USA) byla membrána odmyta. K odmytí byl použit komerční roztok Western blot stripping Buffer (Thermo Fischer Scientific, USA). Malé množství roztoku bylo nalito na membránu umístěnou v nádobě, po 10 minutách na třepačce byl slit. Membrána byla následně promyta 5 minut v PBS – T a 5 minut v PBS. Poté byla znovu použita nebo byla uchována v mrazáku pro pozdější využití.

5 Výsledky

Byla provedena detekce a lokalizace estrogenových receptorů (ERs) pomocí specifických protilátek (kapitola 4.2) u epididymálních, ejakulovaných a kapacitovaných spermií a spermií po indukci akrozomální reakce (AR) (kapitola 4.1) a ve tkáni varlat a nadvarlat (kapitola 4.4) za využití metody nepřímé imunofluorescenční mikroskopie (kapitola 4.3 pro spermie; kapitola 4.5 pro tkáň). Výsledky získané při imunofluorescenční mikroskopii byly doplněny analýzou proteinových extraktů metodou Western blot (kapitola 4.6).

5.1 Lokalizace estrogenových receptorů ve spermiích

Pro detekci ERs ve spermiích byla zvolena imunofluorescenční mikroskopie (kapitola 4.3) s použitím fixovaných spermií pomocí vymraženého acetonu (kapitola 4.3.1). Výsledky detekce ERs v kančích spermiích jsou uvedeny níže na následujících sériích snímků (obrázky 9 až 24). Obrázky zahrnutí 4 typy snímků: modré značení hlaviček spermií (DAPI) znázorňuje jadernou DNA, zelené značení (FITC) značí pozitivní detekci zkoumaného ERs, červené značení znázorňuje integritu akrozomu a na posledním snímku jsou všechna zmíněná značení sloučena dohromady. Ke všem studovaným vzorkům byly provedeny negativní kontroly (obrázek 25). Dále byly veškeré získané výsledky schématicky znázorněny na obrázku 26 a podrobněji zapracovány do tabulky 2. Rozdíly mezi nativními a inseminačními dávkami spermií nebyly pozorovány. Výsledky uvedené v této práci jsou prezentovány na inseminačních dávkách.

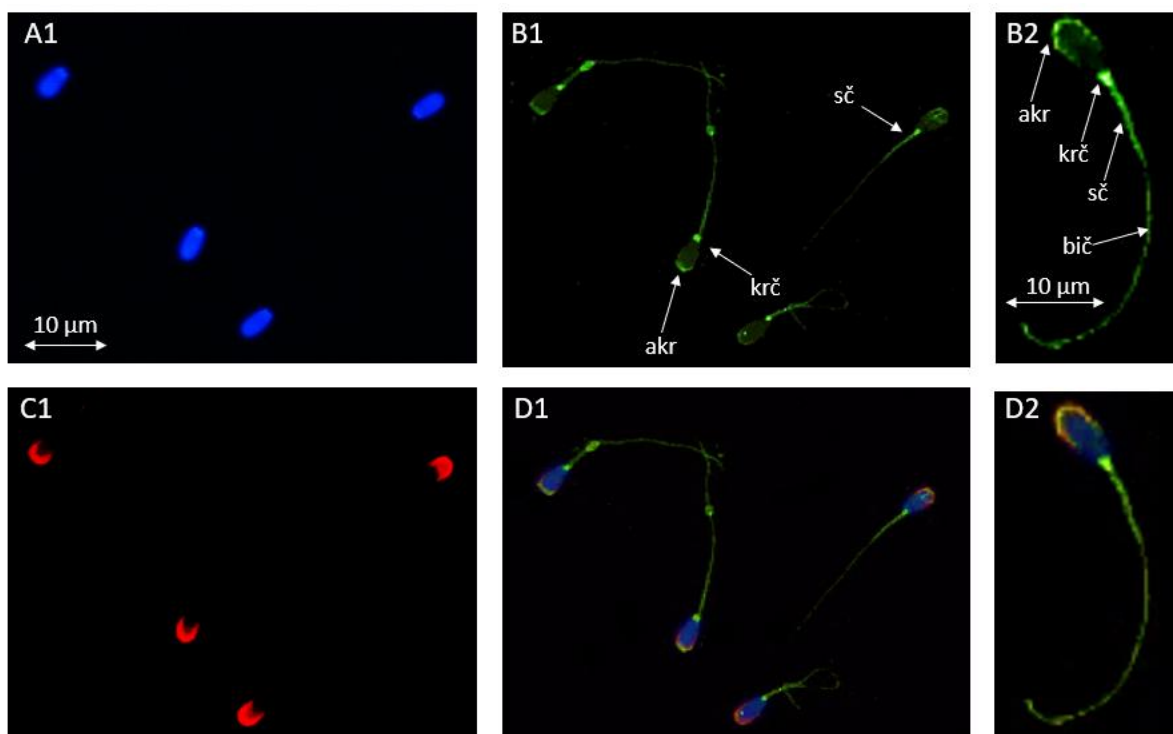
Při zpracování vzorků spermií procesem *in vitro* kapacitace (kapitola 4.1.2) , bylo předpokládáno, že spermie tento proces podstoupily. Kapacitace byla podpořena inkubací v kapacitačním médiu s Hepes. Vzorky, u kterých byla provedena indukce akrozomální reakce (kapitola 4.1.3) byly hodnoceny zároveň s detekcí ERs na spermiích za využití nepřímé imunofluorescence. Sortování buněk bylo provedeno podle přítomnosti a nepřítomnosti akrozomu na základě vazby lektinu PNA na akrozom. U různých vzorků po *in vitro* AR bylo zjištěno různé procento spermií, které tento proces podstoupily. Bylo hodnoceno celkem 200 buněk. U každého prezentovaného vzorku AR je uvedeno v legendě pod obrázkem kolik procent spermií prodělalo akrozomální reakci.

5.1.1 Detekce ESR1 protilátkou ER α (C-311)

K detekci ESR1 byla použita myší monoklonální protilátka ER α (C-311): sc-787 v ředění 1:50 a sekundární protilátka proti myším IgG Alexa Fluor 488 ředěná 1:300. Na obrázcích 9 – 11 je zobrazena detekce ESR1 u EJ, KAP a AR spermií.

Ejakulované spermie

U ejakulovaných spermií (obrázek 9) bylo detekováno pozitivní značení na akrozomu, krčku a střední části bičíku. U individuálních spermií bylo detekováno slabé značení celého bičíku.



Obrázek 9 – Lokalizace ESR1 myší monoklonální protilátkou ER α (C-311) v ejakulovaných spermích.

A1 – modře DAPI (značení jaderné DNA),

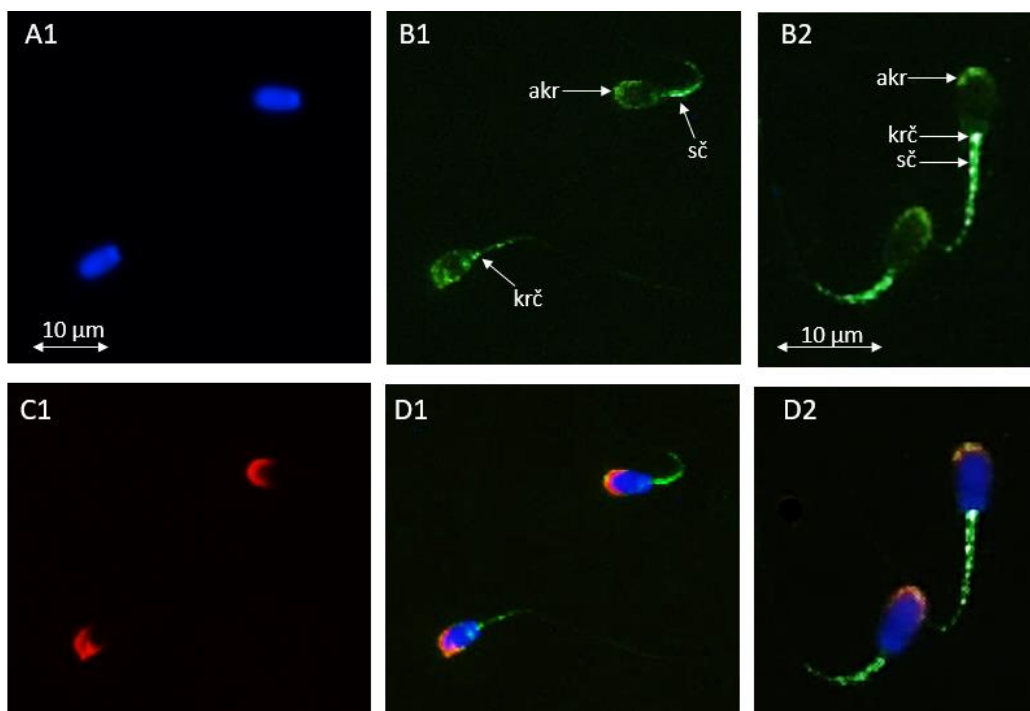
B1,B2 – zeleně FITC pozitivní reakce ESR1 na akrozomu (akr), krčku (krč) a střední části bičíku (sč), individuální spermie slabé značení celého bičíku (bič), snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek B2) jsou viditelné detailní části spermie s detailnějším značením studovaného proteinu,

C1 – červeně PNA (detekce integrity akrozomu),

D1,D2 – proložení snímků DAPI + FITC + PNA, snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek D2) jsou viditelné detailní části spermie.

Kapacitované spermie

U kapacitovaných spermií (obrázek 10) bylo detekováno pozitivní značení na akrozomu, krčku a střední části bičíku, u individuálních spermií bylo detekováno slabé značení celého bičíku, tak jako u EJ spermií (obrázek 9).



Obrázek 10 – Lokalizace ESR1 myši monoklonální protilátkou ERα (C-311) *in vitro* kapacitaci.

A1 – modře DAPI (značení jaderné DNA),

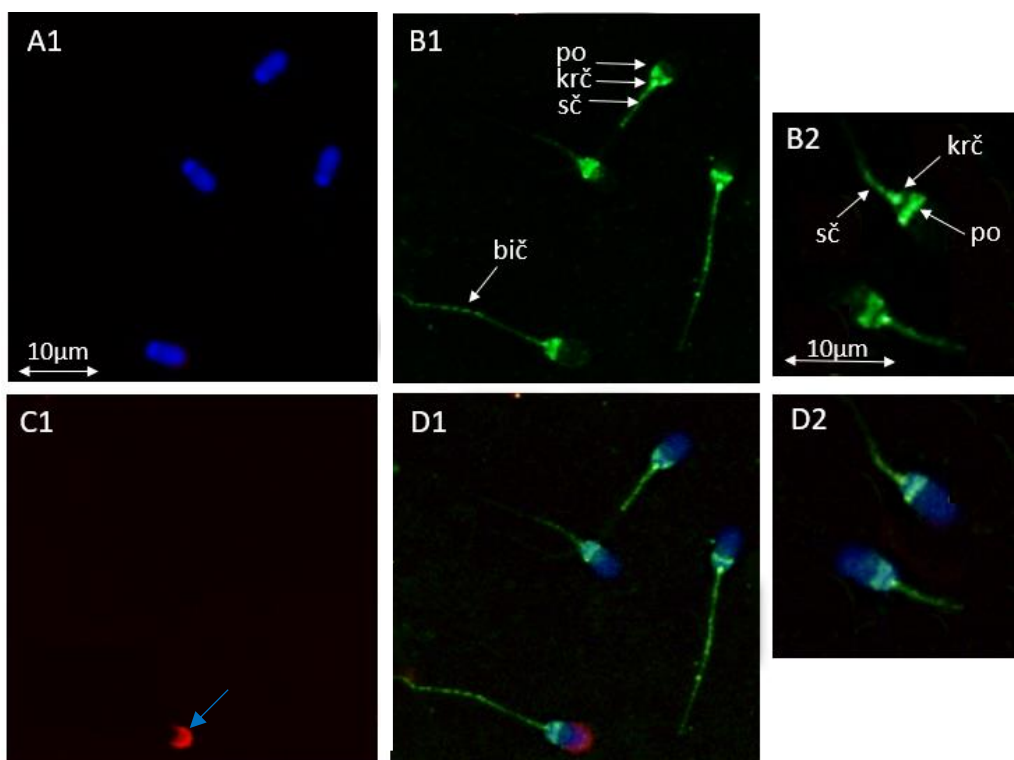
B1, B2 – zeleně FITC pozitivní reakce ESR1 na akrozomu (akr), krčku (krč) a střední části bičíku (sč), individuální spermie slabé značení celého bičíku (na snímku není zobrazeno, silný signál potlačil slabý signál), snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek B2) jsou viditelné detailní části spermie s detailnějším značením studovaného proteinu,

C1 – červeně PNA (detekce integrity akrozomu),

D1, D2 – proložení snímků DAPI + FITC + PNA, snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek D2) jsou viditelné detailní části spermie.

Spermie po akrozomální reakci

U spermií, které prošly AR (obrázek 11) byla pozorována změna v lokalizaci ESR1 v porovnání s EJ a KAP spermii (obrázek 9 a 10). U AR spermií byl ztracen pozitivní signál na akrozomu, naopak se objevil v postakrozomální oblasti. Signál v krčku, střední části a leckdy v celém bičíku zůstal zachován.



Obrázek 11 – Lokalizace ESR1 myši monoklonální protilátkou ER α (C-311): sc-787 ve spermii po *in vitro* akrozomální reakci

A1 – modře DAPI (značení jaderné DNA),

B1, B2 – zeleně FITC pozitivní reakce ESR1 v postakrozomální oblasti (po), krčku (krč) a střední části bičíku (sč), individuální spermie celý bičík (sč), snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek B2) jsou viditelné detailní části spermie s detailnějším značením studovaného proteinu,

C1 – červeně PNA (detekce integrity akrozomu), procento akrozomálně zreagovaných spermií bylo v tomto vzorku 75%, na snímku je pozorována 1 spermie (označená modrou šipkou), u které neproběhla akrozomální reakce, ostatní spermie mají zcela rozpadlé akrozomy, a proto nejsou na snímku pozorovány,

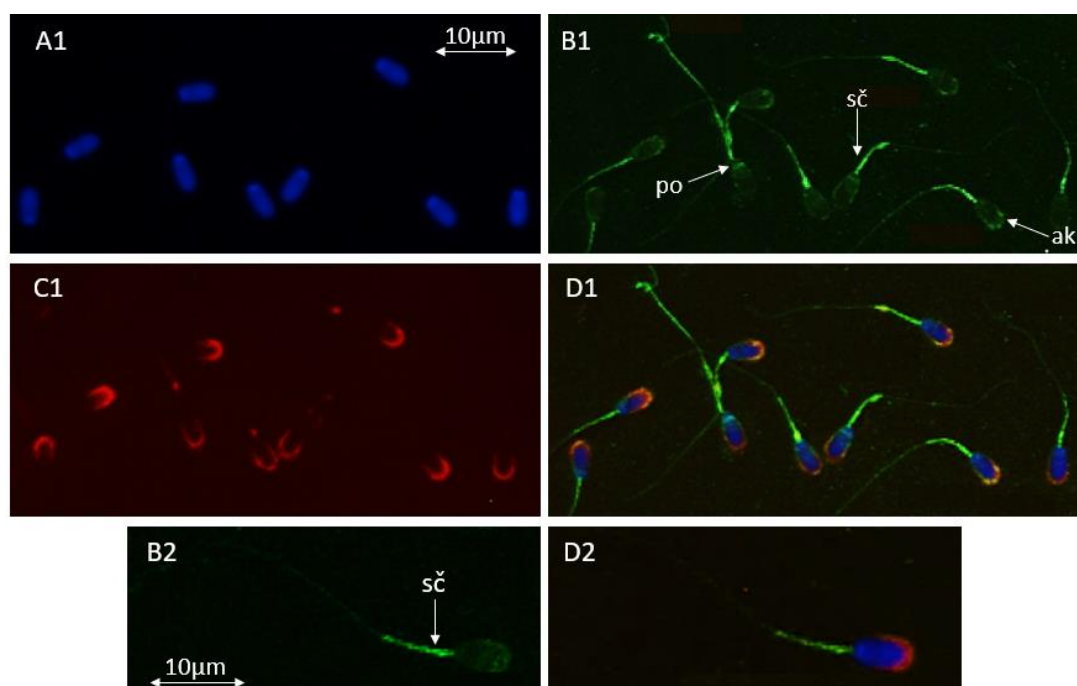
D1, D2 – proložení snímků DAPI + FITC + PNA, snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek D2) jsou viditelné detailní části spermie.

5.1.2 Detekce ESR1 protilátkou ER α (HC-20)

K detekci ESR1 byla vyzkoušena i jiná primární protilátka, a to králíčí polyklonální protilátka ER α (HC-20): sc-543 v ředění 1:50 a sekundární protilátka proti králíčím IgG Alexa Fluor 488 ředěná 1:300. Na obrázcích 12 – 14 jsou znázorněné lokalizace ESR1 u EJ, KAP a AR spermíí.

Ejakulované spermie

U ejakulovaných spermíí byl zjištěn výrazný signál ESR1 ve střední části bičíku, poněkud slabší signály v nízkém zastoupení byly detekované i na akrozomu a v postakrozomální oblasti (obrázek 12).



Obrázek 12 – Lokalizace ESR1 pomocí králíčí polyklonální protilátky ER α (HC-20) v ejakulovaných spermích.

A1 – modře DAPI (značení jaderné DNA),

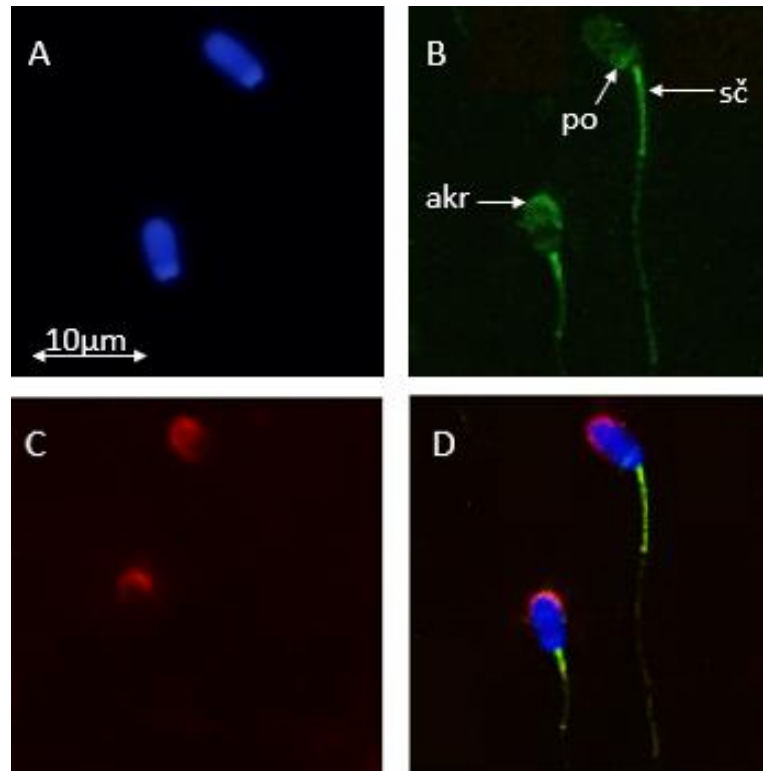
B1, B2 – zeleně FITC pozitivní reakce ESR1 ve střední části bičíku (sč), individuální spermie slabé značení akrozomu (akr) a postakrozomální oblasti (po), snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek B2) jsou viditelné detailní části spermie s detailnějším značením studovaného proteinu,

C1 – červeně PNA (detekce integrity akrozomu),

D1, D2 – proložení snímků DAPI + FITC + PNA, snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek D2) jsou viditelné detailní části spermie.

