

# Oriin seminaaliplasman matriksimetalloproteinaasit

ELK Johanna Vakkamäki

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma

Helsingin yliopisto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto

Kotieläinten lisääntymistiede



Tiedekunta - Fakultet – Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning – Department Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto	
Tekijä - Författare – Author Johanna Vakkamäki			
Työn nimi - Arbetets titel – Title Oriin seminaaliplasman matriksimetalloproteinaasit			
Oppiaine - Läroämne – Subject Kotieläinten lisääntymistiede			
Työn laji - Arbetets art – Level Lisensiaatintutkielma		Aika - Datum – Month and year 4.5.2011	Sivumäärä - Sidoantal – Number of pages 34
Tiivistelmä - Referat – Abstract			
<p>Siirto- ja pakastesiemennysten lisääntyessä tammojen hedelmällisyystulosten parantuminen on hevoskasvatuksen taloudellisuuden kannalta merkittävää. Oriitten spermoissa on eroja sekä siirto- että pakastekestävyydessä. Pelkällä orivalinnalla ei voida kuitenkaan vaikuttaa hedelmällisyystuloksiin, sillä yleensä valinta painottuu suorituskykyyn. Siittiöiden lisäksi seminaaliplasmalla on havaittu vaikutuksia siirto- ja pakastuskestävyyteen. Seminaaliplasma koostuu useista erilaisista biologisista komponenteista, joista matriksimetalloproteinaasit (MMP) ovat yksi. Ne ovat proteiiniperhe, johon kuuluu useita jäseniä. MMP:t kykenevät hajottamaan muun muassa solun ulkoisia tukirakenteita sekä tyvikalvoa erilaisissa fysiologisissa ja patologisissa tiloissa. Matriksimetalloproteinaaseja on löydetty useista kudoksista ja myös seminaaliplasmasta.</p> <p>Työn tutkimusosuudessa haluttiin selvittää MMP-pitoisuuksia, niiden vaihteluita oriitten välillä ja mahdollisia vaikutuksia hedelmällisyystuloksiin. Seminaaliplasmanäytteitä tutkittiin yhteensä 43 oriista. Näytteet oli kerätty astutuskaudella 2006 erirotuisilta ja -ikäisiltä hevosilta sekä kahdelta ponilta. Keräysvaiheessa näytteet jaoteltiin 1-4 eri fraktioon. Jokaisesta näytteestä tutkittiin MMP:t zymografian avulla. Seminaaliplasmanäytteiden lisäksi oriilta kerättiin hedelmällisyystietoja siittoloista sekä Suomen raviurheilun ja hevoskasvatuksen keskusjärjestöltä (Suomen Hippos ry).</p> <p>Kaikki tulokset taulukoitiin ja laskettiin aktiiviselle (akt-MMP-2) ja pro-MMP-2:lle sekä kokonais-MMP-9:lle (tot-MMP-9) siittiörikkaassa (SR) ja siittiököyhässä fraktiossa (SK) sekä kokonaisejakulaatissa (KE): keskiarvot, keskihajonnat, mediaanit sekä maksimi- ja minimiarvot. Spearmanin järjestyskorrelaatiokertoimet laskettiin tammojen ensimmäiseen kiimaan tiinehtymisen ja eri MMP-pitoisuuksien välille SR:ssa ja KE:ssa.</p> <p>Oriilla oli havaittavia pitoisuuksia pro- ja akt-MMP-2:ta sekä tot-MMP-9:ää. MMP-pitoisuudet olivat suurimmat SR:ssa. Suurimpia olivat pro-MMP-2:n pitoisuudet ja orikohtaiset erot olivat siinä pieniä. Saadut tulokset vastasivat odotuksia, sillä miesten seminaaliplasmatutkimusten tulokset ovat samansuuntaisia. Eri MMP-pitoisuuksilla ei havaittu korrelaatiota tammojen tiinehtymiseen kanssa.</p> <p>Aineiston pienen koon takia sattumalla voi olla suuri vaikutus tuloksiin. Myös keräysvuodenaika ja yksilön ejakulaation koostumusvaihtelut saattavat vaikuttaa seminaaliplasman MMP-pitoisuuksiin, sillä sen useissa ominaisuuksissa tapahtuu muutoksia näiden muuttujien mukaan. Tulokset ovat suuntaa antavia ja toimivat apuna jatkotutkimuksia suunniteltaessa.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Ori, seminaaliplasma, MMP-2, MMP-9			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Viikin kampuskirjasto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktor och ledare – Director and Supervisor(s)  Prof. Terttu Katila ja ELT Maria Kareskoski			

# SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO.....	3
2 KIRJALLISUUSKATSAUS .....	4
2.1 Oriitten lisääntymisanatomiaa ja – fysiologiaa .....	4
2.1.1 Oriin lisääntymisanatomiaa.....	4
2.1.2 Oriin lisääntymisfysiologiaa .....	6
2.2 Sperma.....	7
2.2.1 Ejakulaatio ja fraktiot .....	7
2.2.2 Siittiöt .....	9
2.2.3 Seminaaliplasma.....	9
3 AINEISTO JA MENETELMÄT .....	14
3.1 Oriit .....	14
3.2 Näytteiden kerääminen ja käsittely .....	14
3.3 Zymografia .....	17
3.4 Hedelmällisyystiedot .....	18
3.5 Tilastolliset analyysit.....	19
4 TULOKSET .....	19
4.1. Pro-matriksimetalloproteinaasi 2 .....	20
4.2. Aktiivinen matriksimetalloproteinaasi 2.....	22
4.3. Kokonais-matriksimetalloproteinaasi 9 .....	25
4.4. Matriksimetalloproteinaasit ja tiinehtyminen .....	27
5 POHDINTA.....	27
6 KIITOKSET .....	29
7 LÄHTEET .....	30

## Selityksiä käytetyille termeille ja lyhenteille

Adenohypofyysi: aivolisäkkeen etulohko

FSH: follikkeliä stimuloiva hormoni, follitropiini, aivolisäkkeen etulohkosta vapautuva gonadotrooppinen hormoni

GnRH: gonadotropin releasing hormone, gonadoliberiini, hypotalamuksesta vapautuva hormoni, joka vapauttaa aivolisäkkeen etulohkosta sekä follitropiinia että lutropiinia

Hypofyysi: aivolisäke

Hypotalamus: talamuksen alla sijaitseva väliaivojen alaosa

KE: kokonaisejakulaatti

LH: luteinisoiva hormoni, lutropiini, aivolisäkkeen etulohkosta erittyvä gonadotrooppinen hormoni

MMP: matriksimetalloproteinaasi

SK: siittiököyhäfraktio

Spermatidi: esisiittiö

Spermatogeneesi: siementiehyiden ituepiteelissä siittiöiden syntyyn johtava kehityssarja

Spermatogonio: alkusiemensolu, siittiökehityksen kantasolu

Spermatoosyytti: varhaissiemensolu, spermatogoniosta jakautumalla syntynyt solu, joka muuttuu edelleen spermatidiksi

SR: siittiörikasfraktio

TIMP: metalloproteinaasien kudosinhibiittori

# 1 JOHDANTO

Siirto- ja pakastespermasiemennysten lisääntyessä siittiöiden säilytyskestävyys on tärkeässä asemassa. Oriitten välillä on kuitenkin eroja sekä siirto- että pakastekestävyydessä. Toisten oriitten sperma kestää hyvin sekä jäädytettynä säilyttämistä että pakastamista, kun taas toisten spermanlaatu heikkenee nopeasti (Katila et al. 2003). Vastauksia ja selityksiä siihen, mikä aiheuttaa eroja oriitten välillä on yritetty löytää niin siittiöistä kuin siemennesteestä. Sperman siirto- ja pakastekestävyyden sekä hedelmällisyystulosten parantuminen olisi merkittävää hevostalouden taloudellisuuden kannalta. Käytettävien oriitten valinta perustuu suurelta osin niiden suorituskykyyn, joten oriitten valinnalla ei tällä hetkellä pystytä suurestikaan vaikuttamaan hedelmällisyystuloksiin. Kyseiset asiat ovat tällä hetkellä tiiviin tutkimuksen alla, ja joitakin eroja oriitten välillä onkin jo pystytty löytämään.

Oriin ejakulaatiossa vapautuva siemenneste koostuu siittiöistä ja seminaaliplasmasta (Senger 2003). Se jakautuu useaan eri fraktioon, joissa siittiöpitoisuus ja biokemiallinen koostumus vaihtelevat (Mann et al. 1956, Tischner et al. 1974). Seminaaliplasma sisältää useita erilaisia biologisia komponentteja kuten ioneja, entsyymejä ja proteiineja (Kosiniak 1975, Magistrini et al. 1995, Kareskoski et al. 2010). Sen tehtävänä on muun muassa kuljettaa siittiöt virtsaputkea pitkin naaraan sukuelimiin ja toimia ravinnon lähteenä siittiöille (Senger 2003, Troedsson et al. 2005). Tutkimuksia on tehty eri komponenttien merkityksestä siemennesteessä, vaikutuksista sen laatuun ja säilytettävyyteen sekä oriin hedelmällisyyteen (Turner & McDonnell 2003, Dias et al. 2004, Pesch et al. 2006, Kareskoski et al. 2010).

MMP:t muodostavat yhden biologisen komponentin seminaaliplasmassa. Ne ovat proteiiniperhe, johon kuuluu useita jäseniä. MMP:t kykenevät hajottamaan muun muassa solun ulkoisia tukirakenteita sekä tyvikalvoa erilaisissa fysiologisissa ja patologisissa tiloissa (Salamonsen 1996, Hulboy et al. 1997). Niitä on löydetty useista kudoksista ja myös seminaaliplasmasta (Hulboy et al. 1997, Shimokawa et al. 2002). MMP-pitoisuuksia on tutkittu muun muassa miesten seminaaliplasmasta (Shimokawa et al. 2002, Tentes et al. 2007).

Lisensiaatin työn tutkimusosuudessa tutkittiin seminaaliplasmanäytteitä yhteensä 43 oriista. Näytteet oli kerätty astutuskaudella 2006 erirotuisilta ja -ikäisiltä hevosilta sekä

kahdelta ponilta. Näytteet oli jaoteltu 1-4 eri fraktioon. Jokaisesta näytteestä tutkittiin matriksimetalloproteinaaseja zymografian avulla.

## **2 KIRJALLISUUSKATSAUS**

### **2.1 Oriitten lisääntymisanatomiaa ja – fysiologiaa**

#### **2.1.1 Oriin lisääntymisanatomiaa**

Oriin sukuelimiä ovat kivekset, lisäkivekset ja lisäsukurauhaset, joita ovat bulbouretraalirauhaset, prostata, rakkularauhaset sekä ampullat (Kuva 1). Kivekset ja lisäkivekset toimivat siittiöiden valmistus- ja kypsympaikkana, kun taas lisäsukurauhaset osallistuvat seminaaliplasman muodostamiseen (Senger 2003).

Kivesten koko vaihtelee hevosten välillä. Ne ovat normaalisti 6-12 cm pitkät, 4-7 cm korkeat ja noin 5 cm leveät ja painavat yhteensä 300-350g (Davies Morel 1993). Kokoon vaikuttaa muun muassa oriin rotu, koko, ikä, vuoden aika ja siitoskäyttö (Naden et al. 1990, Love et al. 1991). Kivesten koko ja parenkyymien paino korreloivat sperman tuotantokyvyn kanssa (Gebauer et al. 1974, Love et al. 1991). Parenkyymien painoa ei pystytä elävältä hevoselta tutkimaan, mutta mittaamalla kiveksien koko voidaan ennustaa oriin spermantuotantokykyä (Love et al. 1991). Siittiöiden lisäksi kiveksissä tuotetaan testosteronia, estrogeeniä ja inhibiiniä. Kiveksien normaalin toiminnan kannalta tärkeässä asemassa ovat Leydigin ja Sertolin solut. Leydigin solut sijaitsevat siementiehyiden välisessä välikudoksessa ja ne tuottavat testosteronia. Siementiehyiden reunalla on Sertolin soluja, joilla on useita tehtäviä. Ne hoitavat kehittyviä siittiösoluja, osallistuvat veri-kivesesteen muodostamiseen sekä erittävät nesteitä ja proteiineja. Sertolin solut tuottavat myös inhibiiniä (Senger 2003).

