

AUTOREFERAT

opis dorobku i osiągnięć naukowych

Dr inż. Marzena Mogielnicka-Brzozowska

Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

ul. Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn
tel. (089) 523 54 59
e-mail: mmog@uwm.edu.pl

Olsztyn 2016

<i>Spis treści</i>	<i>Strona</i>
1. Życiorys naukowy	3
2. Prace wskazane jako szczególne osiągnięcie naukowe, o którym mowa w artykule 16 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki; Dz. U. 2003, Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami.	4
3. Omówienie szczególnego osiągnięcia naukowego	5
4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych	27
5. Podsumowanie dorobku naukowego	35

Załącznik 1

Top lista 20 najlepszych publikacji z tego samego obszaru nauki w 2012, 2014, 2015, 2016 roku według BioMedical Library Uniwersytetu Minnesota w USA.

1. ŻYCIORYS NAUKOWY

1. Imię i nazwisko

Marzena Mogielnicka-Brzozowska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2000 (19 czerwca) – tytuł zawodowy: **magister inżynier nauk rolniczych**, Wydział Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

2006 (10 listopada) - stopień naukowy: **doktor nauk rolniczych**, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, tytuł rozprawy doktorskiej: „Identyfikacja białek wiążących heparynę, fosforylocholinę i jony Zn^{2+} w plazmie nasienia knura”. promotor: prof. zw. dr hab. Jerzy Strzeżek

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

01.09.2000- 15.04.2007 –Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt, asystent

15.04.2007 - do chwili obecnej, Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt, adiunkt

9.06.2008 - 31.12.2009 - POST-DOC University of Manitoba, Canada, Department of Animal Science

2. PRACE WSKAZANE JAKO SZCZEGÓLNE OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

„Struktury proteomiczne plazmy nasienia psa – charakterystyka biochemiczna oraz ich wpływ na wybrane funkcje plemników”

Publikacja	IF	pkt	Liczba cytowań
3.1. Mogielnicka-Brzozowska M.* , Fraser L., Czarzasta J., Kordan W. 2012. <i>Isolation and characterization of zinc-binding proteins from canine seminal plasma</i> . Polish Journal of Veterinary Science 15 (3) 493-498.	0,57	20	7
3.2. Mogielnicka-Brzozowska M.* , Dziekońska A., Strzeżek R., Załęcki M., Majewska A., Tołścik K., Kordan W. 2014 <i>Effect of zinc-binding proteins of seminal plasma on motility and membrane integrity of canine spermatozoa stored at 5°C</i> . Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy 58 (1) 163-168.	0,357	15	3
3.3. Mogielnicka-Brzozowska M.* , Strzeżek R., Wasilewska K., Kordan W. 2015 <i>Prostasomes of canine seminal plasma - zinc-binding ability and effects on motility characteristics and plasma membrane integrity of spermatozoa</i> . Reproduction in Domestic Animals 50: 484-491. DOI: 10.1111/rda.12516.	1,21	25	1
3.4. Mogielnicka-Brzozowska M.* , Kowalska N., Fraser L., Kordan W. 2015 <i>Proteomic characterization of zinc-binding proteins of canine seminal plasma</i> . Reproduction in Domestic Animals 50: 1017-1021. doi: 10.1111/rda.12629.	1,21	25	1
Podsumowanie	3,347	85	12

Impact factor (IF) podano według listy Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania publikacji; punkty MNiSW według wykazu czasopism naukowych (lista A) opublikowanego przez MNiSW 31 grudnia 2015; liczbę cytowań według ISI Web of Science (z 25.07.2016). * - autor korespondencyjny

Wkład Wnioskodawcy w wyżej wymienione prace przedstawiono w załączniku nr. 3, natomiast oświadczenia współautorów w załączniku nr. 7.

3. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

3.1. Wstęp

Proteomika jest to nauka zajmująca się proteomem. Proteom to zestaw wszystkich białek występujących w komórce, tkance czy organizmie, w określonym czasie. Liczba i rodzaj białek zmieniają się w zależności od stanu fizjologicznego organizmu, jego fazy rozwoju oraz warunków środowiska. Proteomika umożliwia nie tylko identyfikację składu białkowego, ale przede wszystkim poszukuje różnic w ekspresji białek oraz ich modyfikacjach potranslacyjnych w określonych warunkach (np. stanach chorobowych czy w odpowiedzi na warunki środowiska). Badania proteomiczne są niezbędnym narzędziem służącym do identyfikacji właściwości i funkcji białek biorących udział w mechanizmach regulacyjnych procesów rozrodczych. Metody proteomiczne mają zastosowanie w diagnozowaniu płodności samca dzięki poznaniu stanu fizjologicznego poszczególnych organów oraz komórek rozrodczych. Proteomika stanowi doskonałe narzędzie umożliwiające badanie interakcji białek plazmy nasienia z plemnikami oraz mechanizmów wiązania plemnik – komórka jajowa, w których pośredniczą niskocząsteczkowe ligandy typu jonowego, lipidowego lub węglowodanowego (Mogielnicka-Brzozowska i Kordan, 2011). Omawiany obszar nauki skupia się również na analizie składu białkowego struktur występujących w nasieniu takich jak, prostasomy, wesikulosomy czy epididymosomy. Strategie używane do analizy proteomu ssaków pokazują, że proteomika nie opiera się jedynie na identyfikacji i pomiarze ilościowym białek, ale również dotyczy badań: struktury, lokalizacji, modyfikacji, interakcji, aktywności i funkcji białek (Strzeżek i wsp., 2005).

Do podstawowych metod stosowanych w badaniach proteomicznych należą: elektoroforeza jednokierunkowa SDS-PAGE, elektroforeza dwukierunkowa (2D-PAGE) oraz różne typy spektrometrii mas (MS). Do dzisiaj nie wynaleziono metody

pozwalającej na uzyskanie lepszej rozdzielczości zespołu białek niż elektroforeza dwukierunkowa w żelu poliakryloamidowym (2D-PAGE), dlatego jest ona kluczową metodą analityczną proteomiki. Umożliwia ona badanie różnic w ekspresji pojedynczych białek zależnie od zmian stanu fizjologicznego, wieku, sezonu rozrodczego czy stanu chorobowego. Jakkolwiek 2D-PAGE pokazuje zmiany poziomu ekspresji białek, to nie jest w stanie wykryć interakcji białko-białko czy dostarczyć informacji o funkcjach zobrazowanych białek. Aby tego dokonać konieczne jest użycie metod chromatograficznych, między innymi, takich jak chromatografia powinowactwa (AC-affinity chromatography) czy filtracja żelowa (GF-gel filtration). Do kluczowych metod od kilku lat uznawanych za nieodzowne w badaniach proteomicznych zaliczyć należy spektrometrię mas (MS – mass spectrometry). Jest to technika analityczna zaliczana do metod spektroskopowych, której podstawą jest pomiar stosunku masy do ładunku elektrycznego danego jonu. Metoda ta umożliwia z dużym prawdopodobieństwem identyfikację białka po porównaniu peptydów powstałych po jego trawieniu trypsyną z bazą znanych peptydów tworzących znane białka dla danego gatunku. Proteomika funkcjonalna pozwala na zgromadzenie szczegółowych informacji o interakcjach białko-białko, białko-ligand, białko-komórka oraz o wynikających z tego funkcjach biologicznych.

Proteomika znajduje coraz większe zastosowanie w wyjaśnianiu zjawisk towarzyszących procesom reprodukcyjnym, a w praktyce jest pomocna w precyzyjnym sterowaniu rozrodem zwierząt. Proteomika reprodukcyjna stara się odpowiedzieć na następujące pytania: Jakie białka występują w tkankach i płynach ustrojowych układu rozrodczego oraz na i w gametach? Jakim zmianom podlegają poszczególne peptydy lub grupy peptydów w zależności od warunków środowiskowych lub stanów fizjologicznych? Jakie białka można wyróżnić i określić jako skorelowane z płodnością u poszczególnych gatunków zwierząt, co może być pomocne w przyszłości w konstruowaniu komercyjnych testów do diagnozowania płodności samca lub przydatności jego nasienia do konserwacji.

Najczęściej przy wykorzystaniu proteomiki reprodukcyjnej bada się proteom tkanek lub płynów układu rozrodczego samca, plazmy nasienia oraz plemników i poszukuje się korelacji pomiędzy poziomem ekspresji poszczególnych białek a

parametrami jakościowymi nasienia kluczowymi dla pomyślnego przebiegu procesu zapłodnienia komórki jajowej.

Plazma nasienia zawiera szereg substancji niezbędnych plemnikom, do ich dojrzewania i uzyskania ruchliwości, co w późniejszym czasie warunkuje prawidłowy przebieg procesu zapłodnienia komórki jajowej. Spośród całej gamy komponentów peptydy i białka zasługują na szczególną uwagę, ponieważ odgrywają kluczową rolę w regulacji zjawisk towarzyszących procesowi zapłodnienia komórki jajowej. Białka plazmy nasienia wydzielane przez jądra i najądrza wpływają na dojrzewanie plemników (Manjunath i wsp., 1994.). Następnie podczas ejakulacji dochodzi do opłaszczania plazmoemy plemników przez białka gruczołów pęcherzykowych, co prowadzi do stabilizacji plazmoemy w różnych regionach plemnika do czasu kapacytacji (Topfer-Petersen i wsp., 2005). Ważny jest udział białek plazmowych w tworzeniu rezerwuarów plemników w jajowodzie oraz regulacji ich ruchliwości (Jelinkova i wsp., 2004). Z kolei podczas wędrówki plemników w drogach rodnych samicy odgrywają one rolę immunosupresyjną (Kwok i wsp., 2003). Pełnią też funkcje antyoksydacyjne i antybakteryjne (Koziorowska-Gilun i wsp., 2011). Podczas kontaktu plemnika z komórką jajową odpowiadają za interakcję gamet oraz przebieg reakcji akrosomowej (Calvete i wsp., 1994). Na wszystkich tych etapach funkcje białek podlegają precyzyjnym mechanizmom regulacyjnym nierozłącznie związanym ze zdolnościami wiązania różnorodnych ligandów.

Białka o zdolnościach wiązania jonów cynkowych odgrywają istotną rolę na wielu etapach procesu zapłodnienia. Wpływają na stabilność chromatyny plemnikowej, regulują ruchliwość plemników, odgrywają rolę antyoksydacyjną, antybakteryjną i immunosupresyjną (Silvestroni i wsp., 1989, Assreuy i wsp., 2003, Vivacqua i wsp., 2004). Poza grupą wyizolowanych przez nasz zespół białek ZnBPs (Mogielnicka-Brzozowska i wsp., 2012) do najlepiej scharakteryzowanych białek plazmy nasienia knura wiążących jony cynkowe należą: peptydy o m.cz. 25, 38 i 64 kDa (Strzeżek i Hopfer, 1987), spermadhezyna PSPI/PSP II (Campanero-Rhodes i wsp., 2005) i glikoproteina 54kDa (Hołody i Strzeżek, 1999). W plazmie nasienia człowieka do ZnBPs należą semenogeliny I i II oraz antygen specyficzny dla prostaty (PSA) (Mogielnicka-Brzozowska i Kordan, 2011). Białka ZnBPs zidentyfikowano również w plazmie nasienia psa (Mogielnicka-Brzozowska i wsp., 2012), szczura (Sansone i Abrescia 1991) oraz

myszy (Huang i wsp., 1995). Niejednokrotnie znane nam właściwości omawianych substancji wynikają nie tylko ze zdolności wiązania jonów cynkowych, ale również innych dodatkowych ligandów (Mogielnicka-Brzozowska i Kordan, 2011).

Niektóre białka plazmy nasienia uznawane są za tzw. „markery” płodności (FAPs - ang. fertility associated proteins) i wykorzystywane jako wskaźniki jakości biologicznej nasienia. Do białek związanych z płodnością zidentyfikowanych u człowieka należy proteina o masie 57kDa, wyizolowana z błon plazmatycznych plemników (Rajeev i Reddy 2004). Odpowiada ona za wiązanie plemnika z komórką jajową, a jej nieobecność uniemożliwia zapłodnienie. Do innych białek plazmy nasienia człowieka, związanych z procesem zapłodnienia zaliczana jest semenogelina I. Jest to białko wiążące jony cynkowe, odpowiedzialne za proces koagulacji plemników. Wykazano jego zdolność wiązania innego białka - eppiny na powierzchni plemników. Powstawanie tego kompleksu jest kluczowe dla prawidłowego przebiegu procesu zapłodnienia. Przeciwciała przeciw eppinie blokują wiązanie semenogeliny, co powodować może zakłócenie tego procesu.

U kilku gatunków zwierząt gospodarskich i towarzyszących człowiekowi również odkryto białka związane z płodnością. Dla przykładu porównano białka ekstraktów plemnikowych uzyskanych od buhajów wykazujących wysoki oraz niski indeks płodności i stwierdzono, że podjednostki kompleksu T białka 1 (CCT5 i CCT8), dwie izoformy białka wiążącego plemniki najądrzowe E12 (ELSPBP1), typ 6 podjednostki α proteasomów i białko wiążące plemniki 1 (BSP1) wykazywały zwiększoną ekspresję w grupie osobników o niskim indeksie płodności (D'Amours i wsp., 2010). Izoenzym 1 kinazy adenylanowej (AK1) i białko 1 wiążące fosfatydyloetanolaminę (PEBP1) wykazywały większą ekspresję w grupie buhajów o wysokim indeksie płodności, w porównaniu do buhajów o niskim indeksie (D'Amours i wsp., 2010). W przypadku ogiera białko plazmy nasienia HSP 1/2 występowało w wyższej koncentracji w plazmach nasienia osobników charakteryzujących się obniżoną płodnością (Garcia i wsp., 2014). W plazmie nasienia knura również stwierdzono obecność czterech białek FAPs. Dwa z nich (55 kDa, pI 4,8 oraz 26 kDa, pI 6,2) wykazywały dodatnią korelację z płodnością. Autorzy stwierdzili, że wysoka koncentracja omawianych białek w plazmie nasienia knurów była wysoko skorelowana ze zdolnościami zapładniającymi nasienia, zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Zjawisko to przejawiało się wyższym

odsetkiem zapłodnień i liczbą prosiąt żywo urodzonych w miocie (Flowers i wsp., 2001).

Jedynie nieliczne doniesienia naukowe dotyczą badań proteomu nasienia psa. De Souza i wsp. (2006) przy wykorzystaniu elektroforezy SDS-PAGE uzyskali 19 frakcji białkowych wiążących heparynę o masach cząsteczkowych w zakresie od 5,2 - 61,5 kDa, z czego dwa białka 67 kDa i 58,6 kDa, zaliczono do białek związanych z płodnością tzw. FAPs. Zawartość tych protein jest dodatnio skorelowana z ruchliwością plemników, żywotnością, odsetkiem morfologicznie prawidłowych komórek oraz integralnością błon plazmatycznych omawianych komórek. Funkcja białek wiążących heparynę u psa nie została jeszcze w pełni poznana, jednak ze względu na poznanie ich roli u innych gatunków zwierząt, przypuszcza się, że biorą one udział w modulacji reakcji akrosomowej (Cancel i wsp., 1999).

Stosunkowo nowym zagadnieniem w badaniach z zakresu proteomiki są markery przydatności nasienia do konserwacji i przechowywania. Wiadomo, że plazma nasienia może pełnić funkcje osłaniające wobec błon plazmatycznych plemników przed udarem chodowym. Na podstawie analizy białek niskocząsteczkowych (10-30 kDa) plazmy nasienia, wykazano występowanie czterech z nich w ejakulatach ogierów o zwiększonej przydatności do kriokonserwacji nasienia. Białko o masie cząsteczkowej 25-26 kDa, (pI 6,0-6,5) występowało w wysokiej koncentracji w ejakulatach o obniżonej przydatności do mrożenia (Jobim i wsp., 2004).