Kapacitované spermie

U kapacitovaných spermií (obrázek 13) bylo pozorováno totožné značení ESR1 jako u ejakulovaných spermií (obrázek 12), a to ve střední části bičíku, slaběji pak v nižším zastoupení na akrozomu a v postakrozomální oblasti.



Obrázek 13 – Lokalizace ESR1 pomocí králičí polyklonální protilátky ER α (HC-20) ve spermích po *in vitro* kapacitaci.

A – modře DAPI (značení jaderné DNA),

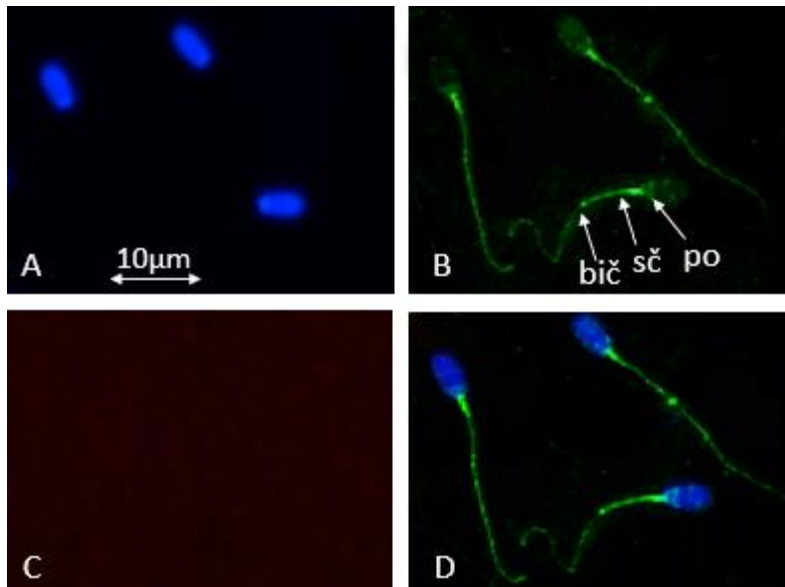
B – zeleně FITC pozitivní reakce ESR1 na střední části bičíku (sč), individuální spermie slabé značení akrozomu (akr), postakrozomální oblasti,

C – červeně PNA (detekce integrity akrozomu),

D – proložení snímků DAPI + FITC + PNA.

Spermie po akrozomální reakci

Spermie po AR (obrázek 14) měly rovněž pozitivní detekci ESR1 ve střední části bičíku a slabé značení v postakrozomální oblasti jako EJ a KAP spermie (obrázek 12 a 13), nicméně vlivem akrozomální reakce slabý signál na akrozomu zmizel. Navíc se však objevil intenzivnější signál v hlavní a koncové části bičíku.



Obrázek 14 – Lokalizace ESR1 pomocí králičí polyklonální protilátky ER α (HC-20) ve spermích po AR.

A – modře DAPI (značení jaderné DNA),

B – zeleně FITC pozitivní reakce ESR1 na střední části bičíku (sč), slabé značení postakrozomální oblasti (po), hlavní a koncové části bičíku (bič), slabý signál na akrozomu zmizel,

C – červeně PNA (detekce integrity akrozomu), akrozomově zreagovaných spermíí bylo 80 %, akrozomy nejsou vidět z důvodu jejich rozpadu po prodělané akrozomální reakci,

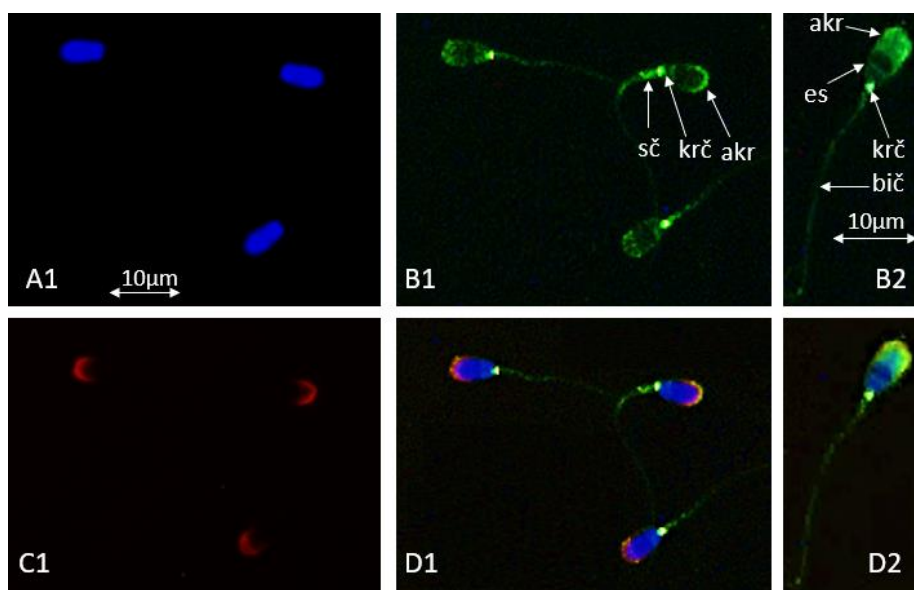
D – proložení snímků DAPI + FITC.

5.1.3 Detekce ESR2 protilátkou ER β (H-150)

K detekci ESR2 byla použita králičí polyklonální protilátka ER β (H-150): sc-8974 v ředění 1:50 a sekundární protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 488 ředěná 1:300. Na obrázcích 15 – 17 je znázorněná detekce GPER u EJ, KAP a AR spermíí.

Ejakulované spermie

Receptor ESR2 byl lokalizován u ejakulovaných spermíí (obrázek 15) na akrozomu, v ekvatoriálním segmentu a krčku. Byly pozorovány individuality ve značení střední části bičíku nebo celého bičíku.



Obrázek 15 – Lokalizace ESR2 pomocí králičí polyklonální protilátky ER β (H-150) v ejakulovaných spermích.

A1 – modře DAPI (značení jaderné DNA),

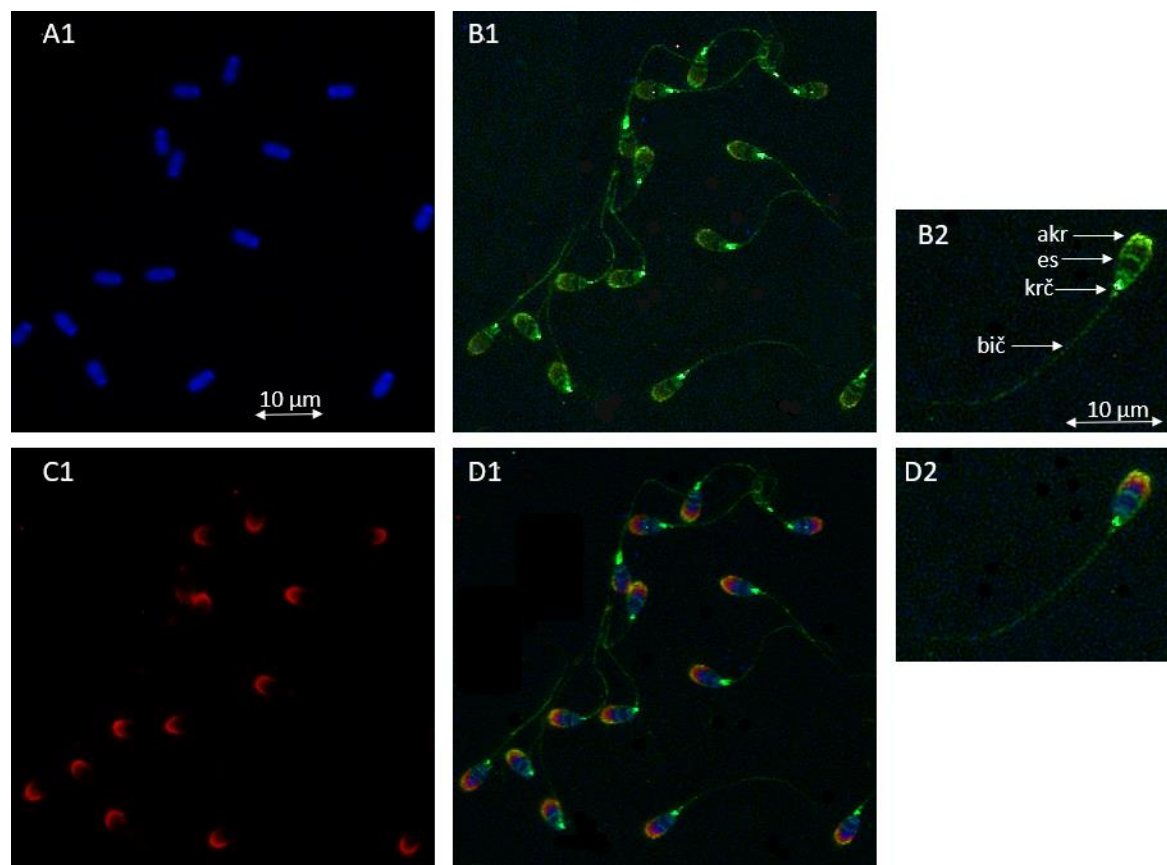
B1, B2 – zeleně FITC pozitivní reakce ESR2 na akrozomu (akr), na ekvatoriálním segmentu (es), krčku (krč), individuální spermie na střední části bičíku (sč) nebo slabé značení na celém bičíku, snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek B2) jsou viditelné detailní části spermie s detailnějším značením studovaného proteinu,

C1 – červeně PNA (detekce integrity akrozomu),

D1, D2 – proložení snímků DAPI + FITC + PNA, snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek D2) jsou viditelné detailní části spermie.

Kapacitované spermie

Receptor ESR2 byl lokalizován u kapacitovaných spermii (obrázek 16) na akrozomu, v ekvatoriálním segmentu a krčku. Individuální značení celého bičíku, které bylo u ejakulovaných spermii ojedinělé, bylo pozorováno téměř u všech kapacitovaných spermii.



Obrázek 16 – Lokalizace ESR2 pomocí králičí polyklonální protilátky ER β (H-150) ve spermii po *in vitro* kapacitaci.

A1 – modře DAPI (značení jaderné DNA),

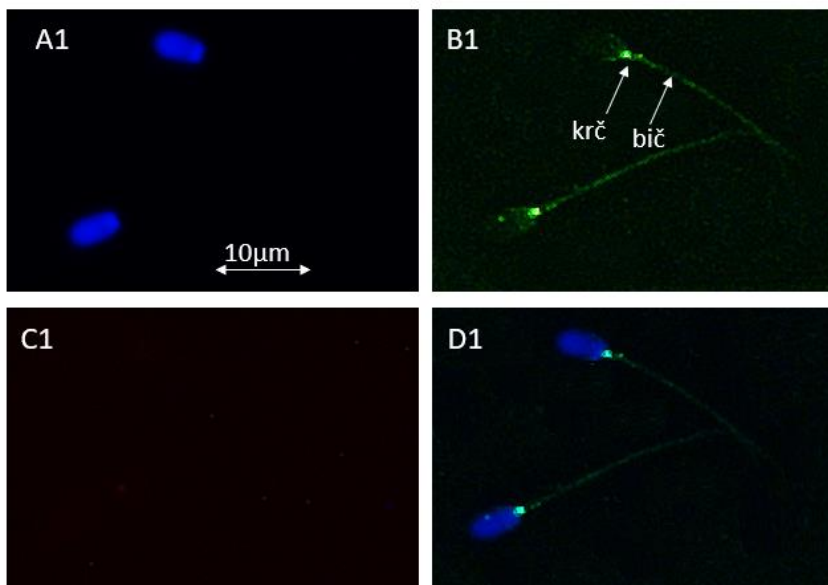
B1, B2 – zeleně FITC pozitivní reakce ESR2 na akrozomu (akr), ekvatoriálním segmentu (es) a krčku (krč), slabé značení bičíku, snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek B2) jsou viditelné detailní části spermie s detailnějším značením studovaného proteinu,

C1 – červeně PNA (detekce integrity akrozomu),

D1, D2 – proložení snímků DAPI + FITC + PNA, snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek D2) jsou viditelné detailní části spermie.

Spermie po akrozomální reakci

Receptor ESR2 byl lokalizován u AR spermií (obrázek 17) v krčku a slabě na celém bičíku. Silný signál na akrozomu u AR spermií zmizel, také zmizel signál v ekvatoriálním segmentu v porovnání s EJ a KAP spermiemi (obrázky 15 a 16).



Obrázek 17 – Lokalizace ESR2 pomocí králičí polyklonální protilátky $ER\beta$ (H-150) ve spermiích po *in vitro* akrozomální reakci.

A – modře DAPI (značení jaderné DNA),

B – zeleně FITC pozitivní reakce ESR2 na krčku a slabě na bičíku,

C – červeně PNA (detekce integrity akrozomu), akrozomově zreagovaných spermií bylo 70 %, spermie nejsou na snímku C1 vidět, důvodem je zcela rozpadlý akrozom po prodělané akrozomální reakci,

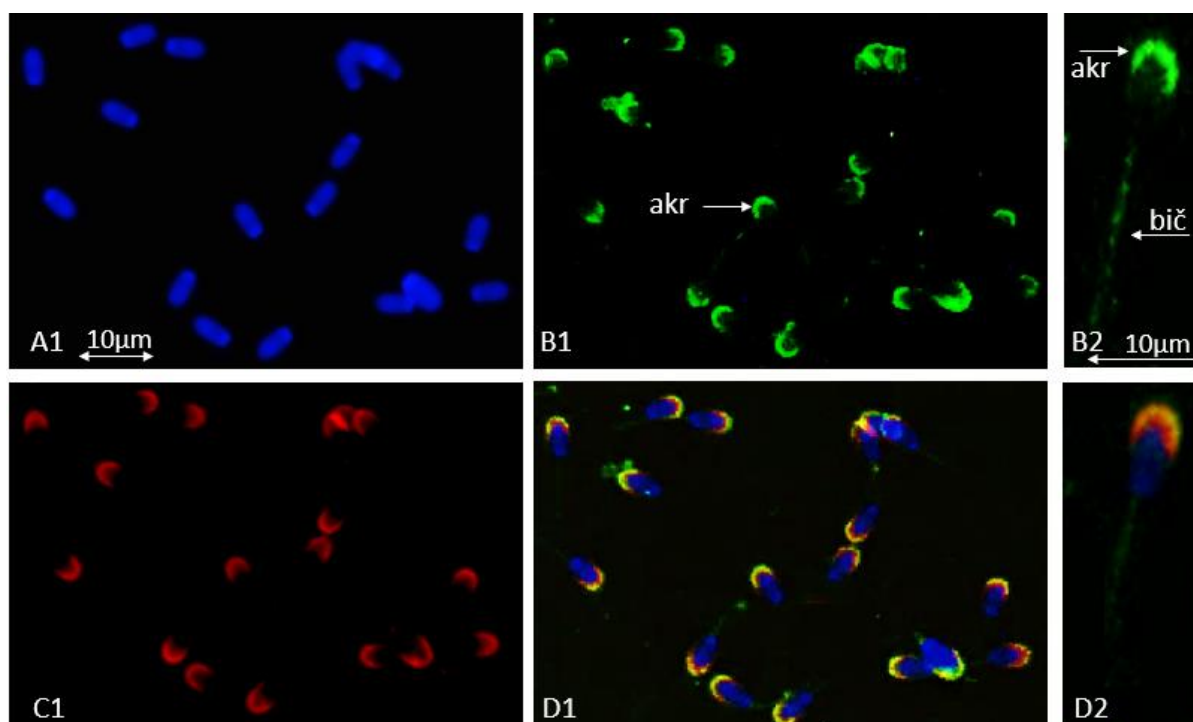
D – proložení snímků DAPI + FITC.

5.1.4 Detekce GPER protilátkou GPR30 (H-300)

K detekci GPER byla použita králičí polyklonální protilátka GPR30 (H-300): sc-134576 v ředění 1:50 a sekundární protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 488 ředěná 1:300. Na obrázcích 18 – 20 je znázorněna detekce GPER u EJ, KAP a AR spermíí.

Ejakulované spermie

Receptor GPER byl u ejakulovaných spermíí (obrázek 18) lokalizován na akrozomu. Také byl lokalizován na bičíku. Na snímcích je slabý signál na bičíku potlačen intenzivním signálem na akrozomu.



Obrázek 18 – Lokalizace GPER pomocí králičí polyklonální protilátky GPR30 (H-300) v ejakulovaných spermích.