Lisäkivekset ovat dorsaalisesti kiinni kiveksissä, mutta niiden häntäosa sijaitsee melko kaudaalisesti. Ne toimivat siittiöiden kypsympaikkana ja varastona. Lisäkiveksistä on erotettavissa kolme osaa: pää, runko ja häntä. Lisäkivekset ovat yhteydessä kivekseen pääosastaan ja liittyvät siemenjohtimen avulla virtsaputkeen. Siittiöt siirtyvät epäkypsinä kiveksistä lisäkiveksiin kypsympään (Senger 2003). Lisäkiveksen eri osissa

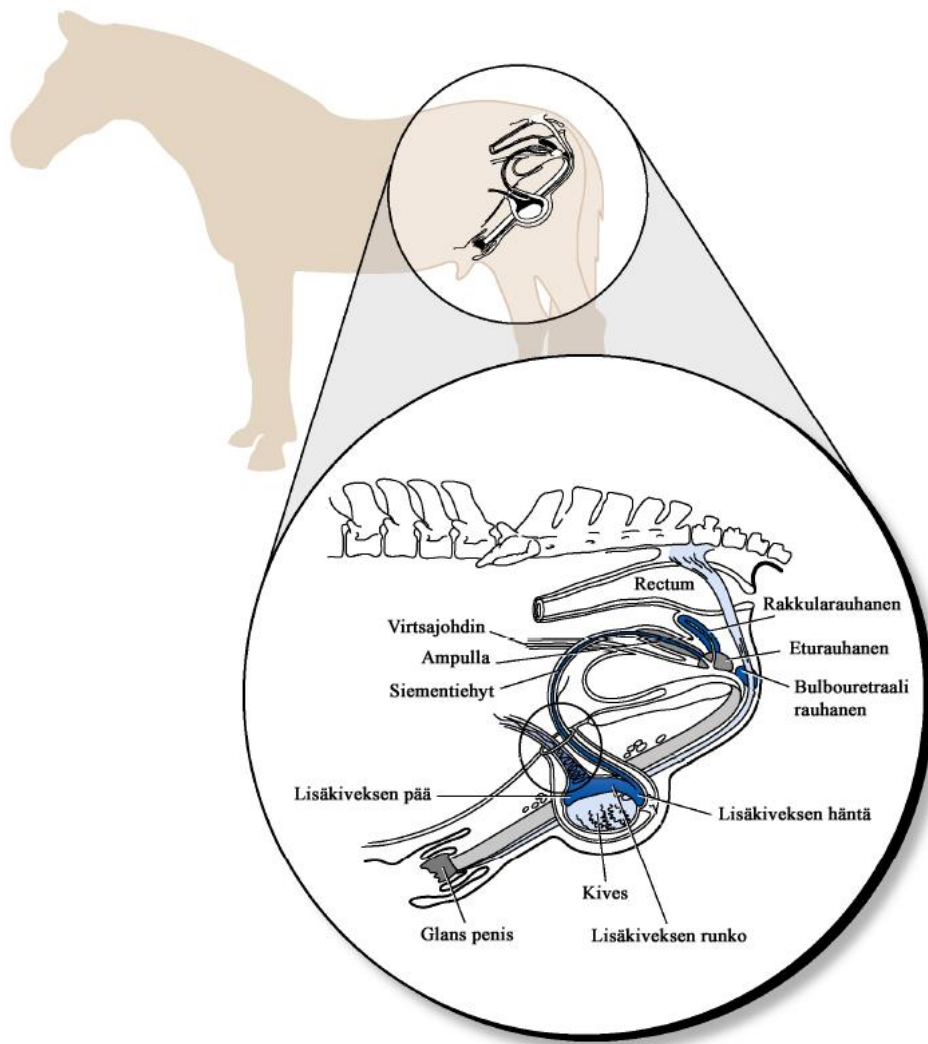
siittiötiheys, samoin kuin erilaisten proteiinien pitoisuus, vaihtelee. Lisäkivekset erittävät useita erilaisia proteiineja, kuten laktoferriniä ja glutationiperoksidaasia lumeniinsa (Fouchécourt et al. 2000).

Lisäsukurauhasista parilliset bulbouretraalirauhaset sijaitsevat peniksen juuressa lähellä anusta (Senger 2003). Rauhasen erite on kirkasta ja sitä erittyy jo ennen varsinaista ejakulaatiota. Sen tarkoituksena on puhdistaa virtsaputkea siellä mahdollisesti olevasta virtsasta ja bakteereista. Erite toimii myös liukasteena parantaen sperman etenemistä oriin virtsaputkessa (Davies Morel 1993).

Prostata sijaitsee ampulloiden ja bulbouretraalirauhasen välissä lähellä kohtaa, jossa virtsaputki liittyy virtsarakkoon (Senger 2003). Prostatan erite on alkaalista ja sisältää paljon proteiineja sekä sitruunahappoa ja sinkkiä (Davies Morel 1993).

Ampulla on siemenjohtimen distaalisen osan laajentuma. Sen tuottamat eritteet laskevat suoraan virtsanputkeen lantio-ontelossa (Senger 2003). Rauhasen erite on kellertävän kermaista ja sisältää runsaasti antioksidatiivista ergotioneiinia (Mann et al. 1956).

Parilliset rakkularauhaset sijaitsevat lantion-ontelossa rakon kaudaalipuolella virtsaputken molemmin puolin. Niiden tuottamat eritteet tyhjenevät virtsaputkeen (Senger 2003). Rauhaset tuottavat suurimman osan seminaaliplasmasta (Davies Morel 1993). Rakkularauhasen erite on läpinäkyvää, väritöntä ja viskoosista (Mann et al. 1956), ja se sisältää paljon natriumia, proteiineja ja sitruunahappoa (Davies Morel 1993). Ejakulaation lopussa tuleva geeli on suurimmaksi osaksi peräisin rakkularauhasista (Mann et al. 1956).



Kuva 1. Oriin sukuelimet (Senger 2003).

### 2.1.2 Oriin lisääntymisfysiologiaa

Oriit saavuttavat sukukypsyyden reilun vuoden ikäisenä, keskimäärin 14 kuukauden iässä, mutta vaihteluväli on suuri: 10 kuukaudesta 24 kuukauteen (Naden et al. 1990, Senger 2003). Puberteetin alkamiseen vaikuttaa muun muassa rotu ja vuodenaika (Naden et al. 1990). Ori säilyttää hedelmällisyytensä loppuikänsä, mutta sperman laatu heikkenee oriin vanhetessa (Davies Morel 1993).

Hevoset ovat pitkän päivän kausilisääntyjiä, mutta tammaan verrattuna oriilla vuodenaika vaikuttaa kuitenkin vähemmän sukupuolitoimintoihin ja oriit pystyvätkin astumaan ja tuottamaan spermaa ympärivuoden (Hoffmann & Landeck 1999). Lisääntymistoiminnoissa on kuitenkin havaittavissa muutoksia normaalin



lisääntymiskauden aikana ja sen ulkopuolella (Pickett et al. 1970). Esimerkiksi oriitten sukupuolihormonipitoisuudet vaihtelevat perifeerisessä verenkierrassa vuodenajan mukaan. Pohjoisella pallon puoliskolla sukupuolihormonipitoisuudet alkavat nousta keväällä ja ne ovat korkeimmillaan loppukevästä ja alkukesästä, kunnes niiden pitoisuudet taas laskevat syksyä kohden (Hoffmann & Landeck 1999). Vuodenaika vaikuttaa myös oriin käyttäytymiseen. Esimerkiksi reaktioaikaan, joka kuluu varsinaisen astumisen alkamiseen tamman näkemisestä, on pidempi talvella. Muutoksia havaitaan myös siemennesteessä (Pickett et al. 1970).

Lisääntymistoimintoja säätelee väliaivojen alaosassa oleva hypotalamus, josta erittyy GnRH:ta hypotalamuksen ja hypofyysin väliseen verenkiertojärjestelmään. GnRH:ta erittyy oriilla tasaisesti toisin kuin tammalla. GnRH:n vaikutuksesta adenohipofyysistä vapautuu FSH:ta ja LH:ta. Molemmilla hormoneilla on omat kohdesolut, joiden toimintaan ne vaikuttavat. LH vaikuttaa kiveksissä oleviin Leydigin soluihin. Kyseiset solut tuottavat sen vaikutuksesta progesteronia, joka muutetaan oriin elimistössä suurimmaksi osaksi testosteroniksi. Kyseinen hormoni aiheuttaa oriille tyypillisen lisääntymiskäyttäytymisen (Senger 2003). FSH puolestaan vaikuttaa kiveksissä oleviin Sertolin soluihin. Solut muuttavat progesteronia dihydrotestosteroniksi ja estrogeeniksi. Sertolin solut osallistuvat myös spermatogeneesiin ja tuottavat lisäksi inhibiiniä, joka vähentää FSH:n tuotantoa adenohipofyysistä (Senger 2003). Kivesten lisäksi progesteronia tuotetaan oriin lisämunuaisissa (Davies Morel 1993). Lisääntymistoimintojen säätelyssä toimii negatiivinen palautusjärjestelmä (feedback). Verenkierrassa oleva progesteroni, estrogeeni ja inhibiini vähentävät GnRH:n vapautumista hypotalamuksesta ja näin myös omaa erittymistään verenkiertoon (Senger 2003).

## **2.2 Sperma**

### **2.2.1 Ejakulaatio ja fraktiot**

Oriin ejakulaatti jakautuu useaan eri fraktioon, jotka eroavat toisistaan siittiötiheydessä, biokemiallisessa koostumuksessa ja siittiönesteen määrässä (Kosiniak 1975). Tischnerin et al. (1974) tutkimuksessa oriilla oli yhdessä ejakulaatiossa keskimäärin 8 sykäystä vaihdellen 5 sykäyksestä 10 sykäykseen. Ejakulaation keskimääräinen kesto kyseisessä

tutkimuksessa oli 7,6 sekuntia (Tischner et al. 1974). Ejakulaatin ominaisuuksissa, kuten tilavuudessa ja siittiömäärässä, on normaalienkin oriiden välillä melko paljon eroa riippuen muun muassa oriin ominaisuuksista ja siitoskäytön määrästä (Pickett et al. 1976). Pickett et al. (1976) tekemässä tutkimuksessa tutkittiin viiden quarterhevosen ejakulaatin ominaisuuksia 13 kuukauden ajan. Tutkimuksessa keskimääräinen ejakulaatin tilavuus oli 65,5 ml ja siittiömäärä  $14,7 \times 10^9$ .

Ejakulaatin koostumus ja määrä vaihtelevat vuoden ajan mukaan. Muun muassa kokonaissiittiömäärä, samoin kuin ejakulaatin geelitön tilavuus, ovat pienempiä siitoskauden ulkopuolella kuin sen aikana (Pickett et al. 1970). Ejakulaatin kokonaismäärän vaihteluiden lisäksi myös fraktioiden suuruus vaihtelee ja siihen vaikuttaa muun muassa oriin seksuaalisen kiihottumisen voimakkuus (Pickett et al. 1976).

Ori, jolla on normaali sukupuolikäyttäytyminen, kiinnostuu kiimaisesta tammasta hyvin nopeasti (Pickett et al. 1970). Ejakulaation saa aikaan sensoristen hermojen aktivoituminen peniksessä. Sen seurauksena siemen vapautuu sukurauhasista ja kulkeutuu virtsaputken kontraktioiden mukana tamman kohtuun (Senger 2003). Ennen varsinaista ejakulaatiota tulee usein pääosin bulbouretraalirauhasesta peräisin oleva kirkas ja vesimäinen esisekreetti (Davies Morel 1993). Ensimmäiset fraktiot esisekreetin jälkeen ovat ulkonäöltään ja koostumukseltaan maitomaista ja sisältävät noin 80 % siemensyöksyn siittiöistä (Tischner et al. 1974). Siittiötiheän fraktion eritteessä on runsaasti ergotioneiniä, joten fraktiossa on mukana runsaasti myös ampullan eritteitä. Viimeiset fraktiot ovat rakenteeltaan viskooseja ja siittiötiheys on niissä pieni. Siittiörikkaan fraktion jälkeen tulevissa fraktiossa ergotioneini-pitoisuus laskee ja vastaavasti sitruunahapon pitoisuus nousee, mikä viittaa siihen, että rakkularauhasen eritteitä erittyy runsaammin ejakulaatin lopussa (Mann et al. 1956). Myös Webberin ja Woodsin (1993) tekemässä tutkimuksessa, jossa tutkittiin oriin sukupuolirauhasen läpimitan muutoksia ejakulaation aikana ultraäänien avulla, todettiin, että ampulloiden läpimitta muuttuu ennen ejakulaation varsinaista alkua ja vastaavasti rakkularauhasen vasta ejakulaation loppupuolella. Samassa tutkimuksessa todettiin prostatasta peräisin olevien eritteiden alkavan erittyä ennen ejakulaation alkua ja jatkuvan myös sen aikana. Bulbouretraalirauhasen ei havaittu muuttavan kokoaan ejakulaation aikana, vaikkakin niiden muoto vaihteli (Webber & Woods 1993).

### **2.2.2 Siittiöt**

Siittiöiden kehitys alkaa kiveksissä ja jatkuu lisäkiveksissä. Se voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen, jonka lopuksi muodostuvat haploidisen kromosomiluvun omaavat siittiöt, joissa on tunnistettavissa rakenteellisesti kolme erilaista osaa pää, keskikappale ja häntä. Pääosan tumassa on tiiviisti pakkautuneena kromatiini ja ulkopuolella akrosomihuppu. Siittiösolun pään ja hännän välissä on keskikappale, jossa on runsaasti mitokondrioita. Viimeisenä osana on keskikappaleeseen liittyvä häntä. Hedelmöittymisen kannalta siittiön normaalirakenne on tärkeää (Senger 2003).

