

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**Buněčná a vývojová biologie
Vývojová biologie**



Bc. Eva Dvořáková

**Vliv zearalenonu na reprodukční parametry a expresi
vybraných genů u myši**

Effect of zearalenone on reproductive parameters and the expression
of selected genes in mice

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitelka: doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc.

Praha, 2012

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 27.8. 2012

.....

Podpis

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. Janě Pěkníkové, Csc. za cenné rady a vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Evě Žatecké a Mgr. Lukáši Dědovi za spolupráci na tématu a rady při zpracování výsledků, dále pak Ing. Aleně Kubátové za trpělivé vedení při učení metod a celému kolektivu naší laboratoře za cenné rady.

V neposlední řadě pak děkuji své rodině za podporu nejen při psaní této práce, ale i během celého studia.

Abstrakt

Mnoho chemických látek může ovlivňovat pozemní i vodní životní prostředí a některé z nich mohou mít i negativní vliv na reprodukci živočichů. Endokrinní disruptory (ED) s estrogenní aktivitou mohou napodobovat činnost endogenních hormonů a ovlivňovat tak jejich přirozenou funkci. Mezi takové látky patří zearalenon (ZEA) produkovaný plísněmi rodu *Fusarium*. Přestože strukturou není steroid, má ZEA a jeho deriváty silnou estrogenní aktivitu.

Vliv ZEA na reprodukční parametry a změny v expresi vybraných genů byly testovány na samcích outbrední linie myší od prenatálního období do 70. dne jejich života. Předložená studie prokázala významné účinky ZEA na savčí organismus a reprodukční parametry. Tento efekt byl zjištěn jak u nízké dávky, se kterou mohou lidé běžně přijít do styku, tak u vyšší dávky, obě vykazovaly změny v testovaných parametrech.

Klíčová slova

Zearalenon, endokrinní disruptory, reprodukční parametry, spermatogeneze, genová exprese

Abstract

A number of chemicals may have a negative impact on the environment and wildlife. Endocrine disruptors (EDs), which can mimic estrogen, interfere with natural hormones in organism and can have a negative effect on the reproductive system. Such substances include zearalenone (ZEA) – mycotoxin, produced by the fungi *Fusarium*. Despite the non-steroidal structure of its molecule, ZEA and its derivatives possess potent estrogenic activity.

The influence of ZEA on reproductive parameters and changes in expression of selected genes were tested in the outbred line of mice. This study showed significant effects of ZEA on number of reproductive performances. This effect was observed at lower examined dose, to which are humans normally exposed, and at higher doses, both showed changes in the tested parameters.

Keywords

Zearalenone, endocrine disruptors, reproductive parameters, spermatogenesis, gene expression

Obsah

Abstrakt.....	4
Klíčová slova	4
Abstract.....	5
Keywords	5
Obsah.....	6
Seznam zkratk	9
1. Úvod	11
1.1 Reprodukce	11
1.1.1 Spermie.....	12
1.1.1.1 Hlavička spermie	12
1.1.1.2 Bičík.....	13
1.1.2 Vznik spermií.....	15
1.1.3 Genová exprese během spermatogeneze	16
1.1.3.1 Geny exprimované v germinálních buňkách.....	17
1.1.3.2 Geny Sertoliho buněk	19
1.1.3.3 Geny související s hormonální regulací.....	19
1.1.3.4 Epigenetika a geny s ní související.....	20
1.1.4 Apoptóza.....	21
1.1.4.1 Molekulární mechanismy apoptózy	22
1.1.4.1.1 Kaspázy.....	22
1.1.4.1.2 Adaptorové proteiny, Bcl-2, TNF-R.....	22
1.1.4.1.3 Dvě dráhy vedoucí k aktivaci kaspáz.....	23
1.1.4.1.4 Role p53 a p21 v iniciaci apoptózy	24
1.1.4.2 Detekce apoptózy.....	25
1.2 Patologie reprodukce.....	26
1.2.1 Endokrinní disruptory	26
1.2.1.1 Zearalenon	27
1.2.1.2 Vliv zearalenonu na savce.....	29
2. Cíle.....	31
3.1 Roztoky a chemikálie.....	32
3.2 Experiment <i>in vivo</i>	33
3.3 Vážení těl a orgánů, měření AGD.....	33

3.4 Příprava myších spermií	34
3.5 Určení koncentrace spermií	34
3.6 Hodnocení morfologie spermií	34
3.7 Určení životnosti spermií	34
3.8 Detekce annexinu V na spermích	35
3.9 Nepřímá imunofluorescence	35
3.10 Izolace proteinů a SDS extrakce	36
3.11 Měření koncentrace proteinů	36
3.12 Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu	36
3.13 Barvení gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue	37
3.14 Přenos proteinů na PVDF membránu (Western Blot)	37
3.15 Imunodetekce	38
3.16 Příprava histologických řezů	39
3.17 Barvení hematoxylinem a eosinem	39
3.18 TUNEL analýza na histologických řezech	39
3.19 Izolace RNA	40
3.20 Agarózová elektroforéza	40
3.21 Měření koncentrace a čistoty RNA	41
3.22 Reverzní transkripce	42
3.23 Real Time PCR – testování primerů	42
3.24 Analýza genové exprese - Real Time PCR	45
3.24.1 Preamplifikace	46
3.24.2 BioMark System	46
3.25 Statistická analýza	48
4. Výsledky	49
4.1 Počet mláďat a poměr pohlaví	49
4.2 Váha těla a orgánů	49
4.3 Spermatologické parametry	50
4.4 Imunodetekce	51
4.5 Histologie	52
4.6 TUNEL analýza na histologických řezech	53
4.7 Analýza genové exprese	55
4.7.1 Geny regulující apoptózu	55
4.7.2 Geny exprimované v germinálních buňkách	56

4.7.3 Geny Sertoliho buněk.....	57
4.7.4 Geny související s endokrinní regulací.....	58
4.7.5 Epigenetika	59
4.7.6 PCA analýza	60
5. Diskuze	61
6. Závěr.....	67
7. Literatura.....	68

Seznam zkratek

A1	Bcl2-related protein
AGD	anogenitální vzdálenost
AIF	apoptosis inducing factor
Anapc11	anaphase promoting complex subunit 11
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
APC	anaphase promoting complex
APS	persíran amonný
AR	androgenní receptor
ATP	adenosintrifosfát
Bad	Bcl2-associated agonist of cell death
Bak	Bcl2-antagonist/killer
Bax	Bcl2-associated X protein
Bcl-2	B cell lymphoma 2
BPA	bisfenol A
BSA	hovězí sérový albumin
CAD	caspase-activated DNase
Ccna1	gen pro cyklin A1
Ccnd1	gen pro cyklin D1
CDK	cyklin dependentní kináza
cDNA	komplementární DNA
CpG islands	úseky DNA bohaté na cytosin a guanin
CREM (gen <i>Crem</i>)	cyclic AMP response element modulator
Ctsd	gen pro cathepsin D
DAPI	4', 6-diamino-2-fenylindolyl
DDT	dichlordifenyltrichloretan
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Dnmt1	gen pro DNA methyltransferázu 1
Dnmt3	DNA methyltransferáza 3
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
dUTP	deoxyuridin trifosfát
ED	endokrinní disruptory
EDTA	ethylenediamin tetraoctová kyselina
Eps8	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8
ER	estrogenní receptor
FADD	Fas-associated death domain protein
FasL	Fas ligand
Fkbp5	FK506 binding protein 5, imunofilin
FSH	folikulostimulační hormon
GRTH (gen <i>Grth</i>)	gonadotropiny regulovaná testikulární RNA helikáza
HEPES	hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid
iCAD	inhibitor CAD
Igfbp4, 5	insulin-like growth factor binding protein 4, 5
Itgb1bp1	integrin beta 1 binding protein 1
Kdm4a	lysine (K)-specific demethylase 4A
LH	luteinizační hormon

Mas1	MAS1 oncogen
Mcl-1	myeloid cell leukemia sequence 1
Mdm2	murine double minute 2
Meig1	meiosis expressed gene 1
mRNA	messenger RNA
NOEL	no observed effect level
p21	inhibitor CDK 1
p53	tumor supresorový protein
PBS	fosfátový pufr (fyziologický roztok)
PCA	analýza hlavních komponent
PCR	polymerázová řetězová reakce
Prm1	protamin P1
PS	fosfatidylserin
PVDF	polyvinylidenfluoridová kyselina
Real Time PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
Sox9	SRY-box containing gene 9
SRY	sex determining region Y
SYCP1, 2, 3	protein synaptonemálního komplexu 1, 2, 3
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TDS	testicular dysgenesis syndrome
TdT	terminální deoxynukleotidyl-transferáza
TEMED	N,N,N', N'-tetramethylendiamin
Tff1 (pS2)	trefoil factor 1
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TP1,2 (gen <i>Tnp1, 2</i>)	tranziční jaderný protein 1, 2
TRADD	TNF-R1-associated death domain protein
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling
Vegfa	vascular endothelial growth factor A
WHO	Světová zdravotnické organizace
Wt1	Wilms' tumour 1
ZEA	zearalenon
α-ZOL, β-ZOL	α- a β-zearalenol

1. Úvod

Od osmdesátých let se věnuje zvýšená pozornost výskytu polutantů v životním prostředí a to hlavně v souvislosti s možným vlivem na zdraví živočichů. Tato obava byla doložena terénním pozorováním a vyšetřením změn v reprodukci zvíře (Tyler et al., 1998; Vos et al., 2000). Další výzkumy potvrdily problémy s reprodukcí i u člověka. Zvýšil se výskyt nádorů varlat (Moller, 2001), stejně jako vady ve vývoji mužských reprodukčních orgánů (Jensen et al., 1995; Toppari et al., 1996), a snižuje se kvalita mužského spermatu (Carlsen et al., 1992; Skakkebaek et al., 2001; Cooper et al., 2010).

Studie ukazují, že více než 15% evropské populace v reprodukčním věku trpí neplodností (Poongothai et al., 2009), z toho mužský faktor je příčinou neplodnosti až v 50% případů (Hirsh, 2003). Zjištění konkrétních příčin poklesu plodnosti není jednoduché, vzhledem k předpokladu, že řada faktorů ovlivňuje lidskou populaci současně. Polutanty v prostředí mohou poškodit biologické funkce organismu, a způsobit problémy i v reprodukci. V této souvislosti jsou v řadě světových laboratoří studovány látky s hormonální aktivitou, tzv. endokrinní disruptory, které napodobují funkci endogenních hormonů a brání jejich přirozené funkci (Sharpe and Skakkebaek, 1993; Safe, 2000; Vos et al., 2000; Kyselova et al., 2003; Kyselova et al., 2004; Elzeinova et al., 2008).

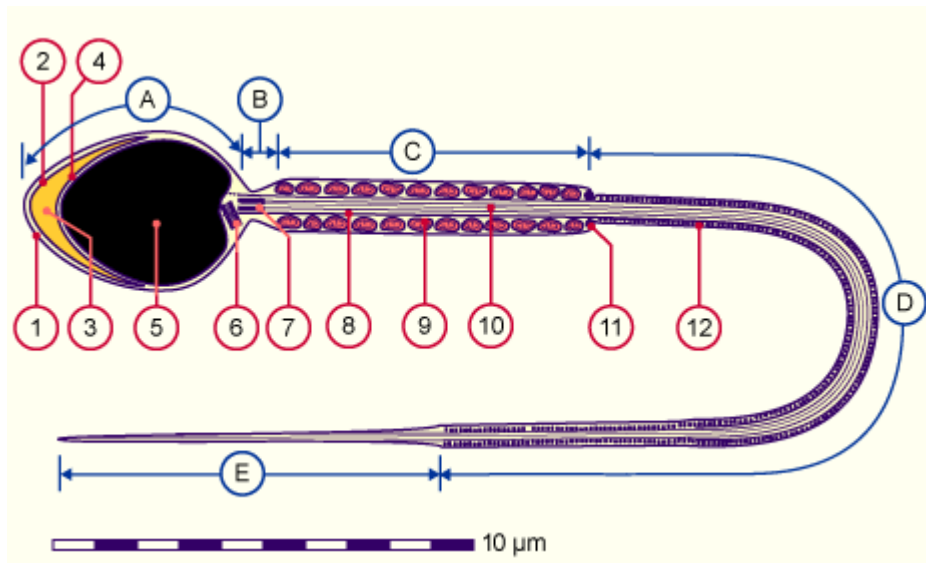
Jednou z takových látek je i mykotoxin zearalenon (ZEA), jehož vliv na reprodukční parametry a expresi vybraných genů u myších samců byl studován v této práci.

1.1 Reprodukce

Reprodukce je biologický proces, který vede ke vzniku nového jedince. Jedná se o základní schopnost organismů nezbytnou pro přežití druhu. Savci, včetně člověka, se rozmnožují pomocí samčích a samičích haploidních gamet, které po splynutí dají vznik diploidní zygotě. Aby došlo k úspěšnému splynutí spermie a vajíčka, je nezbytné, aby nejen pohlavní buňky samotné, ale i celý reprodukční trakt, kde se gamety vyvíjejí a kudy putují ke svému cíli – oplození, byl plně funkční a bez defektů.

1.1.1 Spermie

Spermie je samčí pohlavní buňka, které vzniká v semenotvorných kanálcích varlete procesem, který se nazývá spermatogeneze. Během spermatogeneze a následné spermiogeneze získá spermie typický tvar (Obr. 1), není však ještě schopna oplodnit vajíčko. Tuto kompetenci získá až maturací v nadvarletí (epididymis), kam putuje po uvolnění do lumen semenotvorného kanálku. Spermíím trvá průchod nadvarletem 3-12 dní, v závislosti na druhu organismu. Plně pohyblivé a zralé spermie jsou pak až do ejakulace uchovávány v koncové části nadvarlete (cauda epididymis) (Yanagimachi, 1994; Sullivan et al., 2005; Cooper, 2007).



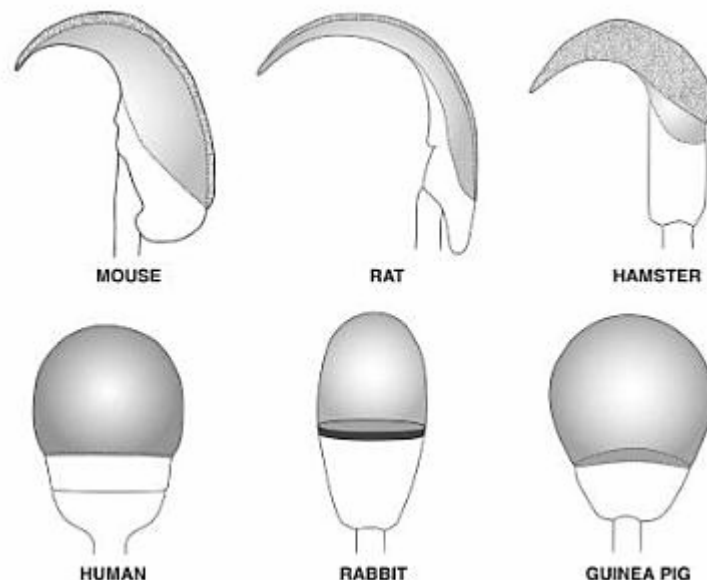
Obr. 1: Schéma spermie. A) hlavička, B) krček, C) mitochondriální část bičíku, D) hlavní část bičíku, E) terminální část bičíku; 1) cytoplasmatická membrána, 2) vnější akrozomální membrána, 3) akrozom, 4) vnitřní akrozomální membrána, 5) jádro, 6) proximální centriola, 7) zbytek distální centrioly, 8) vnější hustá vlákna, 9) mitochondrie, 10) axonema, 11) terminální disk (anulus), 12) prstencovitá vlákna (ring fibers), (převzato z www.embryology.ch)

1.1.1.1 Hlavička spermie

Spermie se skládá ze dvou základních částí – hlavičky a bičíku. Hlavička obsahuje jádro s haploidní kopií otcovského genomu. DNA je zde díky vazbě na malé, histonům podobné proteiny – protaminy, sbalena do velmi kondenzované struktury, která zaujímá malý objem a je geneticky inaktivní (Balhorn, 2007). Kromě jádra se v hlavičce nachází také akrozom, cytoskeletální struktury a malé množství cytoplazmy (Eddy, 2006).