A1 – modře DAPI (značení jaderné DNA),

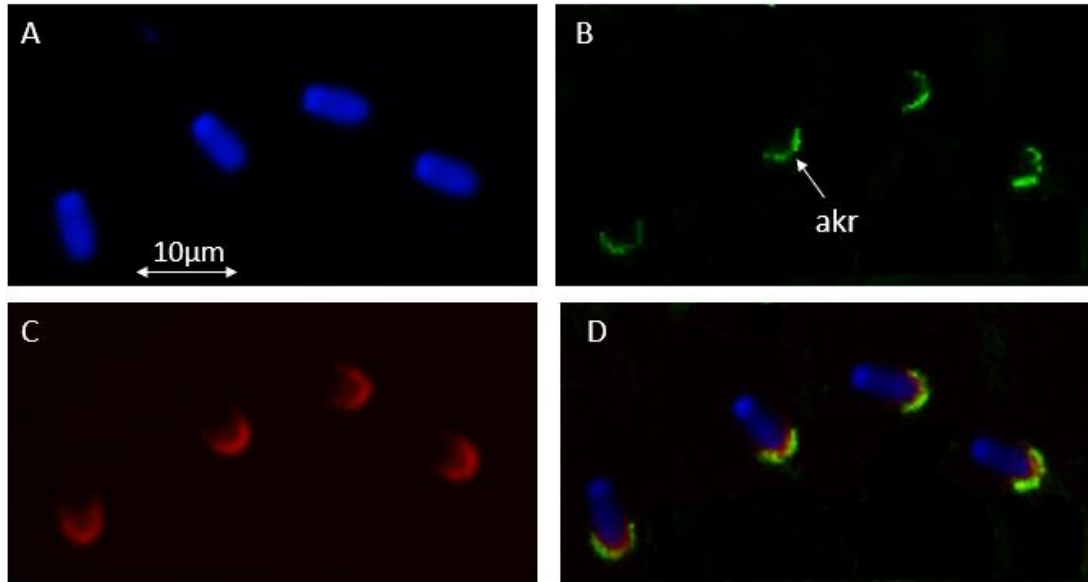
B1, B2 – zeleně FITC pozitivní reakce GPER na akrozomu (akr), slabý signál na bičíku (bič), snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek B2) jsou viditelné detailní části spermie s detailnějším značením studovaného proteinu,

C1 – červeně PNA (detekce integrity akrozomu),

D1, D2 – proložení snímků DAPI + FITC + PNA, snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek D2) jsou viditelné detailní části spermie.

Kapacitované spermie

Receptor GPER u kapacitovaných spermií (obrázek 19) byl shodně lokalizován, tak jako u EJ spermií (obrázek 18), a to na akrozomu a bičíku. Opět je snímcech slabý signál na bičíku potlačen intenzivním signálem na akrozomu.



Obrázek 19 – Lokalizace GPER pomocí králičí polyklonální protilátky GPR30 (H-300) ve spermích po *in vitro* kapacitaci.

A – modře DAPI (značení jaderné DNA),

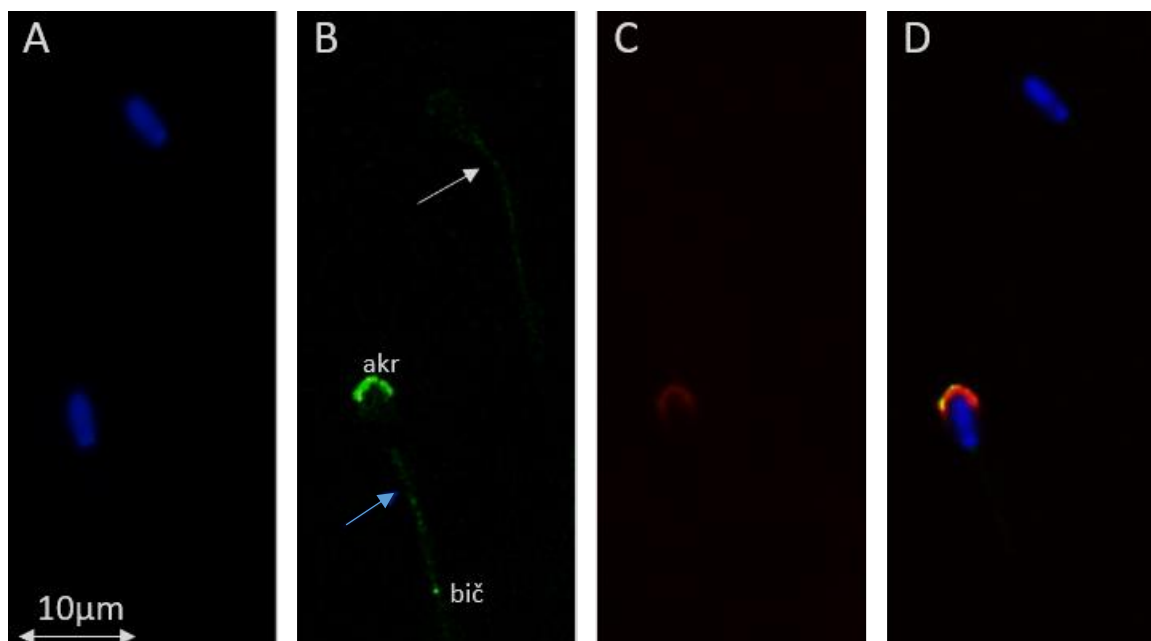
B – zeleně FITC pozitivní reakce GPER na akrozomu (akr), byl pozorován i slabší signál na bičíku, který není na tomto snímku viditelný (silný signál potlačil slabý signál),

C – červeně PNA (detekce integrity akrozomu),

D – proložení snímků DAPI + FITC + PNA.

Spermie po akrozomální reakci

U spermií po AR (obrázek 20) nebylo detekováno žádné značení na rozdíl od EJ a KAP spermií (obrázky 18 a 19) Na snímku B je zachycena spermie (označená bílou šipkou), která podstoupila akrozomální reakci a téměř ztratila pozitivní značení na GPER. Pro srovnání je na stejném snímku zobrazena spermie (označená modrou šipkou), která neprodělala akrozomální reakci a přetrvává u ní pozitivní značení na akrozomu a bičíku.



Obrázek 20 – Lokalizace GPER pomocí králičí polyklonální protilátky GPR30 (H-300) ve spermích po *in vitro* akrozomální reakci.

A – modře DAPI (značení jaderné DNA),

B – zeleně FITC,

C – červeně PNA (detekce integrity akrozomu), procento spermií, které prodělalo akrozomální reakci po *in vitro* inkubaci v tomto vzorku bylo pouze 20%,

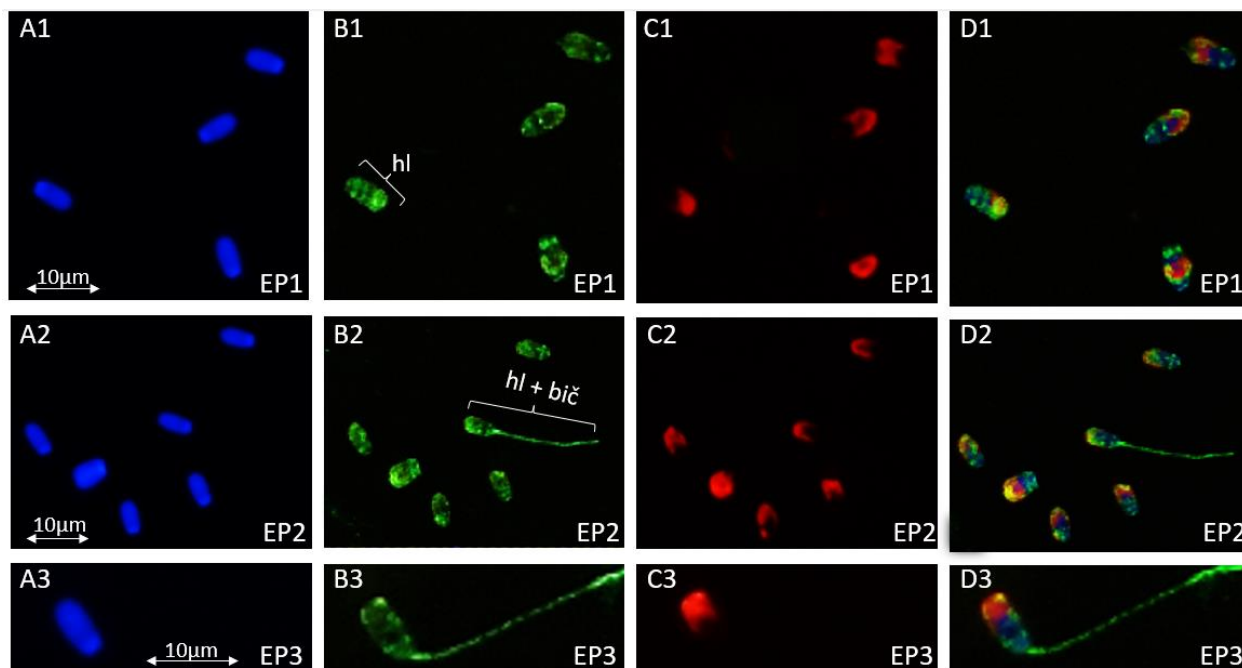
D – proložení snímků DAPI + FITC + PNA.

5.1.5 Detekce GPER protilátkou GPER/GPR30 NLS4271

K detekci GPER byla vyzkoušena i další primární protilátka, a to králičí polyklonální protilátka GPER/GPR30 NLS4271 v ředění 1:50 a sekundární protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 488 ředěná 1:300. Na obrázcích 21 – 24 je znázorněna detekce GPER u EP, EJ, KAP a AR spermií.

Epididymální spermie

Ve spermiích izolovaných z nadvarlete (obrázek 21) bylo zachyceno značení GPER na hlavičce a bičíku. Nejsilnější značení na hlavičce bylo lokalizováno na akrozomu a postakrozomální oblasti. Slabší značení se vyskytovalo v malých okrscích po celé hlavičce a celém bičíku. U spermií z hlavy nadvarlete se vyskytovalo 14 % pozitivních detekcí na celém bičíku. U spermií z těla nadvarlete bylo zjištěno 41 % pozitivních detekcí na bičíku. U spermií z ocasu nadvarlete bylo zjištěno 72 % pozitivních detekcí na bičíku z celkového počtu 200 hodnocených buněk (graf 1).



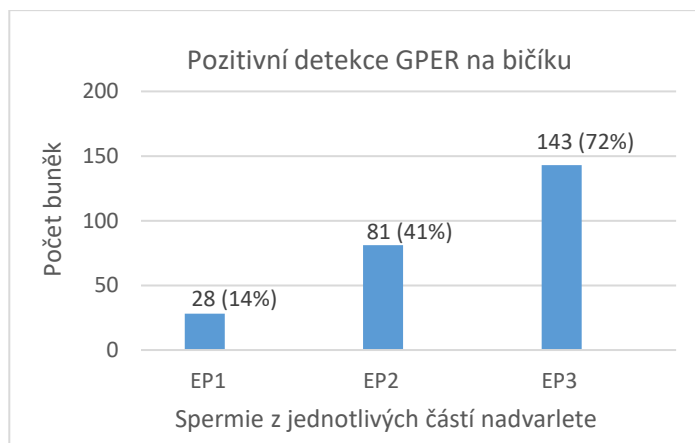
Obrázek 21 – Lokalizace GPER pomocí králičí polyklonální protilátky GPER/GPR30 NLS4271 v epididymálních spermiích. EP1 – spermie z hlavy nadvarlete, EP2 – spermie z těla nadvarlete, EP3 – spermie z ocasu nadvarlete. Zobrazené snímky jsou v různém zvětšení.

A1, A2, A3 – modře DAPI (značení jaderné DNA),

B1, B2, B3 – zeleně FITC pozitivní reakce GPER na hlavičce spermie (hl), od EP1 přes EP2 po EP3 se zvyšoval počet spermií s pozitivní reakcí na bičíku (bič) (graf 1),

C1, C2, C3 – červeně PNA (detekce integrity akrozomu),

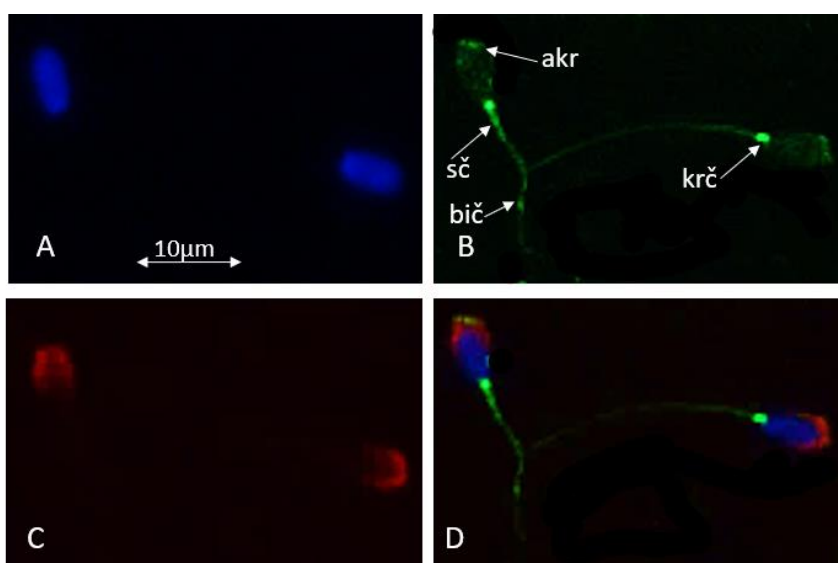
D1, D2, D3 – proložení snímků DAPI + FITC+ PNA.



Graf 1 – Počet buněk s pozitivní detekcí GPER na bičíku. EP1 – spermie z hlavy nadvarlete, EP2 – spermie z těla nadvarlete, EP3 spermie z ocasu nadvarlete.

Ejakulované spermie

U ejakulovaných spermíí (obrázek 22) bylo detekováno GPER se silným signálem na krčku. Dále bylo pozorováno značení na akrozomu ve formě drobných okrsků a ve střední části bičíku. U některých spermíí bylo zaznamenáno pozitivní značení na celém bičíku.



Obrázek 22 – Lokalizace GPER pomocí králičí polyklonální protilátky GPER/GPR30 NLS4271 v ejakulovaných spermíích.

A – modře DAPI (značení jaderné DNA),

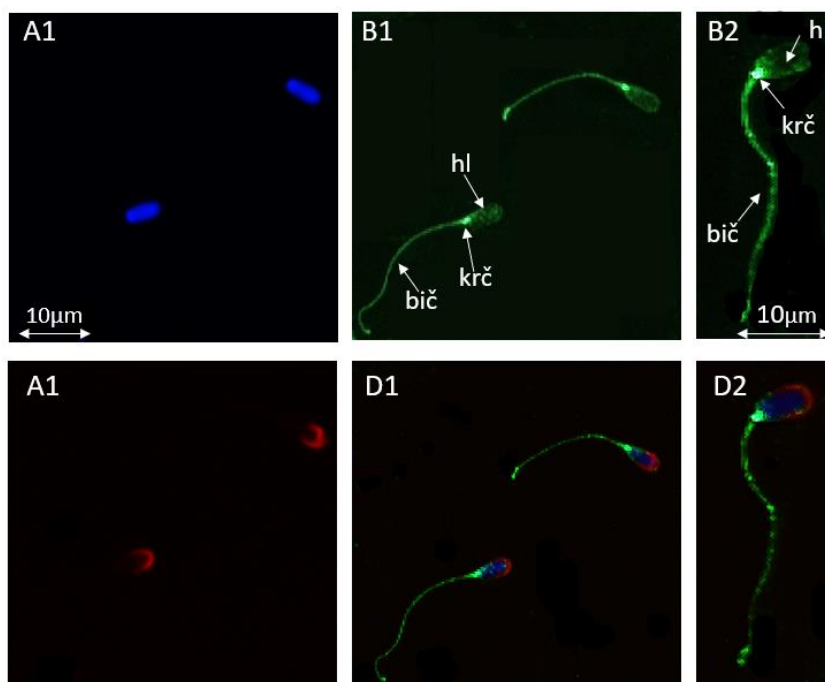
B – zeleně FITC pozitivní reakce GPER na krčku spermie, střední části bičíku, slabé okrsky na akrozomu (akr) a bičíku (bič),

C – červeně PNA (detekce integrity akrozomu),

D – proložení snímků DAPI + FITC+ PNA.

Kapacitované spermie

U kapacitovaných spermíí (obrázek 23) byl GPER detekován na krčku a celém bičíku, slabé značení bylo pozorováno v drobných okrscích na hlavičce.



Obrázek 23 – Lokalizace GPER pomocí králičí polyklonální protilátky GPER/GPR30 NLS4271 ve spermích po *in vitro* kapacitaci.

A1 – modře DAPI (značení jaderné DNA),

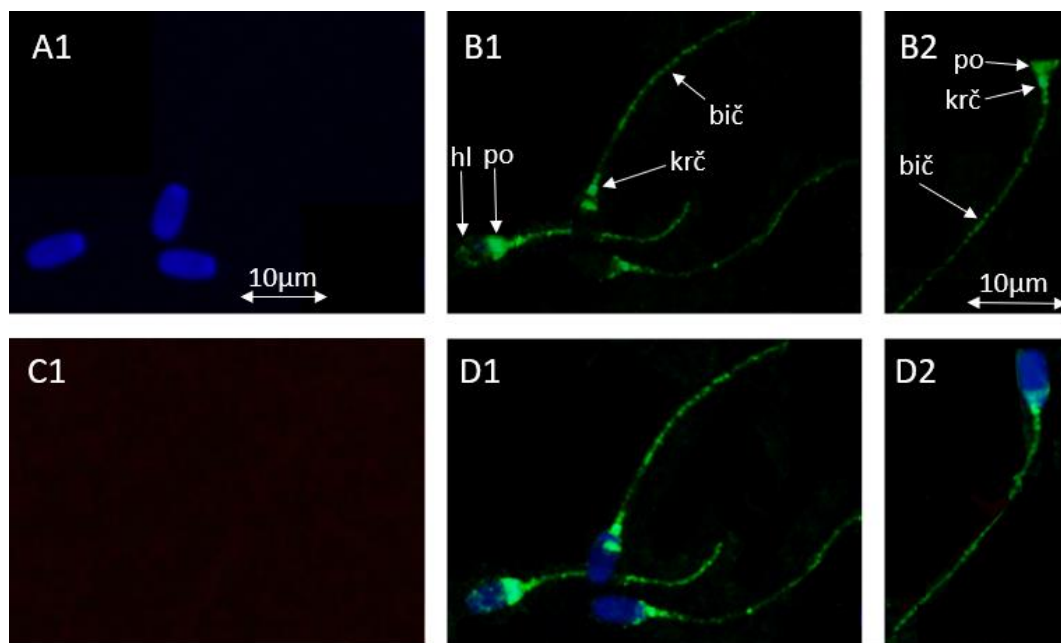
B1, B2 – zeleně FITC pozitivní reakce GPER na krčku (krč) a bičíku (bič), slabé okrsky na hlavičce (hl), snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek B2) jsou viditelné detailní části spermie s detailnějším značením studovaného proteinu,

C1 – červeně PNA (detekce integrity akrozomu),

D1, D2 – proložení snímků DAPI + FITC+ PNA, snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek D2) jsou viditelné detailní části spermie.

Spermie po akrozomální reakci

U AR spermii (obrázek 24) byl pozorován silný signál v postakrozomální oblasti oproti EJ a KAP spermii (obrázky 22 a 23). Okrskové značení na hlavičce, celém krčku a bičíku zůstalo zachováno, tak jak bylo pozorováno u EJ a KAP spermii.



Obrázek 24 – Lokalizace GPER pomocí králičí polyklonální protilátky GPER/GPR30 NLS4271 ve spermii po *in vitro* akrozomální reakci.