Siittiöiden kehitys eli spermatogeneesi alkaa itusolulinjan soluista, jotka sijaitsevat siementiehyen reunoilla. Ensimmäisessä spermatogoniavaiheessa alkusiemensolut jakautuvat mitoottisesti useita kertoja muodostaen suuren joukon B-spermatogonioita. Toisessa meioosivaiheessa syntyneet solut jakautuvat meioottisesti muodostaen ensin primaarisia ja sitten sekundaarisia spermatosyyttejä. Näin muodostuneet varhaissiemensolut ovat kromosomiluvultaan haploidisia. Viimeisessä spermatidivaiheessa ei enää tapahdu solun jakautumisia vaan esisiittiöiden kehittyminen ja kypsyminen jatkuu. Lopulta muodostuneilta siittiöiltä voidaan erottaa pää, keskikappale ja häntä (Senger 2003). Normaalin toiminnan saavuttamiseksi siittiöiden pitää kypsyä vielä lisäkiveksissä. Spermatogeneesi kestää kokonaisuudessaan oriilla noin 50 päivää (Swierstra et al. 1974).

Vuodenaika vaikuttaa jonkin verran myös siittiöihin (Gebauer et al. 1976, Pickett et al. 1976). Pickett et al. (1976) tekemässä tutkimuksessa siittiöiden liikkuvuuden todettiin lisääntyvän ja ejakulaatin kokonaissiittiömäärän taas laskevan talvikaudella. Toisaalta Gebauer et al. (1976) tekemässä tutkimuksessa ei siittiöiden ominaisuuksissa todettu niin suuria vuodenajan mukaisia vaihteluja kuin seminaaliplasmassa.

### **2.2.3 Seminaaliplasma**

Seminaaliplasma koostuu kiven, lisäkiven ja lisäsukurauhasten eritteistä (Mann et al. 1956, Webber & Woods 1993). Se jakautuu eri fraktioihin, joissa sen biokemiallinen koostumus vaihtelee (Kosiniak 1975, Magistrini et al. 1995). Seminaaliplasman koostumukseen vaikuttavat monet asiat kuten oriin siitoskäyttö, ikä ja vuodenaika (Pickett et al. 1970, Abou-Ahmed et al. 1992). Se sisältää useita erilaisia biologisia komponentteja kuten ioneita, entsyymejä ja proteiineja. Myös biologisten

komponenttien määrien vaihteluita oriiden ja vuoden aikojen välillä on raportoitu (Kosiniak & Bittmar 1981, Pesch et al. 2006, Kareskoski et al. 2010).

Seminaaliplasma vähentää siittiöiden liikkuvuutta säilytyksen aikana (Varner et al. 1987). Liikkuvuus säily parempana sekä jäädytetyssä että pakastetussa spermassa, jos seminaaliplasman osuus lasketaan  $\leq 5\%$  (Jasko et al. 1991). Seminaaliplasman negatiivisten vaikutusten lisäksi sillä on todettu olevan useita myönteisiä vaikutuksia naaraan elimistössä ja siittiöiden kehityksessä (Troedsson et al. 2005). Seminaaliplasman koostumus vaihtelee uroksen lisääntymiselimissä. Sen eri komponenteilla on todettu olevan tärkeä merkitys, esimerkiksi siittiöiden pintarakenteiden kehittymiselle ja kypsymiselle uroksen elimistössä. Usean komponentin merkitys on kuitenkin vielä selvittämättä (Magistrini et al. 1995, Hulboy et al. 1997, Fouchécourt et al. 2000, Töpfer-Petersen et al. 2005). Seminaaliplasmalla on osoitettu olevan aktiivinen vaikutus myös naaraan sukupuolielimissä. Sen on todettu vaikuttavan siittiöiden kulkeutumiseen ja lisäävän kohdun sekä munasarjojen verenkiertoa (Troedsson et al. 2005). Seminaaliplasman on todettu myös suojaavan eläviä siittiöitä fagosytoosilta ja toisaalta taas edistävän sitä kuolleiden siittiöiden osalta (Troedsson et al. 2002).

### ***2.2.3.1 Entsyymit***

Oriin spermassa sekä lisäsukurauhasissa on havaittu useita eri entsyymejä. Niiden merkitystä siemennesteessä, vaikutuksia sen laatuun ja oriin hedelmällisyyteen on selvitelty useissa tutkimuksissa (Turner & McDonnell 2003, Dias et al. 2004, Pesch et al. 2006, Kareskoski et al. 2010).

Alkaalinen fosfataasi (AP) on defosforyloiva entsyymi ja sitä on useissa kudoksissa kuten luussa, keuhkoissa ja istukassa (Coleman 1992). Oriin seminaaliplasmassa on korkeat AP:n pitoisuudet. Ne ovat huomattavasti suuremmat varsinaisessa ejakulaatissa kuin ennen ejakulaatiota tulevassa nesteessä (Turner & McDonnell 2003). Kareskosken et al. (2010) tekemässä tutkimuksessa todettiin AP:n pitoisuuksien olevan korkeammat siittiötiheässä kuin siittiököyhässä fraktiossa. AP:n on todettu olevan pääosin peräisin itse seminaaliplasmasta eikä siittiöistä. Seminaaliplasman AP- pitoisuuden avulla voidaan tutkia myös atospermian syitä lajeilla, joilla AP on pääosin peräisin kiveksistä ja lisäkiveksistä. Esimerkiksi tapauksessa, jossa halutaan erottaa todellinen

kivesperäinen atospermia (korkea AP, ei siittiöitä) tiehyiden tukoksesta (matala AP, ei siittiöitä). Oriin lisääntymiselimissä AP:n aktiivisuus on suurinta kiveksissä ja lisäkiveksen häntäosassa (Turner & McDonnell 2003).

Oriin seminaaliplasmassa ja sukurauhasissa on useita erilaisia glukosideja hydrolysoivia entsyymejä, glukosidaaseja, kuten  $\beta$ -glukuronidaasia (BG),  $\beta$ -N-asetyyli-glukosaminidaasia (NAG),  $\alpha$ -glukosidaasia,  $\alpha$ -galaktosidaasia sekä  $\beta$ -galaktosidaasia (Fouchécourt et al. 2000, Dias et al. 2004). Ampullan eritteessä on runsaasti NAG:a sekä  $\alpha$ -mannosidaasia ja rakkularauhasen eritteissä muun muassa BG:a, NAG:a,  $\alpha$ -glukosidaasia sekä  $\alpha$ -galaktosidaasia (Beyler ja Zaneveld 1982). Lisäkiveksien nesteessä on havaittu NAG:a sekä  $\alpha$ -glukosidaasia (Fouchécourt et al. 2000, Dias et al. 2004).  $\alpha$ -glukosidaasin pitoisuus kasvaa lisäkiveksen hännästä kohti sen päätä. Myös seminaaliplasmassa on havaittavissa  $\alpha$ -glukosidaasi-aktiivisuutta (Dias et al. 2004). Kareskosken et al. (2010) tekemässä tutkimuksessa BG-pitoisuus oli korkein siittiötiheässä fraktiossa.

Oriin seminaaliplasmassa on myös monia muita entsyymejä edellä mainittujen lisäksi kuten laktaattidehydrogenaasia (LHD), aspartaatti-aminotransferaasi (AST) ja  $\gamma$ -glutamyyli-transferaasia (GGT). Niiden vaikutuksia ja korrelaatioita sperman ominaisuuksiin on selvitetty seminaaliplasmatutkimuksien avulla. Peschin tutkimusryhmän (2006) mukaan LDH aktiivisuus korreloi merkittävästi sperman motiliteetin, elävien ja kuolleiden siittiöiden jakauman sekä patomorfologian kanssa. Kyseisillä entsyymeillä oli tutkimuksessa positiivinen korrelaatio spermakonsentraation kanssa. Entsyymeillä oli vastaavasti negatiivinen korrelaatio sperman määrän kanssa. Kyseisistä korrelaatioista johtuen entsyymien epäillään olevan peräisin kiveksistä ja lisäkiveksistä (Pesch et al. 2006).

### ***2.2.3.2 Proteiiniyhdisteet***

Seminaaliplasman proteiineilla on tärkeä merkitys lisääntymistoiminnoissa. Ne muun muassa säätelevät kapasitaatiota ja muokkaavat kohdun immuunivastetta. Oriilla on löydetty kahdeksan hevosen seminaaliplasmaproteiinia (HSP-1:stä HSP-8:aan). Ne ovat molekyyli-massaltaan pieniä 14-30 kDa (Töpfer-Petersen et al. 2005). Keskimääräinen proteiinipitoisuus oriin seminaaliplasmassa ennen siitoskauden alkua oli 1,9 g/100 ml. Pitoisuuden todettiin kasvavan siitoskauden jälkeen verrattuna siitoskautta ennen

mitattuihin arvoihin (Kosiniak & Bittmar 1981). HSP-1 ja HSP-2 ovat tavallisimmat proteiinit orin seminaaliplasmassa muodostaen noin 70-80 % kokonaisproteiineista (Ekhlesi-Hundrieser et al. 2005).

### **2.2.3.3. Matriksimetalloproteinaasit**

MMP:t ovat proteiiniperhe, johon kuuluu useita jäseniä. Ne kykenevät hajottamaan muun muassa solun ulkoisia tukirakenteita sekä tyvikalvoa erilaisissa fysiologisissa ja patologisissa tiloissa (Salamonsen 1996, Hulboy et al. 1997). Niitä on löydetty useista kudoksista ja myös seminaaliplasmasta (Hulboy et al. 1997, Shimokawa et al. 2002). Niiden erittymistä ja aktiivisuutta säädellään usealla tavalla muun muassa eri hormoneilla ja kasvutekijöillä (Chambers & Matrisian 1997, Hulboy et al. 1997). MMP:t eritetään latentissa muodossa ja ne aktivoituvat, kun niistä poistetaan inhibitorinen pro-peptidi (Hulboy et al. 1997). Aktivoituneiden MMP:en toimintaa säädellään myös kudoksissa olevien metalloproteinaasi-inhibiittorien (TIMP) avulla (Salamonsen 1996, Shimokawa et al. 2003).

MMP-2 ja MMP-9 ovat sinkistä riippuvaisia gelatinaaseja. MMP-2:lla on kyky hydrolysoida muun muassa gelatiineja, useita kollageenityyppejä, elastiinia sekä fibronektiinia. Myös MMP-9:llä on kyky hydrolysoida elastiinia, gelatiineja sekä hieman eri kollageenityyppejä kuin MMP-2:lla (Hulboy et al. 1997). Matriksimetalloproteinaasien on havaittu olevan mukana erilaisissa elimistön prosesseissa sekä fysiologisissa että patologisissa. Niiden pitoisuuksia ja merkitystä erilaisissa kudoksissa ja eritteissä tutkitaan tällä hetkellä runsaasti eri eläimillä (Hulboy et al. 1997, de Laat et al. 2011). Niillä on osoitettu olevan tärkeä rooli myös ovulaatiossa, implantaatiossa ja synnytyksessä (Salamonsen 1996, Oddsdóttir et al. 2011).

MMP-pitoisuuksia on tutkittu miesten seminaaliplasmasta (Shimokawa et al. 2002, Tentes et al. 2007). Shimokawan et al. (2002) tutkimuksessa ihmisten spermasta löydettiin MMP-2:ta ja MMP-9:ää sekä näiden pro-muotoja että hajoamistuotteita. Samassa tutkimuksessa MMP-2:n ja MMP-9:n toiminta pystyttiin inhiboimaan metalloproteinaasi-inhibiittoreilla EDTA:lla, EGTA:lla ja o-fenantroliinilla (Shimokawa et al. 2002). Miesten seminaaliplasmanäytteissä on löydetty myös kudoshinhibiittoreita (Baumgart et al. 2002, Buchman-Shaken et al. 2002). Shimokawa et al. (2003) löysi miesten seminaaliplasmanäytteistä kudoshinhibiittorit TIMP-1 ja TIMP-2 ja totesi niiden

muodostavan komplekseja MMP-2:n ja MMP-9:n kanssa. Métayerin et al. (2002) tutki matriksimetalloproteinaaseja oriin, päässin ja karjun lisäkiveksistä. MMP-2:n latenttia muotoa havaittiin oriilla lisäkiveksen häntäosassa. Kaikilla kolmella lajilla havaittiin MMP-2:ta, MMP-3:a ja MMP-9:ää sekä kudoshäiriöitä lisäkiveksen eritteessä.