Akrozom je membránový váček, který se nachází mezi cytoplazmatickou membránou a jádrem, v přední části hlavičky. Obsahuje hydrolytické enzymy (např. různé proteázy, akrozín, β -galaktosidázu, hyarulonidázu) umožňující naštěpení glykoproteinového obalu vajíčka – zona pellucida, a průnik spermie do vajíčka. Akrozomální váček vzniká během spermiogeneze z Golgiho aparátu (Honda et al., 2002; Eddy, 2006).

Cytoskeletální proteiny (aktin, tubulin, spektrin, vimentin apod.) mají v hlavičce spermie zásadní vliv na její tvar, který se mezidruhově může značně lišit (Obr. 2), (Eddy, 2006). Mimo to hraje cytoskelet také podstatnou roli i při průniku spermie do vajíčka. Polymerace a depolymerace aktinu je nezbytná pro kapacitaci, akrozomální reakci i splynutí plazmatických membrán spermie a vajíčka během oplození (Brener et al., 2003).

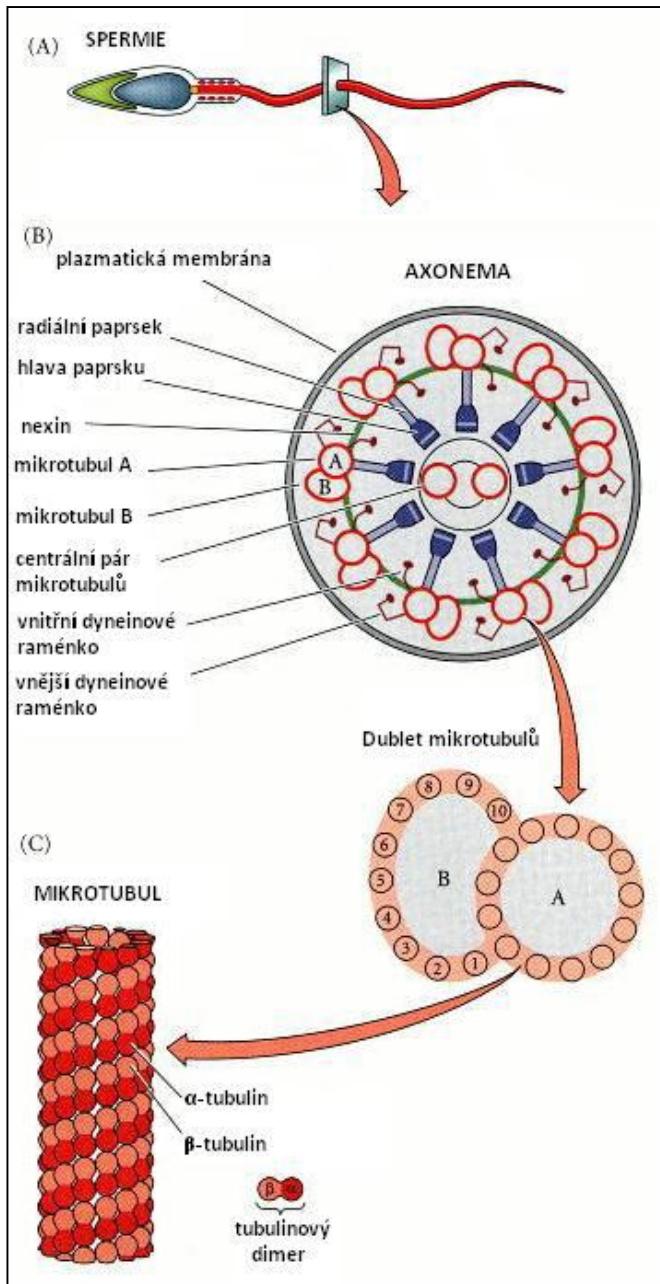


Obr. 2: Morfologie hlaviček spermií různých druhů savců – horní řada zleva: myš, potkan, křeček; dolní řada zleva: člověk, králík, morče (převzato z Eddy, 2006)

1.1.1.2 Bičík

Pohybovým aparátem spermie je bičík. Podle jeho vnitřní struktury můžeme bičík rozdělit na čtyři části – krček, mitochondriální část (middle piece), hlavní část (principal piece) a terminální část (end piece) (Obr. 1).

Středem bičíku prochází po celé jeho délce axonema, která je zároveň hnacím motorem bičíku (Obr. 3). Axonema vybíhá z centrioly umístěné v krčku spermie, která je zároveň organizačním centrem mikrotubulů (Obr. 1). Axonema se skládá



z mikrotubulů v uspořádání „9+2“ - dva centrální samostatné mikrotubuly jsou obklopeny devíti dvojicemi mikrotubulů (dublety), (Obr. 3B). Dublet tvoří mikrotubul A a k němu z boku připojený mikrotubul B. Mikrotubul A je složený ze třinácti koncentricky uspořádaných protofilament, mikrotubul B tvoří pouze deset protofilament (Obr. 3C). Základní stavební jednotkou protofilament je dimer α - a β -tubulinu (Obr. 3C).

Dynein je molekulární motor, který zajišťuje hybnou sílu bičíku. Energie potřebná ke změně konformace dyneinu pochází z chemické energie hydrolýzy ATP. Mitochondrie obklopující bičík v jeho přední části, jsou zdrojem ATP.

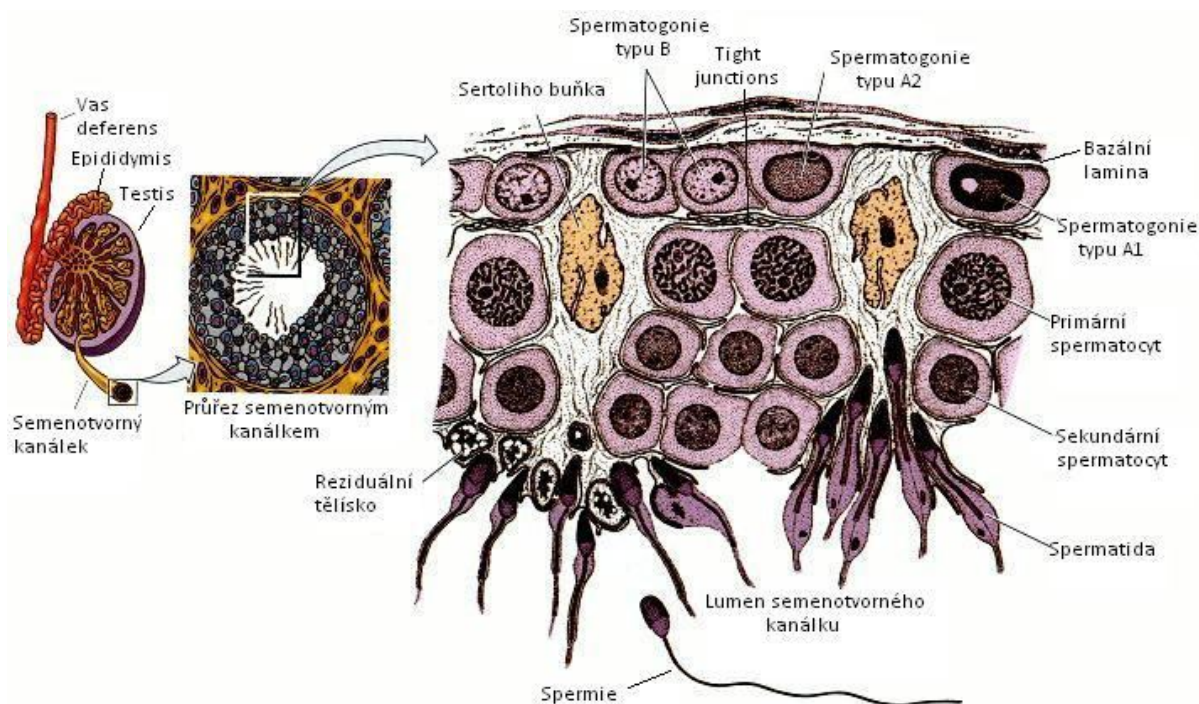
Axonema je kromě koncové části bičíku obklopena tzv. vnějšími hustými vlákny, které celou strukturu zpevňují a zajišťují mechanickou ochranu bičíku (Gilberts, 2000).

Obr. 3: Struktura bičíku. A) spermie se znázorněným průřezem, B) schéma axonemy, C) stavba mikrotubulů (převzato a upraveno z Gilberts, 2000)

1.1.2 Vznik spermií

Spermatogeneze následovaná spermiogenezí je soubor procesů, při kterém v semenotvorných kanálcích varlete (testis) vznikají spermie (Obr. 4). Celý proces začíná sérií mitotických dělení primordiálních zárodečných buněk, ze kterých vznikají spermatogonie označované $A_1 - A_4$. Tyto buňky si zachovávají schopnost kmenových buněk - dát vznik stejným buňkám, jako jsou ony samy, nebo dalšímu diferencovanému typu buněk. Ze spermatogonií typu A_4 pak vzniká spermatogonie typu B, která je již předurčena k diferenciaci v budoucí spermii a ztrácí schopnost kmenovosti. Spermatogonie typu B se mitoticky dělí a dává vznik primárním spermatocytům. Primární spermatocyty prochází prvním meiotickým dělením za vzniku dvou sekundárních spermatocytů, které vstupují do druhé meiózy a každý z nich dává vznik dvěma haploidním kulatým buňkám – spermatidám (Dym, 1994; Gilberts, 2000).

Děj, při kterém se dokončí diferenciaci z kulatých spermatid ve spermie, se nazývá spermiogeneze (někdy také nazývána spermatelióza). Spermiogeneze je rozsáhlá buněčná přestavba, při které dochází mimo jiné ke kondenzaci chromatinu, formování akrozomu z Golgiho aparátu, vzniku bičíku a odvržení části cytoplazmy ve formě reziduálních tělísek (Obr. 4) (Gilberts, 2000).



Obr. 4: Schéma průřezu semenotvorného kanálku varlete (převzato a upraveno z Gilberts, 2000)

Kromě primordiálních zárodečných buněk jsou v semenotvorných kanálcích přítomny Sertoliho buňky, a také myoidní a epiteliální buňky na povrchu kanálku. Mezi jednotlivými semenotvornými kanálky se nachází Leydigovy buňky produkující testosteron (Eddy, 2002).

Sertoliho buňky zajišťují okolním germinálním buňkám nezbytnou výživu a řídí jejich postupný vývoj (Griswold, 1998). Sertoliho buňky jsou poměrně velké a prostupují celým poloměrem semenotvorného kanálku – od bazální laminy až do lumen (Obr. 4). Tyto dva kompartmenty jsou od sebe odděleny pomocí těsných spojů (tight junctions) mezi jednotlivými Sertoliho buňkami (Russell, 1977). Tento spoj zároveň tvoří i bariéru mezi krví a buňkami spermatogenní linie (tzv. blood-testis barrier). V průběhu spermatogeneze se germinální buňky posunují podél Sertoliho buněk směrem do středu kanálku. Mitotická fáze se odehrává v bazální části kanálku, kdežto meiotická a postmeiotická (spermiogeneze) fáze v luminální části (Eddy, 2002). Mitotická fáze trvá u myši přibližně 11 dní, meiotická 10, a postmeiotická přibližně 14 dní. Spermatogeneze je kontinuální děj, který přetrvává po většinu života samce. Celý proces začíná každých zhruba 9 dní nanovo (Clermont and Trott, 1969).

Při dělení buněk během spermatogeneze nedochází k dokončení cytokineze, a dceřinné buňky zůstávají navzájem propojeny přibližně 1 μm velkými cytoplazmatickými můstky, díky nimž mohou buňky sdílet důležité signální molekuly a jejich vývoj je tak synchronizován. Cytoplazmatické propojení se ztrácí až během spermiogeneze (Dym and Fawcett, 1971; Eddy, 2002).

1.1.3 Genová exprese během spermatogeneze

Jak už bylo zmíněno výše, spermatogeneze může být rozdělena do tří fází – mitotické, meiotické a postmeiotické. Mnoho genů a transkriptů je specifických pouze pro konkrétní fázi. Přesná koordinace změn genové exprese během jednotlivých fází je pro úspěšné dokončení spermatogeneze klíčová (Eddy, 2002).

Regulaci spermatogeneze můžeme podle mechanismu působení rozdělit na vnitřní, vnější nebo interaktivní. Vnitřní regulace je zajištěna evolučně velmi konzervovaným genetickým programem, který stanovuje, kdy budou exprimovány konkrétní geny. Interaktivní regulaci představuje vzájemná komunikace

se sousedními buňkami, které se mezi sebou ovlivňují signálními molekulami. V tomto druhu regulace budou nejspíš klíčové Sertoliho buňky, které prostupují celým semenotvorným kanálkem a jsou tak v kontaktu s buňkami ve všech vývojových fázích. Vnější regulaci zajišťuje endokrinní systém, který hormonálně ovlivňuje somatické testikulární buňky, a ty skrze interaktivní regulaci ovlivňují genovou expresi germinálních buněk. Vnější regulace je proto regulací nepřímou (Eddy, 2002). Hlavními hormony, které kontrolují vývoj zárodečných buněk jsou gonadotropiny - luteinizační hormon (LH) a folikulostimulační hormon (FSH). FSH stimuluje proliferaci Sertoliho buněk, LH ovlivňuje Leydigovy buňky, stimuluje je k produkci testosteronu, který je nezbytný pro správnou spermatogenezi. Uvnitř testes je koncentrace testosteronu až 100x vyšší než je fyziologická koncentrace testosteronu v krvi (Verhoeven et al., 2010).

Na tomto místě bych ráda zmínila funkci některých genů účastnících se spermatogeneze. Kompletní výčet genů by dalece přesáhl rámec této práce. Zaměřuji se tedy především na geny, jejichž exprese byla sledována v našem experimentu.

1.1.3.1 Geny exprimované v germinálních buňkách

Některé geny jsou unikátní pro germinální linii a nemají homology v somatických buňkách. Většina takových genů je exprimována během postmeiotické fáze, kdy je potřeba vytvořit speciální strukturní komponenty pro spermii (Eddy, 2002). Takovým je i gen pro protamin P1 (*Prm1*), který je exprimován ve spermatidách všech savců. Protaminy jsou malé proteiny bohaté na arginin, které u spermií nahrazují histony a podílejí se na kondenzaci genomu spermie (Balhorn, 2007).