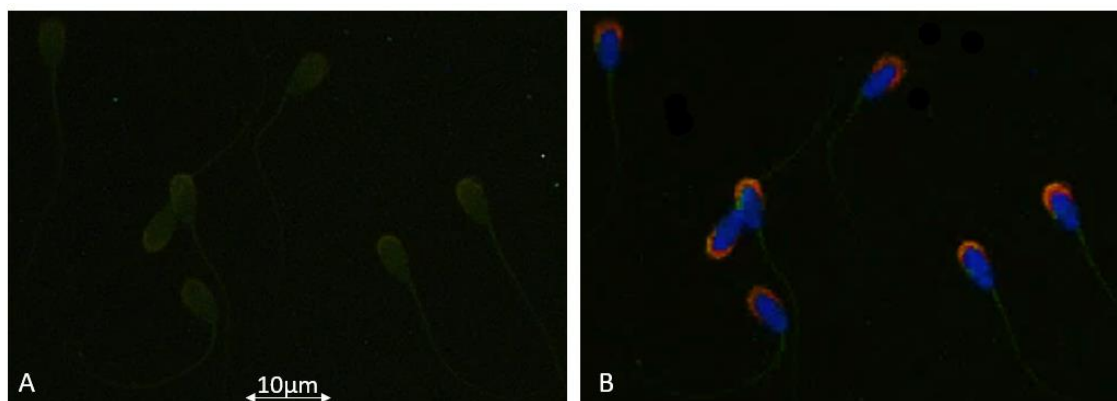
A1 – modře DAPI (značení jaderné DNA),

B1, B2 – zeleně FITC pozitivní reakce GPER v postakrozomální oblasti (po), krčku (krč) a bičíku (bič), slabé okrsky na hlavičce (hl), snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek B2) jsou viditelné detailní části spermie s detailnějším značením studovaného proteinu,

C1 – červeně PNA (detekce integrity akrozomu), procento spermii, které prodělalo akrozomální reakci v tomto vzorku bylo 80%, akrozomy nejsou pozorovány z důvodu jejich rozpadu po akrozomální reakci,

D1, D2 – proložení snímků DAPI + FITC, snímky jsou zobrazeny v odlišném zvětšení, při větším zvětšení (obrázek D2) jsou viditelné detailní části spermie.

U všech studovaných vzorků spermií (EP, EJ, KAP a AR) byla provedena negativní kontrola (obrázek 26), která ve všech pokusech vyšla negativně. Primární protilátka nebyla inkubována. Kontrola byla inkubována pouze se sekundární protilátkou (Alexa Fluor 488).

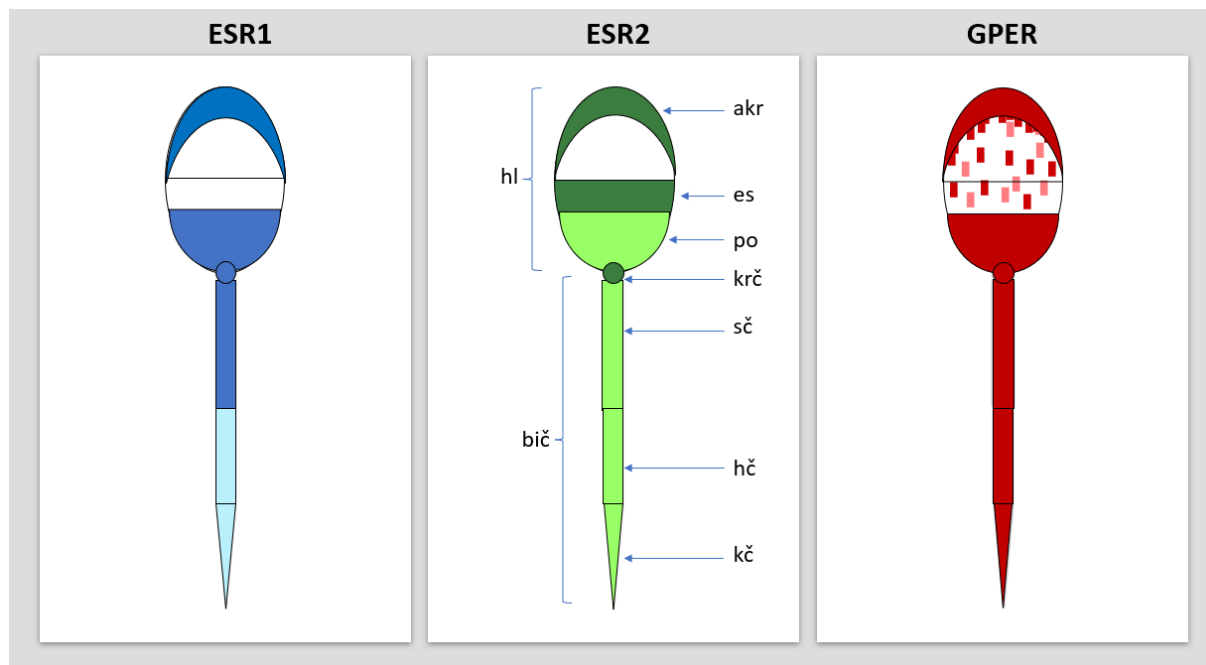


Obrázek 25 – Negativní kontrola u ejakulovaných spermií.

A – spermie zobrazené v kanálu FITC bez pozitivní reakce,

B – proložené snímky spermií negativní kontroly DAPI + FITC + PNA.

Pro shrnutí veškerých výsledků dosažených v této práci bylo vytvořeno schéma lokalizací estrogenových receptorů (obrázek 26). Bližší specifikace značení u spermií, které prošly jednotlivými fázemi maturace byly zpracovány do tabulky 2 níže.



Obrázek 26 – Schématické znázornění všech lokalizací estrogenových receptorů.

Tmavší barva znázorňuje silný signál, světlejší barva slabý signál. Vysvětlivky: hl – hlavička, bič – bičík, akr – akrozom, es – ekvatoriální segment, po – postakrozomální oblast, krč – krček, sč – střední část, hč – hlavní část, kč – koncová část.

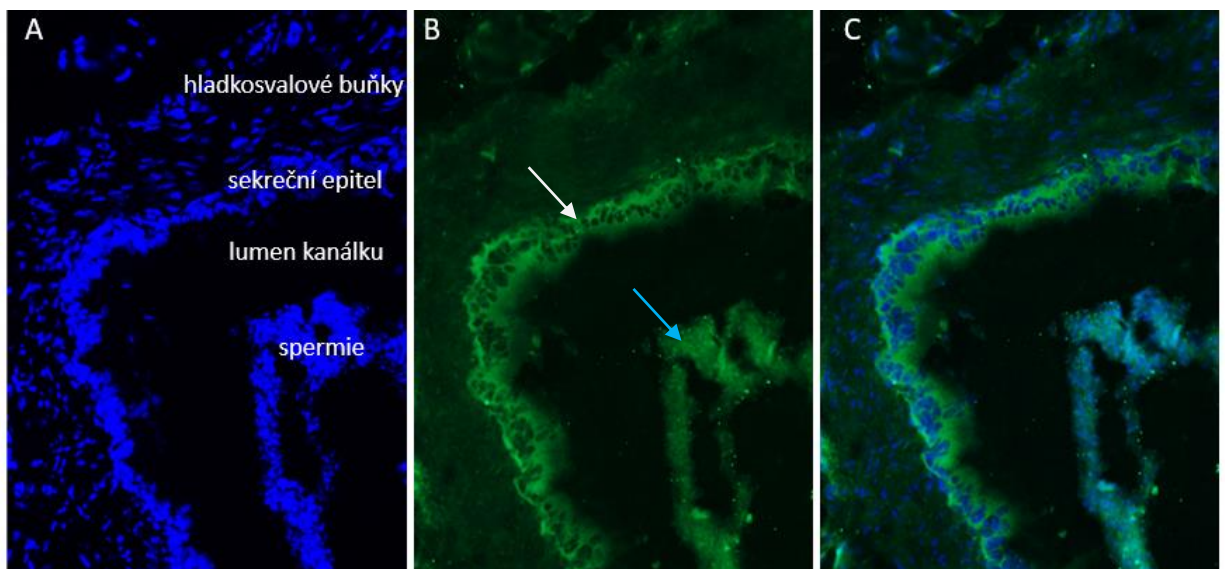
Tabulka 2 – Přehled pozitivních detekcí estrogenových receptorů pomocí specifických protilátek. (NP – neprovedený pokus).

protilátky	epididymální	ejakulované	kapacitované	akrozomální
ERα (C-311): sc-787	NP	akrozom, krček, střední část bičíku, individuální spermie slabé značení celého bičíku	akrozom, krček, střední část bičíku, individuální spermie slabé značení celého bičíku	postakrozomální oblast, krček, střední část bičíku, individuální spermie celý bičík
ERα (HC-20): sc-543	NP	střední část bičíku, individuální spermie slabé značení akrozomu a postakrozomální oblasti	střední část bičíku, slabé značení akrozomu, postakrozomální oblasti	střední část bičíku, slabé značení postakrozomální oblasti, hlavní a koncové části bičíku
ERβ (H-150): sc-8974	NP	akrozom, krček, slabé značení ekvatoriálního segmentu, individuální spermie střední část nebo celý bičík	akrozom, ekvatoriální segment, krček, slabé značení bičíku	krček, slabé značení bičíku
GPR30 (H- 300): sc- 134576	NP	akrozom, slabě bičík	akrozom, slabě bičík	ztráta signálu
GPER/GPR30 NLS4271	okrsky po celé hlavičce, bičík	krček, slabé okrsky na hlavičce především na akrozomu, bičík	krček, celý bičík, slabé okrsky na hlavičce	postakrozomální oblast, krček, celý bičík, slabé okrsky na hlavičce

Tento přehled znázorňuje specifické značení jednotlivých protilátek, které mají detekovat ERs. Protilátky ER α (C-311): sc-787 a ER α (HC-20): sc-543 rozpoznávaly ESR1. Mezi těmito protilátkami jsou pozorovatelné rozdíly v lokalizaci tohoto receptoru u jednotlivých spermií. Protilátka ER β (H-150): sc-8974 rozpoznávala ESR2. Protilátky GPR30 (H-300): sc-134576 a GPER/GPR30 NLS4271 rozeznávaly receptor GPER. Rovněž je možné vidět rozdílnou lokalizaci GPER při použití těchto odlišných protilátek. Každá protilátka je zaměřena proti odlišným epitopům, a proto je lokalizace ERs odlišná. Protilátky: ER β (1531): sc-53494, ER β (L-20): sc-6822 a GPER/GPR30 NBP1-31239 na spermích neznačily a ERs pomocí těchto protilátek se nepodařilo detekovat.

5.2 Lokalizace estrogenových receptorů ve tkáni varlat a nadvarlat

Z tkáně varlat a nadvarlat byly zhotoveny kryořezy, které byly fixovány vymraženým acetone. Pro lokalizaci estrogenových receptorů byla zvolena nepřímá imunofluorescenční mikroskopie (kapitola 4.5). Tkáně byly inkubovány se 3 typy primárních protilátek: ER α (C-311): sc-787, ER β (L-20): sc-6822, GPER/GPR30 NLS427 v různém ředění. Byly použity i různé typy a ředění sekundárních protilátek (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555, Cy5). Různé varianty spočívaly i v ředění protilátek v PBS nebo fyziologickém roztoku (podrobné informace v příloze v tabulce 4). I přes tyto provedené varianty experimentů se estrogenové receptory ve tkáni varlat a nadvarlat nepodařilo lokalizovat. Imunofluorescenční značení bylo nespecifické (obrázek 27) nebo nebylo vůbec detekováno. Důvodem těchto výsledků byla pravděpodobně neoptimalizovaná metodika.



Obrázek 27 - Lokalizace GPER ve tkáni nadvarlete (ocas). Byla použita primární protilátka GPER/GPR30 NLS4271 a sekundární protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 488 ředěná 1:300, zvětšení 200x.

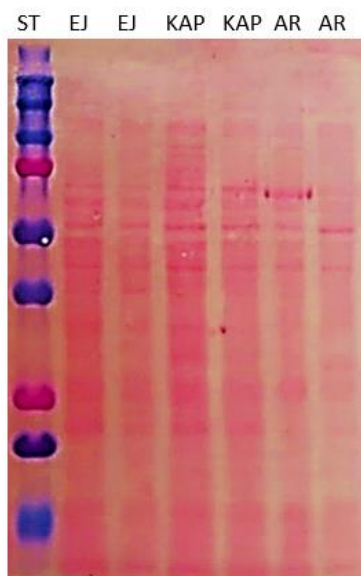
A – modře DAPI (značení jaderné DNA),

B – zeleně FITC pozitivní reakce GPER v sekrečním epitel (bílá šipka) a spermích (modrá šipka), značení se jeví jako nespecifické,

C – proložení snímků DAPI + FITC.

5.3 Lokalizace estrogenových receptorů v proteinových extraktech ze spermií na NC membránách

Pro detekci ERs byla provedena extrakce proteinů (kapitola 4.6.1), které byly separovány pomocí SDS elektroforézy ve 12% akrylamidovém gelu (kapitola 4.6.2) a přeneseny na NC membránu (kapitola 4.6.3). Poté byla provedena vizualizace proteinů barvením Ponceau (obrázek 28) (kapitola 4.6.4). Po odbarvení byly membrány inkubovány se specifickými protilátkami proti ERs (kapitola 4.2) a byla provedena imunodetekce (kapitola 4.6.5). U detekovaných proteinů byly vypočteny molekulové hmotnosti (obrázek 29–32) a byla provedena denzitometrická analýza (graf 2–4) a statistické vyhodnocení.

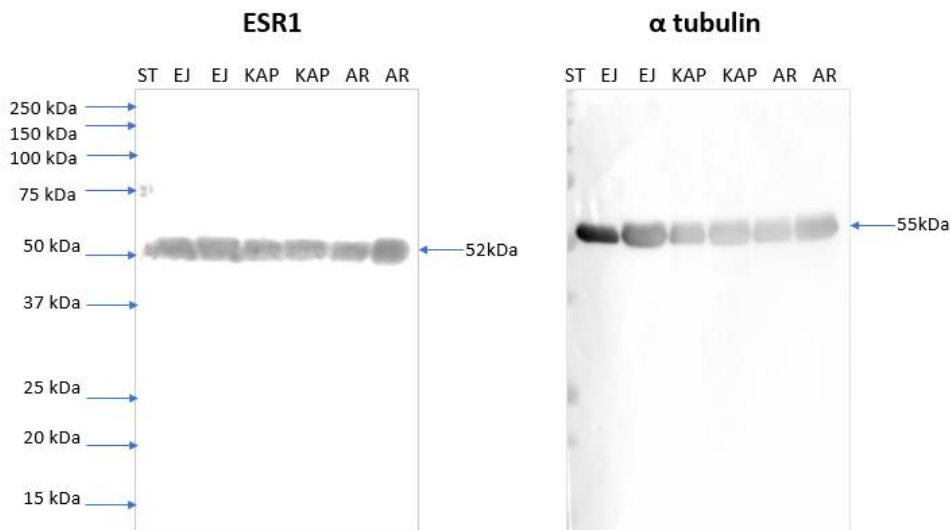


Obrázek 28 - Vizualizace přenesených proteinů barvením Ponceau na NC membráně.

Na membrány byly vždy nanášeny vzorky od dvou kanců v chronologickém pořadí dle stádia maturace od ejakulovaných spermií, spermií po *in vitro* kapacitaci, až po spermie, které podstoupily *in vitro* akrozomální reakci.

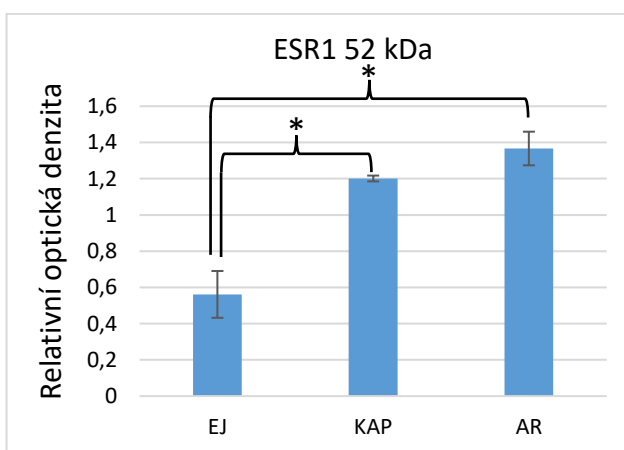
5.3.1 Detekce ESR1 protilátkou ER α (HC-20)

K detekci ESR1 v proteinových extraktech spermií byla použita primární protilátka ER α (HC-20) v ředění 1:250 a sekundární protilátka proti králíčím IgG konjugovaná s HRP v ředění 1:3000. Byl imunodetekován jeden protein ESR1 o velikosti 52 kDa (obrázek 29) v EJ, KAP a AR spermích. Dále byla provedena denzitometrická a statistická analýza tohoto proteinu (graf 2).



Obrázek 29 - Imunodetekce ESR1 na vzorcích extrahovaných proteinů ze spermií.

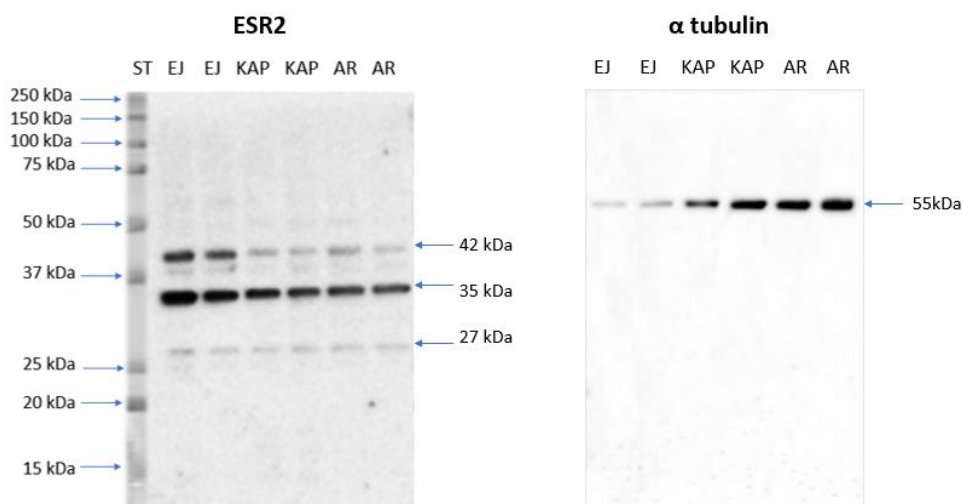
V programu STATISTICA byla provedena analýza, v níž byla porovnávána významnost množství ESR1 v proteinových extraktech z EJ, KAP a AR spermií pomocí t-testu (v příloze tabulka 8). Z výsledků vyplývá že: existuje statisticky významný rozdíl mezi ejakulovanými a kapacitovanými spermii v množství ESR1. Také existuje statisticky významný rozdíl mezi ejakulovanými spermii a spermii po akrozomální reakci v množství ESR1 a neexistuje statisticky významný rozdíl mezi kapacitovanými spermii a spermii po akrozomální reakci v množství ESR1.