Miesten siemennesteen MMP-pitoisuuksissa on todettu olevan eroa normaalien ja epänormaalien siemennesteenäytteiden välillä (Baumgart et al. 2002, Buchman-Shaked et al. 2002, Tentes et al. 2007). Baumgartin et al. (2002) tekemässä tutkimuksessa havaittiin MMP-2:n kokonaispitoisuudessa merkittävä ero siittiökadosta kärsivien ja normaalia spermaa tuottavien miesten välillä. Siittiökadosta kärsivien miesten seminaaliplasmassa oli vähemmän MMP-2:ta. Tässä tutkimuksessa MMP-9:n pitoisuuksissa ei ollut eroja ryhmien välillä. Toisessa tutkimuksessa ei havaittu merkittävää korrelaatiota MMP-2:n tai MMP-9:n aktiivisen muodon ja spermakonsentraation, liikkuvuuden tai morfologian välillä. Kyseisessä tutkimuksessa havaittiin kuitenkin eroavaisuuksia MMP-9:n latentissa muodossa, kun miehet jaettiin ryhmiin siemennesteen konsentraation mukaan. Ryhmässä, jossa siittiötiheys oli pieni, oli MMP-9:n latentin muodon pitoisuus suurempi kuin paremman siittiötiheyden omaavien miesten ryhmässä. MMP-2 pitoisuudet olivat hieman pienempiä siittiötiheydeltään heikompien miesten ryhmässä, mutta erot eivät olleet tilastollisesti merkittäviä ryhmien välillä (Tentes et al. 2007).

### **2.2.3.3 Muut yhdisteet**

Oriin seminaaliplasmassa on monia muita yhdisteitä edellä mainittujen lisäksi. Seminaaliplasmassa on muun muassa fruktoosia ja ergotioneiniä sekä erilaisia elektrolyyttejä ja hormoneja (Kosiniak & Bittmar 1981, Lemazurier et al. 2001, Kareskoski et al. 2010).

Myös seminaaliplasman elektrolyyttipitoisuudet vaihtelevat eri fraktioiden välillä. Fosforipitoisuus on korkein siittiötiheässä fraktiossa ja matalin ennen varsinaista ejakulaattia tulevassa nesteessä. Natrium ja kloridi-pitoisuudet taas ovat korkeampia juuri ennen ejakulaatiota tulevassa nesteessä. Muiden fraktioiden välillä niiden pitoisuudet eivät vaihtelee merkittävästi. Kalsium- ja magnesium-pitoisuudet ovat korkeammat siittiököyhässä fraktiossa kuin siittiötiheässä. Kaliumin pitoisuudet eivät vaihtelee fraktioiden välillä merkittävästi (Kareskoski et al. 2010).

## **3 AINEISTO JA MENETELMÄT**

### **3.1 Oriit**

Yhteensä 30 Suomessa sijaitsevaa siittolaa kutsuttiin tutkimuksen mukaan. Ehtona oli, että siittolassa oli pitänyt olla astutuskaudella 2005 vähintään yksi ori, jolla oli ollut yli kaksikymmentä tammaa. Tällaisista siittoloista hyväksyttiin tutkimukseen mukaan kaikki käytettävissä olevat oriit. Tutkimuksen ehdot täyttävistä siittoloista yhdeksän halusi osallistua.

Spermaa kerättiin yhteensä 43 oriilta astutuskaudella 2006. Oriista kaksikymmentä oli lämminverisiä ravureita, iältään 4-23-vuotiaita. Seitsemäntoista oriitta oli suomenhevosiä, iältään 8-23-vuotiaita. Lämminverisiä ratsuja oli neljä, iältään 9-19-vuotiaita ja lisäksi oli kaksi ponia, iältään 8- ja 9-vuotiaat. Oriiden siitoshistoria ja tuleva käyttö olivat erilaisia ja keskimäärin oriilla oli kaudella 2006 14 tammaa, vaihteluväli oli kuitenkin kahdesta tammasta 150 tammaan oriitta kohden.

### **3.2 Näytteiden kerääminen ja käsittely**

Tutkimukseen osallistuneilta oriilta kerättiin yksi ejakulaattinäyte, joka erotettiin keräysvaiheessa 1-4 fraktioon. Siittolasta ja orista riippuen näytteet kerättiin joko avoimella tai modifioidulla suljetulla keinovaginalla tai Equidame® fantomilla (Lindeberg et al. 1999).

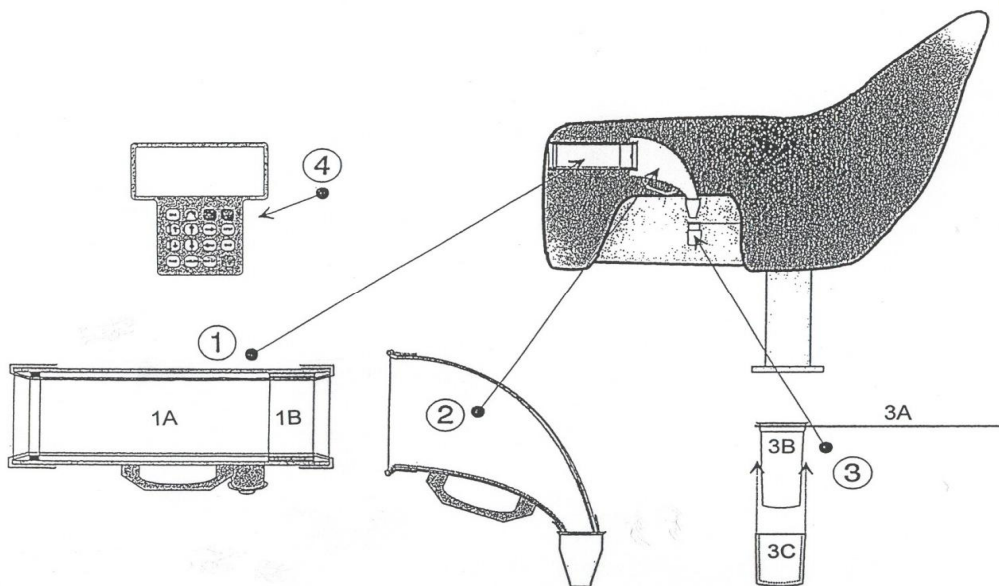
Equidame® fantomi on tietokoneohjelmoitu (Equidame®, Haico Oy, Loimaa, Suomi) ja siinä ejakulaatti voidaan kerätä fraktioittain viiteen eri kuppiin (Kuva 2). Fantomissa fraktiointi perustuu jokaiseen kuppiin edeltä asetettuihin tavoitepainoihin, jotka voidaan asettaa orikohtaisesti optimoimaan fraktiointia. Ori ejakuloi keinovaginan edessä olevaan metallisuppiloon fantomin sisällä (Kuva 3). Muovikupit ovat asetettuina horisontaalisesti liikkuvaan tarjottimeen, joka sijaitsee metallisuppilon alla (Lindeberg et al. 1999). Edellä kuvailtu Equidame® fantomi oli käytössä vain 1 tilalla (6 oriitta). Avoimia keinovaginoita oli useampia (29 oriitta). Modifioitu suljettu keinovagina oli Missouri-tyyppinen (8 oriitta). Sen päähän kiinnitettiin ultraäänianturin suojamuovi (Kruuse A/S, Langeskov, Tanska) siemenkeräysastian sijaan. Siemennäyte kerättiin



muovisuojukseen ja fraktiot erotettiin toisistaan verisuonipihtien avulla (Kuva 4). Samaa menetelmää käytettiin myös avoimissa keinovaginoissa.



**Kuva 3.** Fraktioidun ejakulaatin kerääminen Equidame® fantomilla. Esisekreetti on nähtävissä ensimmäisessä kupissa oikealla, seuraavissa kupeissa siittiörikkaat ja köyhät fraktiot. Viimeinen pieni ja alempana oleva iso kuppi sisältävät suurimmaksi osaksi geeliä (Kareskoski väitöskirja 2011).



**Kuva 3.** Equidame® fantomin rakenne. Irrotettava avoin keinovagina (1A) ja sen sisällä kumi (1B). Vaginän sisällä oleva irrotettava metallinen suppilo (2). 5 irrotettavaa metallista kannatinta (3A) ja 5 muovikuppia (3B) sekä pienet styroksiset suojukset (3C), jotka suojaavat muovikuppeja. (4) Tietokoneen ohjauspaneeli, jolla säädellään ejakulaatin fraktiointia (Lindeberg et al. 1999).



**Kuva 4.** Fraktiointitapa, jota käytettiin kerätessä spermaa avoimella tai modifioidulla suljetulla keinovaginalla (Kareskoski väitöskirja, 2011).

Siemennesteen keräyksen jälkeen siitä poistettiin geeli ja jokaisen fraktion tilavuus mitattiin ja siittiötiheys laskettiin Bürkerin-kammion avulla. Jokaisesta siemennestenäytteestä otettiin tippa kahdelle mikroskooppilasille. Ne valmistettiin ja ilmakeivattiin siittiöiden morfologista tutkimusta varten.

Jokainen fraktio jaettiin kahteen osaan: toinen seminaaliplasmanäytteitä varten ja toinen siittiötutkimuksiin. Seminaaliplasmanäytteet sentrifugoitiin (4000 g) 15 minuutin ajan ja tämän jälkeen supernatantti poistettiin suodattamalla se 0,45  $\mu\text{m}$ :n suodattimen läpi (Millex-HV, Millipore, Billerica, MA, USA). Proteiini-inhibiittoria (Trasylo1 10000 Kallikrein Inactivator Units (KIU)/ml, Bayer Schering Pharma, Berliini, Saksa) lisättiin jokaiseen näytteeseen (500 KIU/ml seminaaliplasmaa) estämään entsyymien ja proteiinien aktivaatiota. Seminaaliplasmanäytteet säilöttiin 1 ml:n putkiin  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  odottamaan analysointia.

### 3.3 Zymografia

Yhteensä 74 seminaaliplasmanäytteestä analysoitiin matriksimetalloproteinaaseja zymografian avulla. Menetelmällä voidaan erottaa näytteissä olevat MMP:t toisistaan erilaisten molekyylipainojen avulla. Näytteet ajetaan elektrofooresissa 10 % SDS-PAGE-geelin läpi, josta renaturaatio- ja kehityspuskuri-käsittelyiden sekä värjäyksen jälkeen voidaan havaita MMP:t vaaleina viivoina muuten tummasta geelistä. Samaa menetelmää käytettiin Shimokawan et al. (2002) tutkimuksessa, jossa tutkittiin MMP-2 ja MMP-9 aktiivisuuksia miesten seminaaliplasmanäytteistä.

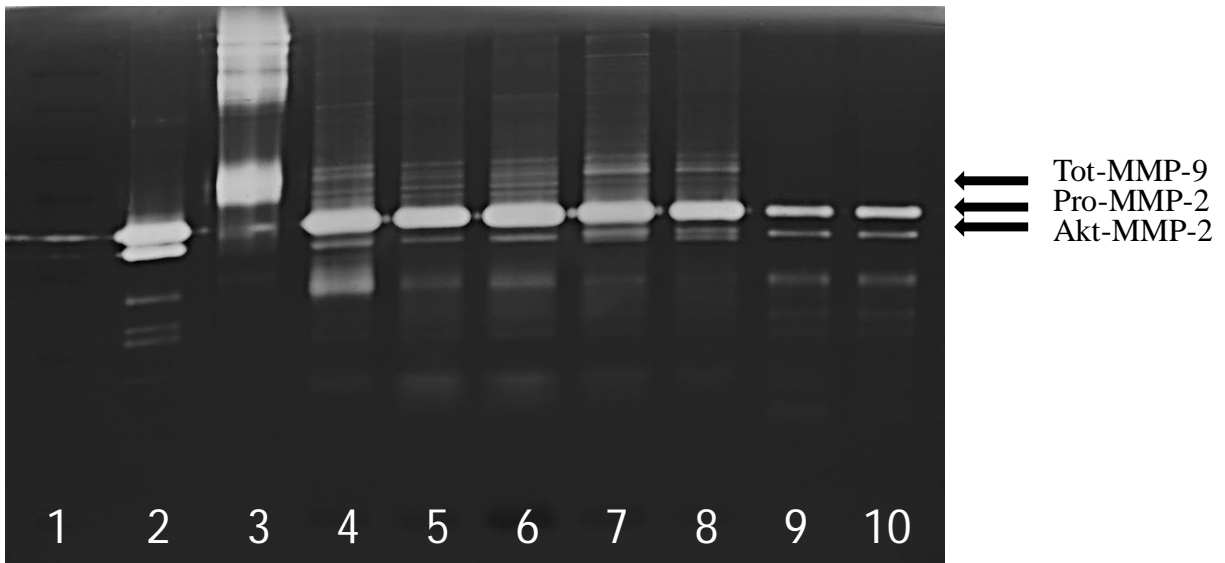
Seminaaliplasmanäytteet sulatettiin jäämurskan päällä. Alkuperäiset näytteet laimennettiin näytepuskurilla (40 mg BPB, 6 g SDS, 87 % glyseroli) suhteessa 1:40. Laimennettuja näytteitä pidettiin jäällä noin tunti ennen ajon alkamista.