S protaminy souvisí i další proteiny – tranziční jaderné proteiny (transition nuclear proteins - TPs), které asociují s DNA během výměny histonů za protaminy. Sekvence genu pro TP1 (*Tnp1*) je evolučně konzervovanější než sekvence pro TP2 (*Tnp2*) (Meistrich et al., 2003). *Tnp2* je úzce spojen s protaminy, nejspíš vznikl duplikací *Prm1*. Transkripce *Tnp1* a *Tnp2* je v myších spermatidách iniciována ve stejný čas jako transkripce *Prm1* a *Prm2* (Engel et al., 1992).

Gen *Meig1* je zásadní pro spermatogenezi, jeho absence způsobuje sterilitu samců (Salzberg et al., 2010). Ačkoliv se dříve vědci domnívali, že je důležitý

pro meiózu (čemuž odpovídá i jeho název - meiosis expressed gene 1), výzkumy na myších mutantech ukázaly, že sterilita nebyla způsobena defektem v meióze, v semenotvorných kanálcích takových myší byly nalezeny spermatogonie, spermatocyty i spermatidy, chyběly však prodlužující se spermatidy (Zhang et al., 2009; Salzberg et al., 2010).

Synaptonemální komplex spojuje homologní chromozomy a účastní se jejich rekombinace a segregace během meiózy I. SYCP1 (synaptonemal complex protein 1, gen *Sycp1*), SYCP2 a SYCP3 (gen *Sycp3*) jsou strukturní proteiny, které se pravděpodobně podílejí na sestavení a rozpadu synaptonemálního komplexu (Zheng et al., 2009). Mutace SYCP proteinů mohou způsobit poruchy během časně meiózy v průběhu gametogeneze a mohou vést až k meiotickému arestu (Costa et al., 2005).

Cykliny a cyklin-dependentní kinázy jsou klíčovými regulátory buněčného cyklu. Jedním z nich je i cyklin A1 (*Ccna1*), který je specificky exprimován ve spermatocytech (Wolgemuth, 2008). Bylo popsáno, že ztráta genu *Ccna1* způsobila nadměrnou apoptózu spermatocytů a následkem toho i sterilitu myších samců (Liu et al., 1998).

GRTH je gonadotropiny regulovaná testikulární RNA helikáza, jejíž gen (*Grth*, někdy označovaný i *Ddx25*) je exprimován ve spermatocytech, spermatidách a Leydigových buňkách. Poškození genu *Grth* u myší způsobuje narušení spermatogeneze během prodlužování spermatid a může vést až k neplodnosti (Dufau and Tsai-Morris, 2007).

Vegfa (vascular endothelial growth factor A) je gen kódující peptid důležitý pro angiogenezi, stimuluje endoteliální buňky k proliferaci a diferenciaci. Jeho nadměrná exprese u transgenních myší působila negativně na samčí plodnost (Korpelainen et al., 1998; Huminiecki et al., 2001). Podobná funkce *Vegfa* jako u endoteliálních buněk byla objevena i u spermatogoniálních kmenových buněk, i zde hraje významnou roli pro jejich sebeobnovu a diferenciaci (Caires et al., 2012).

Mas1 je gen kódující membránový receptor (spojený s G-proteinem) pro angiotenzin. Mas receptor byl nalezen ve všech vrstvách epitelu normálního lidského semenotvorného kanálku, naopak u vzorků s narušenou spermatogenezí nebyl detekován (Reis et al., 2010).

APC (anaphase promoting complex) funguje jako ubiquitin ligáza, zprostředkovává navázání ubiquitinu a následnou destrukci klíčových regulátorů

mitózy i meiózy (Cooper and Strich, 2011). *Anapc11* je podjednotkou APC a exprese genu *Anapc11* byla popsána ve spermatocytech (Choudhury et al., 2010).

1.1.3.2 Geny Sertoliho buněk

Další skupinou genů jsou geny exprimované v Sertoliho buňkách. Gen kódující transkripční faktor SOX9 (*Sox9*, SRY-box containing gene 9) se podílí na indukci vzniku testes během embryonálního vývoje savců a je nezbytný pro vznik samčí pohlavní soustavy. U dospělců je *Sox9* exprimován specificky v Sertoliho buňkách (Kobayashi et al., 2005).

Dalším genem exprimovaným typicky v Sertoliho buňkách (alespoň u dospělých jedinců) je gen *Wt1* (Wilms' tumour). Řádná funkce tohoto genu je klíčová pro správný vývoj gonád. Pokud je gen *Wt1* narušen, během embryonálního vývoje nedojde k vytvoření gonád (Brennan and Capel, 2004; Park and Jameson, 2005).

Při studiu deregulace *Wt1* byly identifikovány další dva geny, které s tímto genem funkčně souvisí. *Eps8* (epidermal growth factor receptor pathway substrate 8) a *Itgb1bp1* (integrin beta 1 binding protein 1, někdy označovaný i jako *Icap1- α*) kódují signální molekuly, které se účastní tzv. apikální ektoplazmické specializace, což je spojení mezi Sertoliho buňkami a prodlužujícími se spermatidami, které bylo zasaženo při narušené expresi *Wt1* (Bettegowda and Wilkinson, 2010). *Eps8* je specificky exprimován v Sertoliho a Leydidových buňkách dospělých myší a předpokládá se, že jeho funkcí je regulace proliferace a diferenciací buněk v semenotvorných kanálcích (Wunsch et al., 2004). *Itgb1bp1* se stejně jako *Eps8* váže na integrin $\beta 1$, který se účastní remodelace cytoskeletu. Zdá se, že *Itgb1bp1* a *Eps8* spolu o vazbu na integrin $\beta 1$ kompetují, vazba *Itgb1bp1* vede k negativní regulaci a naopak vazba *Eps8* k pozitivní regulaci (Rao et al., 2006).

1.1.3.3 Geny související s hormonální regulací

Další skupinou jsou geny, které se podílí na regulaci hormonální odpovědi nebo je jejich exprese různými hormony regulována. Některé z těchto genů nejsou specifické pro testikulární buňky.

Androgenní receptor (AR, gen *Ar*) je receptor přítomný v jádře buněk, který váže androgeny, jako je testosteron a dihydrotestosteron. Jak už bylo zmíněno výše, testosteron je pro správnou spermatogenezi nezbytný. Mutace v androgenním receptoru, která způsobí jeho necitlivost k androgenům, tak vede k poruchám spermatogeneze a plodnosti (Verhoeven et al., 2010).

Fkbp5 je gen kódující imunofilin, jehož funkcí je regulace výskytu steroidních receptorů v jádře nebo v cytoplazmě. *Fkbp5* je transkripčně stimulován androgeny (Magee et al., 2006).

Gen *Tff1* (trefoil factor 1, někdy označovaný jako pS2) a gen pro cathepsin D (*Ctsd*) jsou stimulovány estrogenem (Augereau et al., 1994; Burak et al., 1997), stejně jako *Igfbp4* (insulin-like growth factor binding protein 4) (Qin et al., 1999), zatímco *Igfbp5* je estrogenem downregulován nebo dokonce reprimován (Huynh et al., 1996; Inoue et al., 2002). Nejčastěji je exprese těchto genů zkoumána u nádorových buněk rakoviny prsu (Inoue et al., 2002).

Receptor pro folikulostimulační hormon (*Fshr*) váže FSH a zprostředkovává signalizaci. Jak už bylo zmíněno výše FSH je důležitým hormonem pro správný vývoj testes a průběh spermatogeneze, působí na Sertoliho buňky a stimuluje je k proliferaci (Verhoeven et al., 2010).

1.1.3.4 Epigenetika a geny s ní související

Změny fenotypu, které jsou způsobeny jinými mechanizmy, než změnami v sekvenci DNA se oznamují jako epigenetické změny. Mezi tyto mechanizmy patří molekulární modifikace DNA nebo histonů, které umožňují nebo naopak zamezují přístupu transkripčního aparátu k DNA, a tím i regulují expresi genů. Hlavními modifikacemi chromatinu jsou methylace a demethylace DNA a acetylace a deacetylace histonů. Nejčastěji bývají geny umlčeny přidáním methylových skupin na úseky DNA bohaté na cytosin a guanin (tzv. CpG islands) v promotorové oblasti. Vedle toho acetylace bazických histonů způsobí rozvolnění chromatinové struktury a tím i přístupnost k transkripci. Změny v methylaci byly pozorovány i u některých druhů rakovin (Dada et al., 2012).

DNA methyltransferáza 1 (gen *Dnmt1*) je enzym přidávající methylové skupiny na cytosin, a hraje klíčovou roli v zachování tkáňově specifického vzoru methylace. (Dada et al., 2012).

Cyklin D1 (*Ccnd1*) reguluje během mitózy přechod mezi G1 a S fází buněčného cyklu. U některých rakovinných buněk byl jeho promotorový region methylovaný DNA methyltransferázou Dnmt3 (Hervouet et al., 2009).

CREM (cyclic AMP response element modulator, gen *Crem*) je transkripční regulátor, který reaguje na různé stresové, metabolické nebo vývojové signály. Knock out tohoto genu u myši vedl ke sterilitě samců v důsledku apoptotického odumírání kulatých spermatid během spermiogeneze (Nantel et al., 1996).

Kdm4a (lysine (K)-specific demethylase 4A) je gen kódující histonovou demethylázu, která odebírá methylové skupiny z lysinových zbytků histonů. Disrupce homologu *Kdm4a* u *Drosophily* vede ke ztrátě některých typicky samčích fenotypových projevů (Lorbeck et al., 2010).

1.1.4 Apoptóza

Apoptóza, neboli programovaná buněčná smrt, je koordinovaná série kroků, které vedou k odumření buňky. Apoptóza je nezbytná pro udržení homeostáze organismu a podílí se i na formování částí těla během ontogenetického vývoje. Deregulace apoptózy může zapříčinit vznik různých chorob, např. degenerativních onemocnění, autoimunitních onemocnění nebo rakoviny (Thompson, 1995; Hikim and Swerdloff, 1999).

V průběhu apoptózy dochází k aktivním morfologickým a biochemickým změnám, které zahrnují zmenšení buněčného objemu, fragmentaci a kondenzaci chromatinu, ztrátu původního tvaru, pučení membrány (blebbing) a nakonec rozpad buňky na malé váčky, tzv. apoptotická tělíška, která jsou fagocytována okolními buňkami. Oproti tomu nekróza je pasivní děj, který je indukován nepříznivými podmínkami. Buňka podstupující nekrózu svůj objem naopak zvětšuje, což vede až k prasknutí a vylití obsahu do okolí, čímž způsobí zánět (Hikim and Swerdloff, 1999).

U dospělých savců je apoptotické odumírání některých zárodečných buněk během spermatogeneze přirozeným mechanismem kontroly počtu a kvality spermií. Nedostatek gonadotropinu a testosteronu, zvýšená teplota testes, poranění, stres

nebo působení toxinů mohou být příčiny intenzivnější degenerace zárodečných buněk v testes (Hikim and Swerdloff, 1999).

1.1.4.1 Molekulární mechanismy apoptózy

Apoptóza je regulována prostřednictvím několika nezávislých signálních drah, které mohou být iniciovány zevnitř buňky nebo také z vnějšího prostředí (Strasser et al., 2000). Klíčové apoptotické geny jsou evolučně konzervovány od *C. elegans* až po savce (Hengartner and Horvitz, 1994). Některé z produktů těchto genů jsou aktivátory apoptózy, jiné naopak inhibitory. Jejich vzájemná souhra je pro správnou funkci nezbytná. Na iniciaci a průběhu apoptózy se podílí čtyři hlavní skupiny molekul: kaspázy, adaptorové proteiny, proteiny rodiny Bcl-2 a proteiny TNF-R (tumor necrosis factor receptor) super rodiny (Strasser et al., 2000).

1.1.4.1.1 Kaspázy

Kaspázy jsou hlavními výkonnými enzymy apoptózy. Jsou to cysteinové proteázy, které rozeznávají tetrapeptidový motiv a specificky štěpí substrát za zbytkem kyseliny asparagové. Konkrétní sekvence tetrapeptidu je pro různé kaspázy odlišná. Kaspázy jsou syntetizovány v podobě neaktivního zymogenu (prokaspázy). Pro jejich aktivaci je nezbytné štěpení a tetramerizace (Strasser et al., 2000).

Kaspázy můžeme podle funkce rozdělit na iniciační (kaspázy -2, -8, -9, -10) a exekuční (kaspázy -3, -6, -7). Iniciační kaspázy jsou aktivovány během časně fáze apoptózy a spouští kaskádu vedoucí k buněčné smrti. Exekuční kaspázy jsou aktivované kaspázami iniciačními a dále štěpí tzv. substráty smrti, což jsou převážně důležité strukturní nebo regulační proteiny, bez kterých se buňka více a více přibližuje smrti. Tímto způsobem je například aktivována DNáza CAD (caspase-activated DNase), jejíž funkce je za normálních okolností blokována navázaným inhibítozem iCAD. Inhibitor je rozštěpen kaspázami a aktivní CAD pak štěpí DNA na charakteristické pravidelné úseky (Sakahira et al., 1998; Strasser et al., 2000).

1.1.4.1.2 Adaptorové proteiny, Bcl-2, TNF-R

Adaptorové proteiny fyzicky propojují jednotlivé komponenty účastníci se apoptózy. Příkladem takového adaptorového proteinu je Apaf-1, FADD

(Fas-associated death domain protein) nebo TRADD (TNF-R1-associated death domain protein) (Strasser et al., 2000).

Jednou z nejvíce prozkoumaných skupin apoptotických proteinů je Bcl-2 rodina (B cell lymphoma 2), která obsahuje jak proapoptotické proteiny (Bax, Bak, Bad), tak i antiapoptotické proteiny (Bcl-2, Mcl-1, A1) (Hikim and Swerdloff, 1999).

Do super rodiny TNF (tumor necrosis factor) receptorů patří membránové receptory, které kromě apoptotických signálů přijímají i signály pro proliferaci nebo diferenciaci. Tato skupina zahrnuje i tzv. receptory smrti – TNFR1 nebo Fas receptor (Ashkenazi and Dixit, 1998; Strasser et al., 2000).