Interesujące są prace dotyczące wykorzystania jako dodatku do rozcieńczalnika (do przechowywania w stanie płynnym) heterodimeru spermadhezyn PSP-I/PSP-II plazmy nasienia knura. Inkubacja plemników tego gatunku z izolowanym preparatem PSP-I/PSP-II lub spermadhezyny PSP-II, wywierała korzystny wpływ na zachowanie ich właściwości biologicznych, zwłaszcza wysokiego potencjału błon mitochondrialnych i ruchliwości plemników. Omawiane efekty były słabsze kiedy plemniki inkubowano tylko ze spermadhezyną PSP-I (Centurion i wsp., 2003).

Nadal trwają intensywne poszukiwania białek, które mogłyby stanowić marker raka prostaty u człowieka i psa. Wykazanie obecności lub braku takich białek pozwoliłoby postawić jednoznaczną diagnozę odnośnie występowania stanu patologicznego tego narządu i ustalenia strategii leczenia. Pierwszym białkiem uznanym

za taki marker u człowieka była prostatowa fosfataza kwaśna (AcP) oraz białko zwane antygenem specyficznym dla prostaty (PSA –ang. prostate specific antigen), są to białka badane u mężczyzn z podejrzeniem raka prostaty (Gobello i wsp., 2002). U psa są to odpowiednio fosfataza alkaliczna (AP-ang. alkaline phosphatase) i esteraza argininowa prostaty psa (CPSE ang. - canine prostate specific esterase). Wzrost zawartości w surowicy psa CPSE z 41 do 189 ng/ml, jest związany z przerostem prostaty.

Biorąc pod uwagę aktualny stan wiedzy dotyczący udziału substancji peptydowych i białkowych w regulacji procesów reprodukcyjnych samca podjęto badania, których celem była izolacja wybranych struktur proteomicznych plazmy nasienia psa ich charakterystyka biochemiczna oraz zbadanie wpływu na niektóre funkcje plemników.

3.2. Omówienie wyników prac wskazanych jako szczególne osiągnięcie naukowe

3.2.1. Mogielnicka-Brzozowska M.*, Fraser L., Czarzasta J., Kordan W. 2012. *Isolation and characterization of zinc-binding proteins from canine seminal plasma*. Polish Journal of Veterinary Science 15 (3) 493-498.

Cel pracy i uzasadnienie badań

Celem pracy była identyfikacja i charakterystyka białek plazmy nasienia psa wiążących jony cynkowe (ZnBPs) przy wykorzystaniu cynko-zależnej chromatografii powinowactwa i analiz elektroforetycznych. Ponadto podjęto próbę wyjaśnienia potencjalnej roli ZnBPs w procesach reprodukcyjnych u psów.

Wcześniejsze badania wykazywały, że jony cynkowe wydzielane przez prostatę i gruczoły pęcherzykowe wiążą się z różnymi białkami, które zaangażowane są w procesy związane z zapłodnieniem (Boursnell i wsp., 1975; Arver 1982; Hołody i Strzeżek 1999; Siciliano i wsp., 2000; Mogielnicka-Brzozowska i wsp., 2011). Do tej pory białka wiążące jony cynkowe (ZnBPs) zostały zidentyfikowane w plazmie nasienia człowieka (Arver 1982; Arver i Eliasson 1982; Siciliano i wsp., 2000) i knura (Boursnell i wsp., 1975; Strzeżek i wsp., 1987; Hołody i Strzeżek 1999; Mogielnicka-Brzozowska i wsp. 2011). Odnośnie pochodzenia jonów cynkowych obecnych w plazmie nasienia człowieka i psa, ich źródłem jest prostata (Johnson i wsp., 1969). Ważne znaczenie biologiczne cynku

wynika z jego zaangażowania w prawidłowy rozwój jąder oraz przebieg spermatogenezy. Cynk wpływa również znacząco na funkcje plemników (Henkel i wsp. 2001). Wykazano, że około 93% cynku znajduje się w witce plemników po ejakulacji (Henkel i wsp., 1999), podczas gdy pozostałe 7% występuje w główce, co przyczynia się do stabilności struktury chromatyny jądrowej plemników (Bjorndahl i Kvist 1990; Kvist i wsp., 1990). Przed podjęciem powyższych badań w dostępnej literaturze nie znaleziono żadnych informacji odnośnie występowania, budowy czy funkcji białek wiążących jony cynkowe w plazmie nasienia psa. Biorąc pod uwagę znaczenie jonów cynkowych oraz białek je wiążących w procesach rozrodczych u innych gatunków zwierząt, celowym wydawała się próba sprawdzenia, czy takie białka występują w nasieniu psa oraz jakie potencjalne funkcje mogą pełnić u tego gatunku?

Materiał i metody

W badaniach wykorzystano trzy psy mieszańce (w wieku od 3 do 5 lat). Ejakulatory (n = 6) pobierano od każdego psa dwukrotnie przez okres 2 tygodni (1 raz tygodniowo), przy użyciu metody manualnej. Każdy ejakulat odwirowywano (1000 x g, 15 min) w celu usunięcia plemników. Uzyskany nadsącz ponownie odwirowywano (10 000 x g, 10 min) w celu uzyskania plazmy nasienia. Powstały supernatant dializowano wobec dejonizowanej H₂O przez 24 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie zamrażano w -80 °C, do czasu dalszych analiz.

Całkowitą zawartość białka w próbach oznaczano metodą Lowryego i wsp., (1951). Białka plazmy nasienia niewiążące jony cynkowe (nZnBPs) oraz wiążące jony cynkowe (ZnBPs) izolowano przy wykorzystaniu chromatografii metalopowinowactwa według metody Hołody i Strzeżek (1999), z modyfikacjami Mogielnicka-Brzozowska i wsp. (2011). Uzyskane frakcje białkowe poddawano elektroforezie w warunkach niedenaturujących (PAGE) oraz w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) w żelu poliakrylamidowym według metody Laemmli (1970). Po wybarwieniu frakcji białkowych poddawano je analizie densytometrycznej przy wykorzystaniu programu MultiAnalyst.

Rezultaty badań i ich interpretacja

Profil elucyjny białek plazmy nasienia psa uzyskany po ich wymyciu ze złoża z jonami cynkowymi wykazał obecność dwóch głównych frakcji. Pik o wyższej zawartości

białka obejmował nZnBPs, natomiast pik o niższej zawartości białka stanowiły ZnBPs (4 do 10% o całkowitej zawartości białek plazmy nasienia psa).

Analiza elektroforetyczna uzyskanych frakcji przy wykorzystaniu metody PAGE wykazała, że zarówno nZnBPs jak i ZnBPs występują w stanie natywnym w postaci wysokocząsteczkowych agregatów o masach w zakresie 140 do 669kDa.

Elektroforeza SDS-PAGE wykazała, że w warunkach denaturujących i redukujących nZnBPs dysocjują do 8 frakcji białkowych o masach cząsteczkowych: 10,7; 14,2; 16,5; 17,8; 27,6; 63,4; 69,3 i 79,7kDa. Przy czym frakcje o masach 10,7 i 14,2 kDa stanowiły około 46-48% całkowitej zawartości nZnBPs. W przypadku nZnBPs elektroforeza wykazała obecność 13 frakcji o następujących masach cząsteczkowych: 11,6; 14,3; 16,2; 18,8; 20,1; 24,3; 27,6; 29,8; 50,1; 60,2; 70,2; 111,4; i 152,3kDa. Przy czym frakcje 11,6 i 14,3 kDa stanowiły około 28-30% całkowitej zawartości ZnBPs.

Wyniki omawianej pracy wykazały po raz pierwszy obecność w plazmie nasienia psa białek zarówno wiążących jak i niewiążących jony cynkowe. Stwierdzono, że występują one jako wysokocząsteczkowe agregaty, co jest zjawiskiem charakterystycznym dla białek plazmy nasienia innych gatunków. W warunkach denaturujących ZnBPs dysocjują do kilkunastu frakcji białkowych w zakresie mas cząsteczkowych od 11,6 do 152,3kDa. Zwłaszcza występujące w przewodzie białka niskocząsteczkowe wiążące jony cynkowe, potencjalnie mogą stanowić ważny element w przebiegu procesu zapłodnienia u psa. Dodatkowo w przyszłości ZnBPs mogą okazać się potencjalnymi markerami płodności lub przydatności nasienia psa do konserwacji, a także mogą być przydatne w doskonaleniu technologii reprodukcyjnych u tego gatunku.

3.2.2. Mogielnicka-Brzozowska M.*, Dziekońska A., Strzeżek R., Załęcki M., Majewska A., Tołścik K., Kordan W. 2014 *Effect of zinc-binding proteins of seminal plasma on motility and membrane integrity of canine spermatozoa stored at 5°C*. Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy 58 (1) 163-168.

Cel pracy i uzasadnienie badań

Celem badań było określenie wpływu ZnBPs na parametry ruchliwości, integralność błon plazmatycznych oraz status mitochondriów ejakulowanych plemników psa przechowywanych w temperaturze 5°C.

Jony cynkowe biorą udział w regulacji wielu funkcji plemników kluczowych dla prawidłowego przebiegu procesów związanych z zapłodnieniem. Zn²⁺ stabilizują

dwuwarstwę lipidową błon komórkowych (Silvestroni i wsp., 1989), wpływają na ruchliwość plemników oraz regulują przebieg reakcji akrosomowej (Henkel i wsp., 1999; Riffo i wsp., 1992). Podczas gdy biodostępny cynk jest związany z nisko lub wysokocząsteczkowymi ligandami (Bjorndahl i Kvist 1990), białka plazmy nasienia wydają się być pierwszoplanowymi cząsteczkami pośredniczącymi w oddziaływaniu jonów cynkowych na funkcje plemników. W dostępnej literaturze nie występują jednak informacje odnośnie wpływu białek plazmy nasienia psia wiążących jony cynkowe na parametry ruchliwości, integralność plazmolemy czy status mitochondriów plemników przechowywanych w obniżonej temperaturze.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło nasienie pobrane od 4 psów mieszańców (12 ejakulatów, 3 ejakulatory od każdego osobnika, jeden ejakulat tygodniowo). Nasienie pobierano metodą manualną. Plazmę nasienia uzyskiwano przez odwirowanie plemników przy 700 x g, przez 6 minut). Następnie supernatant ponownie odwirowywano przy 10000 x g, przez 10 minut. Tak uzyskaną plazmę nasienia zamrażano w temperaturze 80°C do czasu dalszych analiz. Osad plemników kilkakrotnie przemywano PBS. Białka nZnBPs oraz ZnBPs izolowano według metody Mogielnicka-Brzozowska i wsp. (2012). Uzyskane frakcje białkowe poddawano biotynylacji według metody Manaskova i Jonakowa (2008). Roztwór plemników w PBS (1:10) inkubowano z biotynylowanymi nZnBPs oraz biotynylowanymi ZnBPs przez 1h w 37°C. Po wykonaniu procedury wiązania biotynylowanych białek do plemników wykonywano rozmazy na szkiełkach mikroskopowych, a próby analizowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego (Zeiss LSM-700). Badanie wpływu dodatku białek nZnBPs oraz ZnBPs na plemniki przechowywane w 5°C poprzedzało przygotowanie następujących prób: grupa kontrolna - osad plemników zawieszano w PBS do koncentracji 30×10^6 . Grupa A z dodatkiem 0.8% nZnBPs. Grupa B z dodatkiem 0.8% ZnBPs. Próby do analiz pobierano natychmiast po ich przygotowaniu oraz po 1 godzinie inkubacji w 5°C. Ruchliwość plemników oceniano przy wykorzystaniu systemu Hamilton-Thorne Sperm Analyser IVOS. Integralność akrosomu oceniano według metody Watson (1975). Integralność plazmolemy badano przy użyciu fluorochromów SYBR-14 i jodku propydydy (PI) według metody Garner i Johnson, (1995). Aktywność mitochondriów oceniano z

wykorzystaniem fluorochromu JC-1 według metody Dziekońska i wsp., (2009). Analizy statystyczne wykonywano przy użyciu programu Statistica.

Rezultaty badań i ich interpretacja

Wyniki badań wskazują, że dodatek ZnBPs izolowanych z plazmy nasienia psa do mieszaniny inkubacyjnej plemników ejakulowanych i przechowywanych w temperaturze 5°C spowodował zachowanie parametrów ruchliwości i wpływał ochronnie na błony plemników poddanych warunkom udaru chłodowego. Użyte techniki fluorescencyjne pozwoliły na wykazanie, że ZnBPs opłaszczają głównie akrosom i witkę ejakulowanych plemników psa, dzięki czemu mogą wywierać efekt protekcyjny, zapobiegając uszkodzeniu tych struktur w niekorzystnych warunkach fizjologicznych lub w trakcie przechowywania nasienia. Białka niewiążące jony cynkowe (nZnBPs) plazmy nasienia wywierały jedynie nieznaczny wpływ ochronny na parametry ruchliwości i integralność plazmolemy plemników psa. Zjawisko to podkreśla znaczenie zdolności wiązania jonów cynkowych przez białka plazmy nasienia w odniesieniu do ich właściwości ochronnych w stosunku do plemników.

Zaprezentowane rezultaty badań podkreślają istotną rolę białek plazmy nasienia w zabezpieczeniu odpowiedniej ilości i dostępności jonów cynkowych jako komponentu wpływającego bezpośrednio lub pośrednio na ruchliwość i stan plazmolemy plemników psa.

3.2.3. Mogielnicka-Brzozowska M.*, Strzeżek R., Wasilewska K., Kordan W. 2015 *Prostasomes of canine seminal plasma - zinc-binding ability and effects on motility characteristics and plasma membrane integrity of spermatozoa. Reproduction in Domestic Animals* 50: 484-491.

Cel pracy i uzasadnienie badań

Celem badań było wykazanie zdolności prostasomów do wiązania jonów cynkowych, jak również zbadanie ich wpływu na parametry ruchliwości plemników oraz integralności błon plazmatycznych tych komórek przechowywanych w warunkach udaru chłodowego.

Prostasomy są to małe pęcherzyki otoczone błonami lipidowymi, które biorą udział w różnych procesach związanych z zapłodnieniem. Struktury te wyizolowano z plazmy nasienia człowieka i niektórych gatunków zwierząt (Davis 1973; Arienti i wsp.,

1998; El-Hajj Ghaoui i wsp., 2004, Piehl i wsp., 2006). W przypadku psa literatura dotycząca funkcji prostasomów jest bardzo ograniczona (Zelli i wsp., 2012; Ronquist i wsp., 2013). Prostasomy wydzielane do plazmy nasienia mogą wchodzić w interakcje z błonami plazmatycznymi plemników, co ma związek z regulacją takich procesów jak dojrzewanie plemników, kapacytacja i reakcja akrosomowa (Saez i wsp., 2003; El-Hajj Ghaoui i wsp., 2004, Sostaric i wsp., 2008, Caballero i wsp., 2011). Pęcherzyki te odgrywają również rolę antyoksydacyjną i antybakteryjną (Saez i wsp., 1998; Carlsson i wsp., 2000; Mourwaki i wsp., 2010). Ruchliwość plemników i integralność ich błon plazmatycznych są kluczowe dla procesu zapłodnienia. Zarówno wolny cynk, jak też białka o zdolnościach wiązania jonów cynkowych w plazmie nasienia mają możliwość wpływania na fizjologię plemników (Mogielnicka i Kordan 2011; Mogielnicka-Brzozowska i wsp., 2011, 2014). Wiadomo, że prostasomy plazmy nasienia człowieka wiążą jony cynkowe i pełnią funkcje regulujące ruchliwość plemników (Vivacqua i wsp., 2001). W odniesieniu do nasienia psa nie poznano jeszcze żadnych funkcji fizjologicznych prostasomów.