Graf 2 - Denzitometrická analýza množství proteinu ESR1 (52 kDa) vztažená k optické denzitě α tubulinu ve vzorcích. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku od průměru. Svorky s hvězdičkou vyjadřují statisticky významné rozdíly mezi vzorky.

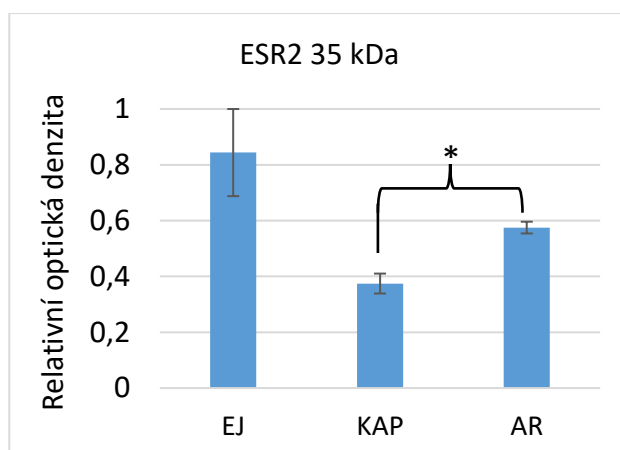
5.3.2 Detekce ESR2 protilátkou ER β (H-150)

Pro detekci ESR2 byla použita primární protilátka ER β (H-150): sc-8974 v ředění 1:250 a sekundární protilátka proti králíčímu IgG konjugovaná s HRP v ředění 1:3000. Western blot analýzou byly detekovány v ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomálně zreagovaných spermích 3 izoformy ESR2 o molekulových hmotnostech 27 kDa, 35 kDa a 42 kDa (obrázek 30). Dále byla provedena denzitometrická a statistická analýza množství proteinu ESR2 (35 kDa) (graf 3).



Obrázek 30 - Imunodetekce ESR2 na vzorcích extrahovaných proteinů ze spermíí.

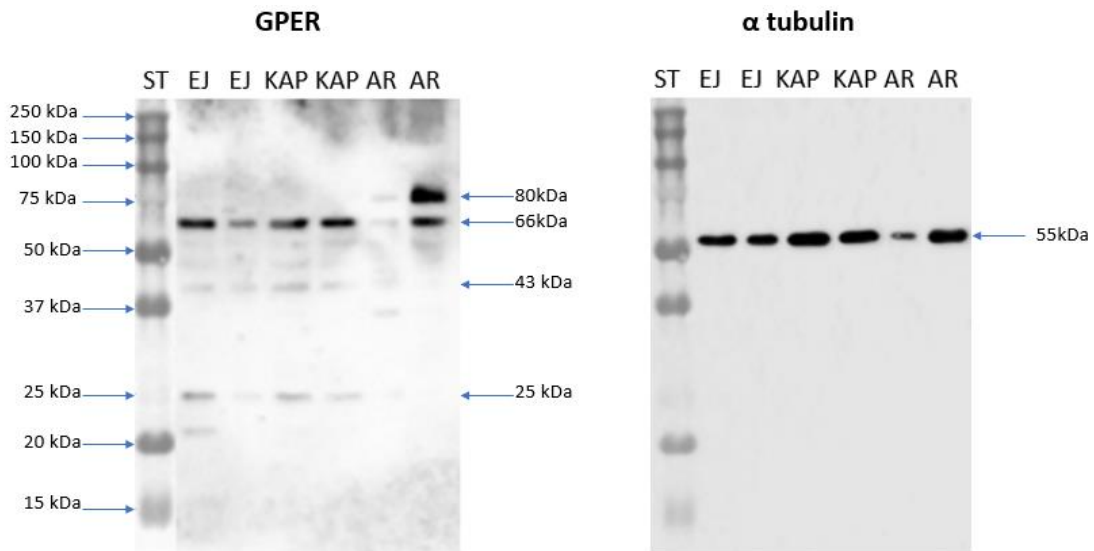
V programu STATISTICA byla provedena analýza, v níž byla porovnávána významnost množství ESR2 (na základě denzitometrické analýzy) v proteinových extraktech z EJ, KAP a AR spermíí pomocí t-testu (v příloze tabulka 9). Z výsledků vyplývá že: neexistuje statisticky významný rozdíl mezi ejakulovanými spermíemi a spermíemi po kapacitaci, rovněž neexistuje statisticky významný rozdíl mezi ejakulovanými spermíemi a spermíemi po akrozomální reakci, ale existuje statisticky významný rozdíl mezi spermíemi po kapacitaci a spermíemi po akrozomální reakci v množství ESR2.



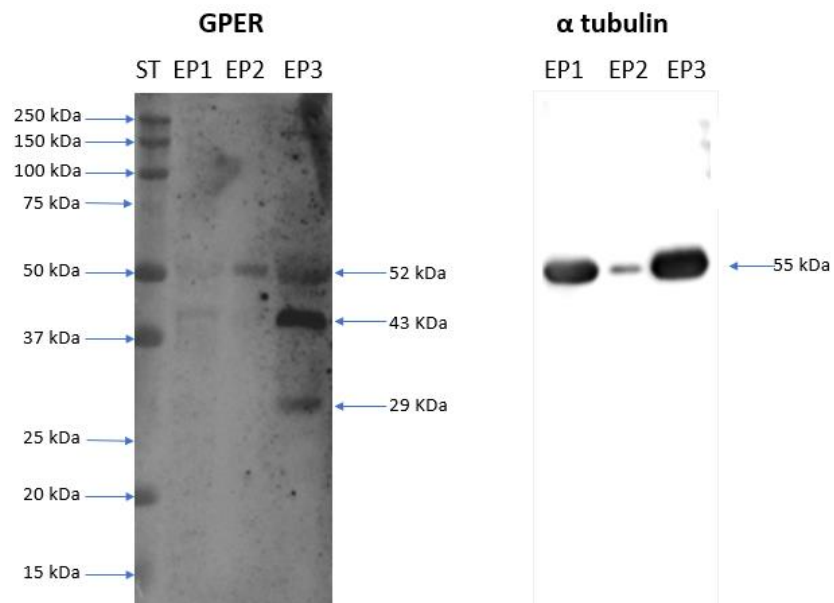
Graf 3 - Denzitometrická analýza množství proteinu ESR2 (35 kDa) vztažená k optické denzitě α tubulinu ve vzorcích. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku od průměru. Svorka s hvězdičkou vyjadřuje statisticky významný rozdíl mezi vzorky.

5.3.3 Detekce GPER protilátkou GPER/GPR30 NLS4271

Pro detekci GPER byla použita primární protilátka GPER/GPR30 NLS4271 v ředění 1:500 a sekundární protilátka proti králičím IgG konjugovaná s HRP v ředění 1:3000. Western blot analýzou byly detekovány v ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomálně zreagovaných spermích 4 izoformy GPER o molekulových hmotnostech 80 kDa, 66 kDa, 43 kDa a 25 kDa (obrázek 31). Dále byly detekovány v epididymálních spermích 3 izoformy GPER o molekulových hmotnostech 52 kDa, 43 kDa a 29 kDa (obrázek 32). Dále byla provedena denzitometrická a statistická analýza proteinu GPER (66 kDa) (graf 4).

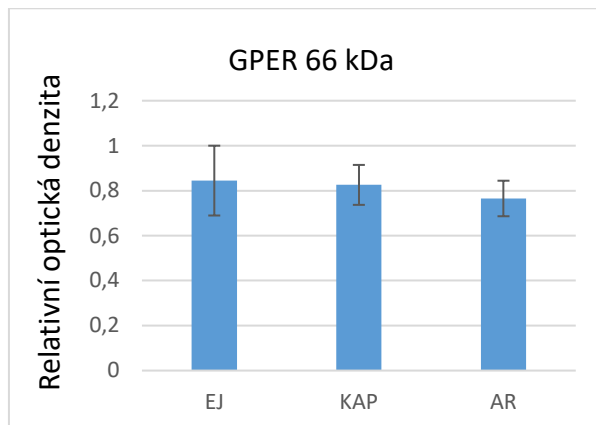


Obrázek 31 - Imunodetekce GPER na vzorcích extrahovaných proteinů ze spermíí.



Obrázek 32 - Imunodetekce GPER na vzorcích extrahovaných proteinů z epididymálních spermíí.

V programu STATISTICA byla provedena analýza, v níž byla porovnávána významnost množství GPER v proteinových extraktech z EJ, KAP a AR spermii pomocí t-testu (v příloze tabulka 10). Z výsledků vyplývá že: neexistuje statisticky významný rozdíl mezi ejakulovanými, kapacitovanými a spermii po akrozomální reakci v množství GPER.



Graf 4 - Denzitometrická analýza množství proteinu GPER (66 kDa) vztažená k optické denzitě α tubulinu ve vzorcích. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku od průměru. Mezi vzorky nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl.

Protilátky ER α (C-311) a ER β (1531): sc-53494 nefungovaly na membránách příliš spolehlivě, detekovat ERs se podařilo jen v některých případech. Protilátka ER β (L-20): sc-6822 neznačila na membránách vůbec (tabulka 6).

Výsledky ERs z nepřímé imunofluorescenční mikroskopie a proteinů přenesených na NC membránu jsou formou detekce ano/ne uvedeny v příloze v tabulce 7. Z této tabulky vyplývá, že některé specifické protilátky nemusí být pro danou analytickou metodu vhodné. Také jsou zde znázorněny rozdíly v detekci u některých vzorků, které mohou být způsobené individualitou kanců.

6 Diskuze

Spermie po dokončení spermiogeneze je sice morfologicky vyvinutá, ale není schopna rozpoznat ani oplodnit oocyt. Tyto schopnosti získává až během fází maturačního zrání. V průběhu maturace dochází ke značným reorganizacím proteinů, lipidů a sacharidů na povrchu spermie. Během těchto jsou komponenty jednotlivých domén plazmatické membrány přidávány, nahrazovány, měněny, přeskupovány a ztráceny (Brener et al. 2003; Darszon et al. 2006; Ded et al. 2010; Megnagi et al. 2015; Bernecic et al. 2019; Zigo et al. 2020). Při studiu proteinů je nutné vzít v úvahu skutečnost, že spermie prochází těmito změnami, a proto mohou být jednotlivé proteiny v daných fázích maturačního vývoje lépe či hůře detekovatelné.

Tato práce je zaměřena na detekci a lokalizaci proteinů estrogenních receptorů v tkáni varlat a nadvarlat a ve spermatických buňkách u kanců. Prasečí model je vhodným organismem pro experimentální účely. Tkáně a buňky jsou pro výzkum snadno dostupné, navíc tento organismus je velmi podobný lidskému. Čili i prasečí spermie jsou na úrovni podobnosti lidských spermií (Geisert et al. 2019).

Estrogeny u samců jsou nutné pro normální průběh spermatogeneze, vývoj spermií a jejich motilitu, kapacitaci a akrozomální reakci spermií. Primární funkce estrogenů u samců spočívá v regulaci množství tekutiny ve vývodných kanálcích varlete (Gunawan et al. 2011; Hess 2003; Gunawan et al. 2011; Hess et al. 2011; Hess & Cooke 2018; Menad et al. 2020). Estrogeny působí na organismus prostřednictvím estrogenních receptorů (ERs). ERs jsou zapojeny do regulace normální funkce reprodukčních procesů. Některé z nich, konkrétně ESR1 a ESR2, jsou umístěny v jádře, byla však prokázána přítomnost receptoru GPER, který je asociovaný s buněčnou membránou. Pro pochopení účinků estrogenních receptorů ovlivňujících pochody v reprodukční tkáni samce je nezbytné provést detekci a lokalizaci jednotlivých ERs v pohlavních orgánech a pohlavních buňkách. Této problematice se věnovalo mnoho autorů, kteří publikovali poměrně různorodé výsledky nejen v závislosti na zvoleném druhu zvířete, ale v rámci jednoho druhu. Důvodem těchto odlišností může být mnoho aspektů, mezi ně lze zařadit například rozdílné podmínky při zpracování vzorků, odlišný metodický přístup nebo použití jiných protilátek a jejich ředění.

Lokalizace ERs ve spermatických buňkách v průběhu jejich zrání

Gunawan et al. (2011) lokalizovali ESR1 pomocí protilátky ER α (HC-20) v postakrozomální oblasti a bičíku epididymálních spermií kanců. My jsme pomocí stejné protilátky ER α (HC-20) lokalizovali ESR1 ve střední části bičíku, slaběji pak v postakrozomální oblasti hlavičky spermií u ejakulovaných, kapacitovaných a AR spermií. U ejakulovaných a kapacitovaných spermií navíc bylo pozorováno slabé značení akrozomu. U spermií po akrozomální reakci bylo zaznamenáno slabé značení hlavní a koncové části bičíku. Použitá protilátka ER α (HC-20) je králíčí polyklonální protilátka cílená proti C-konci aminokyselinové sekvence lidského proteinu. Rago et al. (2007) detekovali ESR1 u kanců v ejakulovaných spermiích ve střední části bičíku a slabě v části koncové pomocí myší monoklonální protilátky ER α (F-10), která rozpoznává mapování epitopu v oblasti C-konce lidského ESR1. My jsme použili ještě primární myší monoklonální protilátku ER α (C-311), která je zaměřena proti aminokyselinám 495–595 bovinního proteinu. Byla detekována silná signalizace ve střední části bičíku u ejakulovaných, kapacitovaných spermií a spermií po

akrozomální reakci. U ejakulovaných a kapacitovaných spermií byl navíc zaznamenán výrazný signál na akrozomu, který byl u spermií po akrozomální reakci (AR) ztracen. Naopak u spermií po AR byl ESR1 detekován v postakrozomální oblasti. U ejakulovaných, kapacitovaných spermií a spermií po AR byl pozorován slabý signál na bičíku.

Rago et al. (2007) identifikovali ESR2 v akrozomu ejakulovaných spermií kance za použití protilátky ER β (H-150). Tato lokalizace je v souladu s našimi výsledky získanými se stejnou protilátkou u ejakulovaných a kapacitovaných spermií. Avšak my jsme detekovali ještě další značení ESR2, a to v ekvatoriálním segmentu, krčku a bičíku ejakulovaných i kapacitovaných spermií. U spermií po akrozomální reakci bylo ztraceno pozitivní značení akrozomu, zachovalo se pouze silné značení krčku a slabé značení celého bičíku. Protilátka ER β (H-150) je králičí polyklonální protilátka proti aminokyselinám 1–150 lidského proteinu. K detekci ESR2 jsme vyzkoušeli i další protilátky, a to ER β (1531) myší monoklonální protilátku proti aminokyselinám 256–505 lidského proteinu a ER β (L-20) kozí polyklonální protilátku proti oblasti v blízkosti C-konce aminokyselinové sekvence lidského proteinu. Ani jedna z těchto protilátek však nefungovala. Neúspěch detekce je velmi diskutabilní. Mohl být způsoben nevhodnou fixací, nevyhovujícím ředěním protilátek, nebo tím, že jsou protilátky vyrobené na myším, králičím, kozím či lidském modelu a nemusí tudíž zcela dobře fungovat na modelu prasečím. Také způsob fixace je zásadní z hlediska zachování či porušení celistvé struktury spermie. V závislosti na typu použité fixační látky může docházet k částečné nebo úplné propustnosti plazmatické membrány. Použitá protilátka tak může více či méně pronikat přes plazmatickou membránu do spermatické buňky. V této práci jsme fixovali spermatické buňky metodou vlhké fixace s vymraženým acetonem, který buněčnou membránu permeabilizuje.

Krejčířová et al. (2018) detekovali GPER v bičíku kančích epididymálních spermií pocházejících ze všech zkoumaných částí nadvarlete (hlava, tělo, ocas) za použití králičí polyklonální protilátky K-19-R. Rago et al. (2014) lokalizovali GPER na akrozomu, v ekvatoriálním segmentu a střední části bičíku ejakulovaných spermiích kanců. Tyto výsledky vycházely shodně u obou použitých primárních protilátek, králičí polyklonální protilátky LS-A4271, jež mapuje třetí extracelulární doménu lidského GPER a králičí polyklonální protilátky K-19-R mapující vnitřní oblast lidského GPER. V naší práci jsme měli k dispozici 3 odlišné protilátky, a to GPR30 (H-300) králičí polyklonální protilátku proti aminokyselinám 76–375 lidského proteinu, králičí polyklonální protilátku GPER/GPR30 NBP1-31239 proti sekvenci v C-konci lidského GPER a králičí polyklonální protilátku GPER/GPR30 NLS4271 proti peptidu ze 3. extracelulární domény lidského GPER. S protilátkou GPR30 (H-300) jsme shodně lokalizovali GPER na akrozomu a bičíku u ejakulovaných spermií, stejně tak u kapacitovaných spermií. U spermií po akrozomální reakci byl signál na akrozomu ztracen. S protilátkou GPER/GPR30 NLS4271 byla zjištěna rozdílná lokalizace. Tuto protilátku jsme použili u epididymálních spermií, kde jsme GPER detekovali na hlavičce a bičíku. Zajímavostí je, že se od spermií pocházejících z hlavy přes spermie z těla po spermie z ocasu nadvarlete zvyšovala intenzita pozitivního značení na bičíku. Toto zjištění naznačuje, že by se GPER mohl podílet na získání schopnosti pohybu u spermií. U ejakulovaných, kapacitovaných spermií a spermií po AR jsme zaznamenali intenzivní signál v krčku a bičíku, slabší signál byl pozorován v malých okrscích na hlavičce. U spermií po akrozomální reakci byl navíc detekován

signál v postakrozomální oblasti. Třetí protilátka GPER/GPR30 NBP1-31239 nefungovala. Po inkubaci spermií s touto protilátkou jsme žádné fluorescenční značení nedetekovali. Důvodem je zřejmě opět otázka výběru protilátek i odlišných metodických postupů.

Lokalizace ERs ve varletní a nadvarletní tkáni

ERs byly zkoumány ve varlatech a nadvarlatech mnoha savčích druhů. ESR2 je v celém samčím reprodukčním traktu všudypřítomný, zatímco ESR1 je tkáňově specifický (Gunawan et al. 2011; Hess et al., 2011; Arkoun et al. 2014).