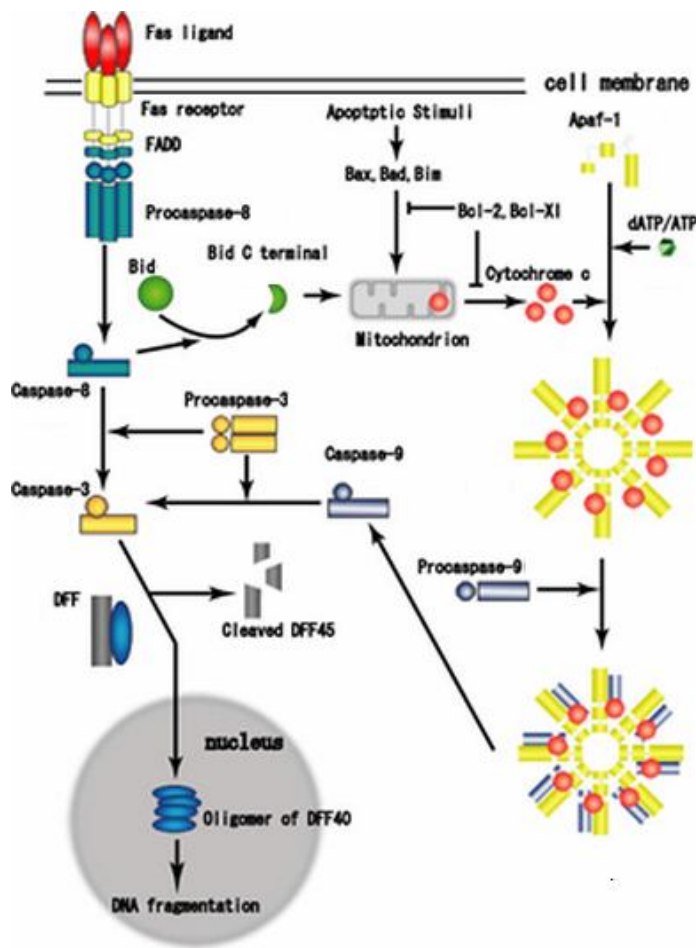
1.1.4.1.3 Dvě dráhy vedoucí k aktivaci kaspáz

Aktivace kaspáz, která dále vede k apoptotické buněčné smrti, je iniciována *a)* skrze mitochondrie (mitochondrial-initiated pathway) nebo *b)* přes membránové receptory smrti (cell surface death receptor pathway) (Budihardjo et al., 1999) (Obr. 5).

a) Mitochondrie jsou vedle produkce ATP i významnými regulátory apoptózy. V jejich mezimembránovém prostoru je přítomna celá řada proteinů regulujících apoptózu, jako je cytochrom *c*, AIF (apoptosis inducing factor) nebo některé prokaspázy. Proteiny rodiny Bcl-2 regulují integritu vnější mitochondriální membrány. Proteiny Bcl-2 spolu navzájem mohou interagovat a tvořit kanálky, skrze které jsou do cytoplazmy uvolněny mitochondriální proapoptotické molekuly (Harris and Thompson, 2000). Uvolněný cytochrom *c* pak asociuje s adaptorovým proteinem Apaf-1 za vzniku apoptosomu, který následně aktivuje prokaspázu-9. Aktivní iniciační kaspáza-9 štěpí a tím i aktivuje exekuční kaspázy-3, -6 a -7 (Budihardjo et al., 1999).

b) Druhým způsobem aktivace kaspáz je signalizace přes membránové receptory smrti. Receptory Fas a TNFR1 mají homologní intracelulární doménu - death domain, která je důležitá pro přenos signálu. Receptory jsou aktivovány vazbou ligandu. Ligandem pro Fas receptor je Fas ligand (FasL), TNF je ligandem TNFR1. Vazba ligandu zapříčiní trimerizaci receptoru, poté se k intracelulární doméně receptoru váží adapterové proteiny FADD a TRADD. Následně dochází k aktivaci

iniciační kaspázy-8, která dále vede k iniciaci exekučních kaspáz (Budihardjo et al., 1999).



Obr. 5: Schéma propojení apoptotických drah.

Vlevo: signalizace přes Fas ligand – Fas receptor – FADD – Prokaspáza-8 – Kaspáza-8 – Kaspáza-3 – aktivace DFF40 (=CAD) rozštěpením jejího inhibitoru DFF45 (=iCAD).

Vpravo: mitochondriální dráha – uvolnění cytochromu c z mitochondrií (díky interakci s proteiny rodiny Bcl-2) – Apaf-1 – Apoptosom – Prokaspáza-9 – Kaspáza-9 – Prokaspáza-3 – Kaspáza-3 – aktivace DFF40 – fragmentace DNA

(převzato a upraveno z <http://genomicobject.net/membre3/GONET/apoptosis.html>)

1.1.4.1.4 Role p53 a p21 v iniciaci apoptózy

Poškození genomu je jednou z příčin, které vedou k aktivaci programované buněčné smrti. Během G1 fáze buněčného cyklu je kontrolován stav DNA (Hartwell and Kastan, 1994). Pokud jsou odhaleny defekty, zvýší se hladina tumor supresorového proteinu p53. p53 je zároveň i transkripčním faktorem, pod jehož kontrolou se nachází řada proteinů, které regulují buněčný cyklus. Jedním z nich je i p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1) protein, který se váže na komplex cyklinu s cyklin dependentní kinázou (CDK) a reguluje tak průchod buněčným cyklem, případně může buněčný cyklus i zablokovat (Hartwell and Kastan, 1994; Israels and Israels, 2001).

Dalšími geny pod transkripční regulací p53, jsou *Mdm2* a *Bax*. Jak již bylo zmíněno výše, protein Bax je proapoptotický protein rodiny Bcl-2. V případě závažného poškození DNA je zvýšena exprese Bax a tím i aktivována apoptóza.

Mdm2 je důležitý regulátor, který díky negativní zpětné vazbě ovlivňuje transkripční aktivitu svého vlastního aktivátoru – p53 (Agarwal et al., 1998).

p53 je nezbytný pro správný průběh buněčného cyklu. Gen kódující p53 (*Trp53*) je jedním z nejčastěji mutovaných genů u mnoha druhů lidských rakovin. Dysfunkce p53 vede k deregulaci p21, a takové buňky pak nejsou schopny reagovat na případné poškození DNA (Vermeulen et al., 2003).

1.1.4.2 Detekce apoptózy

Charakteristické změny v průběhu apoptózy se využívají k její detekci. Chromatin je internukleozomálně štěpen na pravidelné (cca 200 párů bazí dlouhé) fragmenty, které po elektroforetické separaci v agarózovém gelu tvoří pravidelné proužky, tzv. žebříček (Batistatou and Greene, 1993; Hikim and Swerdloff, 1999).

Další metodou využívající fragmentaci DNA je TUNEL assay (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling). Enzym terminální deoxynukleotidyl-transferáza (TdT) rozeznává 3'-OH konec DNA a váže na něj digoxigenin-dUTP nebo fluorescein-dUTP (v závislosti na druhu kitu). Vizualizace pak probíhá nepřímo - pomocí protilátky konjugované s peroxidázou a chromogenním substrátem, nebo přímo - pomocí fluorescenční mikroskopie. Tato metoda se nejčastěji používá pro značení buněk na histologických řezech nebo pro průtokovou cytometrii (Billig et al., 1995; Hikim and Swerdloff, 1999; www.promega.com).

Další metoda detekce apoptózy využívá změn v plazmatické membráně. Fosfatidylserin (PS), negativně nabitý fosfolipid, je za normálních okolností v buňkách přítomen v cytosolické části fosfolipidové dvojvrstvy. Během časně fáze apoptózy dochází k jeho translokaci na povrch. Annexin V je Ca^{2+} dependentní protein, který s vysokou afinitou váže fosfatidylserin. Použití fluorescenčně značeného Annexinu V bývá proto často využívanou metodou (Vermes et al., 1995).

Pro přesnost je nutné dodat, že fragmentace DNA a přítomnost fosfatidylserinu na povrchu buněk nejsou znaky unikátní pouze pro apoptózu, ale můžeme je najít také u nekrotických buněk (Vermes et al., 1995; Hikim and Swerdloff, 1999).

1.2 Patologie reprodukce

Zvýšený výskyt neplodnosti v lidské populaci je předmětem vědeckých diskuzí a studií již několik desetiletí. Podle údajů Světové zdravotnické organizace (WHO) trpí problémy s neplodností 15% párů v reprodukčním věku, z toho až v 50% případů je příčinou mužský faktor (Hirsh, 2003; Poongothai et al., 2009), jako důsledek snižující se kvality spermatu. Podle současných údajů je za normospermika považován muž s koncentrací spermií 15 milionů/ml, přičemž ještě v roce 1999 to bylo 20 milionů spermií/ml a před 20 lety 50 milionů spermií/ml. Zároveň se jako standard udává alespoň 4% morfologicky normálních, 60% živých a 40% pohyblivých spermií (Cooper et al., 2010; WHO, 2010). V posledních desetiletích vzrostl i výskyt rakoviny varlat, kryptorchismu (nesestouplých varlat) a hypospadiie (vrozený rozštěp močové trubice). Souhrnně bývají tyto poruchy označovány jako „testicular dysgenesis syndrome“ (TDS) (Sharpe and Skakkebaek, 1993; Skakkebaek et al., 2001).

Příčin stoupajících problémů s neplodností může být celá řada, například stres, vyšší věk rodičů, nezdravý životní styl nebo kouření. Avšak vzhledem k rapidnímu nárůstu neplodnosti v posledních letech se vina přisuzuje i zhoršené kvalitě životního prostředí, kde byl zaznamenán výskyt mnoha různých polutantů a endokrinních disruptorů. Tyto látky mohou pronikat do vody, potravin nebo do ovzduší a mohou se tak stát každodenní součástí života živočichů, včetně člověka. Je tedy důležité prostudovat jejich potenciální rizika pro organismus a případně zavést kroky k jejich eliminaci.

1.2.1 Endokrinní disruptory

Endokrinní disruptory (ED) jsou exogenní látky, které strukturně nebo metabolicky interferují s hormony v organismu, narušují funkci endokrinního systému, a v důsledku toho způsobují různé zdravotní obtíže u daného organismu, nebo u jeho potomků (Damstra et al., 2002). V posledních třiceti letech je těmto látkám věnována velká pozornost, a to zejména z toho důvodu, že je jejich výskytu v prostředí připisována souvislost s nárůstem neplodnosti u lidí. Reprodukční systém

mohou ovlivnit převážně látky s anti-androgenním nebo estrogením účinkem (Crisp et al., 1998).

Anti-androgenní látky se váží na androgenní receptory (AR) a brání tak přirozeným androgenům v jejich účinku. Samčí reprodukční trakt je k negativnímu vlivu anti-androgenů nejnáchylnější během vývoje, kdy je správná funkce androgenů nezbytná pro maskulinizaci (Fisher, 2004). Anti-androgenním endokrinním disruptorem je například fungicid vinklozolin (Anway and Skinner, 2008; Elzeinova et al., 2008).

Estrogení látky v životním prostředí mohou být rozděleny na přírodní rostlinné fytoestrogeny a na xenoestrogeny, které vznikají lidskou činností. Mezi fytoestrogeny můžeme zařadit genistein, který se nachází v sóje, resveratrol přítomný v červeném víně, ale i některé mykotoxiny, jako je např. zearalenon. Mezi xenoestrogeny patří například polychlorované bifenyly, DDT, bisfenol A, ftaláty, nebo diethylstilbestrol. Estrogení ED kompetují s 17 β -estradiolem o vazbu na estrogení receptory (ER) a v mnoha publikacích byl studován jejich negativní vliv na reprodukční systém (Kuiper et al., 1998; Peknicova et al., 2002; Kyselova et al., 2003; Kyselova et al., 2004).

1.2.1.1 Zearalenon

Zearalenon (ZEA, F-2 toxin) je nesteroidní mykotoxin produkovaný plísněmi rodu *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crokwellense*, *F. sambucinum*, *F. equiseti*), které jsou významnými patogeny většiny zemědělských plodin a to v celosvětovém měřítku. Tyto plísně napadají především pšenici, kukuřici, ječmen, oves, rýži, čirok, sezam, ale i seno nebo siláž (Kuiper-Goodman et al., 1987; Placinta et al., 1999). U savců je ZEA metabolizován za vzniku α - a β -zearalenolu (α -ZOL, β -ZOL). Tyto látky mohou být také produkovány plísněmi, ale v mnohem menších koncentracích, než ZEA (Bottalico et al., 1985).

Přestože zearalenon a jeho deriváty nejsou steroidní látky (Obr. 6), mohou se vázat na estrogení receptory (ER- α a ER- β) a vyvolat tak estrogení odpověď. Afinita ZEA k estrogením receptorům je cca 20x nižší než u 17 β -estradiolu (Kuiper-Goodman et al., 1987).

1.2.1.2 Vliv zearalenonu na savce

Vliv zearalenonu na člověka není příliš dobře popsán. Mirocha a spol. (1982) testovali dobrovolníky 6, 12 a 24 hodin po podání jednorázové dávky 100 mg ZEA. Koncentrace zearalenonu, α -zearalenolu a β -zearalenolu v moči byly 3,7 $\mu\text{g/ml}$ ZEA, 3 $\mu\text{g/ml}$ α -ZOL a β -ZOL po šesti hodinách nebyl detekován. Po dvanácti hodinách naměřili v moči 6,9 $\mu\text{g/ml}$ ZEA, 6 $\mu\text{g/ml}$ α -ZOL, a 2,7 $\mu\text{g/ml}$ β -ZOL; a po 24 hodinách detekovali 2,7 $\mu\text{g/ml}$ ZEA, 4 $\mu\text{g/ml}$ α -ZOL a 2 $\mu\text{g/ml}$ β -ZOL (Mirocha et al., 1982).

Oproti tomu byla publikována celá řada studií, které se zaměřují na různá laboratorní nebo chovná zvířata. Obecně lze říci, že specifické projevy závisí na druhu zvířete, dávce ZEA a na životním stádiu zvířete (říje, březost). Zearalenon má poměrně malý efekt po orálním pozření nebo po injekční aplikaci jednorázové dávky. U dlouhodobých studií závisí projevy především na citlivosti zvířete a na použité koncentraci. Prasata a ovce jsou k ZEA citlivější než hlodavci. Takzvaná koncentrace bez pozorovaného efektu (NOEL - no observed effect level) byla u prasat stanovena na 40 $\mu\text{g/kg}$ tělesné váhy na den, oproti tomu u potkanů na 3 mg/kg tělesné váhy na den (Eriksen et al., 2000).

Z chovných zvířat jsou k ZEA nejcitlivější prasata. Koncentrace ZEA běžně přítomné v krmivu mohou samicím způsobit reprodukční obtíže v podobě hyperestrogenace (otok a zarudnutí vulvy, zvětšení dělohy, vyhřeznutí konečníku a pochvy, falešná březost nebo potraty). U dospělých samců nemá ZEA tak zásadní efekt, byla pozorována jen snížená koncentrace testosteronu v krvi (Ruhr et al., 1983). U prepubertálních prasnic byly po expozici maximální koncentrace ZEA a α -ZOL v krvi dokonce 500x vyšší než koncentrace 17β -estradiolu v ovulaci (Olsen et al., 1985).

Zearalenon a jeho deriváty mohou ovlivnit i oocyty a spermie. Při *in vitro* maturaci prasečích oocytů byl popsán negativní vliv α - a β -ZOL (Alm et al., 2002). Životnost, motilita a akrozomální reakce kančích spermií byla negativně ovlivněna během pokusu *in vitro*, efekt byl úměrný dávce a délce působení (Tsakmakidis et al., 2006). Jiný *in vitro* experiment s prasečími spermii prokázal negativní vliv ZEA a α -ZOL v pM koncentracích na stabilitu chromatinu a životnost spermií, a snížení motility spermií po aplikaci β -ZOL v μM koncentracích (Benzoni et al., 2008).

Kromě efektu na reprodukční systém byl popsán i vliv ZEA na hematologické parametry, kdy autoři mimo jiné pozorovali snížené množství krevních destiček

a vyšší koncentraci bilirubinu v krvi, což může být následek toxicity pro játra (Maaroufi et al., 1996). Při dlouhodobém působení velmi vysokých dávek (více než 8 mg/kg tělesné váhy na den) byl u myší zaznamenán výskyt hepatocelulárních adenomů a hypofyzárních tumorů (Eriksen et al., 2000).