Materiał i metody

Badania zostały podzielone na dwa eksperymenty. Eksperyment 1. Obejmował izolację prostasomów i charakterystykę biochemiczną uzyskanych frakcji. Eksperyment 2. Dotyczył wpływu prostasomów na parametry ruchliwości i integralność błon plazmatycznych plemników psa przechowywanych w temperaturze 5°C przez 2 godziny. W eksperymencie 1. nasienie pobierano metodą manualną od 5 psów mieszańców (35 ejakulatów, 5 od każdego osobnika). Plazmę nasienia oddzielano od plemników przez odwirowanie, najpierw przy 700 x g przez 15 minut. Następnie uzyskany w ten sposób supernatant ponownie odwirowywano przy 10 000 x g przez 10 minut. W eksperymencie 2. nasienie pobierano identycznie jak w eksperymencie 1. od tych samych osobników. Po obliczeniu koncentracji plemniki odwirowywano (700 x g, przez 15 minut) i zawieszano w PBS. Próbę kontrolną stanowiły plemniki rozcieńczone do koncentracji 30×10^6 PBS. Próbę A, B i C przygotowywano jw., dodając odpowiednio prostasomy (PI) do koncentracji 1,5; 2,0; 2,5 %. Charakterystyki nasienia dokonywano w próbach bezpośrednio po rozcieńczeniu (czas 0), a następnie po 1 i po 2 godzinach inkubacji w 5°C.

W eksperymencie 1. prostasomy wyizolowano przy użyciu metody Arienti *wsp.*, (1998) z modyfikacjami. Plazmy nasienia 5 psów zostały połączone i podzielone na próby po 8 ml, następnie odwirowane przy 105 000 x g przez 120 minut w ultrawirówce. Uzyskany osad (PI) rozpuszczano przez wielokrotne pipetowanie w buforze o składzie 30 mM Tris, 130 mM NaCl pH 7.6). 1 ml tak przygotowanego roztworu наносono na kolumnę wypełnioną złożem Superose 6. Po przeprowadzeniu rozdzału chromatograficznego uzyskiwano frakcje, które ponownie ultrawirovano, otrzymując w ten sposób osad prostasomów okreśłany jako PII, który używany był następnie do analiz przy wykorzystaniu mikroskopu transmisyjnego (TEM) oraz do chromatografii metalopowinowactwa. Frakcje prostasomów niewiązące jony cynkowe (P⁻Zn) oraz wiążące jony cynkowe (P⁺Zn), izolowano według metody Mogielnicka-Brzozowska i *wsp.* (2012). Rozdzału elektroforetycznego (SDS PAGE) dokonywano przy użyciu metody Mogielnicka-Brzozowska i *wsp.* (2012).

W eksperymencie 2 parametry ruchliwosci plemnikow okreśłano wykorzystując system analizy komputerowej Hamilton-Thorne Sperm Analyser IVOS. Analizowano TMOT, PMOT, VCL, VLS i VAP. Integralność błon plazmatycznych plemnikow badano przy użyciu barwienia fluorescencyjnego, z wykorzystaniem fluorochromow SYBR-14/PI, według metody Garner i Johnson (1995) z modyfikacjami Fraser i *wsp.* (2007). Integralność akrosomu badano przy użyciu metody Watson (1975) z modyfikacjami Fraser i *wsp.*, (2007). Analizy statystyczne wykonywano przy pomocy pakietu Statistica.

Rezultaty badań i ich interpretacja

W prezentowanych badaniach po raz pierwszy wykonano izolację prostasomow psa z wykorzystaniem zloza Superose 6 w odróżnieniu od standardowej izolacji na zlozu Sephadex G-200, co pozwoliło znacznie skrócić czas procedury bez starty jakości materiału biologicznego. W celu identyfikacji prostasomow w izolowanych frakcjach zastosowano mikroskop transmisyjny (TEM), co pozwoliło na wykazanie obecności pęcherzykow błonowych o średnicy 20.3 do 301 nm (85.5 nm średnio). Zelli i *wsp.* (2012) okreśłili średnicę prostasomow psa na 24,4 do 716.6 nm (117.6 nm średnio).

Do chwili obecnej funkcje prostasomow psa pozostawały nieznanne. Wyniki naszych badań dowodzą, że prostasomy wywierają pozytywny wpływ na parametry ruchliwosci plemnikow psa przechowywanych w temperaturze 5°C w porównaniu do plemnikow przemytych PBS inkubowanych bez dodatku prostasomow.

Najkorzystniejsze efekty były widoczne przy zastosowaniu dodatku 2% prostasomów w mieszaninie inkubacyjnej. Wskazuje to na fakt, iż koncentracja fizjologiczna prostasomów wywiera najlepszy efekt ochronny dla zachowania ruchliwości plemników przechowywanych w obniżonej temperaturze.

Dodatkowo wykazano, że dodatek prostasomów do mieszaniny inkubacyjnej w koncentracji 1,5 do 2% całkowitej zawartości białek plazmy nasienia wywierał pozytywny wpływ na zachowanie integralności błon plazmatycznych, w tym błony akrosomowej plemników psa przechowywanych w obniżonej temperaturze. Taki efekt potwierdzają badania innych autorów wskazujące, że fuzja prostasomów z błonami plazmatycznymi zapobiega przedwczesnej reakcji akrosomowej (Burden i wsp., 2006).

W prezentowanych badaniach wykazano bardzo wysokie powinowactwo prostasomów plazmy nasienia psa do jonów cynkowych, co sugeruje istotny wpływ omawianych struktur na metabolizm cynku w nasieniu psa. Wyniki chromatografii powinowactwa wskazują, że białka wiążące jony cynkowe są dominujące w prostasomach i stanowią od 93 do 100% wszystkich białek. W warunkach denaturujących i redukujących dysocjują one głównie do niskocząsteczkowych polipeptydów o masach 10,2 do 12,0 kDa.

Prezentowane badania po raz pierwszy wykazały, że prostasomy plazmy nasienia psa posiadają zdolność wiązania jonów cynkowych, które to zjawisko może sugerować, iż struktury te biorą udział w regulacji ruchliwości plemników. Ruchliwość plemników jest konieczna do naturalnego zapłodnienia komórki jajowej, a w przypadku zaburzeń parametrów ruchliwości dochodzi do obniżenia płodności samca. Parametry jakościowe ruchu plemników mają istotne znaczenie dla migracji plemników przez drogi rodne samicy, zwłaszcza przy pokonywaniu bariery śluzu szyjki macicy i penetracji osłony przejrzystej (*zona pellucida*) komórki jajowej (Yanagimachi 1966). Prostasomy pełnią, między innymi, funkcje ochronne wobec męskich komórek płciowych oraz powodują wzrost odsetka plemników ruchliwych (Stegmayr i Ronquist 1982; Fabiani i wsp., 1994).

Jony cynkowe pełnią funkcje modulacyjne wobec aparatu ruchu plemników. Cynk występuje w nasieniu zarówno w formie wolnej jak i związanej (Mogielnicka-Brzozowska i Kordan 2011). Duże ilości wolnych jonów cynkowych w plazmie nasienia hamują ruchliwość plemników, podczas gdy obniżona zawartość wolnych jonów cynkowych ma związek z wyższą ruchliwością tych komórek (Riffo i wsp., 1992;

Sorensen i wsp., 1999). Dostępność wolnego cynku w nasieniu jest regulowana przez białka wysokocząsteczkowe, które wiążą Zn^{2+} i redukują jego zawartość w plazmie nasienia (Caprino i wsp., 1998). Biorąc pod uwagę wysoką masę cząsteczkową oraz duże powinowactwo prostasomów do jonów cynkowych można przypuszczać, że pełnią one rolę w regulacji zawartości wolnych jonów cynkowych w plazmie nasienia psa.

Prostasomy zawierają w swojej budowie wiele enzymów, których aktywność może być regulowana przez jony cynkowe. Dla przykładu aktywność ATPazy jest zależna od cynku (Ronquist 1988). Obecność tego enzymu wykazano również w prostasomach psa (Zelli i wsp., 2012; Ronquist i wsp., 2013). Aktywność omawianego enzymu może mieć wpływ na ruchliwość plemników psa, a jony cynkowe mogą potencjalnie działać jako element regulatorowy.

Omawiane badania dostarczają ważnych informacji odnośnie tego w jaki sposób dodatek jonów cynkowych lub specyficznych struktur białkowych wpływa na proces przechowywania plemników w obniżonej temperaturze, a wiedza ta może w przyszłości zostać wykorzystana do w doskonaleniu wspomaganego rozrodu psów.

3.2.4. Mogielnicka-Brzozowska M.*, Kowalska N., Fraser L, Kordan W. 2015 *Proteomic characterization of zinc-binding proteins of canine seminal plasma*. *Reproduction in Domestic Animals* 50: 1017-1021.

Cel pracy i uzasadnienie badań

Celem pracy była charakterystyka białek plazmy nasienia psa wiążących jony cynkowe przy wykorzystaniu elektroforezy dwukierunkowej w żelu poliakryloamidowym (2D-PAGE) oraz spektrometrii mas (MS).

Jak wcześniej wykazano ZnBP odpowiadają za utrzymanie równowagi pomiędzy zawartością jonów cynkowych w plemnikach i plazmie nasienia, co jest niezbędne do uzyskania i zachowania ruchliwości plemników (Mogielnicka-Brzozowska i wsp., 2014). Natomiast do tej pory w dostępnej literaturze brak było informacji na temat proteomicznej charakterystyki tych białek. Elektroforeza dwukierunkowa jest zaawansowaną metodą analityczną, pozwalającą rozdzielić poszczególne polipeptydy ze względu na ich masy cząsteczkowe i punkty izoelektryczne. Z kolei spektrometria mas jest metodą umożliwiającą identyfikację uzyskanych po elektroforezie 2D-PAGE polipeptydów. Zastosowanie wymienionych metod pozwoliło na szczegółowe poznanie

zestawu białek zaliczanych do rodziny wiążących jony cynkowe w plazmie nasienia psa oraz poznanie ich potencjalnych funkcji w procesie zapłodnienia u psa.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły ejakulatory pobierane metodą manualną od 5 psów (n=20, 4 ejakulatory od psa). Plazmę nasienia uzyskiwano poprzez wirowanie ejakulatów. Najpierw 1000 x g, przez 15 minut w celu usunięcia plemników. Następnie supernatant ponownie odwirowywano przy 10 000 x g, przez 10 minut. ZnBPs izolowano z plazmy nasienia według metody Mogielnicka-Brzozowska i wsp. (2012). Elektroforezę dwukierunkową (2D PAGE) przeprowadzano według metody O'Farrell (1975) z modyfikacjami. W celu wizualizacji białek wyso- i niskokocząsteczkowych w badaniach elektroforetycznych (2D PAGE) zastosowano różne ich koncentracje, odpowiednio 75 oraz 45 µg. W analizach wykorzystano paski ZOOM Strip, pH 3-10 NL, Invitrogen, Waltman, MA, USA) w kasecie ZOOM IPG Runner cassettes (Invitrogen). Izoelektroogniskowanie wykonywano w aparacie ZOOM IPG Runner (Invitrogen). Następnie paski ekwilibrowano w odpowiednim buforze i nakładano na 12% żele do SDS PAGE. Wykonywano rozdział elektroforetyczny według metody Laemmli (1970). Żele wybarwiano metodą Coomassie Brilliant Blue. Odbarwione żele analizowano przy użyciu programu PDQuest 7.2 (BioRad). Wybrano 7 polipeptydów ZnBPs obecnych w plazmach nasienia wszystkich analizowanych osobników, wykazujących wysokie wartości gęstości optycznej (OD). Omawiane spoty białkowe wycięto z żeli i wysłano do analizy do Laboratorium Spektrometrii Mas Polskiej Akademii Nauk Instytutu Biochemii i Biofizyki w Warszawie. Peptydy analizowano metodą LC-MS-MS/MS (Chromatografia cieczowa połączona z tandemową spektrometrią mas).

Rezultaty badań i ich interpretacja

Badania powyższe stanowią pierwszą jak dotychczas analizę białek plazmy nasienia psa wiążących jony cynkowe przy wykorzystaniu elektroforezy 2D PAGE i spektrometrii mas. We wcześniejszych badaniach wykazano, że ZnBPs występują w stanie natywnym w plazmie nasienia w formie wysokocząsteczkowych agregatów. Rezultaty powyższej pracy wskazują, iż te naturalnie występujące makromolekuły dysocjują w warunkach denaturujących i redukujących do 46-57 polipeptydów w zakresie mas cząsteczkowych 9,3 do 138,7 kDa, pI w pH 5,2 do 10,0. Plazmy nasienia pochodzące od różnych osobników wykazują różnice w ilości polipeptydów ZnBPs, ich

masach cząsteczkowych i punktach izoelektrycznych. Jakkolwiek u wszystkich analizowanych osobników stwierdzono występowanie 7 polipeptydów charakteryzujących się wysokimi wartościami gęstości optycznej i pI w pH obojętnym lub zasadowym. Wyniki uzyskane metodą spektrometrii mas wykazały z dużym prawdopodobieństwem, że wszystkie 7 polipeptydów to esteraza argininowa specyficzna dla prostaty psa (CPSE). Enzym ten stanowi ponad 90% wszystkich białek wydzielanych przez prostatę i około 30% białek plazmy nasienia psa (Isaacs i Coffey 1984; Dube i wsp., 1986). CPSE posiada w warunkach natywnych masę cząsteczkową 29 kDa. W warunkach redukujących dysocjuje do podjednostek o masach cząsteczkowych 12-14 i 15 kDa (Isaacs i Coffey 1984). Analizowane polipeptydy ZnBPs charakteryzowały się niskimi masami cząsteczkowymi w zakresie 11,7 do 15,4 kDa, co potwierdza, że mogą one być podjednostkami CPSE.

Dokładna funkcja CPSE w plazmie nasienia nie została dotychczas poznana. Wiadomo, że jest to enzym należący do grupy proteinaz serynowych (Champdelane i wsp., 1984). Enzym ten hydrolizuje różnorodne białka takie jak: kazeina, owoalbumina, albumina surowicy bydłowej, globina, fibrynogen i fibryna, jakkolwiek nie wykazano efektów fizjologicznych dla tego enzymu (Rosenkranz i Kirdani 1961). CPSE wykazuje pełną aktywność w granulach sekrecyjnych (prostasomach) wydzielanych przez prostatę psa (Frenette i wsp., 1985). Można przypuszczać, że CPSE jest wydzielana razem z prostasomami do plazmy nasienia podczas ejakulacji. Ze względu na wykazane w niniejszych badaniach wysokie powinowactwo omawianego enzymu do jonów cynkowych można sugerować, iż jego aktywność jest regulowana przez poziom dostępnego cynku. Zaburzenia w ilości dostępnych jonów cynkowych w komórkach prostaty mogą prowadzić do zmian w aktywności CPSE, co może skutkować zaburzeniami procesów rozrodczych lub nawet rozwojem chorób prostaty. W komórkach nowotworowych występuje znaczna redukcja ilości jonów cynkowych (Costello i wsp., 2004) i jednocześnie wzrost aktywności kalikrein (Pampalakis i Sotiropoulou 2007). Tym niemniej, do tej pory dokładny mechanizm oddziaływania jonów cynkowych na aktywność CPSE nie został poznany. Należy stwierdzić, że esteraza argininowa specyficzna dla prostaty psa jest wykorzystywana jako marker aktywności sekrecyjnej prostaty oraz stanowi obiecujące narzędzie w diagnozowaniu zaburzeń

funkcji prostaty (Gobello i wsp., 2002). CPSE jest enzymem homologicznym do PSA (ang. prostate specific antygen) u człowieka.