Seminaaliplasmanäytteiden ajoa varten valmistettiin 10 % SDS- polyakryyiamidi gelatiinigeeli (gelatiinia 100 mg/10 mL). Zymogeelien valamisessa käytettiin 1 mm leveitä laseja ja muovikampoja, joissa oli kymmenen koloa näytteitä varten. Laimennettuja seminaaliplasmanäytteitä pipetoitiin 10 µl zymogeenin koloihin 4-10. Elektrofooresiajossa käytettiin kontrollina kolossa 1 Precision plus protein Kaledoscope-proteiinimarkkeria (Bio-Rad), kolossa 2 MMP-2-markkeria (R&D Systems) ja kolossa 3 MMP-9-markkeria (R&D Systems).

Näytteet ajettiin jäähauhteessa 4 °C:ssa: ensimmäisen 15 minuutin ajan 60 mAh, minkä jälkeen tarkistettiin, että väririntama zymogeelissä oli edennyt. Tämän jälkeen ajoa jatkettiin 30 mAh, kunnes väririntama oli kulkenut zymogeenin läpi. Ajoaika oli keskimäärin 4 tuntia ja 14 minuuttia. Ajon jälkeen zymogeeleit irroteltiin lasista ja pantiin omiin rasioihinsa, johon oli kirjoitettu kyseisen ajon ja geelin tiedot. Ajon jälkeen zymogeelejä pidettiin ensimmäisen tunnin ajan renaturaatio-liuoksessa (2,5 % Triton X-100) sekoittajalaitteessa. Tunnin kuluttua liuos kaadettiin pois ja zymogeeleihin lisättiin kehitepuskuria (50 mM Tris, pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> ja 0,02 % Brilj-35), jossa ne olivat 30 minuutin ajan sekoittajassa. Kehitepuskuri vaihdettiin uuteen ja zymogeeleit pantiin yön ajaksi lämpökaappiin 37 °C. Seuraavana aamuna ne pestiin ionivaihdetulla vedellä kolmesti 10 minuutin ajan. Tämän jälkeen ne peitettiin Coomassie blue-värillä G-250 (Fermentas), jossa ne olivat keskimäärin 2 vuorokautta. Väri huuhdeltiin pois ja zymogeelejä pestiin ionivaihdetulla vedellä useita kertoja ennen niiden tallentamista ja analysointia.

Zymogeelit skannattiin (EPSON Expression 1640 XL) niiden tallentamista ja myöhempiä analysointia varten (Kuva 5). Skannattuja kuvia käsiteltiin niin, että niistä saatiin analysointikelpoisia. Zymogeelien skannatuista kuvista poistettiin roskat ja ilmakuplat kuvankäsittelyohjelman (Photoshop 7.0) avulla.

Zymogeelien MMP-pitoisuudet analysoitiin skannatuista kuvista densitometrialla (Alpha Image HP, Alpha Innotech Corp).



**Kuva 5.** Kuvassa skannattu zymogeeli ajopäivältä 31.1.11. Rivillä 1. proteiinimarkkeri, 2. MMP-2-markkeri, 3. MMP-9- markkeri ja 4.-10. seminaaliplasmanäytteet.

### 3.4 Hedelmällisyystiedot

Hedelmällisyystietoja kerättiin siittoloista sekä Suomen raviurheilun ja hevostalouden keskusjärjestöltä (Suomen Hippos ry). Oriille laskettiin tiineyttämisprosentti kaikista vuonna 2006 tehdyistä siemennyksistä. Sekä synnyttäneet että luoneet tammat käsiteltiin tutkimuksessa tiineinä. Tässä tutkimuksessa käytettiin ensimmäiseen siemennykseen tiinehtyneiden tammojen prosenttia hedelmällisyysparametrina. Pakastespermiasiemennykset jätettiin tutkimuksen ulkopuolelle.

### 3.5 Tilastolliset analyysit

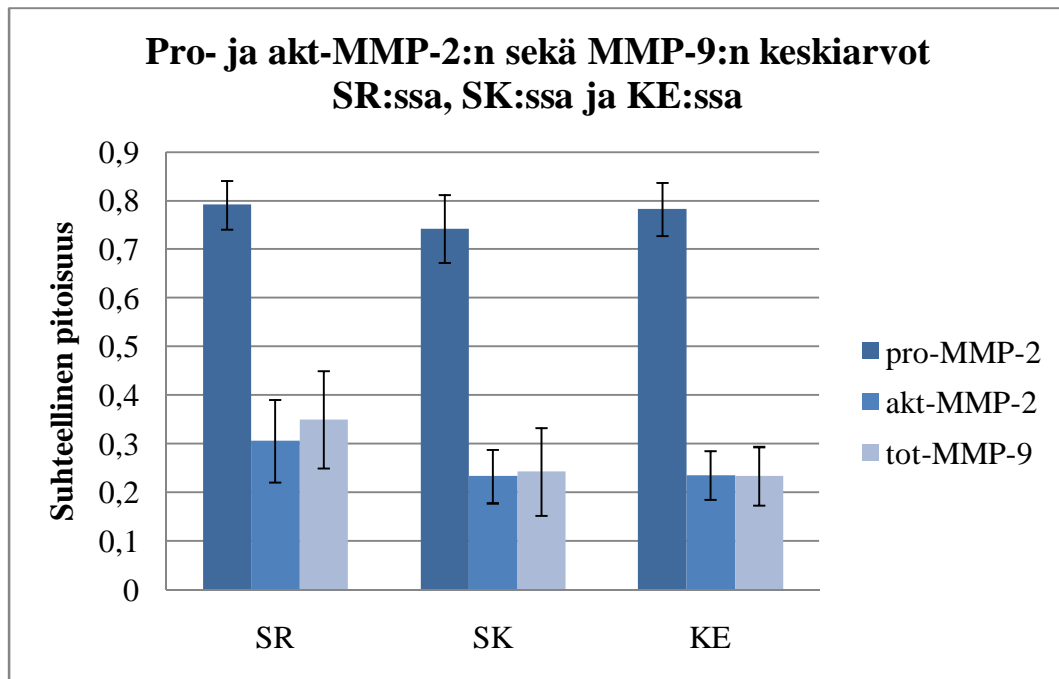
Densitometrialla saaduista tuloksista laskettiin aktiivisen MMP-2:n (akt-MMP-2), pro-MMP-2:n (pro-MMP-2) sekä MMP-9:n aktiivisen ja pro-muodon (tot-MMP-9) suhteelliset pitoisuudet jakamalla zymogeeleistä saadut pitoisuudet kunkin standardin pitoisuudella. MMP-9:n aktiivista ja pro-muotoa ei pystytty kyseisellä menetelmällä erottamaan toisistaan, vaan annetuissa pitoisuuksissa on laskettu yhteen molemmat muodot. Saadut tiedot koottiin taulukkolaskentaohjelmaan ja käsiteltiin sillä (Microsoft Office Excel 2007).

Pro- ja akt-MMP-2:lle sekä tot-MMP-9:lle laskettiin siittöriikkaassa- (SR) ja siittiököyhässäfraktiossa (SK) sekä kokonaisejakulaatissa (KE) keskiarvot, keskihajonnat, mediaanit sekä maksimi- ja minimiarvot. Spearmanin järjestyskorrelaatiokertoimet laskettiin tammojen ensimmäiseen kiimaan tiinehtymisen ja eri MMP-pitoisuuksien välille SR:ssa ja KE:ssa.

## 4 TULOKSET

Oriilla on seminaaliplasmassa havaittavia pitoisuuksia sekä akt-MMP-2:ta ja pro-MMP-2:ta että tot-MMP-9:ää. Kaikilta oriilta ei ollut kerätty kaikkia fraktioita, joten osalla oriista tuloksia on vain joistakin fraktioista eikä kaikista kolmesta (SR, SK ja KE).

Pro-MMP-2:n suhteellisten pitoisuuksien keskiarvot ovat SR:ssa, SK:ssa ja KE:ssa yli 2 kertaluokkaa suuremmat kuin akt-MMP-2:n tai tot-MMP-9:n. Tot-MMP-9:n ja akt-MMP-2:n suhteellisten pitoisuuksien keskiarvot ovat keskenään samaa suuruusluokkaa. Keskihajonta on samaa suuruusluokkaa pro-MMP-2:ssa ja akt-MMP-2:ssa, suurinta se on tot-MMP-9:ssä. SR:n, SK:n ja KE:n välillä MMP:n vaihtelut ovat melko pieniä. Suurimmat MMP:n suhteelliset pitoisuudet ovat SR:ssa, mutta varsinkin pro-MMP-2:n vaihtelu fraktioiden ja ejakulaatin välillä on pientä.



**Kuvaaja 1.** Oriiden keskimääräiset pro- ja akt-MMP-2:n sekä tot-MMP-9:n suhteelliset pitoisuudet SR:ssa, SK:ssa ja KE:ssa.

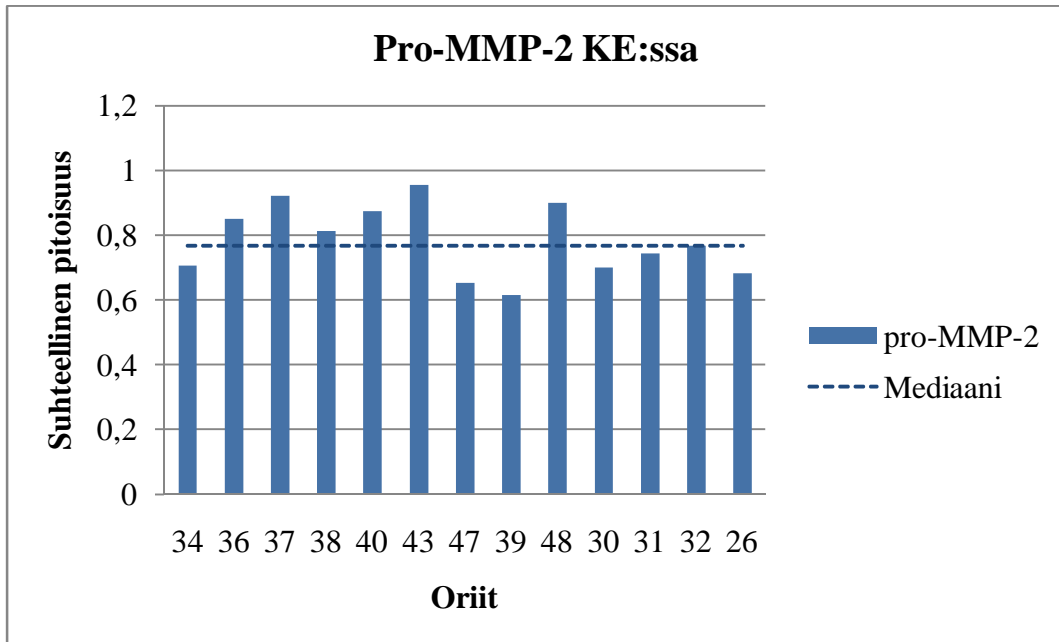
#### 4.1. Pro-matriksimetalloproteinaasi 2

Pro-MMP-2 suhteellisen pitoisuuden keskiarvot ovat melko samanlaiset kaikissa fraktioissa SR:ssa 0,79, SK:ssa 0,74 ja KE:ssa 0,78. Suurimmat suhteelliset pitoisuudet ovat SR:ssa 1,01, SK:ssa 1,04 ja KE:ssa 0,96 ja vastaavasti pienimmät 0,61, 0,52 ja 0,61.