2. Cíle

Cílem této práce byla analýza vlivu endokrinního disruptoru zearalenonu (ZEA) na reprodukční trakt, spermatologické parametry a expresi vybraných genů u outbredních myší s dopadem na reprodukci savců.

Konkrétně byl sledován vliv ZEA na:

1. reprodukci myší, počet mláďat a poměr pohlaví mláďat
2. váhu těla, samčí reprodukční orgány a anogenitální vzdálenost
3. funkční stav a spermatologické parametry spermií
4. histopatologii testes u myší
5. kvantitativní genovou expresi vybraných genů buněk testes

3. Materiál a metody

3.1 Roztoky a chemikálie

2x koncentrovaný SDS vzorkový pufr	<ul style="list-style-type: none">• 20% glycerol; 40 ml 10% SDS; 16 ml 1M Tris (pH 6,8); 5 mg bromfenolová modř
4% formaldehyd	<ul style="list-style-type: none">• 4 ml formaldehyd, 96 ml dH₂O
4% SDS-polyakrylamidový gel	<ul style="list-style-type: none">• 2,1 ml dH₂O; 0,5 ml akrylamidový roztok; 0,38 ml Tris (1 M, pH 6,8); 30 µl 10% SDS; 30 µl 10% APS; 3 µl TEMED
12% SDS-polyakrylamidový gel	<ul style="list-style-type: none">• 1,7 ml dH₂O; 2,0 ml akrylamidový roztok; 1,3 ml Tris (1,5 M, pH 8,8); 50 µl 10% SDS; 50 µl APS; 2 µl TEMED
50% ethanol (EtOH)	<ul style="list-style-type: none">• 50 ml 100% EtOH, 50 ml dH₂O
70% ethanol	<ul style="list-style-type: none">• 70 ml 100% EtOH, 30 ml dH₂O
80% ethanol	<ul style="list-style-type: none">• 80 ml 100% EtOH, 20 ml dH₂O
90% ethanol	<ul style="list-style-type: none">• 90 ml 100% EtOH, 10 ml dH₂O
96% ethanol	<ul style="list-style-type: none">• 96 ml 100% EtOH, 4 ml dH₂O
Akrylamidový roztok	<ul style="list-style-type: none">• 14,85 g akrylamid; 0,15 g Bis-akrylamid; doplněno do 50 ml dH₂O
Blokovací roztok	<ul style="list-style-type: none">• 1,5% gelatine from cold water fish skin v PBS-Tween
Blotovací roztok	<ul style="list-style-type: none">• 72 g glycin, 15 g Tris, 1 l methanol, doplněno do 5 l dH₂O
Coomassie Brilliant Blue barvicí roztok	<ul style="list-style-type: none">• 1,25 g Coomassie Brilliant Blue; 35 ml kyselina octová; 250 ml ethanol; 215 ml dH₂O
Elektrodový pufr	<ul style="list-style-type: none">• 30,3 g Tris; 14,4 g glycin; 0,1 g SDS; doplněno do 1 l dH₂O
HEPES pufr	<ul style="list-style-type: none">• 2,3831 g HEPES; 0,5844 g NaCl, 10 g BSA, doplněno do objemu 100 ml dH₂O; pH 7,4 (upraveno pomocí NaOH; HCl)
Odbarvovací roztok	<ul style="list-style-type: none">• 35 ml 100% ethanol, 10 ml kyselina octová, 55 ml dH₂O
PBS (fosfátový pufr)	<ul style="list-style-type: none">• 17,54 g NaCl; 5,52 g Na₂HPO₄·2H₂O; doplněno do 2 l dH₂O; pH 7,4 (upraveno pomocí NaOH; HCl)
PBS-Tween	<ul style="list-style-type: none">• 0,05% Tween 20 v PBS
Roztok eosinu	<ul style="list-style-type: none">• 1 g eosin, 100 ml dH₂O
Roztok hematoxylinu	<ul style="list-style-type: none">• 1 g hematoxylin, 10 ml 100% ethanol
Sušící roztok	<ul style="list-style-type: none">• 5 ml glycerol, 40 ml 100% ethanol, 55 ml dH₂O
TAE pufr	<ul style="list-style-type: none">• 0,5 ml 1M Tris (pH 7,6); 100 µl 0,5 M EDTA (pH 8); 50 ml tkáňové H₂O

3.2 Experiment *in vivo*

Experiment byl proveden na CD1 outbredních myších (AnLab). Pro tuto linii je charakteristická vysoká heterozygotnost a větší počet mláďat ve vrhu (12-13 mláďat). Všechny myši (včetně kontrol) byly chovány za standardních experimentálních podmínek (konstantní teplota, dvanáctihodinový světelný režim, minimum stresových faktorů) v chovném a experimentálním zařízení Ústavu molekulární genetiky, AV ČR, v. v. i. (ÚMG), Praha. Myším bylo podáváno krmivo bez fytoestrogenů (krmivo bez sóji Sniff, Soest), pití bylo zvířatům k dispozici *ad libitum*. Zearalenon (Sigma-Aldrich) byl dvěma experimentálními skupinám (A a B) podáván neinvazivní metodou a to rozpuštěním ve vodě. Koncentrace ZEA v pití byly 150 µg/l pro skupinu A, a 1000x nižší – 0,150 µg/l pro skupinu B (Tabulka 1).

Tabulka 1: Expoziční koncentrace ZEA.

Skupina	ZEA v pití (µg/l)	ZEA (µg/myš/den)	ZEA (µg/tělesné váhy/den)
A	150	0,75	25
B	0,15	0,00075	0,025

ZEA byl zvířatům podáván od prvního dne březosti matek až do 70. dne života mláďat, kdy byly myši usmrceny (tzn. po celý život jedince, včetně prenatální fáze). Náš experiment se zaměřoval pouze na samce. V každé skupině bylo hodnoceno celkem 18 zvířat. Všechny experimenty byly provedeny v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb. a se souhlasem etické komise.

3.3 Vážení těl a orgánů, měření AGD

Po usmrcení byla zvířatům změřena anogenitální vzdálenost (AGD), poté byly myši zváženy a vykřveny. Nakonec byly vypreparovány testes, prostata, semenné vaky a epididymis. Orgány byly očištěny a jednotlivě zváženy na analytických vahách. Váhy byly následně statisticky vyhodnoceny. Ihned po zvážení byla testes zamrazena v tekutém dusíku při teplotě -70°C, a při stejné teplotě i skladována pro další použití. Z epididymis byly po zvážení vyplavovány spermie (viz 3.4).

3.4 Příprava myších spermií

Myší spermie byly získány z vypreparovaných *cauda epididymis*, které byly nastříhány v PBS (37°C, 1 ml na každý vzorek). Spermie se samovolně vyplavovaly do roztoku v CO₂ inkubátoru 15 minut při 37°C. Poté byla buněčná suspenze (bez zbytků tkáně) přenesena do nové zkumavky a doplněna PBS do 1 ml. Takto připravená suspenze byla výchozím materiálem pro všechny další analýzy myších spermií.

3.5 Určení koncentrace spermií

Koncentrace spermií byla počítána v Bürkerově komůrce. Z výše zmíněné suspenze bylo odebráno 10 µl a naředěno 100x. 10 µl zředěné suspenze pak bylo nanášeno do počítací komůrky a počítáno ve světelném mikroskopu (Meopta) při zvětšení 100x.

3.6 Hodnocení morfologie spermií

Buněčná suspenze byla nakapána na podložní skla (10 µl na kapku), zafixována při teplotě 37°C a barvena podle protokolu Spermac Stain morphology kit (Ferti Pro). Hodnoceno bylo minimálně 200 buněk z každého preparátu.

Morfologické změny, týkající se stavu akrozomu spermie, byly také pozorovány na imunofluorescenčních preparátech značených monoklonálními protilátkami HS-14 a HS-8 (viz 3.9).

3.7 Určení životnosti spermií

Životnost spermií byla sledována pomocí kitu LIVE/DEAD Sperm Viability (Invitrogen). Protokol byl pro myší spermie mírně upraven: výše popsaná buněčná suspenze byla nejprve centrifugována 5 min při 200g. 1 µl buněk z pelety byl smíchán s 200 µl HEPES pufru a s 1 µl 50x ředěného SYBR 14 (v HEPES) a směs byla inkubována 5 minut při 37°C v temnu. Následně byla směs centrifugována

5 minut při 200g. Supernatant byl odstraněn a k peletě bylo přidáno 200 μ l HEPES pufru a 1 μ l propidium iodid, směs byla znovu inkubována 5 minut při 37°C v temnu. Následovala centrifugace 5 minut při 200g. Supernatant byl odstraněn, k peletě bylo přidáno 20 μ l PBS a výsledný roztok byl nakapán na podložní skla, která byla usušena ve tmě, opatrně opláchnuta vodou, osušena filtračním papírem a krycí sklíčko bylo upevněno pomocí montovacího média Vectashield s DAPI (Vector Laboratories). Buňky byly hodnoceny fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E400, objektiv Plan Apo VC 60x oil. Zeleně byly značeny buňky živé a červeně buňky mrtvé.

3.8 Detekce annexinu V na spermích

Detekce apoptotického markeru annexinu V na spermích byla provedena pomocí kitu Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit (Sigma-Aldrich). Protokol byl pro potřebu naší laboratoře upraven. Bylo smícháno 100 μ l 1x koncentrovaného vazebného pufru, 1 μ l roztoku Annexinu V a 1 μ l buněčné suspenze a směs byla inkubována v temnu 15 minut při pokojové teplotě. Poté byla směs resuspendována a nakapána po 10 μ l na podložní skla, která se nechala zaschnout v temnu při 37°C. DNA byla barvena pomocí montovacího média Vectashield s DAPI. Preparáty byly překryty krycím sklíčkem a hodnoceny fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E400, objektiv Plan Apo VC 60x oil. Mikroskopické fotografie byly pořízeny CCD kamerou VDS1300 (Vosskühler) a zpracovány pomocí softwaru NIS Elements AR (Laboratory Imaging).

3.9 Nepřímá imunofluorescence

Monoklonální protilátky HS-14 a HS-8 byly použity pro hodnocení stavu akrozomů. Tyto protilátky proti intra-akrozomálním proteinům byly připraveny v naší laboratoři (Peknicova et al., 2002; 2005)

Mikroskopické preparáty byly připraveny podle protokolu popsáném v publikaci Peknicova et al. (2005), s modifikací inkubace: preparáty byly s primární protilátkou (HS-14 a HS-8) inkubovány ve vlhké komůrce přes noc při 4°C, a se sekundární

protilátkou (Goat-Anti-Mouse IgM conjugated FITC, Sigma-Aldrich) inkubovány ve vlhké komůrce 60 min při 37°C. Nakonec byly preparáty zakápnuty montovacím médiem Vectashield s DAPI, překryty krycím sklíčkem a hodnoceny fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E400, objektiv Plan Apo VC 60x oil. Mikroskopické fotografie byly pořízeny CCD kamerou VDS1300 (Vosskühler) a zpracovány pomocí softwaru NIS Elements AR (Laboratory Imaging).

3.10 Izolace proteinů a SDS extrakce

Suspenze spermií byla centrifugována 5 minut při 200g a supernatant byl odstraněn. Peleta byla resuspendována v SDS extrakčním pufru (100 μ l pufru na 100×10^6 spermií). Vzorky byly následně inkubovány po dobu 3 minut při teplotě 99°C v Mixing Block (Bioer). Ihned poté byly vzorky zchlazeny na ledu a následně centrifugovány po dobu 5 minut při 23100 g a 4°C. Supernatant byl rozdělen do mikrozkušavek a skladován při -20°C.

3.11 Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí Quant-iT protein assay kitu (Invitrogen) na přístroji Qubit Fluorometer (Invitrogen). Před měřením byl přístroj kalibrován pomocí standardů obsažených v kitu. Z každého vzorku byl pro měření odebrán 1 μ l a smíchán s 199 μ l pracovního roztoku pufru (Quant-iT protein reagent 200x ředěný pufr). Směs byla před měřením dobře promíchána a inkubována 15 minut v temnu. Získané hodnoty byly přístrojem automaticky přepočítány na mg/ml.

3.12 Elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu

Pro separaci proteinů byla použita vertikální elektroforéza Mini-Protean 4 (BioRad) a 12% SDS-polyakrylamidový gel. Gel byl po nalití mezi skla převrstven vodou proti vysychání. Polymerace gelu trvala cca 30 minut. Poté byl připraven tzv. zaostřovací 4% SDS-polyakrylamidový gel. Voda byla odsáta a mezi skla byl

umístěn hřebínek pro vytvoření nanášecích jamek, který byl následně zalit zaostřovacím gelem.

Do jedné jamky bylo nanášeno celkové množství 10 µg proteinu. Vzorky byly před nanesením na gel smíchány s 2x koncentrovaným SDS vzorkovým pufrům a s β-merkptoethanolem (finální koncentrace 5%) a inkubovány při 97°C 3 minuty. Následně byly vzorky centrifugovány 5 minut při 150 g a 4°C. Takto připravené vzorky byly nanášeny do jednotlivých jamek v gelu. Jako marker molekulové hmotnosti byly použity proteinové standardy All Blue nebo Dual Color (Bio-Rad).

Elektroforéza probíhala v elektrodoovém pufru při konstantním elektrickém proudu 16 mA (na jeden gel). Po ukončení elektroforetické separace proteinů byly gely barveny roztokem Coomassie Brilliant Blue nebo byly použity k přenosu proteinů na membránu (Western Blot).

3.13 Barvení gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue

Po dokončení elektroforetické separace byly gely krátce propláchnuty v deionizované vodě a barveny 1 hodinu v barvicím roztoku Coomassie Brilliant Blue. Poté byly gely přemístěny do odbarvovacího roztoku a odbarvovány tak dlouho, dokud nebylo pozadí čiré a proteinové proužky dobře rozpoznatelné. Po odbarvení byly gely promývány 30 minut v sušícím roztoku a nakonec usušeny mezi dvěma listy celofánu.

3.14 Přenos proteinů na PVDF membránu (Western Blot)

Akrylamidové gely byly po propláchnutí v deionizované vodě ekvilibrovány 15 minut v blotovacím pufru. Mezitím byly PVDF membrány o velikosti pórů 0,45 µm (Immobilon-P, Millipore) smočeny ve 100% methanolu a následně také ekvilibrovány v blotovacím pufru. Poté byly tři listy chromatografického papíru Whatman 3MM (GE Healthcare) smočeny v blotovacím pufru a navrstveny na sebe. Na ně byla položena PVDF membrána, na ní gel a nahoru znovu tři vrstvy smočeného chromatografického papíru. Takto sestavená souprava byla umístěna do blotovacího

přístroje Mini-transblot (Bio-Rad). Přenos proteinů z gelu na membránu probíhal v blotovacím pufru za konstantního proudu 500 mA a teploty 4°C po dobu 90 minut.

3.15 Imunodetekce

Po přenesení proteinů byly membrány vyjmuty a promyty v roztoku PBS-Tween. Poté byly přes noc inkubovány v blokovacím roztoku při 4°C pro vyvázání nespecifických vazebných míst. Jako primární protilátky byly použity: protilátka HS-14 proti intra-akrozomálním proteinům (připravena v naší laboratoři, viz 3.9, supernatant 5x ředěný) a protilátka TU-12 proti β -tubulinu (získaná z Laboratoře biologie cytoskeletu, ÚMG, Praha; ascites ředěný 4000x). Membrány byly s primárními protilátkami inkubovány za současného třepání 1 hodinu při pokojové teplotě. Po inkubaci byly membrány promyty v roztoku PBS-Tween 6x 10 minut. Jako sekundární protilátka byla použita 3000x ředěná Blotting Grade Affinity Purified Goat anti-Mouse IgG (+L) Horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad) a membrány s ní byly inkubovány 60 minut při pokojové teplotě a následně opět promyty 6x 10 minut v PBS-Tween.