Gunawan et al. (2011) lokalizovali ESR1 pomocí králičí polyklonální protilátky ER α (HC-20) v cytoplazmě Sertoliho a Leydigových buněk a v zárodečných buňkách kančích varlat. V nadvarletí byl ESR1 lokalizován v epiteliálních buňkách hlavy a těla nadvarlete a v hladkosvalové tkáni ocasu nadvarlete.

Gunawan et al. (2012) zvolili u kanců pro detekci ESR2 polyklonální kozí protilátku ER β (L-20). ESR2 byl lokalizován pomocí této protilátky také v zárodečných, Leydigových i Sertoliho buňkách varlat a také v epiteliálních buňkách hlavy, těla a ocasu nadvarlete. Krejčířová et al. (2018) lokalizovali GPER pomocí protilátky K-19-R ve varletní tkáni kanců v Leydigových a spermatických buňkách, byl rovněž lokalizován v tkáni všech úseků nadvarlat.

V našich experimentech byly tkáňové řezy z varlat a nadvarlat inkubovány se 3 typy protilátek: ER α (C-311), ER β (L-20) a GPER/GPR30 NLS427. V řezech tkání varlat i nadvarlat kance bylo pozorováno i nespecifické značení. Dokonce byla ve tkáni varlat i nadvarlat zaznamenána autofluorescence. Pro eliminaci nespecifit ve značení byly použity různé sekundární protilátky (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555, Cy5). Výsledkem však bylo i nadále nespecifické značení nebo žádné značení detekováno nebylo. Tyto neuspokojivé výsledky mohly být způsobeny nevhodně zvolenou metodikou. Dalším důvodem mohlo být také ovlivnění stavu epitopu ERs fixací vymraženým acetonem, jehož důsledkem pravděpodobně byla slabší vazba specifických protilátek a získání negativních výsledků. Jinou pravděpodobnou příčinou by mohl být snadný průnik protilátky do buněk a její navázání se na podobné epitopy za vzniku nespecifického značení.

Lokalizace ERs v proteinových extraktech ze spermií na NC membráně

Proteinová databáze uvádí molekulovou hmotnost ESR1 u kance 66 kDa (UniProt 2022a). Výrobce protilátek Santa Cruz Biotechnology (USA) uvádí molekulovou hmotnost u ESR1 dlouhé izoformy 66 kDa, krátké izoformy 54 kDa, ER46 48 kDa a ER36 36 kDa. Rago et al. (2007) u kančích ejakulovaných spermií detekovali myší monoklonální protilátkou ER α (F-10) protein o molekulové hmotnosti 67 kDa. My jsme detekovali pomocí protilátky ER α (HC-20) v ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomálně zreagovaných spermiích kanců zkrácenou variantu ESR1 o velikosti 52 kDa.

.Databáze UniProt (2022b) uvádí molekulovou hmotnost ESR2 59 kDa u kanců. Výrobce protilátek Santa Cruz Biotechnology (USA) uvádí pro ESR2 molekulovou hmotnost 56 kDa. Rago et. al (2007) našli s pomocí protilátky ER β (H-150) u kančích ejakulovaných spermií protein ESR2 o velikosti 50 a 59 kDa. My jsme detekovali v ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomálně zreagovaných spermiích kanců 3 izoformy ESR2 o molekulových hmotnostech

27 kDa, 35 kDa a 42 kDa rovněž při použití protilátky ER β (H-150). Tyto výsledky naznačují, že ESR2 je pravděpodobně glykosylovaný. Možností, která také přichází v úvahu, je rozpad ESR2, protože ke vzorku nebyly přidány proteinázové inhibitory.

Proteinová databáze UniProt (2022c) uvádí u kance molekulovou hmotnost proteinu GPER 39 kDa. Výrobce protilátek Santa Cruz Biotechnology (USA) uvádí molekulovou hmotnost 38 kDa. Rago et al. (2014) při použití protilátek K-19-R a LS-A4271 GPER prokázali u ejakulovaných kančích spermii protein o velikosti 42 kDa. Krejčířová et al. (2018) detekovali pomocí protilátky K-19-R protein GPER rovněž s molekulovou hmotností 42 kDa v extraktech epididymálních spermii pocházejících z hlavy a těla nadvarlete kance. V extraktu spermii z ocasu nadvarlete stanovili ještě další proteiny o molekulové hmotnostmi 30, 38 a 48 kDa. My jsme detekovali v epididymálních spermii izoformy GPER o molekulových hmotnostech 52 kDa, 43 kDa a 29 kDa. Dále jsme detekovali v ejakulovaných, kapacitovaných a akrozomálně zreagovaných spermiih kanců 4 izoformy GPER o molekulových hmotnostech 80 kDa, 66 kDa, 43 kDa a 25 kDa. V případě molekulových hmotnosti 80 kDa a 66 kDa se může jednat o dimery GPER. Protein GPER o molekulové hmotnosti 52 kDa mohl podstoupit postranslační modifikaci nebo protilátka mohla rozpoznat jiný protein, který je podobný GPER. Molekulová hmotnost 43 kDa je velmi blízká výsledku 42 kDa, které zjistili Rago et al. (2014) a Krejčířová et al. (2018). Rovněž molekulová hmotnost 29 kDa zjištěná u epididymálních spermii je velmi blízká hmotnosti 30 kDa, kterou identifikovali Krejčířová et al. (2018). Molekulová hmotnost GPER 25 kDa je pravděpodobně zkrácená forma tohoto receptoru.

Určité rozdíly ve zjištěné molekulové hmotnosti mohly být způsobeny detekcí specifických nových sestřihových variant nebo použitím jiné metodiky a protilátek různého původu (Dostalova et al. 2017). Rozdíly zjištěné v detekci ERs mohou být zapříčiněné i postranslačními modifikacemi. Postranslační modifikace se vyskytují na postranních řetězcích aminokyselin nebo peptidových vazbách. Jsou nejčastěji zprostředkovány enzymatickou aktivitou. Enzymy jako kinázy, fosfatázy, transferázy a ligázy přidávají nebo odstraňují funkční skupiny (proteiny, lipidy nebo cukry) do nebo z postranních řetězců aminokyselin. Proteázy štěpí peptidové vazby, dochází tak k odstranění specifických sekvencí nebo regulačních podjednotek. Signální peptid proto může být odštěpen. Mnoho proteinů je modifikováno krátce po dokončení translace, aby zprostředkovaly správné sbalení proteinu a jeho stabilitu nebo aby protein nasměrovaly do odlišných buněčných kompartmentů (např. jádro, membrána). Například glykosylace probíhá v místech, kde se nachází serin, asparagin nebo treonin. Další modifikací, které probíhá na proteinech, je ubikvitinace, která může změnit molekulovou hmotnost proteinu až o 8 kDa. Další postranslační modifikace jsou fosforylace, nitrosylace, methylace, acetylace, lipidace a proteolýza, všechny mohou ovlivnit detekci a lokalizaci ERs (Jensen 2004; Kiernan 2007; Ramazi & Zahiri 2021).

Naše vzorky proteinů spermii byly pro elektroforetické rozdělení připravovány v redukujících podmínkách. Nabízí se možnost nedokonalé redukce a tím přetrvání vzájemného spojení proteinů disulfidickými můstky za vzniku dimerů (66kDa a 80kDa GPER). Naopak nižší zjištěné molekulové hmotnosti u ESR2 mohly být zapříčiněné nevhodnou manipulací s proteiny a jejich následnou degradací.

Protilátky ER α (C-311) a ER β (1531): sc-53494 nefungovaly při detekci separovaných proteinů na membránách zcela spolehlivě, detekce ERs se nezdařila ve všech experimentech. Protilátka ER β (L-20): sc-6822 neznačila proteiny na membránách vůbec.

Z denzitometrické analýzy ESR1 z proteinových extraktů kančích spermii lze zaznamenat zvyšující se koncentraci receptoru ESR1 počínaje od spermii ejakulovaných přes kapacitované až ke spermii po AR. Nabízí se idea, že ejakulované spermie mají na povrchu velké množství proteinů ze semenné plasmy (Hunter 2007; Pereira-Lourenço et al. 2019; Zigo et al. 2020), které mohou ESR1 obalovat, a proto může být ESR1 hůře detekovatelný. Při kapacitaci tyto proteiny odcházejí, u spermii během akrozomální reakce se rozpadá akrozom, spermie má méně cytoplasmy a ESR1 může být proto snáze detekovatelný. V případě denzitometrické analýzy ESR2 byla nejvyšší koncentrace proteinů zjištěna v ejakulovaných spermii, u kapacitovaných spermii byla i v porovnání s koncentrací u spermii po AR koncentrace nejnižší. Toto zjištění by mohlo odpovídat předpokladu, že v ejakulovaných spermii může být ESR2 zakotven pomocí palmitoylace do vnitřní vrstvy plazmatické membrány (Cohen 2021), tudíž může být dobře detekovatelný. Úbytek může být dán možnou ztrátou akrozomů během kapacitace a manipulace se vzorkem, překvapující je navýšení po AR, ale to může být způsobeno lepší izolovatelností ER2 u spermii bez akrozomu, kdy dochází k odhalení oblastí (např. jádro a cytoplasma jsou přístupnější), kde je také ukotven ESR2. U denzitometrické analýzy GPER nebyly pozorovány výrazné rozdíly v koncentraci tohoto receptoru mezi spermii ejakulovanými, kapacitovanými a těmi po AR. Výsledky denzitometrické analýzy mohly být ovlivněny manipulací a procesy při získání proteinových extraktů. Například ve vzorcích ejakulovaných spermii mohlo být přítomné určité množství již kapacitovaných spermii, ve vzorcích spermii po *in vitro* akrozomální reakci nemusely některé spermie tento děj podstoupit.

Ze získaných výsledků vyplývá, že je velmi obtížné detekovat na kančím modelu ERs na základě protilátek vyrobených na jiném druhu, může tak docházet k mnoha nepřesnostem a nespecifitám.

7 Závěr

Estrogenové receptory u spermií a v tkáních reprodukčních orgánů jsou předmětem zájmu mnoha odborných studií. Důvodem tohoto poměrně intenzivního vědeckého bádání je jejich přítomnost v živočišných buňkách cílových tkání, která je nezbytná nejen pro navázání hormonů estrogenů, ale umožňuje i vazbu endokrinních disruptorů, které tak mohou ovlivnit gametogenezi a reprodukci celkově.

Naše práce byla založena na hypotéze, že budou estrogenové receptory ESR1, ESR2 i GPER prokázány v jednotlivých vývojových stádiích spermií a rovněž ve tkáni varlete a nadvarlete kanců. Estrogenové receptory byly v naší práci prokazovány ve spermiích získaných z nativní i z inseminační dávky a v tkáních metodou nepřímé imunofluorescenční mikroskopie. ESR1 se podařilo lokalizovat na akrozomu, v postakrozomální oblasti, krčku a bičíku. ESR2 byl nalezen ve stejných strukturách s odlišnou intenzitou značení, navíc byl zjištěn pozitivní signál i v ekvatoriálním segmentu. GPER byl detekován na akrozomu, v malých okrscích po celé hlavičce, postakrozomální oblasti, krčku a bičíku. Mezi spermiemi jednotlivých stádií zrání byla pozorována lokalizace ERs rozdílně, také použití jednotlivých protilátek mělo vliv výslednou lokalizaci. Naše výsledky získané při detekci estrogenových receptorů ve tkáních varlat a nadvarlat nebyly průkazné. V převážné většině experimentů bylo detekované značení pouze nespecifické. Za účelem získání komplexnějších informací o estrogenových receptorech ve spermiích kanců byla provedena také jejich detekce v proteinových extraktech na nitrocelulóзовé membráně. V EJ, KAP a AR spermiích byly detekovány proteiny ESR1 o molekulové hmotnosti 52 kDa. ESR2 byl nalezen ve 3 zkrácených izoformách 42 kDa, 35 kDa a 27 kDa. GPER byl detekován ve 4 izoformách : 80 kDa, 66 kDa, 43 kDa a 25 kDa. GPER byl detekován i v proteinových extraktech epididymálních spermií, u kterých byly zjištěny 3 izoformy 52 kDa, 43 kDa a 29 kDa.

Odlišnosti našich a publikovaných výsledků jiných autorů by mohly být, způsobené volbou použitých protilátek, volbou metodického postupu, ale i přítomností dimerů či naopak krátkých forem receptorů, jež mají vliv na konečný výsledek. Předpoklad, že všechny sledované estrogenové receptory budou prokázány v jednotlivých vývojových stádiích spermií a také ve tkáni varlete, byl splněn jen částečně. Vzhledem k existenci velké variability výsledků publikovaných v odborných člancích různých autorů se ukazuje nutnost dalšího pokračování experimentální práce zabývající se tématem estrogenových receptorů.

Literatura

Andrabi SMH. 2007. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **24**:561–569.

Antalíková J, Šecová P, Horovská L, Krejčířová R, Šimoník O, Jankovičová J, Bartoková M, Tůmová L, Maňásková-Postlerová P. 2020. Missing Information from the Estrogen Receptor Puzzle: Where Are They Localized in Bull Reproductive Tissues and Spermatozoa? *Cells* **9**:183.

Antonson P, Apolinário LM, Shamekh MM, Humire P, Poutanen M, Ohlsson C, Nalvarte I, Gustafsson JÅ. 2020. Generation of an all-exon *Esr2* deleted mouse line: Effects on fertility. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **529(2)**:231–237.

Aquila S, Sisci D, Gentile M, Middea E, Catalano S, Carpino A, Rago V, Andó S. 2004. Estrogen receptor (ER) α and ER β are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89(3)**:1443–1451.

Arkoun B, Gautier G, Delalande Ch, Barrier-Battut I, Guénon I, Goux D, Bouraïma-Lelong H. 2014. Stallion spermatozoa: Putative target of estrogens; presence of the estrogen receptors 1, ESR2 and identification of the estrogen-membrane receptor GPER. *General and Comparative Endocrinology* **200**:35–43.

Bernecic NC, Gadella BM, Leahy T, de Graaf SP. 2019. Novel methods to detect capacitation-related changes in spermatozoa. *Theriogenology* **137**:56–66.

Bidlingmaier M. 2019. Estrogene: In *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J, Breitbart H. 2003. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of reproduction* **68(3)**:837–45.

Carreau S, Hess RA. 2010. Oestrogens and spermatogenesis. A review. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **365**:1517–1535.

Cohen DJ, ElBaradie K, Boyan BD, Schwartz Z. 2021. Sex-specific effects of 17 β -estradiol and dihydrotestosterone (DHT) on growth plate chondrocytes are dependent on both ER α and ER β and require palmitoylation to translocate the receptors to the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1866(12)**:159028.

Cooke PS, Walker WH. 2022. Nonclassical androgen and estrogen signaling is essential for normal spermatogenesis. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* **121**:71–81.

Cornwall GA. 2014. Role of posttranslational protein modifications in epididymal sperm maturation and extracellular quality control. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **759**:159–180.

Dacheux JL, Dacheux F. 2014. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction* **147(2)**:27–42.

Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernández-González EO, Nishigaki T, Trevino CL, Wood C, Beltrán C. 2006. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* **131**:977–988.

De Souza APB, Schorr-Lenz ÂM, Lucca F, Bustamante-Filho IC. 2018. The epididymis and its role on sperm quality and male fertility. *Animal Reproduction* **14(1)**:1234–1244.

Ded L, Dostalova P, Dorosh A, Dvorakova-Hortova K, Peknicova J. 2010. Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology* **8(1)**:1–11.

Ded L, Sebkova N, Cerna M, Elzeinova F, Dostalova P, Peknicova J, Dvorakova-Hortova K. 2013. In vivo exposure to 17 β -estradiol triggers premature sperm capacitation in cauda epididymis. *Reproduction* **145(3)**:255–263.

Dostalova P, Zatecka E, Dvorakova-Hortova K. 2017. Of Oestrogens and Sperm: A Review of the Roles of Oestrogens and Oestrogen Receptors in Male Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences* **18(5)**:904.

Dumasia K, Kumar A, Deshpande S, Sonawane S, Balasinor N. 2016. Differential roles of estrogen receptors, ESR1 and ESR2, in adult rat spermatogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* **428**:89–100.

Eddy EM. 2006. The Spermatozoon. In: Neill JD, Challis JRG, Pfaff DW, Plant TM, Kretser DM, Richards JS, Wassarman PM (Eds). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier Academic Press, San Diego.

Fietz D, Ratzenböck C, Hartmann K, Raabe O, Kliesch S, Weidner W, Klug J, Bergmann M. 2014. Expression pattern of estrogen receptors α and β and G-protein-coupled estrogen receptor 1 in the human testis. *Histochemistry and cell biology* **142(4)**:421–432.

Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B. 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science* **68(3–4)**:249–265.

Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *International Journal of Developmental Biology* **52(5–6)**:473–480.

- Gautier C, Barrier-Battut I, Guénon I, Goux D, Delalande C, Bouraïma-Lelong H. 2016. Implication of the estrogen receptors GPER, ESR1, ESR2 in post-testicular maturation of equine spermatozoa. *General and Comparative Endocrinology* **233(1)**:100–108.
- Geisert RD, Sutovsky P, Lucy M, Bartol FF, Meyer AE. 2019. Reproductive physiology of swine. In: Bazer FW, Lamb GC, Wu G (eds) *Animal agriculture 1st edition: challenges, innovations, and sustainability*. Academic Press, Cambridge.
- Gil MC, García-Herreros M, Barón FJ, Aparicio IM, Santos AJ, García-Marín LJ. 2009. Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology* **71(2)**:254–263.
- Gillies EA, Cannon RM, Green RB, Pacey AA. 2009. Hydrodynamic propulsion of human sperm. *Journal of Fluid Mechanics* **625**:445–474.
- Górski K, Kondracki S, Wysokińska A, Iwanina M. 2018. Dependence of sperm morphology and ejaculate characteristics on sperm concentration in the ejaculates of Hypor boars. *Journal of Veterinary Research* **62(3)**:353–357.
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. 2002. Production and actions of estrogens. *The New England Journal of Medicine* **346(5)**:340–352.
- Guerra-Carvalho B, Carrageta DF, Crisóstomo L, Carvalho RA, Alves, MG, Oliveira PF. 2021. Molecular mechanisms regulating spermatogenesis in vertebrates: Environmental, metabolic, and epigenetic factor effects. *Animal reproduction science* **106896**.
- Gunawan A, Cinar MU, Uddin MJ, Kaewmala K, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C, Schellander K. 2012. Investigation on Association and Expression of ESR2 as a Candidate Gene for Boar Sperm Quality and Fertility. *Reproduction in Domestic Animals* **47**:782–790.
- Gunawan A, Kaewmala K, Uddin MJ, Cinar MU, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C, Schellander K. 2011. Association study and expression analysis of porcine ESR1 as a candidate gene for boar fertility and sperm quality. *Animal Reproduction Science* **128**:11–21.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman, J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological Reviews* **87**:905–931.
- Hess RA, Cooke PS. 2018. Estrogen in the male: a historical perspective. *Biology of reproduction* **99(1)**:27–44.
- Hess RA, Fernandes SAF, Gomes GRO, Oliveria CA, Lazari MFM, Porto CS. 2011. Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. *Journal of Andrology* **32(6)**:600–612.