Powyższe badania podkreślają rolę jonów cynkowych w strukturze i regulacji aktywności CPSE, która posiada istotne znaczenie dla utrzymania fizjologicznej funkcji prostaty i plemników.

Podsumowanie

Podstawą rozprawy habilitacyjnej są prezentowane, w załączonych 4 publikacjach, wyniki badań dotyczących struktur proteomicznych plazmy nasienia psa, ich charakterystyki biochemicznej oraz wpływu na wybrane funkcje plemników.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy habilitacyjnej zaliczam:

1. Wykazanie, po raz pierwszy, zdolności białek plazmy nasienia psa do wiązania jonów cynkowych.
2. Wykazanie zdolności ZnBPs do opłaszczania akrosomu i witki ejakulowanych plemników psa.
3. Wykazanie ochronnego wpływu białek ZnBPs na parametry ruchliwości oraz integralność błon plazmatycznych plemników psa przechowywanych w warunkach udaru chłodowego.
4. Opracowanie uproszczonej metody izolacji prostasomów z plazmy nasienia psa.
5. Wskazanie, że ponad 90% białek prostasomów wyizolowanych z plazmy nasienia psa posiada zdolność wiązania jonów cynkowych.
6. Wykazanie pozytywnego wpływu prostasomów plazmy nasienia psa w ich fizjologicznym stężeniu na ruchliwość plemników przechowywanych w warunkach udaru chłodowego.
7. Wykazanie, że esteraza argininowa (CSPE) specyficzna dla prostaty psa jest głównym białkiem wiążącym jony cynkowe w plazmie nasienia psa.

Podsumowując, prezentowane rezultaty badań posiadają aspekt poznawczy polegający na wykazaniu nieznanych dotąd właściwości białek plazmy nasienia psa, polegających na zdolności wiązania jonów cynkowych. Model funkcji prostaty psa jest uznanym układem fizjologicznym w odniesieniu do badań funkcji prostaty człowieka. Odpowiednikiem CPSE u człowieka jest PSA (antygen specyficzny dla prostaty) co

pozwala wskazywać na możliwość przeniesienia w przyszłości rezultatów powyższych badań na model ludzki.

Literatura

Arienti G, Carlini E, De Cosmo AM, Di Profio P, Palmerini CA, 1998: Prostate-like particles in stallion semen. *Biol Reprod* 59, 309-313.

Arver S, 1982: Zinc and zinc ligands in human seminal plasma. III. The principal low molecular weight zinc ligands in prostatic secretion and seminal plasma. *Acta Physiol Scand* 116, 67-73.

Arver S, Eliasson R, 1982: Zinc and zinc ligands in human seminal plasma. II. Contribution by ligands of different origin to the zinc binding properties of human seminal plasma *Acta Physiol Scand* 115, 217-224.

Assreuy AM, Alencar NMN, Cavada BS, Rocha-Filho DR, Feitosa RFG, Cunha FQ, Calvete JJ, Ribeiro RA, 2003: Porcine spermadhesins PSP-I/PSP-II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. *Biol Reprod* 68, 1836-1841.

Bjorndhal L, Kvist U, 1990: Influence of seminal vesicular fluid on the zinc content of human spermatozoa chromatin. *Int J Androl* 13, 232-237.

Bourns J, Noble EA, Andrews MG, 1975: Boar seminal zinc-precipitable protein and the haemagglutinin. *J Reprod Fertil* 45, 415-420.

Burden HP, Holmes CH, Persad R, Whittington K, 2006: Prostate - their effects on human male reproduction and fertility. *Hum Reprod Update* 12, 283-292.

Caballero J, Frenette G, Sullivan R, 2011: Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostate. *Vet Med Int* 75719,

Calvete JJ, Sanz L, Töpfer-Petersen E, 1994: Spermadhesins: structure - functions, relationships. *Ass. Rep Androl* 6, 316-330.

Campanero-Rhodes MA, Menendez M, Saiz JL, Sanz L, Calvete JJ, Solís D, 2005: Analysis of the stability of the spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer. Effects of Zn²⁺ and acidic pH. *FEBS J* 272(21), 5663-5670.

Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ, 1999: Osteopontin localization in the Holstein bull tract. *Biol Reprod* 60, 454-460.

Caprino A, Siciliano L, Petroni MF, De Stefano C, Aquila S, Ando S, 1998: Low seminal zinc bound to high molecular weight proteins in astenozoospermic patients: evidence of increased sperm zinc content in oligoastenozoospermic patients. *Hum Reprod* 13, 111-114.

Carlsson L, Pahlson C, Bergquist M, Ronquist G, Stridsberg M, 2000: Antibacterial activity of human prostate. *Prostate* 44, 297-286.

Centurion F, Vazquez JM, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Perilla I, Garcia EM, Martinez EA, 2003: Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biol Reprod* 69, 640-646.

- Chapdelaine P, Dube JY, Frenette G, Tremblay RR, 1984: Identification of arginine esterase as the major androgen-dependent protein secreted by dog prostate and preliminary molecular characterization in seminal plasma. *J Androl* 5, 206-210.
- Costello LC, Feng P, Milon B, Tan M, Franklin RB, 2004: Role of zinc in the pathogenesis and treatment of prostate cancer: critical issues to resolve. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 7, 111-117.
- D'Amours O, Frenette G, Fortier M, Leclerc P, Sullivan R, 2009: Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. *Reproduction* 139(3), 545-556.
- Davis BK, 1973: Occurrence of vesicles in rabbit seminal plasma. *Experientia* 29, 1484-1487.
- De Souza F, Martins MI, dos Santos Fernandes CE, Ribolla PE, Lopes MD, 2006: Heparin-binding proteins of canine seminal plasma. *Theriogenology* 66, 1606-1609.
- De Souza FF, Barreto CS, Lopes MD, 2007: Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. *Theriogenology* 68: 100-106.
- Dube JY, Lazure C, Tremblay RR, 1986: Dog prostate arginine esterase is related to human prostate specific antigen. *Clin Invest Med* 9, 51-54.
- Dziekonska A, Fraser ., Strzezek J, 2009: Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. *J Anim Feed Sci* 18, 638-649.
- El-Hajj Ghaoui R, Thomson PC, Evans G, Maxwell WMC, 2004: Characterization and localization of membrane vesicles in ejaculate fractions from the ram, boar and stallion. *Reprod Dom Anim* 39, 173-180.
- Fabiani R, Johansson L, Lundkvist O, Ulmsten U, Ronquist G, 1994: Promotive effect by prostasomes on normal human spermatozoa exhibiting no forward motility due to buffer washings. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 57, 181-188.
- Flowers WL, 2001: Relationships between seminal plasma proteins and boar fertility. *Ann. Swine Rep.* pp. 1-4.
- Fraser L, Dziekońska A, Strzezek R, Strzezek J, 2007: Dialysis of boar semen prior to freezing-thawing: its effects on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenology* 67, 994-1003.
- Frenette G, Dube JY, Marcotte JR, Tremblay RR, 1985: Arginine esterase from isolated dog prostate secretory granules is fully active enzymatically. *Can J Physiol Pharmacol* 63, 1603-1607.
- Garcia LAD, Brito ELR, Serpa P, Gregory J, Natalini C, Mattos RC, Jobim MIM, 2014: Horse seminal plasma proteins (HSP-1 and HSP-2) concentration: a possible marker for poor fertility. *Pferdeheilkunde* 30, 557-560.
- Garner DL, Johnson LA, 1995: Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod* 53, 276-284.
- Gobello C, Castex G, Corrada Y, 2002: Serum and seminal markers in the diagnosis of disorders of the genital tract of the dog: a mini-review. *Theriogenology* 57, 1285-1291.

- Henkel R, Bittner J, Weber R, Huther F, Miska W, 1999: Relevance of zinc in human spermatozoa flagella and its relation to motility. *Fertil Steril* 71, 1138–1143.
- Henkel R, Bladauf C, Bittner J, Weidner W, Miska W, 2001: Elimination of zinc from the flagella of spermatozoa during epididymal transit is important for motility. *Reprod Technol* 10, 280-285.
- Hołody D, Strzeżek J, 1999: Heparin- and Zn²⁺-binding proteins from boar seminal plasma. *Acta Biochim Pol* 46, 935–939.
- Huang Y-H, Luo C-W, Yu L-C, Chu S-T, Chen Y-H, 1995: The protein conformation and a zinc-binding domain of an autoantigen from mouse seminal vesicle. *Biophysical Journal* 11, 2084-2089.
- Isaacs W, Coffey D, 1984: The predominant protein of canine seminal plasma is an enzyme. *J Biol Chem* 259, 11520-11526.
- Jelinkova P, Ryslava H, Liberda J, Jonakova V, Ticha M, 2004: Aggregated forms of bull seminal plasma proteins and their heparin-binding activity. *Collect Czech Chem Commun* 69, 616-630.
- Jobim MI, Oberst ER, Salbego CG, De Souza DO, Wald VB, Tramontina F, Mattos RC, 2004: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* 61, 255-266.
- Johnson L, Wikstrom S, Nylander G, 1969: The vehicle for zinc in the prostatic secretion of dogs. *Scandi J Urol Nephrol* 3, 9-11.
- Koziorowska-Gilun M, Koziorowski M, Fraser L, Strzeżek J, 2011: Antioxidant Defence System of Boar Cauda Epididymal Spermatozoa and Reproductive Tract Fluids. *Reprod Dom Anim* 46, 527-533.
- Kvist U, Kjelberg S, Björndahl L, Soufir JC, Arver S, 1990: Seminal fluid from men with agenesis of the Wolffian ducts: zinc-binding properties and effects on sperm chromatin stability. *Int J Androl* 13, 245–252.
- Kwok SC, Soares MJ, McMurtry JP, Yurewicz EC, 1993: Binding characteristics and immunolocalization of porcine seminal protein, PSP-I. *Mol Reprod Dev* 35, 244-250.
- Laemmli UK, 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lindholmer C, Glauman H, 1972: Zinc and magnesium in human male reproductive tract. *Andrologie* 4, 231–237.
- Lowry IO, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 263-288.
- Manaskova P, Jonakova V, 2008: Localization of porcine seminal plasma (PSP) proteins in the boar reproductive tract and spermatozoa. *J Reprod Immunol* 78, 40-48.
- Manjunath P, Soubeyrand S, Chandonnet L, Roberts KD, 1994: Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. *Biochem J* 303, 121–128.

Mogielnicka - Brzozowska M, Fraser L, Czarzasta J, Kordan W, 2012: Isolation and characterization of zinc-binding proteins of canine seminal plasma. *Pol J Vet Sci* 15: 493-498.

Mogielnicka - Brzozowska M, Wysocki P, Strzeżek J, Kordan W, 2011: Zinc-binding proteins from boar seminal plasma-isolation, biochemical characteristics and influence on spermatozoa stored at 4° C. *Acta Biochim Pol* 58, 171-177.

Mogielnicka-Brzozowska M, Dziekońska A, Strzeżek R, M Załęcki, A Majewska, Tołścik K Kordan W, 2014: Effect of zinc-binding proteins of seminal plasma on motility and membrane integrity of canine spermatozoa stored at 5°C. *Bull Vet Inst Pulawy* 58, 163-168.

Mogielnicka-Brzozowska M, Wysocki P, Strzeżek J, Kordan W, 2011: Zinc-binding proteins from boar seminal plasma isolation, biochemical characteristics and influence on spermatozoa stored at 4°C. *Acta Biochim Pol* 58, 171-177.

Mourvaki E, Cardinali R, Dal Bosco A, Castellini C, 2010: *In vitro* antioxidant activity of the prostatic secretory granules in rabbit semen after exposure to organic peroxides. *Reprod Biol Endocrinol* 8, 16-23.

O'Farrell PH, 1975: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021.

Pampalakis G, Sotiropoulou G, 2007: Tissue kalikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochem Biophys Acta* 1776, 22-31.

Piehl LL, Cisale H, Torres N, Capani F, Sterin-Speziale N, Hager A, 2006: Biochemical characterization and membrane fluidity of membrane vesicles isolated from boar seminal plasma. *Anim Reprod Sci* 92, 401-410.

Rajeev SK, Reddy KV, 2004: Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility-associated sperm antigen. *Hum Reprod* 19(2), 234-242.

Riffo M, Leiva S, Astudillo J, 1992: Effect of zinc on human sperm motility and the acrosome reaction. *Int J Androl* 15, 229-237.

Ronquist G, 1988: Zinc ion stimulation of ATP cleavage by prostasomes from human seminal plasma. *Urol Int* 43, 334-340.

Ronquist KG, Ek B, Morrell J, Stavreus-Evers A, Strom Holst B, Humblot P, Ronquist G, Larsson A, 2013: Prostasomes from four different species are able to produce extracellular adenosine triphosphate (ATP). *Biochim Biophys Acta* 1830, 4604-4610.

Rosenkranz H, Kirdani ES, 1961: The proteolytic enzymes of canine prostatic fluids. *Cancer Chemother Rep* 15, 9-16.

Saez F, Motta C, Boucher D, Grizard G, 1998: Antioxidant capacity of prostasomes in human semen. *Mol Hum Reprod* 4, 667-672.

Sansone G, Abrescia P, 1991. Zinc-protein from rat prostate fluid binds epididymal spermatozoa. *J Exp Zool* 259, 379-385.

- Siciliano L, De Stefano C, Petroni MF, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, 2000: Prostatic origin of a zinc binding high molecular weight protein complex in human seminal plasma. *Mol Hum Rep* 3, 215-218.
- Silverstroni L, Menditto A, Modesti A, Scarpa S, 1989: Zinc uptake in human seminal spermatozoa: characterization and effects on cell membranes. *Arch Androl* 23, 97-103.
- Sorensen MB, Stoltenberg M, Danscher G, Ernst E, 1999: Chelation of intracellular zinc ions affects human sperm cell motility. *Mol Hum Reprod* 4, 338-341.
- Sostaric E, Aalberts M, Gadella BM, Stout TAE, 2008: The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 107, 237-248.
- Stegmayr B, Ronquist G, 1982: Promotive effect of human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res* 10, 253-257.
- Strzeżek J, Hopfer E, 1987: Zinc ion-dependent protein in boar semen. I. Egg yolk precipitating activity and some biochemical properties. *Anim Reprod Sci* 13: 117-131.
- Strzeżek J, Wysocki P, Kordan W, Kuklińska M, Mogielnicka M, Soliwoda D, Fraser L, 2005: Proteomics of boar seminal plasma – current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod Biol* 5, 279–290.
- Topfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H, 2005: The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Anim Reprod Sci* 89, 159-170.
- Vivacqua A, Siciliano L, Sabato M, Palma A, Caprino A, 2004: Prostasomes as zinc ligands in human seminal plasma. *Int J Androl* 27, 27-31.
- Watson PF, 1975: Use of Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet Rec* 97, 12-15.
- Yanagimachi R, 1966: Time and process of sperm penetration into hamster ova *in vivo* and *in vitro*. *J Reprod Fertil* 11, 359-370.
- Zelli R, Bellezza I, Rambotti MG, Minelli A, Polisca A, 2012: Ultrastructural and enzymatic activity of membranous vesicles isolated from canine seminal plasma. *Reprod Dom Anim* 48, 252-257.

3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych

Podczas pracy w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt uczestniczyłam w badaniach naukowych zespołu, który zajmował się głównie zagadnieniami biochemii nasienia zwierząt gospodarskich, ze szczególnym uwzględnieniem proteomiki męskiego układu rozrodczego oraz doskonaleniem metod konserwacji nasienia zwierząt. Efektem tych badań są publikacje naukowe prezentowane poniżej.

4.1. Charakterystyka biochemiczna i funkcje białek plazmy nasienia

4.1.1. Mapowanie białek plazmy nasienia knura przy wykorzystaniu elektroforezy dwukierunkowej w żelu poliakryloamidowym (2-D PAGE). (A.2)

Celem badań była ocena wpływu wieku knurów i sezonu na polimorfizm polipeptydów plazmy nasienia.