K vizualizaci značených míst na membránách byly použity dvě různé metody – buď expozice rentgenografického filmu nebo chemická reakce se vznikem barviva. Při použití první metody byly membrány po promytí inkubovány 3 minuty s chemiluminiscenčním substrátem SuperSignal West Pico (Pierce). Po odsátí substrátu byly v temné komoře k membránám přikládány rentgenografické filmy Medix XBU (Foma Bohemia). Expozice probíhala v různých časech. Filmy pak byly vyvolány za použití chemikálií Eastman Kodak (Sigma).

Pro detekci značných míst přímo na membráně byl roztok TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Liquid Substrate System for Membranes, Sigma) nakapán na membránu, a po vybarvení byla reakce zastavena ponořením membrány do destilované vody.

Kvantifikace výsledků imunodetekce byla provedena v programu AIDA (Advanced Image Data Analyzer, Raytest). Experimentální skupiny A a B byly vždy porovnávány s kontrolou (100%) a pozadím (0%)

3.16 Příprava histologických řezů

Testes byla nejprve fixována 48 hodin ve 4% formaldehydu. Poté byla tkáň promyta 15 minut v destilované vodě a následně odvodněna stoupající koncentrační řadou ethanolu (EtOH): 60 minut v 70% EtOH, 60 minut v 80% EtOH a 60 minut v 96% EtOH. Následně byla odvodněná tkáň ponořena na 30 minut do směsi acetonu a xylenu (1:1), a pak na 30 minut do xylenu. Nakonec byla testes zalita do parafinu (Paraplast, Sigma-Aldrich). Takto připravené parafínové bločky pak byly řezány mikrotomem na řezy o tloušťce 15-20 μm a jednotlivé řezy byly nanесeny na vytemperované podložní sklíčko.

Před dalším použitím byly řezy odparafínovány a zavodněny. Nejprve byla skla inkubována třikrát 10 minut v xylenu a poté pokaždé 5 minut v 96%, 90%, 80%, 70%, 50% EtOH a v destilované vodě.

3.17 Barvení hematoxylinem a eosinem

Rehydratované řezy byly barveny 10 minut v roztoku hematoxylinu a poté 5 minut v roztoku eosinu. Vzorky byly zality Kanadským balzámem a hodnoceny světelným mikroskopem Olympus BX41 při zvětšení 400x. Snímky byly fotografovány kamerou Olympus IX81 při zvětšení 200x.

3.18 TUNEL analýza na histologických řezech

Pro detekci apoptotických buněk na řezech testes byla použita TUNEL analýza (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) podle protokolu DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega Corporation, G3250).

Vzorky byly hodnoceny fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E400, objektiv 40x Nikon Plan 40/0.65. Mikroskopické fotografie byly pořízeny CCD kamerou VDS1300 (Vosskühler) a zpracovány softwarem NIS Elements AR (Laboratory Imaging).

Metoda TUNEL fluorescenčně značí fragmentovanou DNA buněk, u nichž probíhá apoptóza. Počítány byly pozitivně značené buňky v deseti semenotvorných kanálcích, z každé skupiny bylo hodnoceno 6 řezů.

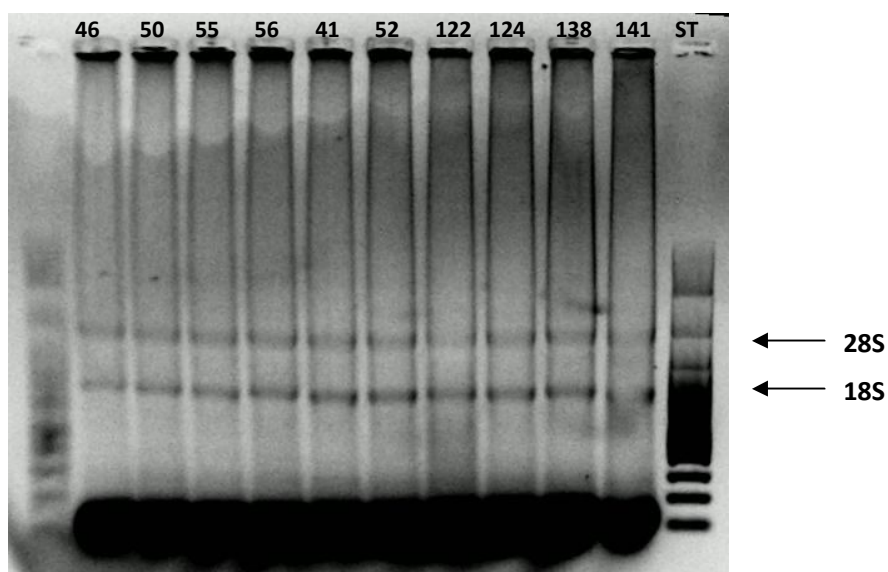
3.19 Izolace RNA

RNA z testes byla izolována za použití kitu TRI Reagent (Sigma-Aldrich, T9424). Tkáň byla homogenizována třikrát 20 s v homogenizátoru Precellys 24 (Bertin Technologies). Nakonec byla RNA peleta (podle velikosti) rozpuštěna ve 70-100 μ l vody bez RNáz (RNase free water, Fermentas). Všechna práce s RNA byla prováděna v PCR boxu za sterilních podmínek a RNA byla skladována v -70°C .

3.20 Agarózová elektroforéza

Čistota RNA byla nejprve zkontrolována pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu, který byl připraven rozpuštěním 1 g agarózy ve 100 ml zahřátého TAE pufru. Před nalitím do formy, ale až po zchlazení alespoň na 60°C , byl v tekuté směsi rozmíchán 1 μ l GelRed (Biotium, 41003). Hotový gel byl zalit vychlazeným TAE puftrem. Do jednotlivých jamek bylo nanášeno 8,5 μ l RNA smíchané s 5 μ l Loading dye (Fermentas). Elektroforéza probíhala při 70 V na přístroji Bio-RAD PowerPac Basic. Gel byl následně vyfotografován pod UV zářením na přístroji MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems).

Na agarózové elektroforéze by v ideálním případě měly být vidět pouze dva pruhy v každé dráze. Tyto pruhy představují 28S a 18S ribozomální RNA (Obr. 7). Přítomnost dalšího pruhu by znamenala kontaminaci DNA. Degradovaná RNA se pozná podle nezřetelných pruhů.

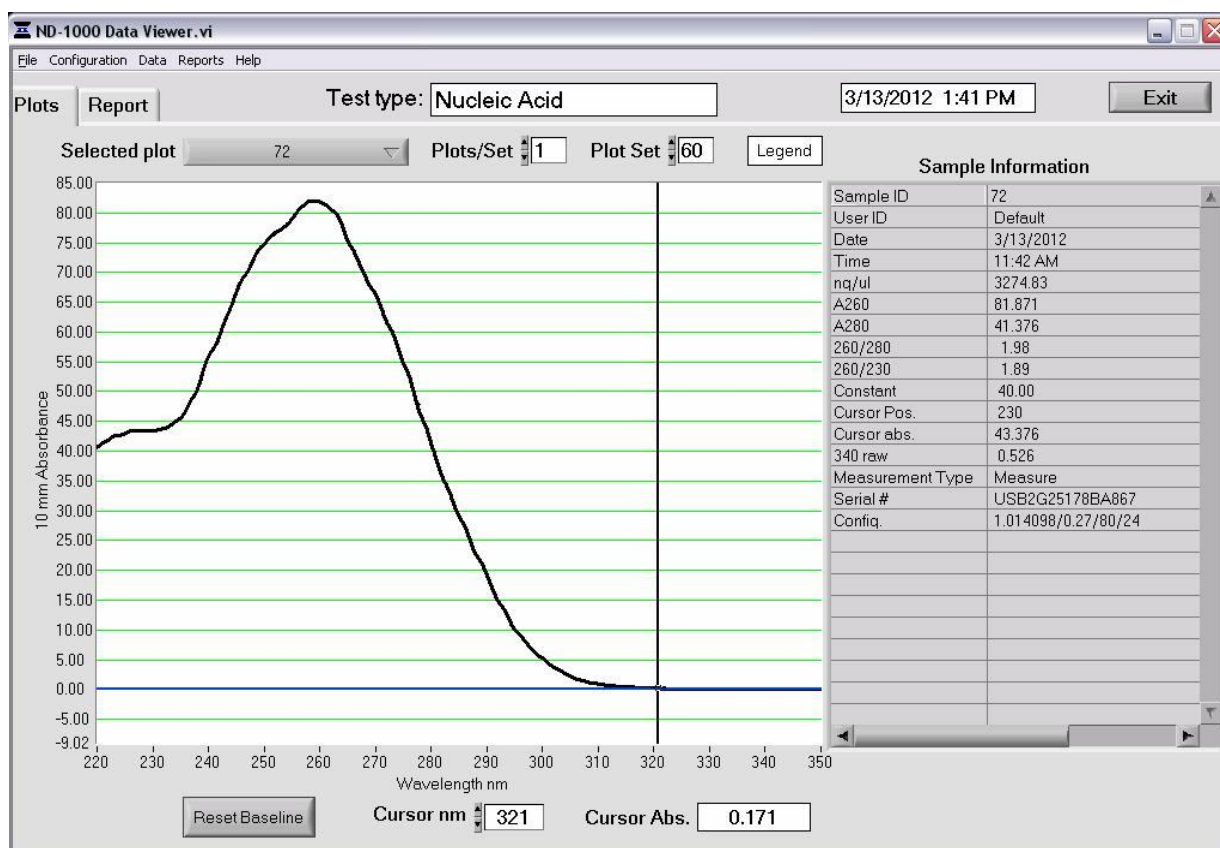


Obr. 7: Fotografie RNA v agarózovém gelu.

3.21 Měření koncentrace a čistoty RNA

Koncentrace RNA byla měřena na NanoDrop-1000 spektrofotometru (Thermo Scientific). RNase free water (Fermentas) byla použita jako blank. Absorbance byla měřena při 230, 260 a 280 nm (Obr. 8). Poměr absorbance A_{260}/A_{280} určuje čistotu RNA ve vzorku, která by ideálně měla být ~2,0. Nižší hodnota pak značí kontaminaci proteiny. Dále byl měřen poměr absorbance A_{260}/A_{230} určující případnou kontaminaci fenolem nebo dalšími chemikáliemi použitými při izolaci RNA (Technical note: RNA quality control, www.sabiosciences.com). Do dalších experimentů nebyly zahrnuty vzorky s poměrem A_{260}/A_{280} nebo A_{260}/A_{230} nižším než 1,8.

Některé vzorky byly ještě sekundárně přečištěny: bylo k nim přidáno 600 μ l isopropanolu a inkubovány 10 minut při pokojové teplotě. Následně byly centrifugovány 15 minut při 14000 rpm v centrifuze vychlazené na 4°C. Vzniklá peleta byla promyta v 75% EtOH a znovu centrifugována 10 minut při 8000 rpm a 4°C. Na závěr byla peleta rozpuštěna ve 30 μ l RNase free water (Fermentas).



Obr 8: Příklad analýzy RNA na NanoDrop-1000 spektrofotometru.

3.22 Reverzní transkripce

Před samotnou syntézou cDNA byla nejprve ze vzorků odstraněna případná DNA. 5 µg RNA bylo smícháno s 1 µl DNázy (Invitrogen), 1 µl reakčního pufru pro DNázu I (Fermentas) a objem byl doplněn do 10 µl RNase free vody (Fermentas). Reakční směs byla přemístěna do termocycleru (Techne Touchgene Gradient PCR Thermal Cycler, Labrecyclers), kde byla inkubována 30 minut při 37°C. Poté byl přidán 1 µl EDTA (Fermentas) a směs byla inkubována 10 minut při 65°C. EDTA se využívá k chelataci RNA, pro zvýšení její stability při zahřívání.

Následně bylo ke každému vzorku přidáno 8 µl reakčního pufru pro M-MuLV reverzní transkriptázu, 4 µl 10nM 4 dNTP směsi, 0,3 µl inhibitoru RiboLock, 1 µl oligo(dT) s náhodnými primery, 0,5 µl M-MuLV reverzní transkriptázy a 16,2 µl RNase free vody (vše Fermentas). Reakce probíhala ve výše zmíněném termocycleru 60 minut při 42°C, 10 minut při 70°C a nakonec byla ukončena zchlazením na 4°C. Získaná cDNA byla poté skladována při -20°C.

3.23 Real Time PCR – testování primerů

Před samotnou analýzou genové exprese vzorků jsme zkontrolovali funkčnost, specifitu a efektivitu primerů pro cDNA (PCR produkt 1000x ředěný) v koncentrační řadě – ředěno 10x, 100x, 1000x, 10 000x a 100 000x. K 5 µl cDNA požadované koncentrace byl přidán 1 µl primer mixu (směs 0,5 µl reverse primer + 0,5 µl forward primer), 10 µl SYBR Green (Fermentas) a 4 µl vody. Seznam použitých primerů je uveden v Tabulce 2. Všechny reakce byly provedeny v tripletech v termocycleru (Bio-Rad CFX384 Real Time PCR Instrument) podle protokolu v Tabulce 4. U všech primerů byl před dalším použitím zkontrolován průběh amplifikace a křivka tání (Obr. 9 a 10 viz níže).

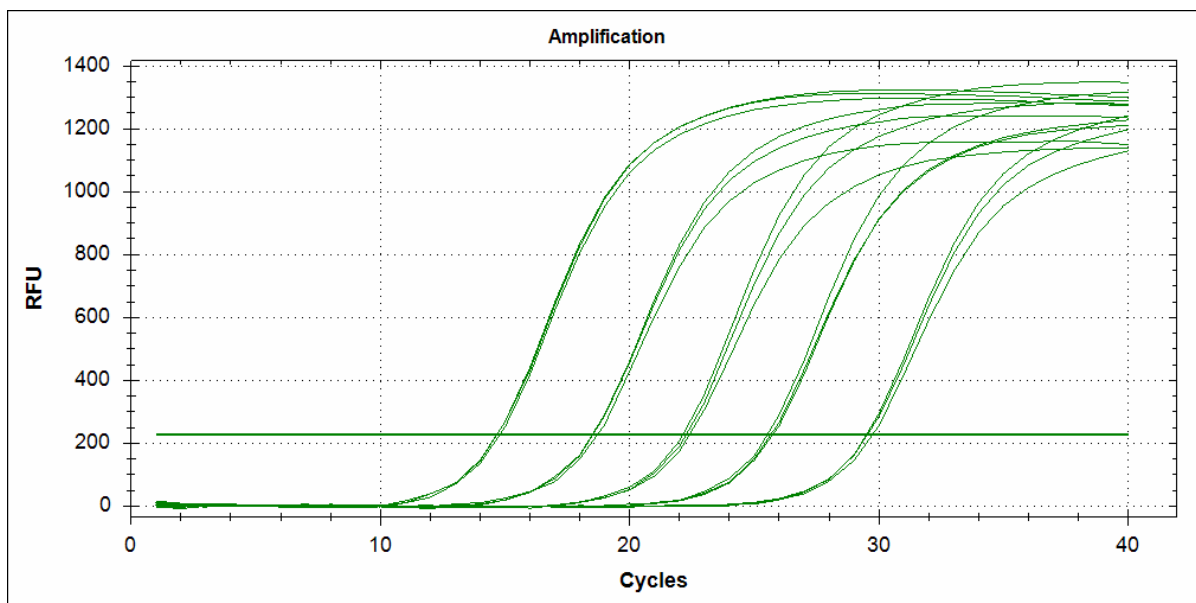
Tabulka 2: Nukleotidové sekvence jednotlivých primerů a velikosti PCR produktů.