- Hess RA. 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1(1)**:1–14.
- Hirohashi N, Yanagimachi R. 2018. Sperm acrosome reaction: its site and role in fertilization. *Biology of reproduction* **99(1)**:127–133.
- Hook KA, Wilke LM, Fisher HS. 2021. Apical Sperm Hook Morphology Is Linked to Sperm Swimming Performance and Sperm Aggregation in *Peromyscus* Mice. *Cells* **10(9)**:2279.
- Hunter T. 2007. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Molecular cell biology* **28**:730–738.
- Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M. 2010. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *The Journal of clinical Investigation* **120(4)**:984–994.
- Jensen ON. 2004. Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spektrometry. *Current Opinion in Chemical Biology* **8**:33–41.
- Kang L, Zhang X, Xie Y, Tu Y, Wang D, Liu Z, Wang ZY. 2010. Involvement of estrogen receptor variant ER- α 36, not GPR30, in nongenomic estrogen signaling. *Molecular Endocrinology* **24(4)**:709–721.
- Kiernan UA. 2007. Quantitation of target proteins and post-translational modifications in affinity-based proteomics approaches. *Expert Review of Proteomics* **4(3)**:421–428.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. 2003. Acroplaxome, an F-actin–keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Molecular biology of cell* **14**:4628–4640.
- Kondracki S, Górski A, Iwanina M. 2020. Impact of sperm concentration on sperm morphology of large white and landrace boars. *Livestock Science* **241**:1–10.
- Krejčířová R, Maňasová M, Sommerová V, Langhamerová E, Rajmon R, Maňásková-Postlerová P. 2018. G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in adult boar testes, epididymis and spermatozoa during epididymal maturation. *International journal of biological macromolecules* **116**:113–119.
- Kumar R, Zakharov MN, Khan SH, Miki R, Jang H, Toraldo G, Singh R, Bhasin S, Jasuja R. 2011. The dynamic structure of the estrogen receptor. *Journal of amino acids* **2011**.
- Lambard S, Galeraud-Denis I, Saunders PTK, Carreau S. 2004. Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors. *Journal of molecular endocrinology* **32(1)**:279–290.

- Lazaros LA, Xita NV, Kaponis A, Zikopoulos KA, Plachouras NI, Georgiou IA. 2010. Estrogen receptor α and β polymorphisms are associated with semen quality. *Journal of Andrology* **31(3)**:291–298.
- Lecomte S, Demay F, Ferrière F, Pakdel F. 2017. Phytochemicals targeting estrogen receptors: beneficial rather than adverse effects? *International Journal of Molecular Sciences* **18(7)**:1381.
- Levin ER. 2009. Plasma membrane estrogen receptors. A review. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **20(10)**:477–482.
- Lewis J, Aziz IN, Seshadri S, Douglas A, Howard P. 2003. Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. *Fertility and Sterility* **79(1)**:212–215.
- Luo J, Liu D. 2020. Does GPER really function as a G protein-coupled estrogen receptor in vivo? *Frontiers in endocrinology* **11**:148.
- Macků F, Čech E. Porodnictví. Informatrium, Praha.
- Malo AF, Gomendio M, Garde J, Lang-Lenton B, Soler AJ, Roldan ER. 2006. Sperm design and sperm function. *Biology letters* **2(2)**:246–249.
- Megnagi B, Finkelstein M, Shabtay O, Breitbart H. 2015. The role and importance of cofilin in human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Cell and tissue research* **362(3)**:665–675.
- Menad R, Fernini M, Lakabi L, Soudani N, Smaï S, Bonnet X, Gernigon-Spychalowicz T, Moudilou E, Exbrayat JM. 2020. G protein-coupled oestrogen receptor 1, oestrogen receptors and androgen receptor in the sand rat (*Psammomys obesus*) efferent ducts. *Folia morphologica* **79(4)**:756–766.
- Menkveld R, El-Garem Y, Schill WB, Henkel R. 2003. Relationship between human sperm morphology and acrosomal function. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **20**:432–438.
- Moore KL, Persaund TVN. 2008. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Noorafshan A, Karbalay-Doust S. 2010. A simple method for unbiased estimating of ejaculated sperm tail length in subjects with normal and abnormal sperm motility. *Micron* **41(1)**:96–99.
- Otto C, Fuchs I, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Andreasen P, Schwarz G, Altmann H, Klewer M, Schoor M, Vonk R, Fritzscheier KH. 2009. GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biology of Reproduction* **80**:34–41.

- Pearl ChA, Berger T, Roser JF. 2007. Estrogen and androgen receptor expression in relation to steroid concentrations in the adult boar epididymis. *Domestic Animal Endocrinology* **33**:451–459.
- Pena FJ, Saravia, F, Garcia-Herreros M, Nunez-Martinez I, Tapia, JA, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H. 2005. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *Journal of Andrology* **26**:716–723.
- Pereira-Lourenço M, Brito DV, Pereira BJ. 2019. Premature ejaculation: From physiology to treatment. *Journal of family & reproductive health* **13**(3):120.
- Pesch S, Bergmann M. 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* **37**(7):597–612.
- Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA. 2007. GPR30: AG protein-coupled receptor for estrogen. *Molecular and cellular endocrinology* **265**:138–142.
- Rago V, Aquila S, Panza R, Carpio A. 2007. Cytochrome P450arom, androgen and estrogen receptors in pig sperm. *Reproductive biology and endocrinology* **5**(1):1–6.
- Rago V, Giordano F, Brunelli E, Zito D, Aquila S, Carpio A. 2014. Identification of G protein-coupled estrogen receptor in human and pig spermatozoa. *Journal of Anatomy* **224**:732–736.
- Rago V, Maggiolini M, Vivacqua A, Palma A, Carpio A. 2004. Differential expression of estrogen receptors (ER α /ER β) in testis of mature and immature pigs. *The Anatomical Record Part A* **281A**:1234–1239.
- Ramazi S, Zahiri J. 2021. Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database* **2021**.
- Rooij DG. 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* **121**:347–354.
- Saacke RG. 2008. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology* **70**(3):473–478.
- Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. 2010. Association of polymorphisms in the estrogen receptors alpha, and beta (ESR1, ESR2) with the occurrence of male infertility and semen parameters. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **122**(4):193–203.
- Sebkova N, Cerna M, Ded L, Peknicova J, Dvorakova-Hortova K. 2012. The slower the better: how sperm capacitation and acrosome reaction is modified in the presence of estrogens. *Reproduction* **143**(3):297.

- Shaha C. 2008. Estrogens and spermatogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **636**:42–64.
- Silber SJ. 2018. *Fundamentals of male infertility*. Springer International Publishing, New York.
- Siriani R, Chimento A, Ruggiero C, De Luca A, Lappano R, Andó S, Maggiolini M, Pezzi V. 2008. The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. *Endocrinology* **149(10)**:5043–5051.
- Sousa PC, Santos EAA, Souza ALP, Lima GL, Barros FFPC, Oliveira MF, Silva AR. 2013. Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Pesquisa Veterinaria Brasileira* **33**:924–930.
- Sutovsky P, Manandhar G. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: Anatomical and compartmental analysis. In *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Teves ME, Roldan ER. 2022. Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection. *Physiological reviews* **102(1)**:7–60.
- Thomas P. 2017. Role of G-protein-coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) in maintenance of meiotic arrest in fish oocytes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **167**:153–161.
- Toshimori K, Ito C. 2003. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Archives of histology and cytology* **66**:383–396.
- Touré A, Martinez G, Kherraf ZE, Cazin C, Beurois J, Arnoult C, Ray P, Coutton C. 2021. The genetic architecture of morphological abnormalities of the sperm tail. *Human Genetics* **140(1)**:21–42.
- Travert C, Carreau S, Galeraud-Denis I. 2009. La capacitation in vitro. *Gynécologie obstétrique & fertilité* **37(6)**:523–528.
- Vacek Z. 2006. *Embryologie*. Grada Publishing a.s., Praha.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature cell biology* **3**:59–64.
- Weiss P. 2010. *Sexuologie*. Grada Publishing a.s., Praha.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD. (eds.): *The Physiology of reproduction*. Raven Press, New York.

Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. 2008. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nuclear Receptor Signaling* **6**:e003.

Zigo M, Maňásková-Postlerová P, Zuidema D, Kerns K, Jonáková V, Tůmová L, Bubeníčková F, Sutovsky P. 2020. Porcine model for the study of sperm capacitation, fertilization and male fertility. *Cell and tissue research* **380(2)**:237–262.

Zimmerman MA, Budish RA, Kashyap S, Lindsey SH. 2016. GPER-novel membrane oestrogen receptor. *Clinical science* **130(12)**:1005–1016.

Internetové zdroje :

UniProt. 2022a. ESR1 – Estrogen receptor – *Sus scrofa* (Pig) - ESR1 gene & protein UniProt.org. Available from: <https://www.UniProt.org/UniProt/Q29040> (accessed March 2022).

UniProt. 2022b. ESR2 – Estrogen receptor beta – *Sus scrofa* (Pig) - ESR2 gene & protein UniProt.org. Available from: <https://www.UniProt.org/UniProt/Q9XSW2> (accessed March 2022).

UniProt. 2022c. GPER1 – G-protein coupled estrogen receptor 1 - *Sus scrofa* (Pig) - GPER1 gene & protein. UniProt.org. Available from: <https://www.UniProt.org/UniProt/I3LSZ2> (accessed March 2022).

8 Seznam použitých zkratek a symbolů

akr – akrozom

AR – spermie po akrozomální reakci, akrozomální reakce

bič – bičík

DNA – deoxyribonukleová kyselina

E2 – estradiol

EJ – ejakulované spermie

EP1 – spermie z hlavy nadvarlete

EP2 – spermie z těla nadvarlete

EP3 – spermie z ocasu nadvarlete

ERs – estrogenový receptor

ESR1 – estrogenový receptor alfa

ESR2 – estrogenový receptor beta

es – ekvatoriální segment

FITC – fluorescein isothiokyanát

GPER – estrogenový receptor spojený s G proteinem

hč – hlavní část

hl – hlavička

ID – inseminační dávka

IgG – protilátka

KAP – kapacitované spermie

kč – koncová část

krč – krček

NAT – nativní dávka

NC membrána – nitrocelulózová membrána

PBS – fosfátový pufr

PNA – peanut aglutinin

po – postakrozomální oblast

sč – střední část

ST – proteinový standard

VZPred – vzorkový pufr redukující

9 Samostatné přílohy

Tabulka 3 – Výsledky značení spermií fixovaných na sklech po imunofluorescenčním mikroskopování

vzorky	primární protilátka	ředění prim. protilátky	sekundární protilátka	ředění sek. protilátky	fluorescence	značení u EJ	značení u KAP	značení u AR
ID 668+711	ER α (C-311): sc-787	1:100	GAM 488	1:300	ne	x	x	x
ID 730+740	ER α (C-311): sc-787	1:100	GAM 488	1:300	ne	x	x	x
EP1, EP2, EP3	ER α (C-311): sc-787	1:50	GAM 488	1:300	ne	x	x	x
ID 734+668+745	ER α (C-311): sc-787	1:50	GAM 488	1:300	ne	x	x	x
ID 740+679	ER α (C-311): sc-787	1:50	GAM 488	1:300	ano	akrozom, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík	akrozom, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík	postakrozomální oblast, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík
ID 756+673	ER α (C-311): sc-787	1:50	GAM 488	1:300	ano	akrozom, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík	akrozom, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík	postakrozomální oblast, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík
ID 756+700	ER α (C-311): sc-787	1:50	GAM 488	1:300	ne	x	x	x
NAT 679	ER α (C-311): sc-787	1:50	GAM 488	1:300	ano	akrozom, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík	akrozom, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík	postakrozomální oblast, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík
NAT 700	ER α (C-311): sc-787	1:50	GAM 488	1:300	ano	akrozom, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík	akrozom, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík	postakrozomální oblast, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík
NAT 730	ER α (C-311): sc-787	1:50	GAM 488	1:300	ano	akrozom, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík	akrozom, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík	postakrozomální oblast, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík
NAT 744	ER α (C-311): sc-787	1:50	GAM 488	1:300	ano	akrozom, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík	akrozom, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík	postakrozomální oblast, krček, střední část bičíku, slabě celý bičík
ID 740+679	ER α (HC-20) sc-543	1:50	GAR 488	1:300	ano	střední část bičíku, slabě akrozom a postakrozomální oblast	střední část bičíku, slabě akrozom a postakrozomální oblast	střední část bičíku, slabě postakrozomální oblast a hlavní a koncová část bičíku
ID 756+673	ER α (HC-20) sc-543	1:50	GAR 488	1:300	ano	střední část bičíku, slabě akrozom a postakrozomální oblast	střední část bičíku, slabě akrozom a postakrozomální oblast	střední část bičíku, slabě postakrozomální oblast a hlavní a koncová část bičíku
NAT 679	ER α (HC-20) sc-543	1:50	GAR 488	1:300	ano	střední část bičíku, slabě akrozom a postakrozomální oblast	střední část bičíku, slabě akrozom a postakrozomální oblast	střední část bičíku, slabě postakrozomální oblast a hlavní a koncová část bičíku
NAT 744	ER α (HC-20) sc-543	1:50	GAR 488	1:300	ano	střední část bičíku, slabě akrozom a postakrozomální oblast	střední část bičíku, slabě akrozom a postakrozomální oblast	střední část bičíku, slabě postakrozomální oblast a hlavní a koncová část bičíku
ID 685+673	ER β (1531): sc-53494	1:100	GAM 488	1:300	ne	x	x	x
ID 700+679	ER β (1531): sc-53494	1:100	GAM 488	1:300	ne	x	x	x
NAT 700	ER β (1531): sc-53494	1:100	GAM 488	1:300	ne	x	x	x
NAT 711 EJ	ER β (1531): sc-53494	1:100	GAM 488	1:300	ne	x	x	x
NAT 730	ER β (1531): sc-53494	1:100	GAM 488	1:300	ne	x	x	x
ID 668+711	ER β (1531): sc-53494	1:100	GAM 488	1:300	ne	x	x	x
ID 730+740	ER β (1531): sc-53494	1:100	GAM 488	1:300	ne	x	x	x
EP1, EP2, EP3	ER β (1531): sc-53494	1:50	GAM 488	1:300	ne	x	x	x
ID 734+668+745	ER β (1531): sc-53494	1:50	GAM 488	1:300	ne	x	x	x
ID 756+700	ER β (1531): sc-53494	1:50	GAM 488	1:300	ne	x	x	x

vzorky	primární protilátka	ředění prim. protilátky	sekundární protilátka	ředění sek. protilátky	fluorescence	značení u EJ	značení u KAP	značení u AR
ID 734+668+745	ER β (H-150): sc-8974	1:50	GAR 488	1:300	ano	akrozom, ekvatoriální segment, krček, bičík	akrozom, ekvatoriální segment, krček	krček, bičík
ID 756+700	ER β (H-150): sc-8974	1:50	GAR 488	1:300	ano	akrozom, ekvatoriální segment, krček, bičík	akrozom, ekvatoriální segment, krček	krček, bičík
ID 685+673	ER β (L-20): sc-6822	1:100	DAG 488	1:300	ano	x	x	x
ID 700+679	ER β (L-20): sc-6822	1:100	DAG 488	1:300	ano	x	x	x
NAT 700	ER β (L-20): sc-6822	1:100	DAG 488	1:300	ano	x	x	x
NAT 711 EJ	ER β (L-20): sc-6822	1:100	DAG 488	1:300	ne	x	x	x
ID 734+668+745	ER β (L-20): sc-6822	1:50	DAG 488	1:300	ne	x	x	x
ID 756+700	ER β (L-20): sc-6822	1:50	DAG 488	1:300	ne	x	x	x
NAT 730	ER β (L-20): sc-6822	1:50	DAG 488	1:300	ne	x	x	x
NAT 700	GPER/GPR30 NBP1-31239	1:30	GAR 488	1:300	ne	x	x	x
NAT 730	GPER/GPR30 NBP1-31239	1:30	GAR 488	1:300	ne	x	x	x
ID 668+711	GPER/GPR30 NBP1-31239	1:10	GAR 488	1:300	ne	x	x	x
ID 730+740	GPER/GPR30 NBP1-31239	1:10	GAR 488	1:300	ne	x	x	x
NAT 679	GPER/GPR30 NBP1-31239	1:10	GAR 488	1:300	ne	x	x	x
NAT 744	GPER/GPR30 NBP1-31239	1:10	GAR 488	1:300	ne	x	x	x
EP1, EP2, EP3	GPER/GPR30 NLS4271	1:50	GAR 488	1:300	ano	ep1 – hlavička, bičík	ep2 – hlavička, bičík	ep3 – hlavička, bičík
ID 685+673	GPER/GPR30 NLS4271	1:50	GAR 488	1:300	ano	krček, slabě hlavička a bičík	krček, bičík, slabě hlavička	postakrozomální oblast, krček, bičík
ID 700+679	GPER/GPR30 NLS4271	1:50	GAR 488	1:300	ano	krček, slabě hlavička a bičík	krček, bičík, slabě hlavička	postakrozomální oblast, krček, bičík
ID 717+741	GPER/GPR30 NLS4271	1:50	GAR 488	1:300	ano	krček, slabě hlavička a bičík	krček, bičík, slabě hlavička	postakrozomální oblast, krček, bičík
ID 734+668+745	GPER/GPR30 NLS4271	1:50	GAR 488	1:300	ano	krček, slabě hlavička a bičík	krček, bičík, slabě hlavička	postakrozomální oblast, krček, bičík
NAT 679	GPER/GPR30 NLS4271	1:60	GAR 488	1:300	ano	krček, slabě hlavička a bičík	krček, bičík, slabě hlavička	postakrozomální oblast, krček, bičík
ID 740+679	GPR30 (H-300): sc-134576	1:50	GAR 488	1:300	ano	akrozom, bičík	akrozom, bičík	x
ID 756+673	GPR30 (H-300): sc-134576	1:50	GAR 488	1:300	ano	akrozom, bičík	akrozom, bičík	x
NAT 710	GPR30 (H-300): sc-134576	1:50	GAR 488	1:300	ano	akrozom, bičík	akrozom, bičík	x
NAT 730	GPR30 (H-300): sc-134576	1:50	GAR 488	1:300	ano	akrozom, bičík	akrozom, bičík	x

Z této tabulky vyplývá, že některé specifické protilátky při nepřímém imunofluorescenčním mikroskopování nefungovaly vůbec.