Wykazano, że modyfikacje elektroforezy dwukierunkowej polegające na zastąpieniu merkaptoetanolu (ME) przez ditiotreitól (DTT) oraz użycie zestawu odczynników do oczyszczania prób (Plus One 2-D Clean-Up Kit, Amersham Biosciences) znacząco poprawiły rozdzielczość elektroforegramów. Wykazano, iż zawartość polipeptydów w plazmie nasienia była znacząco niższa u knurów 12-miesięcznych w porównaniu ze zwierzętami trzyletnimi. Dodatkowo stwierdzono, że latem zawartość polipeptydów była niższa w porównaniu do okresu jesiennego. Wykazano, że zmodyfikowana elektroforeza dwukierunkowa (2-D) może być z powodzeniem stosowana w analizie białek plazmy nasienia knura. Z kolei uwarunkowany wiekiem knurów i pór roku polimorfizm map polipeptydowych plazmy nasienia może być wykorzystany jako marker molekularnych zmian aktywności sekrecyjnej dodatkowych gruczołów płciowych oraz może stanowić istotny wyznacznik kwalifikacji samców do rozrodu.

4.1.2. Zastosowanie spektrometrii mas (MS) do analizy struktury wybranych polipeptydów plazmy nasienia knura uzyskanych po elektroforezie dwukierunkowej (2-D PAGE). (A.3, B.16)

W prezentowanej publikacji przeprowadzono analizę struktury wybranych polipeptydów plazmy nasienia knura, z wykorzystaniem spektrometrii mas.

Przy użyciu elektroforezy dwukierunkowej (2-D PAGE) dokonano identyfikacji na mapach polipeptydowych plazmy nasienia knurów czterech zakonserwowanych polipeptydów o identycznej masie cząsteczkowej (24 kDa), ale różnych zakresach punktów izoelektrycznych (pI): (1) 7,4-7,7, (2) 8,1-8,4 (3) 8,5-8,8 oraz (4) 9,2-9,4. Przy użyciu skomputeryzowanej spektrometrii mas (LC-MS/MS) dokonano analizy peptydów otrzymanych po trawieniu trypsyną wykazując ich podobieństwo do rodziny spermadhezyn, zwłaszcza spermadhezyny najądrzowej AWN1. Ponadto stwierdzono

homologię peptydów 3 i 4, z prekursorem lizozymu C (1,4-beta-N-acetylmuramidase C). Przedstawione wyniki wskazują na udział analizowanych polipeptydów w procesach towarzyszących zapłodnieniu.

4.1.3. Białka wiążące jony cynkowe plazmy nasienia knura - izolacja, charakterystyka biochemiczna oraz wpływ na plemniki przechowywane w 4°C. (A.4, B.1)

Celem badań była izolacja i charakterystyka biochemiczna białek wiążących jony cynkowe plazmy nasienia knura oraz określenie wpływu wyizolowanych frakcji na niektóre parametrów jakościowe plemników przechowywanych w warunkach udaru chłodowego (4°C).

Wykazano, że około 30% ogólnej puli białek plazmy nasienia knura stanowią białka wykazujące powinowactwo do jonów cynku (ZnBP). Przy użyciu elektroforezy natywnej (PAGE) stwierdzono w obrębie ZnBP, sześć frakcji białkowych, które zostały następnie rozdzielone w warunkach denaturujących (SDS/PAGE) na 27 frakcji. Z zastosowaniem elektroforezy dwukierunkowej (2D PAGE) wykazano 148 polipeptydów ZnBP o punktach izoelektrycznych głównie w pH zasadowym i obojętnym. Stwierdzono, że białka wiążące jony cynkowe tworzą głównie polipeptydy o masach cząsteczkowych 10-20 kDa, które prawdopodobnie należą do rodziny spermadhezyn. Dodatek ZnBP do mieszaniny inkubacji plemników przechowywanych przez 1 lub 24 godziny w temperaturze 4°C, spowodował zachowanie wyższego odsetka komórek wykazujących ruch liniowy, w porównaniu do próby kontrolnej przechowywanej w PBS. Wykazano, że białka wiążące jony Zn^{2+} opłaszczają plazmolemę plemników w tym akrosom, chroniąc tym samym omawiane struktury przed skutkami udaru chłodowego.

4.1.4. Antygenowy charakter białek wiążących jony cynkowe i ich lokalizacja w układzie rozrodczym knura - Badania wstępne. (A.6)

Celem badań było wykazanie charakteru antygenowego białek plazmy nasienia knura wiążących jony cynkowe oraz ustalenie miejsca ich sekrecji w układzie rozrodczym knura.

Określono charakter antygenowy białek wiążących jony cynkowe przy wykorzystaniu immunoelektroforezy oraz podwójnej immunodifuzji żelowej. Natomiast

badania miejsca sekrecji ww. białek występujących w plazmie nasienia dokonano przy użyciu immunofluorescencji pośredniej tkanek układu rozrodczego knura z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych i antykróliczych IgG skoniugowanych z izotiocyjanianem fluoresceiny – FITC.

Przy zastosowaniu badań immunoelektroforetycznych wykazano, iż ZnBP występują w postaci trzech kompleksów białkowych o właściwościach antygenowych. Podczas gdy przy użyciu surowicy poliklonalnej przeciw ZnBPs oraz analizy metodą podwójnej immunodyfuzji żelowej stwierdzono specyficzny wzorzec immunoreaktywności białek ZnBP. Technika immunofluorescencji pośredniej potwierdziła, że ZnBPs są wydzielane przez różne tkanki układu rozrodczego knura, co skutkuje ich obecnością w plazmie nasienia.

4.1.5. Zdolność białek wiążących jony cynkowe z plazmy nasienia knura do wiązania heparyny i fosforylocholiny. (A.9, B.15, B.18)

Celem badań było określenie, czy białka wiążące jony cynkowe z plazmy nasienia knura są zdolne do wiązania dodatkowych ligandów.

Po raz pierwszy wykazano, że ZnBPs knura mają powinowactwo zarówno do heparyny (hep) jak i fosforylocholiny (pch). Białka wiążące jony cynkowe i heparynę (ZnBPs+hep) stanowiły około 20%, a wiążące jony cynkowe i fosforylocholiny (ZnBPs+pch) - około 45% całkowitej zawartości ZnBPs. Wykazano, że w obu grupach (ZnBPs+hep, ZnBPs+pch) dominowały polipeptydy o masach cząsteczkowych 6,5 do 14 kDa. Niskie masy cząsteczkowe analizowanych peptydów, oraz ich zdolność do wiązania jonów cynku, a także heparyny i fosforylocholiny sugerują, że należą one do rodziny wielofunkcyjnych spermadhezyn, które pełnią swoje funkcje w procesie zapłodnienia poprzez wiązanie więcej niż jednego ligandu.

4.2. Doskonalenie metod konserwacji nasienia zwierząt

4.2.1. Wpływ przechowywania nasienia w różnych rozcieńczalnikach na jakość plemników knura przed zamrożeniem i po rozmrożeniu. (A.10)

Celem pracy było zbadanie wpływu przechowywania nasienia w różnych rozcieńczalnikach komercyjnych na jakość plemników przed zamrożeniem i po rozmrożeniu.

W rozcieńczalniku Androhep (AH) odsetek plemników z nienaruszonymi błonami plazmatycznymi (PMI) oraz zawartość ATP w plemnikach były znacząco wyższe ($P < 0,05$) w porównaniu komórkami przechowywanymi w rozcieńczalnikach BTS lub Gedil (GD). Ponadto, plemniki przechowywane w AH charakteryzował statystycznie wyższy ($P < 0,05$) odsetek komórek z (nienaruszonymi błonami mitochondriów) MMP. Dodatkowo w przypadku prób nasienia przechowywanych w rozcieńczalniku Androhep zanotowano wzrost aktywności peroksydazy glutationowej (GPx) w stosunku do prób, w których zastosowano rozcieńczalnik BTS. Uzyskane rezultaty badań wskazują, że rozcieńczalnik AH lepiej zabezpieczał jakość plemników knura po rozmrożeniu w porównaniu z BTS lub GD.

4.2.2. Zmiany składu biochemicznego nasienia knurów w zależności od wieku i sezonu. (A.11, B.10)

Celem badań było określenie zmian w składzie nasienia knura związanych z wiekiem i sezonem, obejmujące okres 3 lat.

Ejakulatory pobierano od knurów podzielonych na 3 grupy wiekowe: 8-18; 19-30 i 31 do 42 miesięcy w dwóch sezonach: jesienno-zimowym i wiosenno-letnim. Odnotowano różnice osobnicze w większości analizowanych parametrów. Wykazano, znacząco wyższe objętości ejakulatów u knurów starszych niż 18 miesięcy podczas sezonu jesienno-zimowego. Koncentracja plemników była wyższa w sezonie jesienno-zimowym w każdej z analizowanych grup. Stwierdzono, że odsetek plemników z nieuszkodzonym akrosomem był wyższy u knurów w wieku 19 do 30 miesięcy w sezonie jesienno-zimowym. Plemniki pochodzące z sezonu wiosenno-letniego były bardziej podatne na peroksydację lipidów niezależnie od grupy wiekowej. Wyniki prezentowanych badań wskazują, że wiek i sezon wpływają na funkcje układu rozrodczego knura, co skutkuje wyraźnymi zmianami składu biochemicznego nasienia.

4.2.3. Dodatni wpływ schładzania nasienia w rozcieńczalnikach długoterminowych przed procesem zamrażania na parametry jakościowe plemników. (A.12, B.28)

Celem pracy było zbadanie wpływu rozcieńczalników długoterminowych na parametry jakości plemników po rozmrożeniu co poprzedzone było różną długością czasu przechowywania w 17 i 10°C.

Fracja gęsta ejakulatu (SR) pobierana od 5 knurów była rozrzedzana przy użyciu rozcieńczalników Androhep Plus (AHP), Androstar Plus (SP), Safecell Plus i TRIXcell Plus (TCP). Rozrzedzone próby nasienia przechowywano przez 2h w 17°C (HT1) i dodatkowo 24h w 10 °C (HT2), następnie oceniano parametry jakości plemników i zamrażano je. Wykazano, że zmienność osobnicza, rodzaj rozcieńczalnika i czas przechowywania znacząco wpływały na parametry jakościowe plemników zwłaszcza po rozmrożeniu. Schładzanie nasienia do 10°C (24h) spowodowało uzyskanie znacząco wyższych wartości VCL i VAP, podczas gdy nie wykazano znaczącego wpływu na integralność błon plemników i ich przeżywalność (YO-PRPO-1-PI-) niezależnie od rozcieńczalnika. Po rozmrożeniu TMOT i PMOT wykazywały znacząco wyższe wartości w rozcieńczalnikach AHP i ASP w wariacie HT2, podczas gdy VSL, VCL i VAP wykazywały obniżone wartości w rozcieńczalniku TCP. Stwierdzono, że przechowywanie nasienia knura w 10°C przez 24 h w rozcieńczalnikach długoterminowych wpływa na parametry jakościowe plemników w sposób zależny od rodzaju rozcieńczalnika.

4.2.4. Wpływ sezonu na sprawność metaboliczną plemników ogiera. (B.13, B.21)

Celem badań było określenie wpływu sezonu rozrodczego na wskaźniki metaboliczne plemników przechowywanych w Equipro™ w 5°C przez 5 dni.

Ejakulaty pobierano od 4 ogierów (wiek 10 do 20 lat) w okresie sezonu rozrodczego (maj-lipiec) i poza sezonem rozrodczym (wrzesień-grudzień). Nasienie rozrzedzano w rozcieńczalniku Equipro™ (Minitübe, Germany) i przechowywano 5 dni w 5°C. Wykazano, że w nasieniu świeżym wszystkie analizowane parametry oprócz zawartości ATP wykazywały znacząco wyższe wartości w sezonie rozrodczym. Nie stwierdzono znaczących różnic w parametrach metabolicznych plemników i PMI

analizowanych w sezonie i poza sezonem rozrodczym, niezależnie od dnia przechowywania. W drugim dniu przechowywania TMOT (średnia±SEM) w sezonie i poza sezonem rozrodczym wynosiły odpowiednio 61,9±5,0% and 65,4±2,9%. Stwierdzono, że dodatek rozcieńczalnika znacząco poprawił parametry ruchliwości plemników w porównaniu z nasieniem świeżym, niezależnie od sezonu reprodukcyjnego.

4.2.5. Wpływ wieku na sprawność metaboliczną plemników ogiera. (B.14)

Celem badań było zbadanie wpływu wieku ogiera na charakterystykę metaboliczną plemników przechowywanych w stanie płynnym.

Ejakulatory pobierano od 8 ogierów podzielonych na 2 grupy wiekowe: grupa 1 (10 do 15 lat), grupa 2 (16 do 21 lat). Nasienie rozrzedzano w rozcieńczalniku EquiPro™ (Minitübe, Germany) i przechowywano 5 dni w 5°C. Podczas całego okresu przechowywania plemniki z grupy 1 charakteryzowała wyższa sprawność metaboliczna w porównaniu z plemnikami z grupy 2. W trzecim dniu przechowywania TMOT (62,2 ± 4,4%), PMOT (24,5 ± 3,1%), PMI (60,6 ± 2,9%) and MMP (56,9 ± 3,3%) wykazywały wartości znacząco wyższe ($p < 0,05$) w grupie 1, niż TMOT (36,9 ± 5,0%), PMOT (11,1 ± 1,8%), PMI (47,9 ± 5,3%), MMP (47,8 ± 5,9%) w grupie 2. Wykazano, że wiek ogiera znacząco wpływa na charakterystykę metaboliczną plemników przechowywanych w stanie płynnym.

4.3. Prace przeglądowe

4.3.1. Proteomika plazmy nasienia knura – aktualne badania i możliwości ich zastosowania w biotechnologii rozrodu zwierząt. (A.1, B.2)

Celem pracy było omówienie kluczowych zagadnień dotyczących proteomiki plazmy nasienia knura oraz możliwości ich zastosowania w diagnozowaniu płodności samca.

Funkcje fizjologiczne większości białek plazmy nasienia nie zostały do tej pory poznane. Stwierdzono, że zastosowanie metod proteomicznych może być pomocne w identyfikacji różnorodnych zmian jakim podlegają białka plazmy. Dotyczy to struktury, funkcji i interakcji białko-białko, które to zjawiska wpływają na modulację funkcji plemników, takich jak hyperaktywacja, kapacytacja i reakcja akrosomowa. Wskazano, że

w przyszłości zdobycze proteomiki funkcjonalnej wpłyną znacząco na wyjaśnienie podstaw molekularnych większości funkcji białek plazmy nasienia w procesach rozrodczych. Powyższe badania dają możliwość monitorowania płodności samców różnych gatunków zwierząt i doskonalenia technologii związanych z ich rozrodem.

4.3.2. Charakterystyka wybranych białek plazmy nasienia i możliwości ich zastosowania w doskonaleniu procesów reprodukcyjnych u ssaków. (A.5, B.1)

W pracy na podstawie najnowszej literatury przedstawiono informacje odnośnie wybranych białek plazmy nasienia i możliwości ich zastosowania w doskonaleniu procesów reprodukcyjnych u ssaków.