Gen	sekvence 5'-3'	velikost produktu (bp)
Actb	CGGTTCCGATGCCCTGAGGCTCTT	100
	CGTCACACTTCATGATGGAATTGA	
Anapc11	TGGAATGGTGTGGCCACTTGGC	114
	GGGGCAGTCATCACCAGGCAC	
Ar	CCGGACCTTATGGGGACATGCG	143
	GCTGCCACAAGTGAGAGCTCCG	
Bcl-2	CAGGGAGATGTCACCCCTGGTGG	104
	AGGCATCCCAGCCTCCGTTATCC	
Ccna1	TTGCAGCTTGTCGGGACAGCA	80
	ACAAACTCATCCACGTCGGGCG	
Ccnd1	ACCTGGGCAGCCCAACAAC	139
	GCCTGGCGCAGGCTTGACTC	
Crem	GCCTCACCAGGAAGCCTGCAC	115
	TCTTCTTCTGCGACACTCCCG	
Ctsd	GACTCCCGGCGTCTTGCTGC	119
	AGCCGCCACCTCCGTCATA	
Dnmt1	AGCAAGTCGGACAGTGACACCCTTT	149
	GCCGAGTTCCCCTCTTCCGACT	
Eps8	CCACTGCGGAGGAACGGAAGC	114
	CGTTGCGGAACCTCGGGACG	
Fkbp5	GTTCGCAGAGCGGGACGCAA	142
	CTCCGTGGCGCAGCGTCATA	
Fshr	GGAGCCTCTGGGCCAGTCGT	108
	GCGGTATGTTGACCTGGCCCTC	
Grth	TACTTTGGGGAGGCGACGCC	85
	AGGTTCTTCTGGGGTGGACGA	
Igfbp4	CGCCTCACAGAGCCGTACCC	122
	AGCACTGCCACGCTGTCCG	
Igfbp5	CGCGGGTTTGCCTCAACGA	128
	GGCCGGAAGACCTTGGGGGA	
Itgb1bp1	GCCGCTGGACCATCCCACAC	111
	GCTCGATCCAGAGAAGATGCCGC	
Kdm4a	GCAAGCTCCCACGCCACCAC	81
	CCTCGGGGGTCAGCTGCTCA	
Mas1	CCGAGACTGCCCCAAGCCTCT	108
	TGCCCTGGGTCACTTCAGGTCAT	
Meig1	TCTGCACTGAGTCTGGTCGTCGA	144
	TCCTTGACCATTTCTTGGCACGA	
p21	CCGCCGCGGTGTCAGAGTCTA	120
	CTGTGCGGAACAGGTCCGAC	

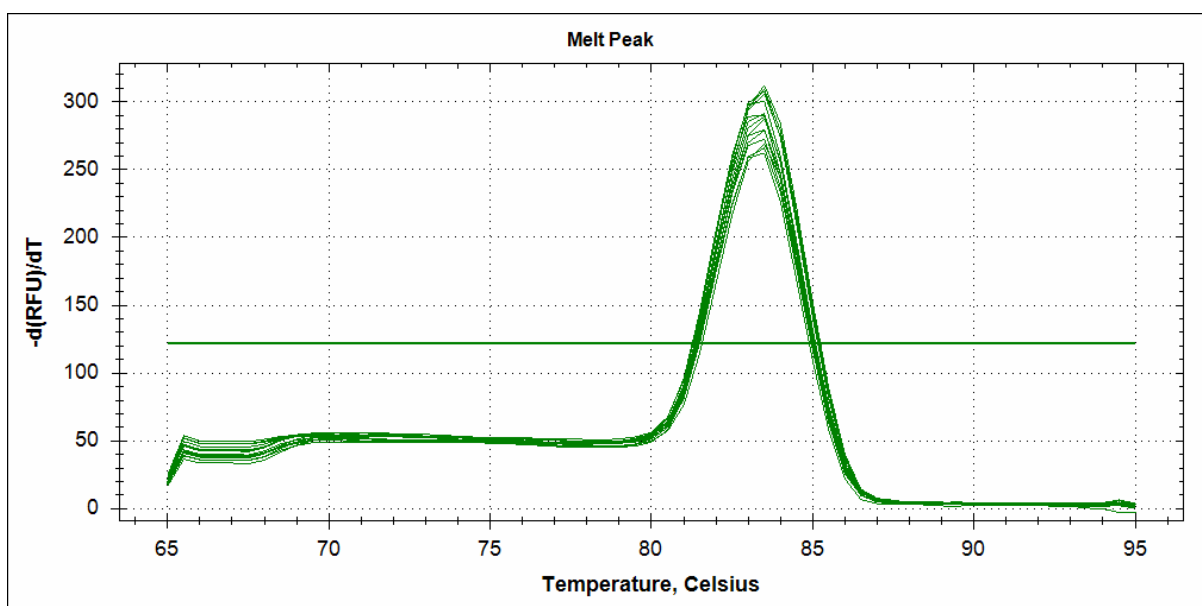
p53	ATGGCTCCACCTGGGCTTCCTG	119
	CCACAACCTGCACAGGGCACGT	
Prm1	ACAGGTTGGCTGGCTCGACC	90
	CGGCAGCATCGGTATCTGGCC	
Sox9	GCTGGAAGTCGGAGAGCCGAGA	137
	AGAGAACGAAACCGGGGCCAC	
Sycp1	GCCCATGCTCGAACAGGTTGC	98
	ACAGTCTGCTCATTGGCTCTGAA	
Sycp3	GGACAGCGACAGCTCACCGG	90
	GGTGGCTTCCCAGATTTCCCAGA	
Tff1	TGTCCGGGGATTCCCGTGGT	131
	CCAGTGCCAGGTGGAGGGT	
Tnp1	CCGAGCTCCTCACAAGGGCGT	140
	CAGGGCAGAGCTCATTGCCGC	
Tnp2	CCTGCAAGACCCAGCCACCG	94
	GTTCCGCCTCCTGACGGCC	
Vegfa	TGCTCTTTGGGTGCACTGGAC	147
	GACGGCAGTAGCTTCGCTGGT	
Wt1	GGCGCTTTGAGGGGTCCGAC	205
	AAAGTGGGCGGAGCACCGAC	

Tabulka 3: Jednotlivé kroky Real Time PCR.

Krok	Teplota °C	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	10 min	1
Denaturace	95	15 s	40
Přisednutí primerů	60	30 s	
Syntéza DNA	72	30 s	



Obr. 9: Průběh Real Time PCR (RFU = Relative Fluorescence Unit)



Obr. 10: Křivka tání. $-d(\text{RFU})/dT$ = změna negativní hodnoty RFU v závislosti na teplotě.

3.24 Analýza genové exprese - Real Time PCR

Analýza genové exprese byla provedena na přístroji BioMark System (Fluidigm) v Laboratoři genové exprese, Biotechnologického ústavu, AV ČR v. v. i., Praha. Tento přístroj umožňuje vysoce výkonné provedení Real Time PCR na čipu pro 48 vzorků x 48 primerů. Výhodou této metody je průběh všech reakcí ve stejném čase a za identických podmínek.

3.24.1 Preamplifikace

Před nanesením na čip byla v 96-jamkové destičce provedena genově specifická preamplifikace vzorků. 2 μl cDNA (koncentrace 10 ng/ μl) byly smíchány s 1,2 μl preamplifikačního primer mixu (1,5 μl od každého primeru - koncentrace 10 μM), 5 μl iQ supermixu (Bio-Rad, 170-8864) a 1,8 μl vody. Jednotlivé primery jsou uvedeny v Tabulce 2. Preamplifikace probíhala podle kroků popsaných v Tabulce 4. Po ukončení preamplifikace byla destička umístěna na led a výsledná cDNA byla 10x naředěna vodou.

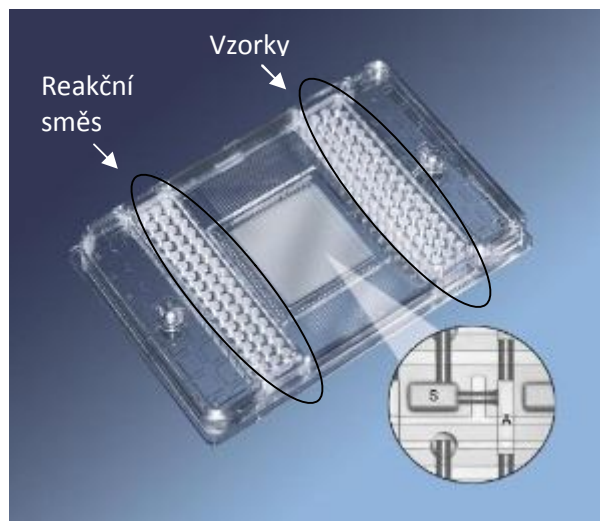
Tabulka 4: Jednotlivé kroky preamplifikace.

Teplota °C	Čas	Počet cyklů
95	10 min	1
95	15 s	18
59	4 min	

3.24.2 BioMark System

Po preamplifikaci byla připravena tzv. vzorková a reakční směs. Vzorková směs vznikla smícháním 1 μl zředěné cDNA, 2,5 μl Universal Master Mix II (TaqMan, 4440040), 0,25 μl 20x GE sample loading reagent (Fluidigm, 85000746) a 1,25 μl vody. Reakční směs byla složena z 2,5 μl primeru a z 2,5 μl 2x GE assay loading reagent (Fluidigm, 85000736).

5 μl od každé vzorkové reakční směsi a 5 μl od každé reakční směsi bylo napipetováno do příslušných otvorů na čipu (Obr. 11). Čip byl vložen do IFC Controller (Fluidigm), kde došlo k automatickému smíchání obou směsí. Poté byl čip umístěn do přístroje BioMark Reader (Fluidigm), kde byla provedena kvantitativní Real Time PCR reakce podle protokolu popsaném v Tabulce 5.



Obr. 11: Fotografie čipu pro 48 vzorků a 48 primerů. V pravé části jsou znázorněny otvory, do kterých se pipetuje vzorková směs, v levé části pak otvory pro reakční směs. Uprostřed se nachází síť mikrokanálek a komůrek, ve kterých dochází ke smíchání vzorků (S) a primerů (A) a následně zde probíhá PCR reakce. (Zdroj www.businesswire.com; upraveno)

Tabulka 5: Jednotlivé kroky kvantitativní Real Time PCR reakce.

Teplota °C	Čas	Počet cyklů
95	10 min	1
95	15 s	40
60	1 min	

Data byla shromážděna pomocí BioMark Data Collection Software 3.1.2 a analyzována prostřednictvím BioMark Real-Time PCR Analysis Software 3.1.3., kde byly překontrolovány amplifikační křivky a získány hodnoty tzv. prahové hodnoty cyklu (cycle threshold - CT).

Následně byla získaná data vyhodnocena za použití programu GenEx 5.3.7 (MultiD Analyses AB). Genová exprese byla vždy porovnávána s expresí referenčního genu *Actb*, kódujícím beta aktin, jehož exprese je v buňkách testes neměnná (Radonic et al., 2004). Ze získaných hodnot CT bylo vypočítáno relativní množství mRNA pro každý vzorek. Hodnota exprese daného genu u kontrolní skupiny byla vždy stanovena jako 100%. Výsledky měření u skupiny A a B pak byly porovnávány s kontrolou.

3.25 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí programu STATISTICA 7.0 (Statsoft). Počet potomků v první generaci byl analyzován Mann-Whitney U-testem. Váha těla a orgánů byla srovnávána metodou analýzy rozptylu (ANOVA), post hoc analýza byla provedena za použití Newman-Keuls testu. Váha jednotlivých orgánů byla srovnávána metodou analýzy kovariance (ANCOVA) a jako kovariát byla použita váha těla. Data z analýzy spermií a metody TUNEL byla analyzována pomocí testu Kruskal-Wallis ANOVA, post hoc analýza byla provedena pomocí MCMR.

Statistická analýza genové exprese byla provedena v programu GenEx 5.3.7 (MultiD Analyses AB) metodou One-way ANOVA, post hoc analýza byla provedena za použití Dunnett testu. Analýza hlavních komponent (Principal component analysis – PCA) byla použita k porovnání dat získaných z analýzy genové exprese.

Hodnota P menší než 0,05 byla označena za statisticky signifikantní. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

4. Výsledky

Do *in vivo* experimentu byly zahrnuty tři skupiny myší. Zearalenonem ovlivněné skupiny A (150 µg/l ZEA), B (0,15 µg/l ZEA) a kontrolní skupina K (bez ovlivnění).

4.1 Počet mláďat a poměr pohlaví

U všech myší byl sledován průměrný počet mláďat na jednu matku a zastoupení pohlaví mláďat ve vrhu. Počet mláďat ani poměr pohlaví však nebyl u ovlivněných skupin signifikantně změněn (Tabulka 6).

Tabulka 6: Vliv ZEA na průměrný počet mláďat na samici, celkový počet narozených samců a samic ve skupině, poměr samců a samic přepočítaný na 100 jedinců.

Skupina	počet matek	prům. máďat	♂	♀	poměr ♂/♀
K	10	12,80 ± 2,35	61	67	48/52
A (150 µg/l)	7	13,14 ± 2,23	48	44	52/48
B (0,15 µg/l)	9	13,11 ± 0,99	62	56	53/47

4.2 Váha těla a orgánů

Studovali jsme vliv ZEA na váhu těla a reprodukčních orgánů. Výsledky měření anogenitální vzdálenosti (AGD) a váhy těla, testes, prostaty, semenných vaků a epididymis jsou zaznamenány v Tabulce 7. Žádný z pozorovaných parametrů nebyl oproti kontrolám signifikantně změněn.

Tabulka 7: Vliv ZEA na anogenitální vzdálenost, váhu těla a samčích reprodukčních orgánů. Mean±SD. N=18.

Skupina	AGD (cm)	Váha těla (g)	Testes (mg)	Prostata (mg)	Semenné vaky (mg)	Epididymis (mg)
K	1.57±0.15	35.10±2.53	0.261±0.030	0.159±0.030	0.310±0.052	0.088±0.010
A	1.53±0.12	33.81±4.30	0.239±0.022	0.156±0.036	0.291±0.066	0.084±0.006
B	1.48±0.07	34.63±2.36	0.248±0.023	0.151±0.036	0.309±0.041	0.087±0.007

4.3 Spermatologické parametry

Kromě váhy samčích reprodukčních orgánů byl sledován i funkční stav spermií (Tabulka 8, Obr. 12). Zajímala nás především koncentrace, morfologie a viabilita spermií, a také integrita akrozomů.