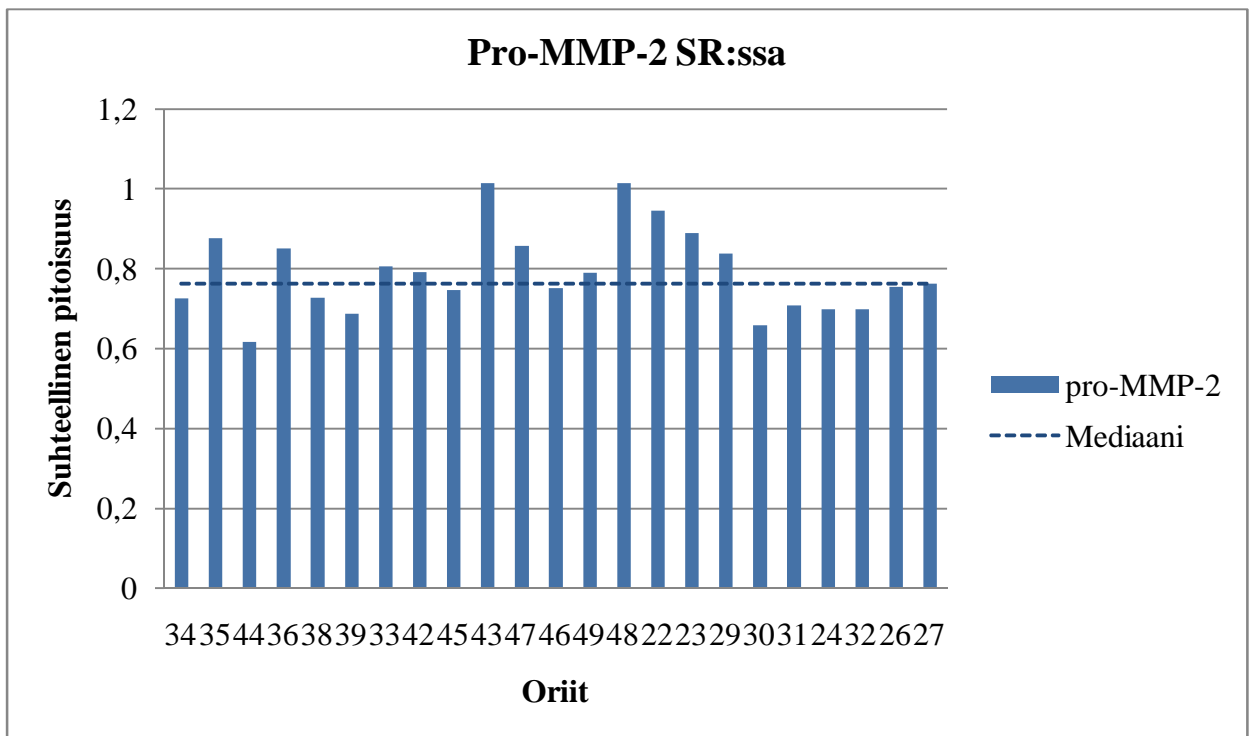
**Taulukko 1.** Pro-MMP-2:n suhteellisen pitoisuuden keskiarvo, keskihajonta sekä maksimi- ja miniarvot SR:ssa, SK:ssa ja KE:ssa.

	SR	SK	KE
Keskiarvo	0,79	0,74	0,78
Keskihajonta	0,1	0,14	0,11
Max.arvo	1,01	1,04	0,96
Min.arvo	0,61	0,52	0,61

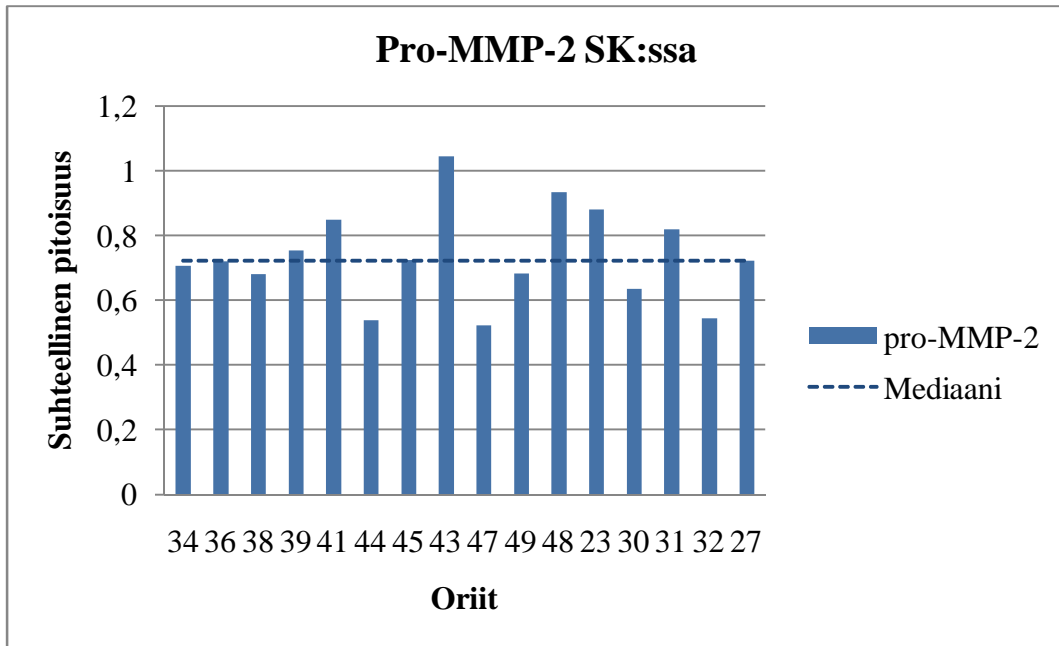
Oriilla 43 ja 48 ovat korkeimmat pitoisuudet pro-MMP-2:ta SR:ssa, SK:ssa sekä KE:ssa. Oriin 37 pro-MMP-2:n suhteellinen pitoisuus KE:ssa on korkea, muita fraktioita ei kyseisellä oriilla ollut kerätty. Pienimmät pitoisuudet ovat eri oriilla: SR:ssa 44, SK:ssa 47 ja KE:ssa oriilla 39.



**Kuvaaja 2.** Pro-MMP-2:n suhteelliset pitoisuudet KE:ssa oriittain.



**Kuvaaja 3.** Pro-MMP-2:n suhteelliset pitoisuudet SR:ssa oriittain.



**Kuvaaja 4.** Pro-MMP-2:n suhteelliset pitoisuudet SK:ssa oriittain.

#### 4.2. Aktiivinen matriksimetalloproteinaasi 2

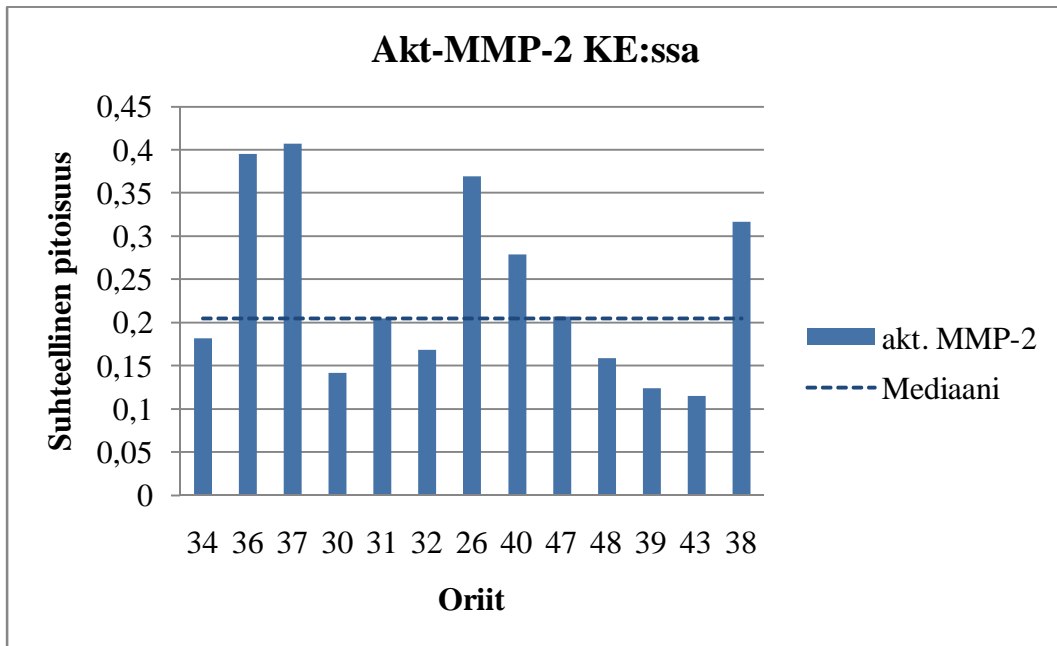
Akt-MMP-2:n suhteellisen pitoisuuden keskiarvot vaihtelivat fraktioittain enemmän kuin pro-MMP-2:n. Fraktioittain ne ovat SR:ssa 0,31, SK:ssa 0,23 ja KE:ssa 0,24. Suurimmat suhteelliset pitoisuudet ovat SR:ssa 0,65, SK:ssa 0,55 ja KE:ssa 0,41 ja vastaavasti pienimmät 0,1, 0,11 ja 0,12. Keskihajonta on myös suurempi akt-MMP-2:n SR:ssa kuin pro-MMP-2:ssa SR:ssa.

**Taulukko 2.** Akt-MMP-2:n suhteellisen pitoisuuden keskiarvo, keskihajonta sekä maksimi- ja miniarvot SR:ssa, SK:ssa ja KE:ssa.

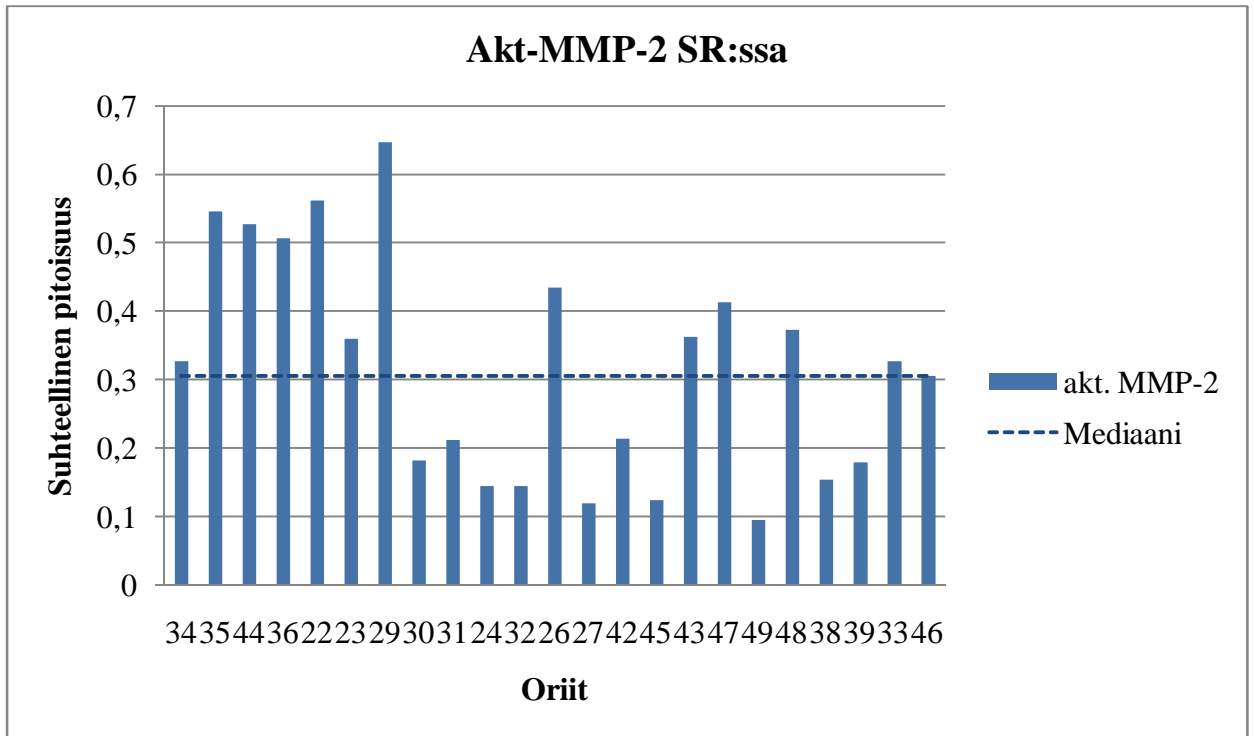
	SR	SK	KE
Keskiarvo	0,31	0,23	0,24
Keskihajonta	0,17	0,11	0,1
Max.arvo	0,65	0,55	0,41
Min.arvo	0,1	0,11	0,12



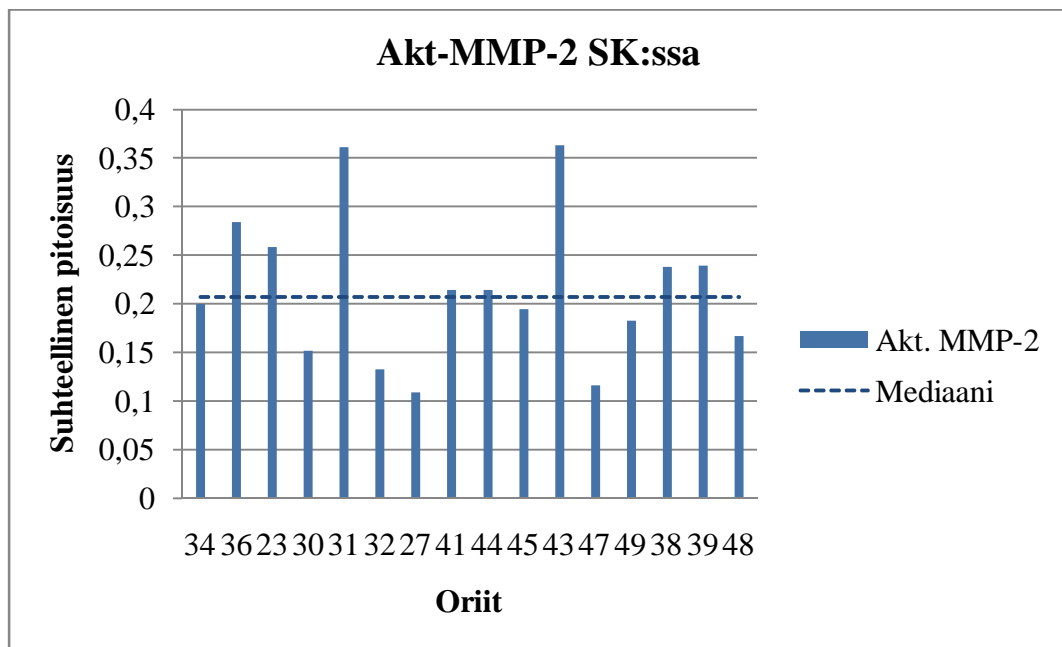
Oriiden tulokset eri fraktioissa ja KE:ssa eivät ole yhtä selkeästi samansuuntaisia kuin pro-MMP-2:n välillä. Oriilla saattaa olla korkea suhteellinen pitoisuus SR:ssa ja taas matalampi SK:ssa, kuten oriilla 31. Akt-MMP-2:n korkein pitoisuus SR:ssa on oriilla 29, SK:ssa taas 43 ja KE:ssa 37. Pienimmät pitoisuudet ovat SR:ssa oriilla 49, SK:ssa 27 ja KE:ssa 43.