Stwierdzono, że spośród wielu składników plazmy nasienia substancje peptydowe i białkowe odgrywają specyficzną rolę w regulacji procesu zapłodnienia zwłaszcza dzięki ich zdolnościom do wiązania różnych typów ligandów takich jak, polisacharydy, lipidy i jony. Białka wiążące heparynę regulują proces kapacytacji i reakcji akrosomowej. Przedstawiono, że powinowactwo białek plazmy nasienia do mannanów nabłonka jajowodu ułatwia tworzenie rezerwuarów plemników w żeńskich drogach rodnych. Z kolei zdolność do wiązania fosforylocholin jest jednym z warunków opłaszczania białek plazmy nasienia na błonach plemnikowych, a także umożliwia tworzenie form oligomerycznych niektórych białek. Wiązanie jonów cynkowych przez białka plazmy nasienia reguluje stan kondensacji chromatyny plemników. Zjawisko to reguluje również ruchliwość ww. komórek i przebieg reakcji akrosomowej. Stwierdzono również, że oznaczanie zawartości pewnych białek plazmy nasienia pozwala określić przydatność nasienia do konserwacji. Wskazano na celowość stosowanie dodatku określonych białek plazmy nasienia do plemników poddanych procesowi konserwacji, w celu zachowania funkcji ww. komórek.

4.3.3. Metody oceny jakości nasienia i ich znaczenie w technologii reprodukcyjnej. (A.7)

W pracy opisano metody oceny jakości plemników, które dotyczyły wyznaczania parametrów ruchu tych komórek (Computer Assisted Semen Analysis - CASA), oceny integralności plazmolemy (osmotic resistance test - ORT, hypoosmotic swelling test -

HOS, barwienia z użyciem następujących fluorochromów: dioctanu 6-karboksyfluoresceiny - CFDA, HOECHST 33258, jodku propydy - PI, pomiar ilości dialdehydu malonowego - MDA, aspartate aminotransferase test - AspAT), oceny sprawności funkcjonalnej mitochondriów (barwienia fluorochromami 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbeimidazolyl carbocyanine iodide- JC-1 i Rodamina 123 - R-123, pomiar zawartości ATP w plemnikach, resazurin reduction test - RRT), oceny statusu chromatyny i integralności DNA (metoda radioizotopowa z zastosowaniem znakowanej trytem Aktynomycyny D - ^3H -AMD, neutral comet assay - NCA, sperm chromatin dispersion assay -SCSA), oceny zmian apoptotycznych (testy fluorescencyjne z zastosowaniem fluorescein isothiocyanate labelled Annexin V (Annexin V-FITC) i Yo-Pro-1. Opisano przydatność omawianych testów w wyznaczaniu jakości nasienia. W prezentowanej pracy dokonano również charakterystyki wybranych metod biochemicznych stosowanych w badaniach plazmy nasienia. Podkreślono znaczenie głównego enzymu proteolitycznego - akrosyny oraz inhibitorów proteinaz jako wyznaczników przydatności plemników do zapłodnienia. Wskazano na rolę fosfataz kwaśnej i alkalicznej jako wyznaczników funkcji wydzielniczych najądrzy i dodatkowych gruczołów płciowych. Wskazano na możliwość zastosowania technik proteomicznych (elektroforezy dwukierunkowej -2-D i spektrometrii mas - LC-MS/MS) do identyfikacji właściwości i funkcji białek plazmowych w ocenie płodności samca oraz roli jakie substancje te pełnią w procesie zapłodnienia komórki jajowej.

4.4. Wpływ dodatków paszowych na parametry odchowu kurcząt broilerów

Po uzyskaniu stopnia doktora odbyłam staż naukowy (post-doc) na University of Manitoba, Department of Animals Sciences, efektem mojego udziału w badaniach była praca nie należąca do mojego głównego nurtu tematycznego.

Wpływ proteazy, amylazy i enzymu rozkładającego polisacharydy nieskrobiowe na utylizację składników odżywczych i wzrost kurcząt broilerów karmionych mieszanką opartą na kukurydzy i soi. (A.8, B.5)

Celem badań było określenie wpływu dodatku amylazy i proteazy do paszy na poprawę przyswajania składników pokarmowych podczas pierwszych 2 tygodni wzrostu broilerów. Nie odnotowano wpływu suplementacji paszy wymienionymi enzymami na przyrosty masy ciała i współczynnik wykorzystania paszy. Zostało to

potwierdzone przez podobne wartości strawności skrobi i białek w jelicie, których uśrednione wartości wynosiły 96,8, 96,8 oraz 96,9 % oraz 83,9; 80,1 i 79,6 % odpowiednio dla kontroli oraz dla diety suplementowanej amylazą i amylazą plus proteazą. Drugi rodzaj badań polegał na oszacowaniu wpływu rozmiaru cząsteczek kukurydzy (konwencjonalne/grubo mielone/drobno mielone) oraz dodatku enzymu rozkładającego polisacharydy nieskrobiowe i amylazy na przyrosty masy ciała i strawność paszy podawanej kurczętom. Dodatek amylazy nie wywierał wpływu na wzrost wydajności rzeźnej kurcząt karmionych konwencjonalną dietą zawierającą kukurydzę, ale spowodował lepsze przyrosty masy ciała i wyższy współczynnik wykorzystania paszy w przypadku kurcząt karmionych kukurydzą rozdrobnioną prawdopodobnie dzięki wzrostowi strawności skrobi w górnej części jelit.

4. Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dorobek naukowy obejmuje oryginalne prace twórcze, prace przeglądowe, referaty naukowe, doniesienia i komunikaty naukowe prezentowane na konferencjach krajowych i zagranicznych. Jestem autorem lub współautorem **44** pozycji bibliograficznych (tabela 1).

- a) 15** oryginalnych prac twórczych, w tym **14** po uzyskaniu stopnia doktora, w czasopismach z listy JCR -**15**, wszystkie w języku angielskim, opublikowanych w większości w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym.
- b) 3** prace przeglądowe, w tym **2** po uzyskaniu stopnia doktora, w czasopismach z listy JCR
- c) 3** publikacje w recenzowanych materiałach z konferencji międzynarodowych, uwzględnionych w *Web of Science* (wszystkie po uzyskaniu stopnia doktora)
- d) 2** wygłoszone referaty naukowe (**1** przed, **1** po uzyskaniu stopnia doktora)
 - na konferencjach krajowych – **2**
- e) 25** doniesień i komunikatów naukowych przedstawionych na zagranicznych i krajowych konferencjach naukowych (**3** przed, **22** po uzyskaniu stopnia doktora); w tym
 - na konferencjach zagranicznych – **11** (**2** przed, **9** po uzyskaniu stopnia doktora)

- na konferencjach krajowych – **14** (**1** przed, **13** po uzyskaniu stopnia doktora),

Oryginalne recenzowane prace twórcze i przeglądowe opublikowałam w następujących czasopismach :

- Acta Biochimica Polonica – **2** pozycje (**IF = 1,491; 1,389**)
- Animal Science Papers and Reports - **2** pozycje (**IF = 0,349; 0,718**)
- Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy – **1** pozycja (**IF = 0,357**)
- Medycyna Weterynaryjna – **1** pozycja
- Polish Journal of Veterinary Science – **4** pozycje (**IF = 0,565; 0,570; 0,712; 0,719**)
- Reproduction in Domestic Animals - **3** pozycje (**IF = 1,210; 1,210; 1,210**)
- Reproductive Biology – **1** pozycja
- Theriogenology - **1** pozycja (**IF = 1,838**)
- Poultry Sciences - **1** pozycja (**IF = 1,672**)
- Materiały konferencji zagranicznej – **3** pozycje

Szczegółowy wykaz opublikowanych prac w czasopismach naukowych podano w tabeli 1.

Całkowity **IF** mojego dorobku naukowego wynosi **14,0**. Całość po uzyskaniu stopnia doktora. Liczba cytowań w bazie **Web of Science Core Collection** wynosi **93**; a **indeks Hirscha** wynosi **4**. Całkowita liczba cytowań **na platformie Web of Science** wynosi **100**, a **indeks Hirscha** wynosi **4**. Indeks Hirscha i liczbę cytowań podano na dzień (01.08.2016)

Ogólna wartość przedstawionego do oceny dorobku naukowego (wg aktualnej punktacji MNiSW) wynosi **397** punktów, w tym po uzyskaniu stopnia doktora **382**. Wszystkie prace wydane po uzyskaniu stopnia doktora opublikowano w czasopismach z listy **JCR**.

Tabela 1

Lp.	Kategoria	Liczba pozycji/liczba punktów		
		przed	po	Ogółem
1.	Publikacja w czasopiśmie naukowym posiadającym IF, wymienionym w części A wykazu MNiSW	1 / 15	14 / 315	15 / 330
2.	Publikacja w czasopiśmie naukowym posiadającym IF, wymienionym w części A wykazu MNiSW, procesie wydawniczym, przyjęte do druku	-	1 / 25	1 / 25
3.	Publikacja w recenzowanych materiałach z konferencji międzynarodowej, uwzględnionej w bazie <i>Web of Science</i>	-	3 / 42	3 / 42
4.	Pozostałe publikacje, streszczenia lub doniesienia na konferencje naukowe, publikacje popularnonaukowe	5	20	25
5.	Nie opublikowane opracowania (oczekujące na publikację, prace projektowe, doświadczalno-konstrukcyjne, ważniejsze ekspertyzy. itp.)	-	2	2
	Razem	6 / 15	40 / 382	46 / 397

Sumaryczny Impact Factor – **14,0** (całość po uzyskaniu stopnia doktora)

Liczba cytowań: **Web of Science Core Collection- 93 (h-index = 4)**



Załącznik 1. Top lista 20 najlepszych publikacji z tego samego obszaru nauki w 2012, 2014, 2015, 2016 roku według BioMedical Library Uniwersytetu Minnesota w USA.

2012

List 1: Top 20 Articles, in the Domain of Article 21957748, Since its Publication (2011)

1. Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive processes in mammals. Mogielnicka-Brzozowska M, Kordan W: Pol J Vet Sci; 2011;14(3):489-99

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21957748%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

2. Zinc-binding proteins from boar seminal plasma -- isolation, biochemical characteristics and influence on spermatozoa stored at 4°C. Mogielnicka-Brzozowska M, Wysocki P, Strzepek J, Kordan W: Acta Biochim Pol; 2011;58(2):171-7

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21584285%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

3. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. Bernardini A, Hozbor F, Sanchez E, Fornace MW, Alberio RH, Cesari A: Theriogenology; 2011 Aug;76(3):436-47

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21601269%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

4. Seminal plasma proteins: what role do they play? Rodriguez-Martinez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ: Am J Reprod Immunol; 2011 Jul;66 Suppl 1:11-22

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21726334%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

5. Colloid centrifugation removes seminal plasma and cholesterol from boar spermatozoa. Kruse R, Dutta PC, Morrell JM: Reprod Fertil Dev; 2011;23(7):858-65

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21871205%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

6. Steroid hormone content of seminal plasma influences fertilizing ability of sperm in White Leghorns. Anderson EM, Navara KJ: Poult Sci; 2011 Sep;90(9):2035-40

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21844270%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

7. Density gradient centrifugation of sperm from a subfertile stallion and effect of seminal plasma addition on fertility. Mari G, Castagnetti C,

Rizzato G, Mislei B, Iacono E, Merlo B: Anim Reprod Sci; 2011 Jun;126(1-2):96-100

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21616614%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

8. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. Jobim MI, Trein C, Zirkler H, Gregory RM, Sieme H, Mattos RC: Theriogenology; 2011 Sep 1;76(4):765-71

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21601917%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

9. Paramount levels of ergothioneine transporter SLC22A4 mRNA in boar seminal vesicles and cross-species analysis of ergothioneine and glutathione in seminal plasma. Nikodemus D, Lazic D, Bach M, Bauer T, Pfeiffer C, Wiltzer L, Lain E, Schäfermig E, Gräfendemann D: J Physiol Pharmacol; 2011 Aug;62(4):411-9

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=22100842%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

10. Isolation of lipocalin-type protein from rainbow trout seminal plasma and its localisation in the reproductive system. Nynca J, Dietrich MA, Bilińska B, Kotula-Balak M, Kiebasa T, Karol H, Ciereszko A: Reprod Fertil Dev; 2011;23(2):381-9

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21211472%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

11. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. Vadnais ML, Althouse GC: Theriogenology; 2011 Nov;76(8):1508-16

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21803410%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

12. Identification of calcium-binding proteins in fish seminal plasma. Dietrich MA, Nynca J, Westfalewicz B, Karol H, Ciereszko A: Fish Physiol Biochem; 2011 Sep;37(3):447-52

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21042848%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

13. Verification of male infertility biomarkers in seminal plasma by multiplex selected reaction monitoring assay. Drabovich AP, Jarvi K, Diamandis EP: Mol Cell Proteomics; 2011 Dec;10(12):M110.004127

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21933954%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

14. Addition of seminal plasma to post-thawing equine semen: what is the effect on sperm cell viability? de Andrade AF, Zaffalon FG, Celeghini EC, Nascimento J, Tarragã OF, Martins SM, Alonso MA, Arruda RP: Reprod Domest Anim; 2011 Aug;46(4):682-6

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21121969%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

15. Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils. Doty A, Buhi WC, Benson S, Scoggin KE, Pozor M, Macpherson M, Mutz M, Troedsson MH: Biol Reprod; 2011 Jul;85(1):157-64
Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21389342%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

16. Loss of cysteine-rich secretory protein 4 (Crisp4) leads to deficiency in sperm-zona pellucida interaction in mice. Turunen HT, Sipilä P, Krutskikh A, Toivanen J, Mankonen H, Härmälä V, Björkrgren I, Huhtaniemi I, Poutanen M: Biol Reprod; 2012 Jan;86(1):1-8
Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21865554%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

17. The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. Kershaw-Young CM, Maxwell WM: Theriogenology; 2011 Oct 15;76(7):1197-206
Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21820722%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

18. Transgene transmission in chickens by sperm-mediated gene transfer after seminal plasma removal and exogenous DNA treated with dimethylsulfoxide or N,N-dimethylacetamide. Collares T, Campos VF, De Leon PM, Cavalcanti PV, Amaral MG, Dellagostin OA, Deschamps JC, Seixas FK: J Biosci; 2011 Sep;36(4):613-20
Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21857108%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

19. Seminal molecular markers as a non-invasive diagnostic tool for the evaluation of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. Aslani F, Modarresi MH, Soltanghorae H, Akhondi MM, Shabani A, Lakpour N, Sadeghi MR: Syst Biol Reprod Med; 2011 Aug;57(4):190-6
Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21548847%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

20. Quality characteristics and fertilizing ability of ram sperm subpopulations separated by partition in an aqueous two-phase system. Mendoza N, Casao A, Del Valle I, Serrano E, Nicolau S, Asumpção ME, Muiño-Blanco T, Cebrián-Párez JA, Pérez-Párez R: J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci; 2012 Jan 1;880(1):74-81
Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=22153331%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

List 2: Top 20 Free-Fulltext Articles, in the Domain of Article 21957748, in the Past 12 Months

1. Zinc-binding proteins from boar seminal plasma -- isolation, biochemical characteristics and influence on spermatozoa stored at 4°C. Mogielnicka-Brzozowska M, Wysocki P, Strzeżek J, Kordan W: Acta Biochim Pol; 2011;58(2):171-7
Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21584285%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

2. Paramount levels of ergothioneine transporter SLC22A4 mRNA in boar seminal vesicles and cross-species analysis of ergothioneine and glutathione in seminal plasma. Nikodemus D, Lazic D, Bach M, Bauer T, Pfeiffer C, Wiltzer L, Lain E, SchÄfÄmrig E, GrÄfÄndemann D: J Physiol Pharmacol; 2011 Aug;62(4):411-9

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=22100842%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

3. Transgene transmission in chickens by sperm-mediated gene transfer after seminal plasma removal and exogenous DNA treated with dimethylsulfoxide or N,N-dimethylacetamide. Collares T, Campos VF, De Leon PM, Cavalcanti PV, Amaral MG, Dellagostin OA, Deschamps JC, Seixas FK: J Biosci; 2011 Sep;36(4):613-20

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21857108%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

4. Computational analysis of Concanavalin A binding glycoproteins of human seminal plasma. Tomar AK, Sooch BS, Yadav S: Bioinformation; 2011;7(2):69-75