Tabulka 4 – Výsledky detekce ERs ve tkáních (v kryožezech)

vzorky tkáně	fixace	oplach	primární protilátka	ředění primární protilátky	sekundární protilátka	ředění sekundární protilátky	fluorescence	poznámka
varle	aceton	PBS	ER α (C-311): sc-787	1:50	GAM 488	1:300	ano	nespecifické značení
varle	aceton	PBS	ER α (C-311): sc-787	1:40	GAM Cy5	1:500	ne	bez značení
nadvarle	aceton	PBS	ER α (C-311): sc-787	1:50	GAM 488	1:300	ano	nespecifické značení
nadvarle	aceton	PBS	ER α (C-311): sc-787	1:40	GAM Cy5	1:500	ne	bez značení
varle	aceton	PBS	ER β (L-20): sc-6822	1:50	DAG 488	1:300	ano	nespecifické značení
varle	aceton	PBS	ER β (L-20): sc-6822	1:40	DAG 488	1:300	ne	nespecifické značení
nadvarle	aceton	PBS	ER β (L-20): sc-6822	1:50	DAG 488	1:300	ano	nespecifické značení
nadvarle	aceton	PBS	ER β (L-20): sc-6822	1:40	DAG 488	1:300	ne	nespecifické značení
varle	aceton	PBS	GPER/GPR30 NLS4271	1:50	GAR 488	1:300	ano	nespecifické značení
varle	aceton	PBS	GPER/GPR30 NLS4271	1:40	GAR Cy5	1:500	ne	bez značení
varle	aceton	0,9% NaCl	GPER/GPR30 NLS4271	1:40	GAR Cy5	1:500	ne	bez značení
varle	aceton	0,9% NaCl	GPER/GPR30 NLS4271	1:40	GAR 555	1:500	ano	nespecifické značení
nadvarle	aceton	PBS	GPER/GPR30 NLS4271	1:50	GAR 488	1:300	ano	nespecifické značení
nadvarle	aceton	PBS	GPER/GPR30 NLS4271	1:40	GAR Cy5	1:500	ne	bez značení
nadvarle	aceton	0,9% NaCl	GPER/GPR30 NLS4271	1:40	GAR Cy5	1:500	ne	bez značení
nadvarle	aceton	0,9% NaCl	GPER/GPR30 NLS4271	1:40	GAR 555	1:500	ano	nespecifické značení

Tabulka 5 – Pořadí vzorků proteinových extraktů ze spermií nanášených do jamek akrylamidového gelu na SDS elektroforézu a Western blot.

VZPred = vzorkový pufr redukující, NAT = nativní dávka, ID = inseminační dávka, ST = proteinový standard, EP = epididymální spermie, EJ = ejakulované spermie, KAP = kapacitované spermie, AR = spermie po akrozomální reakci

POŘADÍ VZORKU	GEL 1	GEL 2	GEL 3	GEL 4	GEL 5
1	VZPred	VZPred	VZPred	VZPred	VZPred
2	NAT EJ 700	ID EJ 668+711	ID EJ 740+679	NAT EJ 710	NAT EJ 744
3	NAT EJ 730	ID EJ 730+740	ID EJ 756+673	NAT EJ 730	NAT EJ 679
4	ID EJ 711	ID KAP 668+711	ID KAP 740+679	NAT KAP 710	NAT KAP 744
5	ID EJ 685+673	ID KAP 730+740	ID KAP 756+673	NAT KAP 730	NAT KAP 679
6	ID EJ 700+679	ID AR 668+711	ID AR 740+679	NAT AR 710	NAT AR 744
7	ST ALL BLUE	ID AR 730+740	ID AR756+673	NAT AR 730	NAT AR 679
8	NAT KAP 700	ST ALL BLUE	ST ALL BLUE	ST ALL BLUE	ST ALL BLUE
9	NAT KAP 730	ID EJ 668+711	ID EJ 740+679	NAT EJ 710	NAT EJ 744
10	ID KAP 685+673	ID EJ 730+740	ID EJ 756+673	NAT EJ 730	NAT EJ 679
11	ID KAP 700+679	ID KAP 668+711	ID KAP 740+679	NAT KAP 710	NAT KAP 744
12	NAT AR 700	ID KAP 730+740	ID KAP 756+673	NAT KAP 730	NAT KAP 679
13	NAT AR 730	ID AR 668+711	ID AR 740+679	NAT AR 710	NAT AR 744
14	ID AR 685+673	ID AR 730+740	ID AR 756+673	NAT AR 730	NAT AR 679
15	ID AR 700+679	VZPred	VZPred	VZPred	VZPred

POŘADÍ VZORKU	GEL 6	GEL 7	GEL 8	GEL 9	GEL 10
1	VZPred	VZPred	VZPred	VZPred	EP1 HLAVA
2	ID EJ 679+744	ID EJ 734+668+745	NAT EJ 700	ID EJ 734+668+745	EP2 TĚLO
3	ID EJ 717+741	ID EJ 756+700	NAT EJ 730	ID EJ 717+741	EP3 OCAS
4	ID KAP 679+744	ID KAP 734+668+745	NAT KAP 700	ID KAP 734+668+745	ST DUAL COLOR
5	ID KAP 717+741	ID KAP 756+700	NAT KAP 730	ID KAP 717+741	EP1 HLAVA
6	ID AR 679+744	ID AR 734+668+745	NAT AR 700	ID AR 734+668+745	EP2 TĚLO
7	ID AR 717+741	ID AR 756+700	NAT AR 730	ID AR 717+741	EP3 OCAS
8	ST DUAL COLOR	ST DUAL COLOR	ST DUAL COLOR	ST DUAL COLOR	ST DUAL COLOR
9	ID EJ 679+744	ID EJ 734+668+745	NAT EJ 700	ID EJ 685+673	EP1 HLAVA
10	ID EJ 717+741	ID EJ 756+700	NAT EJ 730	ID EJ 700+679	EP2 TĚLO
11	ID KAP 679+744	ID KAP 734+668+745	NAT KAP 700	ID KAP 685+673	EP3 OCAS
12	ID KAP 717+741	ID KAP 756+700	NAT KAP 730	ID KAP 700+679	ST DUAL COLOR
13	ID AR 679+744	ID AR 734+668+745	NAT AR 700	ID AR 685+673	EP1 HLAVA
14	ID AR 717+741	ID AR 756+700	NAT AR 730	ID AR 700+679	EP2 TĚLO
15	VZPred	VZPred	VZPred	VZPred	EP3 OCAS

Tabulka 6 – Výsledky značení ERs na NC membráně po imunodetekci

vzorky spermií na jedné membráně	primární protilátka	ředění primární protilátky	sekundární protilátka	ředění sekundární protilátky	značení
ID 668+711 ID 730+740	ER α (C-311): sc-787	1:500	anti mouse HRP	1:3000	ano
EP1, EP2, EP3	ER α (C-311): sc-787	1:250	anti mouse HRP	1:3000	ano
ID 679+744, ID 717+741	ER α (C-311): sc-787	1:250	anti mouse HRP	1:3000	ne
ID 734+668+745, ID 756+700	ER α (C-311): sc-787	1:250	anti mouse HRP	1:3000	ne
ID 740+679, ID 756+673	ER α (C-311): sc-787	1:250	anti mouse HRP	1:3000	ano
NAT 700, NAT 730	ER α (C-311): sc-787	1:250	anti mouse HRP	1:3000	ano
NAT 744, NAT 679	ER α (C-311): sc-787	1:250	anti mouse HRP	1:3000	ano
ID 740+679, ID 756+673	ER α (HC-20) sc-543	1:250	anti rabbit HRP	1:3000	ano
NAT 744, NAT 679	ER α (HC-20) sc-543 jiná šarže	1:250	anti rabbit HRP	1:3000	ne
ID 668+711, ID 730+740	ER β (1531): sc-53494	1:500	anti mouse HRP	1:3000	ano
ID 679+744, ID 717+741	ER β (1531): sc-53494	1:500	anti mouse HRP	1:3000	ne
NAT 700, NAT 730, ID 711, ID 685+673, ID 700+679	ER β (1531): sc-53494	1:500	anti mouse HRP	1:3000	ano
EP1, EP2, EP3	ER β (1531): sc-53494	1:250	anti mouse HRP	1:3000	ne
ID 734+668+745, ID 756+700	ER β (1531): sc-53494	1:250	anti mouse HRP	1:3000	ne
ID 740+679, ID 756+673	ER β (1531): sc-53494	1:250	anti mouse HRP	1:3000	ne
NAT 700, NAT 730	ER β (1531): sc-53494	1:250	anti mouse HRP	1:3000	ne
ID 734+668+745, ID 756+700	ER β (H-150): sc-8974	1:250	anti rabbit HRP	1:3000	ano
ID 734+668+745, ID 756+700	ER β (L-20): sc-6822	1:250	anti goat HRP	1:1000	ne
NAT 700, NAT 730	ER β (L-20): sc-6822	1:250	anti goat HRP	1:3000	ne
NAT 700, NAT 730, ID 711, ID 685+673, ID 700+679	ER β (L-20): sc-6822	1:250	anti goat HRP	1:3000	ne
ID 668+711, ID 730+740	GPER/GPR30 NBP1-31239	1:500	anti rabbit HRP	1:3000	ano
NAT 700, NAT 730	GPER/GPR30 NBP1-31239	1:500	anti rabbit HRP	1:3000	ano
NAT 744, NAT 679	GPER/GPR30 NBP1-31239	1:500	anti rabbit HRP	1:3000	ano
EP1, EP2, EP3	GPER/GPR30 NLS4271	1:500	anti rabbit HRP	1:3000	ano
ID 700+679, ID 685+673	GPER/GPR30 NLS4271	1:500	anti rabbit HRP	1:3000	ano
ID 717+741, ID 734+668+745	GPER/GPR30 NLS4271	1:500	anti rabbit HRP	1:3000	ano
NAT 710, NAT 730	GPR30 (H-300): sc-134576	1:500	anti rabbit HRP	1:3000	ano
ID 740+679, ID 756+673	GPR30 (H-300): sc-134576	1:250	anti rabbit HRP	1:3000	ano

Z této tabulky lze rovněž vyčíst, že některé typy protilátek nefungovaly příliš spolehlivě.

Tabulka 7 – Shrnutí výsledků zjištěných detekcí ERs na NC membránách a spermií na sklech

protilátka	vzorek	značení na NC membráně	značení spermií na sklech
ER α (C-311): sc-787	NAT 679	ano	ano
ER α (C-311): sc-787	NAT 744	ano	ano
ER α (C-311): sc-787	EP1, EP2, EP3	ano	ne
ER α (C-311): sc-787	ID 668+711	ano	ne
ER α (C-311): sc-787	ID 730+740	ano	ne
ER α (C-311): sc-787	ID 740+679	ano	ano
ER α (C-311): sc-787	ID 756+673	ano	ano
ER α (C-311): sc-787	NAT 700	ano	ano
ER α (C-311): sc-787	NAT 730	ano	ano
ER α (C-311): sc-787	ID 734+668+745	ne	ne
ER α (C-311): sc-787	ID 756+700	ne	ne
ER α (C-311): sc-787	ID 679+744	ne	pokus neproveden
ER α (C-311): sc-787	ID 717+741	ne	pokus neproveden
ER α (HC-20) sc-543	ID 740+679	ano	ano
ER α (HC-20) sc-543	ID 756+673	ano	ano
ER α (HC-20) sc-543 jiná šarže	NAT 679	ne	ano
ER α (HC-20) sc-543 jiná šarže	NAT 744	ne	ano
ER β (1531): sc-53494	ID 668+711	ano	ne
ER β (1531): sc-53494	ID 685+673	ano	ne
ER β (1531): sc-53494	ID 700+679	ano	ne
ER β (1531): sc-53494	ID 711 EJ	ano	ne
ER β (1531): sc-53494	ID 730+740	ano	ne
ER β (1531): sc-53494	NAT 700	ano	ne
ER β (1531): sc-53494	NAT 730	ano	ne
ER β (1531): sc-53494	EP1, EP2, EP3	ne	ne

protilátka	vzorek	značení na NC membráně	značení spermií na sklech
ER β (1531): sc-53494	ID 734+668+745	ne	ne
ER β (1531): sc-53494	ID 756+700	ne	ne
ER β (1531): sc-53494	ID 679+744	ne	pokus neproveden
ER β (1531): sc-53494	ID 717+741	ne	pokus neproveden
ER β (1531): sc-53494	ID 740+679	ne	pokus neproveden
ER β (1531): sc-53494	ID 756+673	ne	pokus neproveden
ER β (1531): sc-53494	NAT 700 OPAKOVANÝ POKUS	ne	pokus neproveden
ER β (1531): sc-53494	NAT 730 OPAKOVANÝ POKUS	ne	pokus neproveden
ER β (H-150): sc-8974	ID 734+668+745	ano	ano
ER β (H-150): sc-8974	ID 756+700	ano	ano
ER β (L-20): sc-6822	NAT 700	ne	ano
ER β (L-20): sc-6822	ID 734+668+745	ne	ne
ER β (L-20): sc-6822	ID 756+700	ne	ne
ER β (L-20): sc-6822	NAT 730	ne	ne
ER β (L-20): sc-6822	ID 685+673	ne	ne
ER β (L-20): sc-6822	ID 700+679	ne	ne
ER β (L-20): sc-6822	ID 711 EJ	ne	ne
GPÉR/GPR30 NBP1-31239	ID 668+711	ano	ne
GPÉR/GPR30 NBP1-31239	ID 730+740	ano	ne
GPÉR/GPR30 NBP1-31239	NAT 679	ano	ne
GPÉR/GPR30 NBP1-31239	NAT 700	ano	ne
GPÉR/GPR30 NBP1-31239	NAT 730	ano	ne
GPÉR/GPR30 NBP1-31239	NAT 744	ano	ne
GPÉR/GPR30 NLS4271	EP1, EP2, EP3	ano	ano
GPÉR/GPR30 NLS4271	ID 685+673	ano	ano
GPÉR/GPR30 NLS4271	ID 700+679	ano	ano
GPÉR/GPR30 NLS4271	ID 717+741	ano	ano
GPÉR/GPR30 NLS4271	ID 734+668+745	ano	ano
GPR30 (H-300): sc-134576	ID 740+679	ano	ano
GPR30 (H-300): sc-134576	ID 756+673	ano	ano
GPR30 (H-300): sc-134576	NAT 710	ano	ano
GPR30 (H-300): sc-134576	NAT 730	ano	ano

Z této tabulky vyplývá, že některé specifické protilátky nemusí být pro danou analytickou metodu vhodné. Protilátky ER α (C-311) a ER β (1531): sc-53494 nefungovaly na membránách příliš spolehlivě, detekovat ERs se podařilo jen v některých případech. Protilátka ER β (L-20): sc-6822 neznačila na membránách vůbec. Při nepřímé imunofluorescenci na spermiích neznačily protilátky: ER β (1531): sc-53494, ER β (L-20): sc-6822 a GPÉR/GPR30 NBP1-31239. Také jsou zde znázorněny rozdíly v detekci u některých vzorků, které mohou být způsobené individualitou kanců nebo drobnými odchylkami při zpracování vzorků.

Tabulka 8 – Statistické hodnocení proteinu ESR1 pomocí T-testu – výstup z programu STATISTICA

Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky Pozn.: Proměnné byly brány jako nezávislé vzorky										
	Průměr skup. 1	Průměr skup. 2	Hodnota t	s v	p	Poč.plat. skup. 1	Poč.plat. skup. 2	Sm.odch. skup. 1	Sm.odch. skup. 2	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly
EJ vs. KAP	0,561481	1,201304	-4,91440	2	0,038999	2	2	0,182715	0,022716	64,69767	0,157486
EJ vs. AR	0,561481	1,366855	-5,06227	2	0,036877	2	2	0,182715	0,131289	1,93682	0,793312
KAP vs. AR	1,201304	1,366855	-1,75717	2	0,220968	2	2	0,022716	0,131289	33,40413	0,218138

Existuje statisticky významný rozdíl mezi ejakulovanými spermii a spermii po kapacitaci v množství ESR1.

Existuje statisticky významný rozdíl mezi ejakulovanými spermii a spermii po akrozomální reakci v množství ESR1.

Neexistuje statisticky významný rozdíl mezi spermii po kapacitaci a spermii po akrozomální reakci v množství ESR1.

Tabulka 9 – Statistické hodnocení proteinu ESR2 pomocí T-testu – výstup z programu STATISTICA

Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky Pozn.: Proměnné byly brány jako nezávislé vzorky										
	Průměr skup. 1	Průměr skup. 2	Hodnota t	s v	p	Poč.plat. skup. 1	Poč.plat. skup. 2	Sm.odch. skup. 1	Sm.odch. skup. 2	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly
EJ vs. KAP	0,843825	0,374578	2,92892	2	0,099479	2	2	0,220865	0,050541	19,09714	0,286426
EJ vs. AR	0,843825	0,575137	1,70496	2	0,230318	2	2	0,220865	0,029818	54,86547	0,170861
KAP vs. AR	0,374578	0,575137	-4,83346	2	0,040238	2	2	0,050541	0,029818	2,87297	0,678658

Neexistuje statisticky významný rozdíl mezi ejakulovanými spermii a spermii po kapacitaci v množství ESR2.

Neexistuje statisticky významný rozdíl mezi ejakulovanými spermii a spermii po akrozomální reakci v množství ESR2.

Existuje statisticky významný rozdíl mezi spermii po kapacitaci a spermii po akrozomální reakci v množství ESR2.

Tabulka 10 – Statistické hodnocení proteinu GPER pomocí T-testu – výstup z programu STATISTICA

Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky Pozn.: Proměnné byly brány jako nezávislé vzorky										
	Průměr skup. 1	Průměr skup. 2	Hodnota t	s v	p	Poč.plat. skup. 1	Poč.plat. skup. 2	Sm.odch. skup. 1	Sm.odch. skup. 2	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly
EJ vs. KAP	0,844787	0,825695	0,106776	2	0,924712	2	2	0,219505	0,125534	3,057505	0,661445
EJ vs. AR	0,844787	0,765271	0,456545	2	0,692785	2	2	0,219505	0,111742	3,858862	0,599531
KAP vs. AR	0,825695	0,765271	0,508453	2	0,661672	2	2	0,125534	0,111742	1,262095	0,926073

Neexistuje statisticky významný rozdíl mezi ejakulovanými spermii, spermii po kapacitaci a spermii po akrozomální reakci v množství GPER.