**Kuvaaja 5.** Oriittain akt-MMP-2:n suhteelliset pitoisuudet KE:ssa.



**Kuvaaja 6.** Oriittain akt-MMP-2:n suhteelliset pitoisuudet SR:ssa.



**Kuvaaja 7.** Oriittain akt-MMP-2:n suhteelliset pitoisuudet SK:ssa.

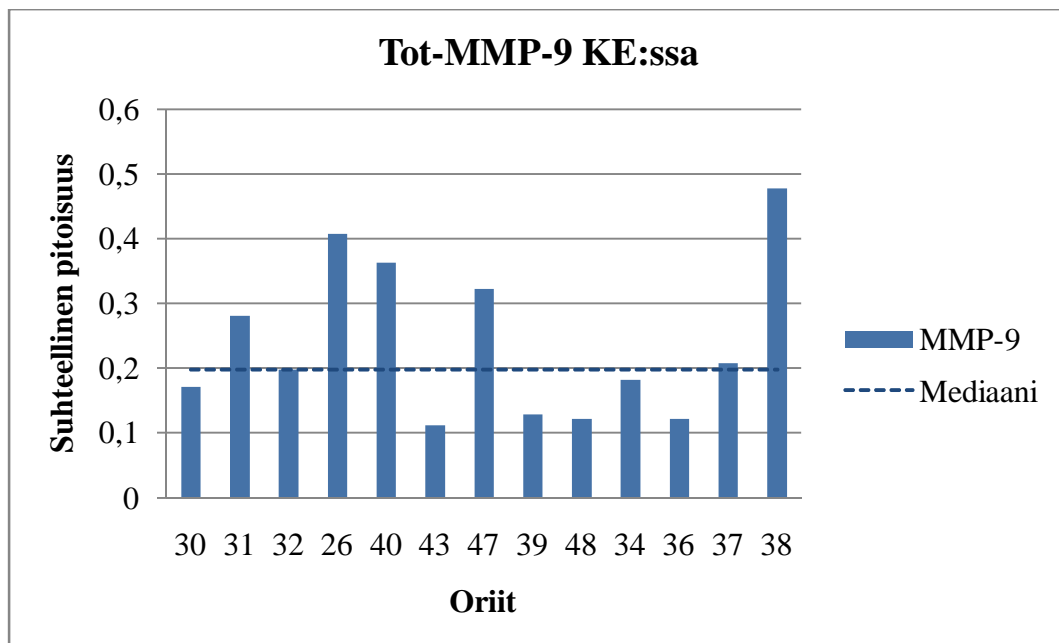
### 4.3. Kokonais-matriksimetalloproteinaasi 9

Tot-MMP-9:n suhteellisen pitoisuuden keskiarvot ovat SR:ssa 0,35, SK:ssa 0,24 ja KE:ssa 0,23. Pienimmät tot-MMP-9 pitoisuudet ovat hyvin pieniä. Suurimmat suhteelliset pitoisuudet ovat SR:ssa 0,74, SK:ssa 0,74 ja KE:ssa 0,48 ja vastaavasti pienimmät 0,06, 0,05 ja 0,11.

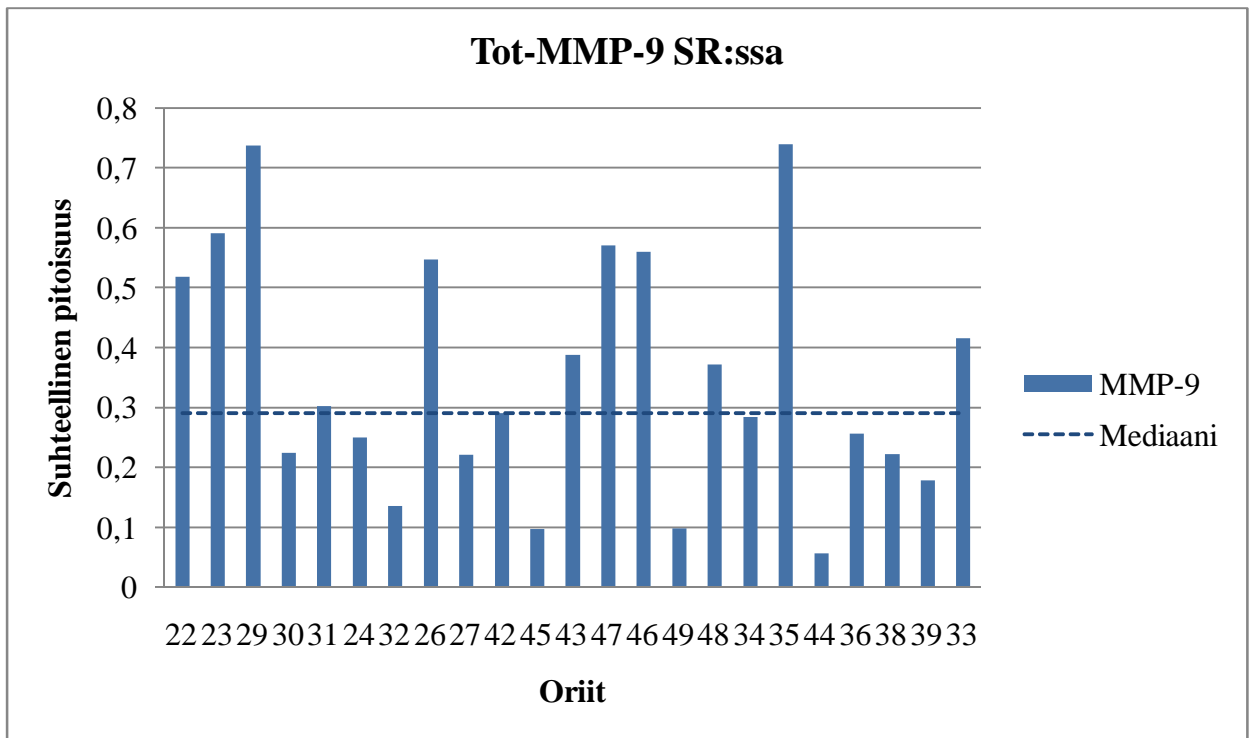
**Taulukko 3.** Tot-MMP-9:n suhteellisen pitoisuuden keskiarvo, keskihajonta sekä maksimi- ja miniarvot SR:ssa, SK:ssa ja KE:ssa.

	SR	SK	KE
Keskiarvo	0,35	0,24	0,23
Keskihajonta	0,2	0,18	0,12
Max.arvo	0,74	0,74	0,48
Min.arvo	0,06	0,05	0,11

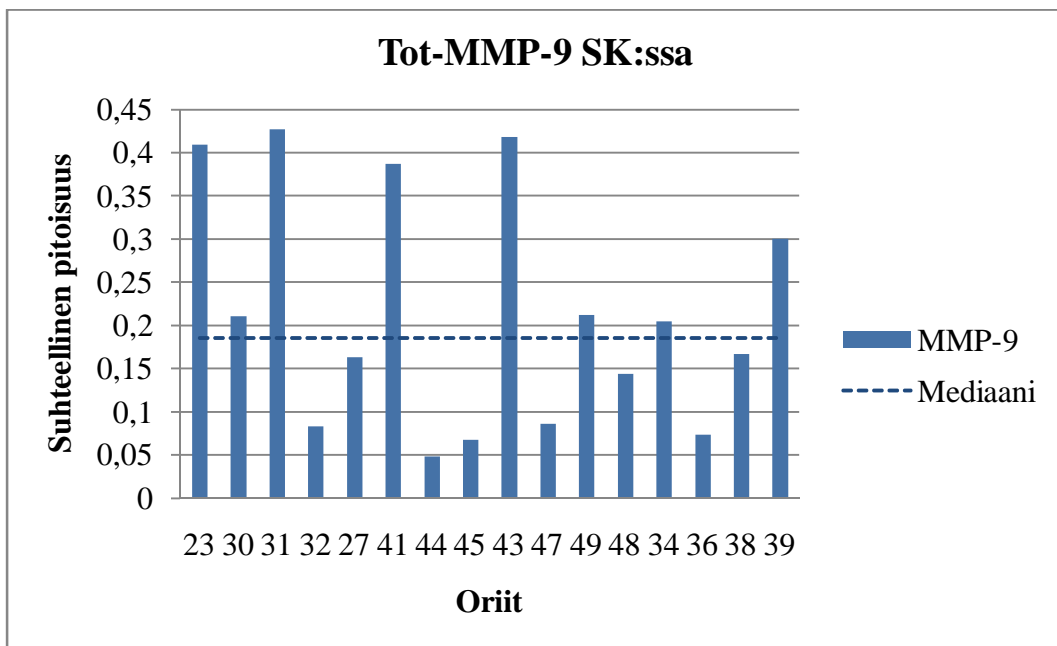
Oriin suhteelliset pitoisuudet vaihtelevat SR:ssa, SK:ssa sekä KE:ssa. Tot-MMP-9:n korkein pitoisuus SR:ssa on oriilla 35, SK:ssa oriilla 43 ja KE:ssa oriilla 38. Pienimmät pitoisuudet ovat oriilla SR:ssa 44, SK:ssa 44 ja KE:ssa 43.



**Kuvaaja 8.** Tot-MMP-9: n suhteellinen pitoisuus KE:ssa oriittain.



**Kuvaaja 9.** Tot-MMP-9:n suhteellinen pitoisuus SR:ssa oriittain.



**Kuvaaja 10.** Tot-MMP-9:n suhteellinen pitoisuus SK:ssa oriittain.

#### 4.4. Matriksimetalloproteinaasit ja tiinehtyminen

Tammojen tiinehtyminen ensimmäiseen kiimaan ja oriitten MMP-pitoisuudet olivat tiedossa SR:ssa 19 ja KE:ssa 11 oriilla. Spearmanin järjestyskorrelaatiokertoimet ovat melko pieniä MMP:en ja tiinehtymisprosenttien välillä (Taulukko 4).

**Taulukko 4.** Spearmanin järjestyskorrelaatiokertoimet 1. kiimaan tiinehtymisen ja eri MMP-pitoisuuksien välillä SR:ssa sekä KE:ssa.

<b>Siittäörikasfraktio</b>	Pro-MMP-2	Akt-MMP-2	Tot-MMP-9
Tiinehtyminen 1. kiimaan	0,13	-0,14	0,08
<b>Kokonaisejakulaatti</b>			
Tiinehtyminen 1. kiimaan	0,09	0,09	0,08

## 5 POHDINTA

Kaikilla tutkimuksen oriilla oli havaittavia pitoisuuksia pro- ja akt-MMP-2:ta sekä tot-MMP-9:ää. Tulos oli odotettu, sillä miehillä on useammassa tutkimuksessa osoitettu seminaaliplasmasta kyseisiä matriksimetalloproteinaaseja (Shomokawa et al. 2002, Tentes et al. 2007). Oriilla vaikuttaa olevan suuremmat pitoisuudet pro-MMP-2:ta kuin akt-MMP-2:ta tai tot-MMP-9:ää. Myös nämä tulokset vastaavat miesten seminaaliplasman tutkimustuloksia (Tentes et al. 2007).