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21938208%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

5. Correlation of membrane binding and hydrophobicity to the chaperone-like activity of PDC-109, the major protein of bovine seminal plasma. Sankhala RS, Damai RS, Swamy MJ: PLoS One; 2011;6(3):e17330

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21408153%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

6. Mouse sperm undergo GPI-anchored protein release associated with lipid raft reorganization and acrosome reaction to acquire fertility. Watanabe H, Kondoh G: J Cell Sci; 2011 Aug 1;124(Pt 15):2573-81

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21750187%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

7. TRY-5 is a sperm-activating protease in Caenorhabditis elegans seminal fluid. Smith JR, Stanfield GM: PLoS Genet; 2011 Nov;7(11):e1002375

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=22125495%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

8. Elucidation of the involvement of p14, a sperm protein during maturation, capacitation and acrosome reaction of caprine spermatozoa. Nandi P, Ghosh S, Jana K, Sen PC: PLoS One; 2012;7(1):e30552

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=22291985%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

9. The positive effects of seminal plasma during the freezing process on cryosurvival of sperm with poor freezability in the rhesus macaque (Macaca mulatta). Yang S, Ping S, Ji S, Lu Y, Niu Y, Wang H, Ji W, Si W: J Reprod Dev; 2011 Dec;57(6):737-43

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21897058%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

10. The *Drosophila melanogaster* seminal fluid protease "seminase" regulates proteolytic and post-mating reproductive processes. LaFlamme BA, Ram KR, Wolfner MF: PLoS Genet; 2012 Jan;8(1):e1002435

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=22253601%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

11. Sperm proteasomes degrade sperm receptor on the egg zona pellucida during mammalian fertilization. Zimmerman SW, Manandhar G, Yi YJ, Gupta SK, Sutovsky M, Odhiambo JF, Powell MD, Miller DJ, Sutovsky P: PLoS One; 2011;6(2):e17256

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21383844%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

12. Sperm proteasome and fertilization. Sutovsky P: Reproduction; 2011 Jul;142(1):1-14

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21606061%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

13. Altered antioxidant status and increased lipid per-oxidation in seminal plasma of tunisian infertile men. Atig F, Raffa M, Ali HB, Abdelhamid K, Saad A, Ajina M: Int J Biol Sci; 2012;8(1):139-49

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=22211112%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

14. Mass-specific metabolic rate and sperm competition determine sperm size in marsupial mammals. Tourmente M, Gomendio M, Roldan ER: PLoS One; 2011;6(6):e21244

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21731682%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

15. Role of FYN kinase in spermatogenesis: defects characteristic of Fyn-null sperm in mice. Luo J, Gupta V, Kern B, Tash JS, Sanchez G, Blanco G, Kinsey WH: Biol Reprod; 2012 Jan;86(1):1-8

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21918125%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

16. The impact of blood and seminal plasma zinc and copper concentrations on spermogram and hormonal changes in infertile Nigerian men. Akinloye O, Abbiyesuku FM, Oguntibeju OO, Arowojolu AO, Truter EJ: Reprod Biol; 2011 Jul;11(2):83-98

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21804631%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

17. Protein-specific manipulation of ejaculate composition in response to female mating status in *Drosophila melanogaster*. Sirot LK, Wolfner MF, Wigby S: Proc Natl Acad Sci U S A; 2011 Jun 14;108(24):9922-6

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21628597%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

18. Cationic amphipathic peptides accumulate sialylated proteins and lipids in the plasma membrane of eukaryotic host cells. Weghuber J, Aichinger MC,

Brameshuber M, Wieser S, Ruprecht V, Plochberger B, Madl J, Horner A, Reipert S, Lohner K, Henics T, SchÄfÄ½tz GJ: *Biochim Biophys Acta*; 2011 Oct;1808(10):2581-90

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21718688%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

19. Towards a semen proteome of the dengue vector mosquito: protein identification and potential functions. Sirot LK, Hardstone MC, Helinski ME, Ribeiro JM, Kimura M, Deewatthanawong P, Wolfner MF, Harrington LC: *PLoS Negl Trop Dis*; 2011;5(3):e989

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=21423647%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

20. Isothermal titration calorimetric studies on the interaction of the major bovine seminal plasma protein, PDC-109 with phospholipid membranes. Anbazhagan V, Sankhala RS, Singh BP, Swamy MJ: *PLoS One*; 2011;6(10):e25993

Go to the online record:

<http://bmlsearch.com/?&kwr=22022488%5Bpmid%5D&cmpgn83301=DND2045TA3zOKlwPn&xpclps3=Matches>

List 1 Top 20 Articles, in the Domain of Article 21584285, Since its Publication (2011)

1. Zinc-binding proteins from boar seminal plasma -- isolation, biochemical characteristics and influence on spermatozoa stored at 4°C.

Mogielnicka-Brzozowska M, Wysocki P, Strzeżek J, Kordan W.
Acta Biochim Pol; 2011;58(2):171-7.

[Free fulltext](#) | [Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Email](#) mmog@uwm.edu.pl | [Citation export](#)

2. Colloid centrifugation removes seminal plasma and cholesterol from boar spermatozoa.

Kruse R, Dutta PC, Morrell JM.
Reprod Fertil Dev; 2011;23(7):858-65.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

3. Artificial insemination with seminal plasma improves the reproductive performance of frozen-thawed boar epididymal spermatozoa.

Okazaki T, Akiyoshi T, Kan M, Mori M, Teshima H, Shimada M.
J Androl; 2012 Sep-Oct;33(5):990-8.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

4. Isolation and identification of Concanavalin A binding glycoproteins from human seminal plasma: a step towards identification of male infertility marker proteins.

Tomar AK, Sood BS, Raj I, Singh S, Singh TP, Yadav S.
Dis Markers; 2011;31(6):379-86.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

5. The percentage of spermatozoa lost during the centrifugation of brown bear (*Ursus arctos*) ejaculates is associated with some spermatozoa quality and seminal plasma characteristics.

Alvarez M, Nicolas M, Borragán S, Lopez-Urueña E, Anel-López L, Martinez-Pastor F,

Tamayo-Canul J, Anel L, de Paz P.

Anim Reprod Sci; 2012 Nov;135(1-4):113-21.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

6. Oral zinc supplementation restore high molecular weight seminal zinc binding protein to normal value in Iraqi infertile men.

Hadwan MH, Almashhedy LA, Alsalman AR.

BMC Urol; 2012;12:32.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Email](#) mahmoudhadwan@gmail.com | [Citation export](#)

7. Boar variability affects sperm metabolism activity in liquid stored semen at 5 degrees C.

Dziekońska A, Strzezek J.

Pol J Vet Sci; 2011;14(1):21-7.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Email](#) a.dziekonska@uwm.edu.pl | [Citation export](#)

8. Biochemical isolation and purification of ovulation-inducing factor (OIF) in seminal plasma of llamas.

Ratto MH, Delbaere LT, Leduc YA, Pierson RA, Adams GP.

Reprod Biol Endocrinol; 2011;9:24.

[Free fulltext](#) | [Abstract](#) | [1 citer](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

9. Spermatozoa in the sperm-peak-fraction of the boar ejaculate show a lower flow of Ca(2+) under capacitation conditions post-thaw which might account for their higher membrane stability after cryopreservation.

Hossain MS, Johannisson A, Siqueira AP, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H.

Anim Reprod Sci; 2011 Oct;128(1-4):37-44.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

10. New strategies of boar sperm cryopreservation: development of novel freezing and thawing methods with a focus on the roles of seminal plasma.

Okazaki T, Shimada M.

Anim Sci J; 2012 Sep;83(9):623-9.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

11. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing.

Leahy T, de Graaf SP.

Reprod Domest Anim; 2012 Aug;47 Suppl 4:207-13.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Email](#) t.leahy@uq.edu.au | [Citation export](#)

12. Isolation of lipocalin-type protein from rainbow trout seminal plasma and its localisation in the reproductive system.

Nynca J, Dietrich MA, Bilińska B, Kotula-Balak M, Kiełbasa T, Karol H, Ciereszko A.

Reprod Fertil Dev; 2011;23(2):381-9.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Email](#) j.nynca@pan.olsztyn.pl | [Citation export](#)

13. Effects of vitamins, probiotics, and protein level on semen traits and some seminal plasma macro- and microminerals of male broiler breeders after zinc-induced molting.

Khan RU, Zia-Ur-Rahman, Javed I, Muhammad F.

Biol Trace Elem Res; 2012 Jul;148(1):44-52.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

14. Boar seminal plasma or hen's egg yolk decrease the in-vitro chemotactic and phagocytotic activities of neutrophils when co-incubated with boar or bull sperm.

Li JC, Yamaguchi S, Funahashi H.

Theriogenology; 2012 Jan 1;77(1):73-80.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

15. Differences in the ability of spermatozoa from individual boar ejaculates to withstand different semen-processing techniques.

Parrilla I, del Olmo D, Sijes L, Martinez-Alborcia MJ, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J.

Anim Reprod Sci; 2012 May;132(1-2):66-73.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

16. Characteristics of selected seminal plasma proteins and their application in the improvement of the reproductive processes in mammals.

Mogielnicka-Brzozowska M, Kordan W.

Pol J Vet Sci; 2011;14(3):489-99.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Email](#) mmog@uwm.edu.pl | [Citation export](#)

17. The effect of boar seminal plasma on the release of prostaglandins and interleukin-6 by porcine endometrial and cervical cells and bovine endometrial cells.

Madej M, Norrby M, Madsen M, Johannisson A, Hansen C, Madej A.

Reprod Domest Anim; 2012 Feb;47(1):113-24.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Email](#) Malgorzata.Madej@slu.se | [Citation export](#)

18. Subsequent effect of subacute T-2 toxicosis on spermatozoa, seminal plasma and testosterone production in rabbits.

Kovács M, Tornyo G, Matics Z, Kametler L, Rajli V, Bodnár Z, Kulcsár M, Huszenicza G, Keresztes Z, Cseh S.

Animal; 2011 Aug;5(10):1563-9.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Email](#) kovacs.melinda@ke.hu | [Citation export](#)

19. Purification, molecular cloning and functional characterization of swine phosphatidylethanolamine-binding protein 4 from seminal plasma.

An LP, Maeda T, Sakaue T, Takeuchi K, Yamane T, Du PG, Ohkubo I, Ogita H.

Biochem Biophys Res Commun; 2012 Jul 13;423(4):690-6.

[Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

20. Paramount levels of ergothioneine transporter SLC22A4 mRNA in boar seminal vesicles and cross-species analysis of ergothioneine and glutathione in seminal plasma.

Nikodemus D, Lazic D, Bach M, Bauer T, Pfeiffer C, Wiltzer L, Lain E, Schömig E, Gründemann D.

J Physiol Pharmacol; 2011 Aug;62(4):411-9.

[Free fulltext](#) | [Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

List Top 20 Free-Fulltext Articles, in the Domain of Article 21584285, in the Past 12
2 Months

1. Zinc-binding proteins from boar seminal plasma -- isolation, biochemical characteristics and influence on spermatozoa stored at 4°C.

Mogielnicka-Brzozowska M, Wysocki P, Strzeżek J, Kordan W.

Acta Biochim Pol; 2011;58(2):171-7.

[Free fulltext](#) | [Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Email](#) mmog@uwm.edu.pl | [Citation export](#)

2. Biochemical isolation and purification of ovulation-inducing factor (OIF) in seminal plasma of llamas.

Ratto MH, Delbaere LT, Leduc YA, Pierson RA, Adams GP.

Reprod Biol Endocrinol; 2011;9:24.

[Free fulltext](#) | [Abstract](#) | [1 citer](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

3. AMP-activated kinase AMPK is expressed in boar spermatozoa and regulates motility.

Hurtado de Llera A, Martin-Hidalgo D, Gil MC, Garcia-Marin LJ, Bragado MJ.
PLoS One; 2012;7(6):e38840.

[Free fulltext](#) | [Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

4. Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate.

Martinez-Alborcia MJ, Valverde A, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J.
PLoS One; 2012;7(5):e36550.

[Free fulltext](#) | [Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

5. The positive effects of seminal plasma during the freezing process on cryosurvival of sperm with poor freezability in the rhesus macaque (*Macaca mulatta*).

Yang S, Ping S, Ji S, Lu Y, Niu Y, Wang H, Ji W, Si W.
J Reprod Dev; 2011 Dec;57(6):737-43.

[Free fulltext](#) | [Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

6. Elucidation of the involvement of p14, a sperm protein during maturation, capacitation and acrosome reaction of caprine spermatozoa.

Nandi P, Ghosh S, Jana K, Sen PC.
PLoS One; 2012;7(1):e30552.

[Free fulltext](#) | [Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

7. Altered antioxidant status and increased lipid per-oxidation in seminal plasma of tunisian infertile men.

Atig F, Raffa M, Ali HB, Abdelhamid K, Saad A, Ajina M.
Int J Biol Sci; 2012;8(1):139-49.

[Free fulltext](#) | [Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Email](#) atigfatma@hotmail.fr | [Citation export](#)

8. Expression, immunolocalization and processing of fertilins ADAM-1 and ADAM-2 in the boar (*Sus domesticus*) spermatozoa during epididymal maturation.

Fàbrega A, Guyonnet B, Dacheux JL, Gatti JL, Puigmulé M, Bonet S, Pinart E.
Reprod Biol Endocrinol; 2011;9:96.

[Free fulltext](#) | [Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

9. Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men.

Atig F, Raffa M, Habib BA, Kerkeni A, Saad A, Ajina M.
BMC Urol; 2012;12:6.

[Free fulltext](#) | [Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Email](#) atigfatma@hotmail.fr | [Citation export](#)

10. Genotype-independent transmission of transgenic fluorophore protein by boar spermatozoa.

Garrels W, Holler S, Taylor U, Herrmann D, Struckmann C, Klein S, Barg-Kues B, Nowak-Imialek M, Ehling C, Rath D, Ivics Z, Niemann H, Kues WA.
PLoS One; 2011;6(11):e27563.

[Free fulltext](#) | [Abstract](#) | [More from the authors](#) | [Citation export](#)

2014

Mogielnicka-Brzozowska M, Fraser L, Czarzasta J, Kordan W: Isolation and Temat characterization of zinc-binding proteins of canine seminal plasma. *Pol J Vet Sci*; 2012;15(3):493-8

Od [Mir Siadaty-BioMedLib](#) 

Do mmog@uwm.edu.pl 

Data 2014-12-21 15:08

**List 1: Top 20 Articles, in the Domain of Article 23214370, Since 2012
(publication date of the domain article)**

1. Oral zinc supplementation restores high molecular weight seminal zinc binding protein to normal value in Iraqi infertile men.
Hadwan MH, Almashhedy LA, Alsalman AR.
BMC Urol; 2012;12:32.

2. The antigenic character of zinc-binding proteins and their localization in boar reproductive tract--a preliminary study.
Mogielnicka-Brzozowska M, Fraser L, StrzeÅ½ek J, Kordan W.
Acta Biochim Pol; 2013;60(2):255-8.

3. Functional proteomic analysis of seminal plasma proteins in men with various semen parameters.
Sharma R, Agarwal A, Mohanty G, Jesudasan R, Gopalan B, Willard B, Yadav SP, Sabanegh E.
Reprod Biol Endocrinol; 2013;11:38.

4. Isolation and characterization of canine parvovirus type 2C (CPV-2C) from symptomatic puppies.
Puentes R, Eliopulos N, PÃ©rez R, Franco G, Sosa K, Bianchi P, Furtado A, HÃ¼bner SO, Esteves PA.
Braz J Microbiol; 2012 Jul;43(3):1005-9.

5. Human seminal plasma proteome study: a search for male infertility biomarkers.
Davalieva K, Kiprijanovska S, Noveski P, Plaseski T, Kocevaska B, Plaseska-Karanfilska D.
Balkan J Med Genet; 2012 Dec;15(Suppl):35-8.

6. Natural proteins: Sources, isolation, characterization and applications.
Nehete JY, Bhambar RS, Narkhede MR, Gawali SR.
Pharmacogn Rev; 2013 Jul;7(14):107-16.

7. Lactotransferrin in Asian elephant (*Elephas maximus*) seminal plasma correlates with semen quality.
Kiso WK, Selvaraj V, Nagashima J, Asano A, Brown JL, Schmitt DL, Leszyk J, Travis AJ, Pukazhenthil BS.
PLoS One; 2013;8(8):e71033.

8. Isolation and characterization of zinc-binding proteins of canine seminal plasma.
Mogielnicka-Brzozowska M, Fraser L, Czarzasta J, Kordan W.
Pol J Vet Sci; 2012;15(3):493-8.

9. Immunoaffinity chromatographic isolation of prostate-specific antigen from seminal plasma for capillary electrophoresis analysis of its isoforms.
Garrido-Medina R, Farina-Gomez N, Diez-Masa JC, de Frutos M.
Anal Chim Acta; 2014 Apr 11;820:47-55.

10. Purification, molecular cloning and functional characterization of swine phosphatidylethanolamine-binding protein 4 from seminal plasma.
An LP, Maeda T, Sakaue T, Takeuchi K, Yamane T, Du PG, Ohkubo I, Ogita H.
Biochem Biophys Res Commun; 2012 Jul 13;423(4):690-6.

11. Comparison of protein fractions in seminal plasma from multiple sperm collections in sterlet (*Acipenser ruthenus*).

Shaliutina A, Hulak M, Li P, Sulc M, Dzyuba B, Linhart O.
Reprod Domest Anim; 2013 Feb;48(1):156-9.

12. Identification of fatty acids in canine seminal plasma.
Dãaz R, Inostroza K, Risopatrã³n J, Sanchez R, Sepã°lveda N.
Andrologia; 2014 Mar;46(2):194-7.

13. Spermatozoa motility and variation in the seminal plasma proteome of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) during the reproductive season.
Shaliutina A, Hulak M, Dzyuba B, Linhart O.
Mol Reprod Dev; 2012 Dec;79(12):879-87.

14. Electroejaculation increases low molecular weight proteins in seminal plasma modifying sperm quality in Corriedale rams.
Ledesma A, Manes J, Cesari A, Alberio R, Hozbor F.
Reprod Domest Anim; 2014 Apr;49(2):324-32.

15. Isolation and characterization of a canine mammary cell line prepared for proteomics analysis.
Zamani-Ahmadmahmudi M, Nassiri SM, Jahanzad I, Shirani D, Rahbarghazi R, Yazdani B.
Tissue Cell; 2013 Jun;45(3):183-90.

16. Isolation and Characterization of an Ovoinhibitor, a Multidomain Kazal-Like Inhibitor from Turkey (*Meleagris gallopavo*) Seminal Plasma.
Sã,owiã„ska M, Liszewska E, Nynca J, Bukowska J, Hejmej A, Biliã„ska B, Szubstarski J, Kozã,owski K, Jankowski J, Ciereszko A.
Biol Reprod; 2014 Nov;91(5):108.

17. Ultrastructural and enzymatic activity of membranous vesicles isolated from canine seminal plasma.
Zelli R, Bellezza I, Rambotti MG, Minelli A, Polisca A.
Reprod Domest Anim; 2013 Apr;48(2):252-7.

18. Effects of vitamins, probiotics, and protein level on semen traits and some seminal plasma macro- and microminerals of male broiler breeders after zinc-induced molting.
Khan RU, Zia-Ur-Rahman, Javed I, Muhammad F.
Biol Trace Elem Res; 2012 Jul;148(1):44-52.

19. Seasonal variations in seminal plasma proteins of buffalo.
Sharma L, Pandey V, Nigam R, Singh P, Saxena A, Swain DK.
Reprod Domest Anim; 2014 Jun;49(3):387-91.

20. Aggregation analysis of Con A binding proteins of human seminal plasma: a dynamic light scattering study.
Tomar AK, Sooch BS, Singh S, Yadav S.
Int J Biol Macromol; 2013 Feb;53:133-7.

2015

List 1: Top 20 Articles, in the Domain of Article 23214370, Since 2012 (publication date of the domain article)

1. Isolation and characterization of zinc-binding proteins of canine seminal plasma.
Mogielnicka-Brzozowska M, Fraser L, Czarzasta J, Kordan W.
Pol J Vet Sci; 2012;15(3):493-8.

2. Prostatosomes of canine seminal plasma - zinc-binding ability and effects on motility characteristics and plasma membrane integrity of spermatozoa.
Mogielnicka-Brzozowska M, Strzeżek R, Wasilewska K, Kordan W.
Reprod Domest Anim; 2015 Jun;50(3):484-91.

3. Semen characteristics and selected biochemical markers of canine seminal plasma in various seasons of the year.
Strzeżek R, Szemplińska K, Filipowicz K, Kordan W.
Pol J Vet Sci; 2015;18(1):13-8.

4. Immunoaffinity chromatographic isolation of prostate-specific antigen from seminal plasma for capillary electrophoresis analysis of its isoforms.
Garrido-Medina R, Farina-Gomez N, Diez-Masa JC, de Frutos M.
Anal Chim Acta; 2014 Apr 11;820:47-55.

5. Purification, molecular cloning and functional characterization of swine phosphatidylethanolamine-binding protein 4 from seminal plasma.
An LP, Maeda T, Sakaue T, Takeuchi K, Yamane T, Du PG, Ohkubo I, Ogita H.
Biochem Biophys Res Commun; 2012 Jul 13;423(4):690-6.

6. Oral zinc supplementation restores high molecular weight seminal zinc binding protein to normal value in Iraqi infertile men.
Hadwan MH, Almashhedy LA, Alsalman AR.
BMC Urol; 2012;12:32.

7. Comparison of protein fractions in seminal plasma from multiple sperm collections in sterlet (*Acipenser ruthenus*).
Shaliutina A, Hulak M, Li P, Sulc M, Dzyuba B, Linhart O.
Reprod Domest Anim; 2013 Feb;48(1):156-9.

8. Protein profile of the seminal plasma of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758).
Santos EA, Sousa PC, Martins JA, Moreira RA, Monteiro-Moreira AC, Moreno FB, Oliveira MF, Moura AA, Silva AR.
Reproduction; 2014 Jun;147(6):753-64.

9. Identification of fatty acids in canine seminal plasma.
Dãaz R, Inostroza K, Risopatrã³n J, Sanchez R, Sepã³lveda N.
Andrologia; 2014 Mar;46(2):194-7.

10. Seasonal variations in seminal plasma proteins of buffalo.
Sharma L, Pandey V, Nigam R, Singh P, Saxena A, Swain DK.
Reprod Domest Anim; 2014 Jun;49(3):387-91.

11. The antigenic character of zinc-binding proteins and their localization in boar reproductive tract--a preliminary study.
Mogielnicka-Brzozowska M, Fraser L, Strzeżek J, Kordan W.
Acta Biochim Pol; 2013;60(2):255-8.

12. Electroejaculation increases low molecular weight proteins in seminal plasma modifying sperm quality in Corriedale rams.
Ledesma A, Manes J, Cesari A, Alberio R, Hozbor F.
Reprod Domest Anim; 2014 Apr;49(2):324-32.

13. Spermatozoa motility and variation in the seminal plasma proteome of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) during the reproductive season.
Shaliutina A, Hulak M, Dzyuba B, Linhart O.
Mol Reprod Dev; 2012 Dec;79(12):879-87.

14. Isolation and characterization of a canine mammary cell line prepared for proteomics analysis.
Zamani-Ahmadmahmudi M, Nassiri SM, Jahanzad I, Shirani D, Rahbarghazi R, Yazdani B.
Tissue Cell; 2013 Jun;45(3):183-90.
15. Isolation and characterization of an ovoidinhibitor, a multidomain Kazal-like inhibitor from Turkey (*Meleagris gallopavo*) seminal plasma.
SÅ,owiÅ„ska M, Liszewska E, Nynca J, Bukowska J, Hejmej A, BiliÅ„ska B, Szubstarski J, KozÅ„owski K, Jankowski J, Ciereszko A.
Biol Reprod; 2014 Nov;91(5):108.
16. Functional proteomic analysis of seminal plasma proteins in men with various semen parameters.
Sharma R, Agarwal A, Mohanty G, Jesudasan R, Gopalan B, Willard B, Yadav SP, Sabanegh E.
Reprod Biol Endocrinol; 2013;11:38.
17. Characterization, expression and antibacterial properties of apolipoproteins A from carp (*Cyprinus carpio* L.) seminal plasma.
Dietrich MA, Adamek M, BiliÅ„ska B, Hejmej A, Steinhagen D, Ciereszko A.
Fish Shellfish Immunol; 2014 Dec;41(2):389-401.
18. Ultrastructural and enzymatic activity of membranous vesicles isolated from canine seminal plasma.
Zelli R, Bellezza I, Rambotti MG, Minelli A, Polisca A.
Reprod Domest Anim; 2013 Apr;48(2):252-7.
19. Effects of vitamins, probiotics, and protein level on semen traits and some seminal plasma macro- and microminerals of male broiler breeders after zinc-induced molting.
Khan RU, Zia-Ur-Rahman, Javed I, Muhammad F.
Biol Trace Elem Res; 2012 Jul;148(1):44-52.
20. Growth, testis size, spermatogenesis, semen parameters and seminal plasma and sperm membrane protein profile during the reproductive development of male goats supplemented with de-oiled castor cake.
Oliveira CH, Silva AM, Silva LM, van Tilburg MF, Fernandes CC, Velho AL, Moura AA, Moreno FB, Monteiro-Moreira AC, Moreira RA, Lima IM, Rondina D.
Reprod Toxicol; 2015 Jun;53:152-61.

2016

Mogielnicka-Brzozowska M, Fraser L, Czarzasta J, Kordan W: Isolation and
Temat characterization of zinc-binding proteins of canine seminal plasma. Pol J Vet Sci;
2012;15(3):493-8

Od [Kery Ernst-BioMedLib](#) 

Do mmog@uwm.edu.pl 

Data 2016-01-08 14:25

List 1: Top 20 Articles, in the Domain of Article 23214370, Since 2012
(publication date of the domain article)

1. **Isolation and characterization of zinc-binding proteins of canine seminal plasma.**

Mogielnicka-Brzozowska M, Fraser L, Czarzasta J, Kordan W.
Pol J Vet Sci; 2012;15(3):493-8.

2. Proteomic Characterization of Zinc-Binding Proteins of Canine Seminal Plasma.

Mogielnicka-Brzozowska M, Kowalska N, Fraser L, Kordan W.
Reprod Domest Anim; 2015 Dec;50(6):1017-21.

3. Prostatosomes of canine seminal plasma - zinc-binding ability and effects on motility characteristics and plasma membrane integrity of spermatozoa.

Mogielnicka-Brzozowska M, StrzeÅ¼ek R, Wasilewska K, Kordan W.
Reprod Domest Anim; 2015 Jun;50(3):484-91.

4. Semen characteristics and selected biochemical markers of canine seminal plasma in various seasons of the year.

StrzeÅ¼ek R, SzempliÅ„ska K, Filipowicz K, Kordan W.
Pol J Vet Sci; 2015;18(1):13-8.

5. Immunoaffinity chromatographic isolation of prostate-specific antigen from seminal plasma for capillary electrophoresis analysis of its isoforms.

Garrido-Medina R, Farina-Gomez N, Diez-Masa JC, de Frutos M.
Anal Chim Acta; 2014 Apr 11;820:47-55.

6. Isolation and characterization of an ovoidinhibitor, a multidomain Kazal-like inhibitor from Turkey (Meleagris gallopavo) seminal plasma.

SÅ„owiÅ„ska M, Liszewska E, Nynca J, Bukowska J, Hejmej A, BiliÅ„ska B, Szubstarski J, KozÅ„owski K, Jankowski J, Ciereszko A.
Biol Reprod; 2014 Nov;91(5):108.

7. Purification, molecular cloning and functional characterization of swine phosphatidylethanolamine-binding protein 4 from seminal plasma.

An LP, Maeda T, Sakaue T, Takeuchi K, Yamane T, Du PG, Ohkubo I, Ogita H.
Biochem Biophys Res Commun; 2012 Jul 13;423(4):690-6.

8. Oral zinc supplementation restores high molecular weight seminal zinc binding protein to normal value in Iraqi infertile men.

Hadwan MH, Almashhedy LA, Alsalman AR.
BMC Urol; 2012;12:32.

9. Comparison of protein fractions in seminal plasma from multiple sperm collections in sterlet (Acipenser ruthenus).

Shaliutina A, Hulak M, Li P, Sulc M, Dzyuba B, Linhart O.
Reprod Domest Anim; 2013 Feb;48(1):156-9.

10. Identification of fatty acids in canine seminal plasma.

DÃ¡az R, Inostroza K, RisopatrÃ³n J, Sanchez R, SepÃ³lveda N.
Andrologia; 2014 Mar;46(2):194-7.

11. Protein profile of the seminal plasma of collared peccaries (Pecari tajacu Linnaeus, 1758).

Santos EA, Sousa PC, Martins JA, Moreira RA, Monteiro-Moreira AC, Moreno FB, Oliveira MF, Moura AA, Silva AR.
Reproduction; 2014 Jun;147(6):753-64.

12. Seasonal variations in seminal plasma proteins of buffalo.

Sharma L, Pandey V, Nigam R, Singh P, Saxena A, Swain DK.
Reprod Domest Anim; 2014 Jun;49(3):387-91.

13. The antigenic character of zinc-binding proteins and their localization in boar reproductive tract--a preliminary study.

**Mogielnicka-Brzozowska M, Fraser L, StrzeÅ½ek J, Kordan W.
Acta Biochim Pol; 2013;60(2):255-8.**

14. Electroejaculation increases low molecular weight proteins in seminal plasma modifying sperm quality in Corriedale rams.
Ledesma A, Manes J, Cesari A, Alberio R, Hozbor F.
Reprod Domest Anim; 2014 Apr;49(2):324-32.

15. Spermatozoa motility and variation in the seminal plasma proteome of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) during the reproductive season.
Shaliutina A, Hulak M, Dzuyba B, Linhart O.
Mol Reprod Dev; 2012 Dec;79(12):879-87.

16. Isolation and characterization of a canine mammary cell line prepared for proteomics analysis.
Zamani-Ahmadm Mahmudi M, Nassiri SM, Jahanzad I, Shirani D, Rahbarghazi R, Yazdani B.
Tissue Cell; 2013 Jun;45(3):183-90.

17. Functional proteomic analysis of seminal plasma proteins in men with various semen parameters.
Sharma R, Agarwal A, Mohanty G, Jesudasan R, Gopalan B, Willard B, Yadav SP, Sabanegh E.
Reprod Biol Endocrinol; 2013;11:38.

18. Effect of seminal plasma vesicular structures in canine frozen-thawed semen.
Goericke-Pesch S, Hauck S, Failing K, Wehrend A.
Theriogenology; 2015 Dec;84(9):1490-8.

19. Ultrastructural and enzymatic activity of membranous vesicles isolated from canine seminal plasma.
Zelli R, Bellezza I, Rambotti MG, Minelli A, Polisca A.
Reprod Domest Anim; 2013 Apr;48(2):252-7.

20. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of Bali bull (*Bos javanicus*) seminal plasma proteins and their relationship with semen quality.
Sarsaifi K, Haron AW, Vejayam J, Yusoff R, Hani H, Omar MA, Hong LW, Yimer N, Ju TY, Othman AM.
Theriogenology; 2015 Oct 1;84(6):956-68.