Tulokset osoittavat, että kaikkia matriksimetalloproteinaaseja erittyy kaikissa fraktioissa. MMP:en pitoisuudet olivat suurimpia SR:ssa. Pro-MMP-2:n pitoisuudet olivat lähes samaa tasoa sekä molemmissa fraktioissa että KE:ssa. Akt-MMP-2:n ja tot-MMP-9:n pitoisuudet olivat pienempiä SK:ssa ja KE:ssa kuin SR:ssa. Orikohtaiset erot olivat pienimpiä pro-MMP-2 kohdalla, jossa varsinkin SR:ssa keskihajonta oli pieni. Tuloksien vertailu oriiden välillä on hankalaa pienen aineiston takia. Sattuma saattaa vaikuttaa tuloksiin hyvinkin paljon. Lisäksi kaikista oriista ei ollut saatavilla kaikkia fraktioita, joten tiedot jäivät monella oriilla yhden fraktion tai KE:n varaan. MMP-pitoisuuksien ja sperman ominaisuuksien vertailemiseksi tarvittaisiin aineistoltaan laajempia tutkimuksia, jotta mahdollisia merkittäviä eroja voitaisiin varmemmin

osoittaa oriitten välillä. Lisäksi esimerkiksi oriin seksuaalisen kiihottumisen on osoitettu vaikuttavan seminaaliplasman määrään (Pickett et al. 1976), joten MMP-pitoisuuksissa voi olla eroja ejakulaatioiden välillä. Keräysvuodenaika saattaa myös vaikuttaa MMP-pitoisuuksiin seminaaliplasmassa, sillä seminaaliplasman useissa ominaisuuksissa tapahtuu muutoksia vuodenajan mukaan (Pickett et al. 1970). Oriilta pitäisi kerätä useampia seminaaliplasmanäytteitä sekä astutuskaudella että sen ulkopuolella, jotta mahdolliset vaihtelut ejakulaatioiden ja eri vuodenaikojen välillä voitaisiin havaita.

Vertailu tammojen tiinehtymisen ja oriiden MMP-pitoisuuksien välillä tehtiin KE:n lisäksi SR:ssa. Sillä KE:ssa oli käytössä vain 11 oriin tiedot. Korrelaatiokertoimet olivat pieniä. Aikaisempia tutkimuksia, joissa samaa asiaa olisi tutkittu oriilla, en löytänyt. En löytänyt suoraan vastaavanlaisia vertailuja MMP-pitoisuuksien ja naisten raskauksien välillä. Miehillä vertailuja MMP-pitoisuuksien ja sperman parametrien välillä on tehty. Niissä on todettu siemennesteen MMP-pitoisuuksissa olevan eroa normaalien ja epänormaalien siemennesteenäytteiden välillä (Baumgart et al. 2002, Buchman-Shaked et al. 2002, Tentes et al. 2007). Baumgartin et al. (2002) tekemässä tutkimuksessa havaittiin MMP-2:n kokonaispitoisuudessa olevan matalampi siittiökadosta kärsivillä miehillä. Oriilla vaikuttaisi pro-MMP-2:ta olevan enemmän niillä, joilla oli paremmat tiineystulokset. Toisaalta normaalia suurempi akt-MMP-2 määrä vaikuttaisi olevan oriilla, joiden tiinehtymistulokset olivat heikompia. Oriitten määrä oli kuitenkin pieni, joten sattumalla voi olla suuri vaikutus tuloksiin. Lisää tutkimuksia pitäisi tehdä myös sperman parametrien ja MMP-pitoisuuksien korrelaatioista.

MMP:lla tiedetään olevan tärkeä rooli, esimerkiksi ovulaatiossa ja alkion implantaatiossa sekä kohtukuppien muodostumisessa (Salamonsen 1996, Oddsdóttir et al. 2011). MMP:en merkityksestä urosten sukuelimissä, niiden vaikutuksista siittiöiden kehittymiseen ja kypsymiseen, tiedetään vielä melko vähän. Myöskään seminaaliplasman mukana tamman kohtuun päätyvän MMP:en vaikutuksista kohdussa ei ole tehty tutkimuksia. Seminaaliplasmalla on osoitettu olevan aktiivinen vaikutus myös naaraan sukupuolielimissä, ja sen on todettu vaikuttavan useisiin asioihin (Troedsson et al. 2005). Lisää tutkimuksia siis vaadittaisiin, ennen kuin tiedetään enemmän MMP:n merkityksistä ja vaikutuksista seminaaliplasmassa sekä uroksen että tamman sukuelimissä.

Mielenkiintoisia ovat myös poikkeavat yksilöt kuten ori 43, jolla MMP-pitoisuudet olivat korkeat SR:ssa ja SK:ssa; samoin oriit 32 ja 30, joilla kaikki MMP-pitoisuudet molemmissa fraktioissa sekä KE:ssa olivat alle keskiarvon. Jos tällaisia oriitta löytyisi suuremmissa aineistoissa enemmän, olisi mielenkiintoista vertailla niiden sperman ominaisuuksia sekä tiinehtymistuloksia verrattuna tavallisiin oriisiin.

## 6 KIITOKSET

Lämpimät kiitokset ohjaajilleni Maria Kareskoskelle ja Terttu Katilalle kannustavasta ja ystävällisestä ohjauksesta.

Erityiset kiitokset laboratoriotöissä minua auttaneille Mari Palviaiselle ja Kirsi Laukkaselle asiantuntevasta ja ystävällisestä avusta sekä kärsivällisyydestä.

## 7 LÄHTEET

Abou-Ahmed MM, El-Belely MS, Ismail ST, El-Baghdad YRM, Hemeida NA, 1993: Influence of age and season on certain biochemical constituents of seminal plasma of Arabian horses. *Anim. Reprod. Sci.* 32 237-244.

Baumgart E, Lenk SV, Loening SA, Jung K, 2002: Quantitative differences in matrix metalloproteinase (MMP)-2, but not in MMP-9, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 or TIMP-2, in seminal plasma of normozoospermic and azoospermic patients. *Hum. Reprod.* 17 2919-2923.

Beyler SA, Zaneveld LJD, 1982: The male accessory sex glands. Teoksessa: Zaneveld LJD, Chatterton RT (toim.) *Biochemistry of mammalian reproduction*. John Wiley & Sons, New York, USA. Sivut 65-88.

Buchman-Shaked O, Kraiem Z, Gonen Y, Goldman S, 2002: Presence of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase in human sperm. *J. Androl.* 23 702-708.

Chambers AF, Matrisian LM, 1997: Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* 89 1260-1270.

Coleman JE, 1992: Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21 441-483.

Davies Morrell MCG 1993: *Equine reproductive physiology, breeding and stud management*. 1. painos, Farming press books, Ipswich, Englanti. Sivut 17-59.

de Laat MA, Kyaw-Tanner MT, Nourian AR, McGowan CM; Silence MN, Pollitt CC, 2011: The developmental and acute phases of insulin-induced laminitis involve minimal metalloproteinase activity. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 140 275-281.

Dias AJ, Maia MS, Retamal CA, López ML, 2004: Identification and partial characterization of alpha-1,4-glucosidase activity in equine epididymal fluid. *Theriogenology* 61 1545-1558.



- Ekhlasi-Hundrieser M, Schäfer B, Kirchhoff C, Hess O, Bellair S, Muller P, Töpfer-Petersen E, 2005: Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Mol. Reprod. Dev.* 70 45-57.
- Fouchécourt S, Métayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux J-L, 2000: Stallion epididymal fluid proteome: Qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol. Reprod.* 62 1790-1803.
- Gebauer MR, Pickett BW, Swierstra EE, 1974: Reproductive physiology of the stallion. II. Daily production and output of sperm. *J. Anim. Sci.* 39 732-736.
- Gebauer MR, Pickett BW, Faulkner LC, Remmenga EE, Berndtson KE, 1976: Reproductive physiology of the stallion. VII. Chemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 43 626-632.
- Hoffmann B, Landeck A, 1999: Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. *Anim. Reprod. Sci.* 57 89-98.
- Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM, 1997: Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol. Hum. Reprod.* 3 27-45.
- Jasko DJ, Moran DM, Farlin ME, Squires EL, 1991: Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoa motion characteristics of cooled semen. *Theriogenology* 35 1059-1067.
- Kareskoski AM, Reilas T, Sankari S, Andersson M, Givenc K, Katila T, 2010: Alkaline and acid phosphatase,  $\beta$ -glucuronidase and electrolyte levels in fractionated stallion ejaculates. *Reprod. Dom. Anim.* 45 369-374.
- Kareskoski AM, 2011: Components of fractionated stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity (väitöskirja). Helsinki, Helsingin yliopisto.
- Katila T, Reilas T, Givenc K, Alm K, Andersson M, 2003: The effect of seminal plasma on motility characteristics and viability of spermatozoa after cooled storage. Havemeyer Foundation Monograph Series 13 3-5.
- Kosiniak K, 1975: Characteristics of the successive jets of ejaculated semen of stallions. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 23 59-61.

- Kosiniak K, Bittmar A, 1981. Biochemical components of stallion seminal plasma before and after the breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* 4 39-47.
- Lemazurier E, Moslemi S, Sourdain P, Desjardins I, Plainfosse B, Seralini GE, 2002: Free and conjugated estrogens and androgens in stallion semen. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125 272-282.
- Lindeberg H, Karjalainen H, Koskinen E, Katila T, 1999: Quality of stallion semen obtained by a new semen collection phantom (Equidame) versus a Missouri artificial vagina. *Theriogenology* 51 1157-1173.
- Love CC, Garcia MC, Riera FR, Kenney RM, 1991: Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 44 99-105.
- Magistrini M, Seguin F, Beau P, Akoka S, Le Pape A, Palmer E, 1995: 1H nuclear magnetic resonance analysis of stallion genital tract fluids and seminal plasma: contribution of the accessory sex glands to the ejaculate. *Biol. Reprod. Mono.* 1 599-607.
- Mann T, Leone E, Polge C, 1956: The composition of the stallion's semen. *J. Endocrin.* 13 279-290.
- Métayer S, Dacheux F, Dacheux J-L, Gatti J-L, 2002: Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals. Matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. *Biol. Reprod.* 66 1219-1229.
- Naden J, Amann RP, Squire EL, 1990: testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behavior in stallions. *J. Reprod. Fertil.* 88 167-176.
- Oddsdóttir C, Riley SC, Leask R, Shaw DJ, Aurich C, Palm F, Fowden AL, Ricketts SW, Watson ED, 2011: Dynamics of activities of matrix metalloproteinases-9 and -2, and the tissue inhibitors of MMPs in fetal fluid compartments during gestation and at parturition in the mare. *Theriogenology* 75 1130-1138.
- Pickett BW, Faulkner LC, Sutherland TM, 1970: Effect of month and stallion characteristics and sexual behavior. *J. Anim. Sci.* 31 713-728.

- Pickett BW, Faulkner LC, Seidel GE, Berndtson KE, Voss JL, 1976: Reproductive physiology of the Stallion. IV. Seminal and behavioral characteristics. *J. Anim. Sci.* *43* 617-625.
- Pesch S, Bergmann M, Bostedt H, 2006: Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology* *66* 307-313.
- Salamonsen LA, 1996. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in endocrinology. *Trends Endocrinol. Metab.* *7* 28-34.
- Samper JC, Hellander JC, Crabo BG, 1991: Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J. Reprod. Fert. Suppl.* *44* 107-114.
- Senger PL, 2003: Pathways to pregnancy and parturition. 2 painos, Current conceptions Inc. Washington, USA. Sivut 44-265.
- Shimokawa K, Katayama M, Matsuda Y, Takahashi H, Hara I, Sato H, Kaneko S, 2002: Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. *Mol. Hum. Reprod.* *8* 32-36.
- Shimokawa K, Katayama M, Matsuda Y, Takahashi H, Hara I, Sato H, 2003: Complexes of gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in human seminal plasma. *J. Androl.* *24* 73-77.
- Swierstra EE, Gebauer MR, Pickett BW, 1974: Reproductive physiology oh the Stallion. I. Spermatogenesis and testis composition. *J. Reprod. Fert.* *40* 113-123.
- Tentes I, Asimakopoulos B, Mourvati E, Diedrich K, Al-Hasani S, Nikolettos N, 2007: Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in seminal plasma. *J. Assist. Reprod. Genet.* *24* 278-281.
- Tischner M, Kosiniak K, Bielanski W, 1974: Analysis of pattern of ejaculation in stallions. *J. Reprod. Fert.* *41* 329-335.
- Troedsson MHT, Alghamdi AS, Mattisen J, 2002: Equine seminal plasma protects the fertility of spermatozoa in an inflamed uterine environment. *Theriogenology* *58* 453-456.

Troedsson MHT, Desvouses A, Alghamdi AS, Dahms B, Dow CA, Hayna J, Valesco R, Collahan PT, Macpherson ML, Pozor M, Buhi WC, 2005: Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim Reprod Sci.* 89 171-86.

Turner RMO, McDonnell SM, 2003: Alkaline phosphatase in stallion semen: characterization and clinical applications. *Theriogenology* 60 1-10.

Töpfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H, 2005: The role of stallion seminal plasma proteins in fertilisation. *Anim. Reprod. Sci.* 89 159-170.

Varner DD, Blanchard TL, Love CC, Garcia MC, Kenney RM, 1987: Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoa motility parameters. *Theriogenology* 28 709-723.

Weber JA, Woods GL, 1993: Ultrasonographic measurement of stallion accessory sex glands and excurrent ducts during seminal emission and ejaculation. *Biol. Reprod.* 49 267-273.