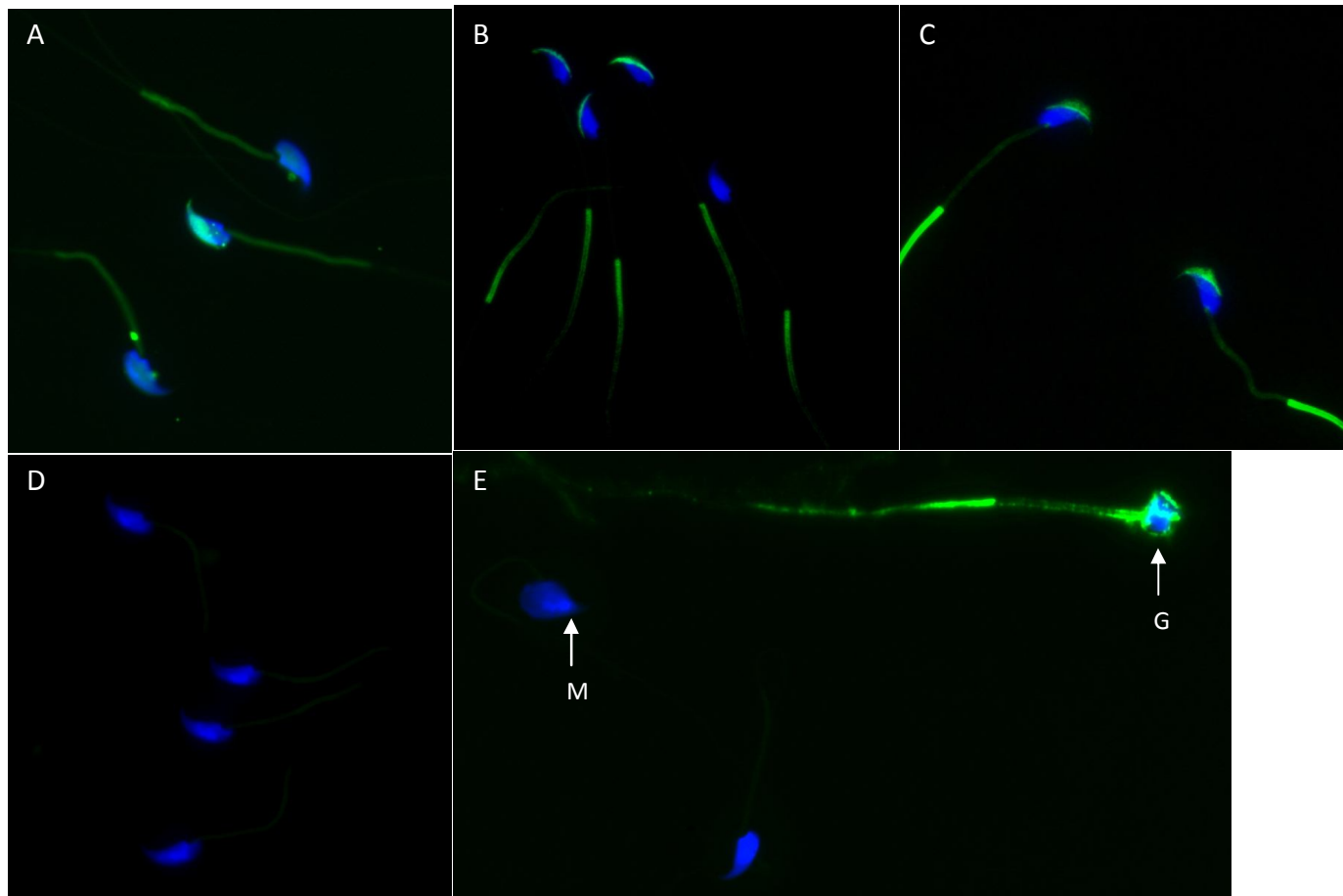
U skupiny B (nižší koncentrace ZEA) bylo pozorováno snížení počtu a zhoršení morfologie spermií. Hodnocené parametry nebyly u skupiny A oproti kontrole signifikantně změněny. Životnost spermií nebyla ovlivněna u žádné experimentální skupiny.

Procento apoptotických spermií značených Annexinem V bylo zvýšeno u skupiny A i B, přičemž nižší koncentrace ZEA měla na myši spermie větší proapoptotický vliv – u skupiny B bylo oproti kontrole pozorováno navýšení o cca 23%, u skupiny A jen o 9%.

Monoklonální protilátky proti intra-akrozomálním proteinům, HS-14 a HS-8, byly použity pro hodnocení stavu akrozomů, obsahujících proteiny důležité pro vazbu spermie na vajíčko (Peknicova et al., 2002). Obě tyto protilátky u myši značí proteiny v akrozomu a v principal piece bičíku (hodnoceny byly proteiny v akrozomu). U obou experimentálních skupin byl pozorován zvýšený počet HS-14 pozitivních akrozomů, a to o cca 4,5%. Celková hodnota byla velmi podobná u skupiny A i B. K signifikantnímu snížení počtu akrozomů vážících protilátku HS-8 došlo pouze u skupiny A (vyšší koncentrace ZEA), a to zhruba o 4%.

Tabulka 8: Vliv ZEA na spermatologické parametry. Annexin V byl použit pro detekci apoptotických buněk. Protilátky HS-14 a HS-8 značí intra-akrozomální proteiny a byly použity k hodnocení stavu hlaviček spermií a akrozomů. Mean \pm SD. N=200. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

Skupina	Koncentrace spermií (*10 ⁶ /ml)	Morfologie spermií (% normálních buněk)	Životnost spermií (% živých buněk)	Annexin V (% pozitivních buněk)	HS-14 (% pozitivních akrozomů)	HS-8 (% pozitivních akrozomů)
K	38.7 \pm 9.35	93.60 \pm 1.60	91.00 \pm 1.41	61.00 \pm 2.45	72.10 \pm 1.96	82.00 \pm 2,33
A	29.90 \pm 11.71	91.25 \pm 3.02	89.80 \pm 1.17	70.50\pm2.26***	76.60\pm3.58**	78.70\pm2.67**
B	23.80\pm9.75*	91.20\pm1.93*	89.40 \pm 1.34	84.00\pm3.16***	76.40\pm3.98**	83.20 \pm 2.49



Obr. 12: Mikroskopické snímky myších spermií značené různými protilátkami (zeleně) a jádro značeno DAPI (modře); spermie značené: A) Annexin V, B) HS-14, C) HS-8; D) negativní kontrola, E) defekty spermií: M - makrocefalie, G – globozoospermie.

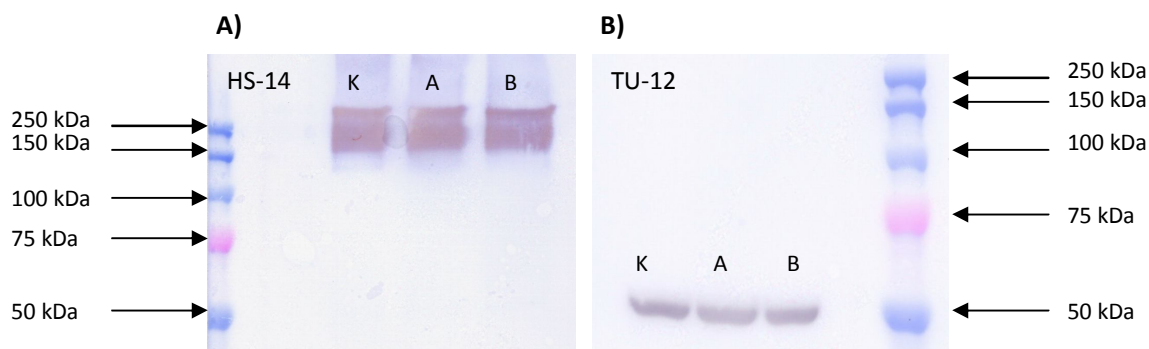
4.4 Imunodetekce

Monoklonální protilátka HS-14 byla kromě imunofluorescenčních mikroskopických preparátů aplikována také pro imunodetekci proteinů extrahovaných z myších spermií. Protilátka proti β -tubulinu TU-12 zde byla použita jako kontrola (Obr. 13) a kvantifikace pak byla provedena v programu AIDA.

Sledovali jsme, zda budou výsledky ze subjektivního počítání buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu odpovídat objektivnější metodě – imunodetekci kvantifikované prostřednictvím softwaru v PC.

Pomocí protilátky HS-14 jsme na membráně detekovali více proteinů o molekulové hmotnosti mezi cca 150 a 300 kDa. Intenzita signálu se mezi skupinami lišila minimálně. Protilátka TU-12 značila vždy jen jeden protein o přibližné molekulární hmotnosti 50 kDa.

Po provedení kvantifikace a normalizace jsme detekovali ve skupině A pokles o 7% a naopak ve skupině B nárůst o 13% oproti kontrole (Tabulka 9). Pro srovnání - analýza imunofluorescenčních preparátů se stejnou protilátkou prokázala u skupiny A i B zvýšení počtu pozitivních akrozomů, a to o cca 4,5% (Tabulka 8).



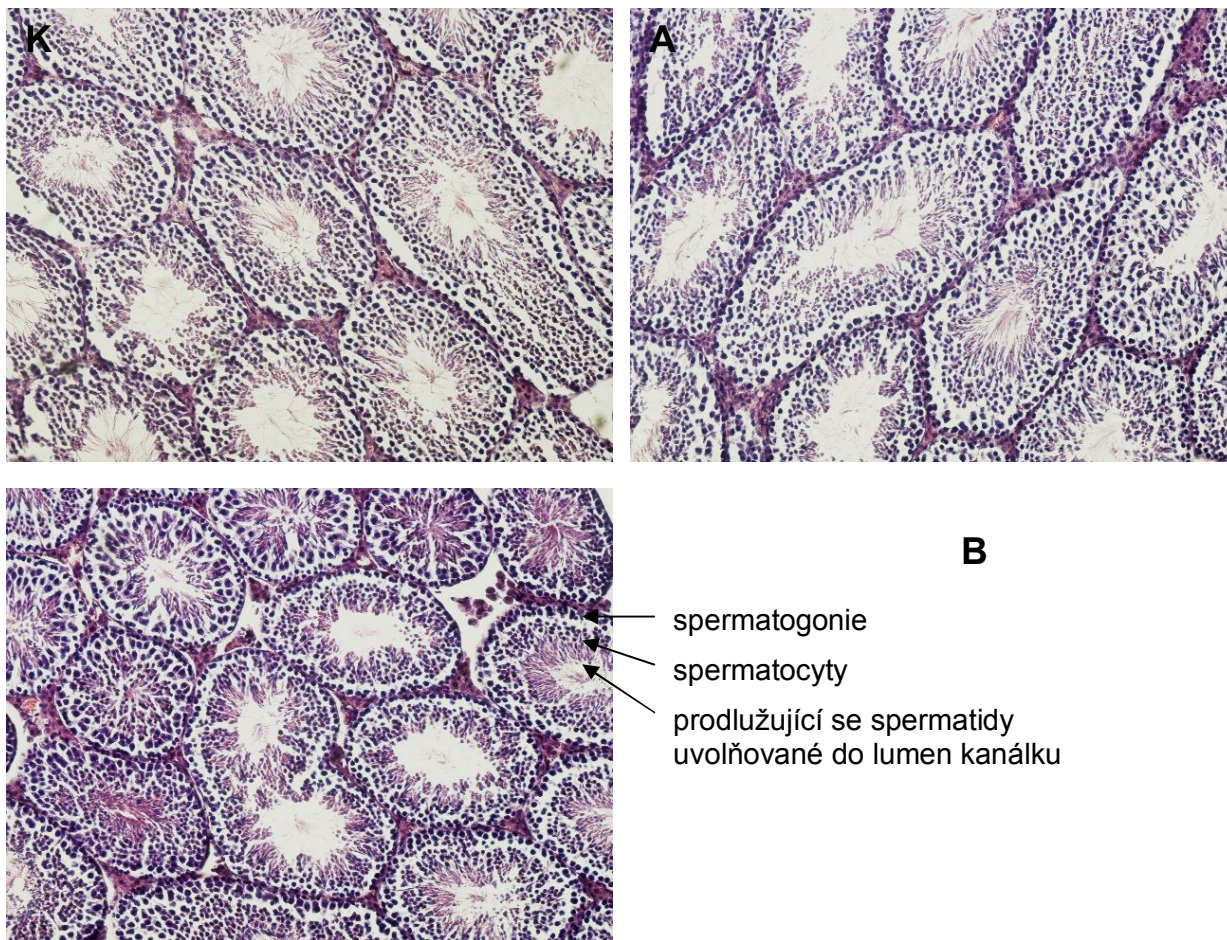
Obr. 13: Výsledky imunodetekce proteinů myších spermií na PVDF membránách, signál byl vizualizován pomocí TMB. A) proteiny detekované monoklonální protilátkou proti intra-akrozomálním proteinům – HS-14. B) detekce β -tubulinu protilátkou TU-12. Výsledky detekce β -tubulinu byly použity k normalizaci nanášky.

Tabulka 9: Výsledky imunodetekce za použití protilátky proti intra-akrozomálním proteinům HS-14. Normalizace nanášky byla provedena pomocí výsledků imunodetekce s protilátkou proti β -tubulinu TU-12. Kvantifikace byla provedena v programu AIDA.

	HS-14 %	TU-12 %	HS-14 normalizovaná podle TU-12
K	100	100	100
A	103,2	111,1	92,9
B	113,9	100,5	113,3

4.5 Histologie

Na hematoxylin-eosinem obarvených histologických řezech testes byla ve světelném mikroskopu pozorována struktura tkáně a morfologie semenotvorných kanálků (Obr. 14). U zearalenonem ovlivněných skupin A i B nebyly pozorovány žádné viditelné morfologické změny a spermatogeneze probíhala u všech zvířat.

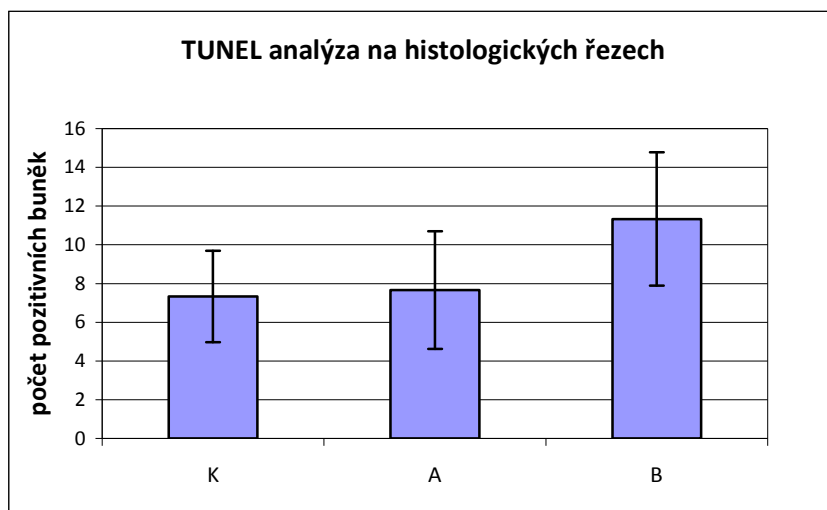


Obr. 14: Fotografie histologických řezů varlat barvených hematoxylinem a eosinem, zvětšení 200x – skupiny K, A, B

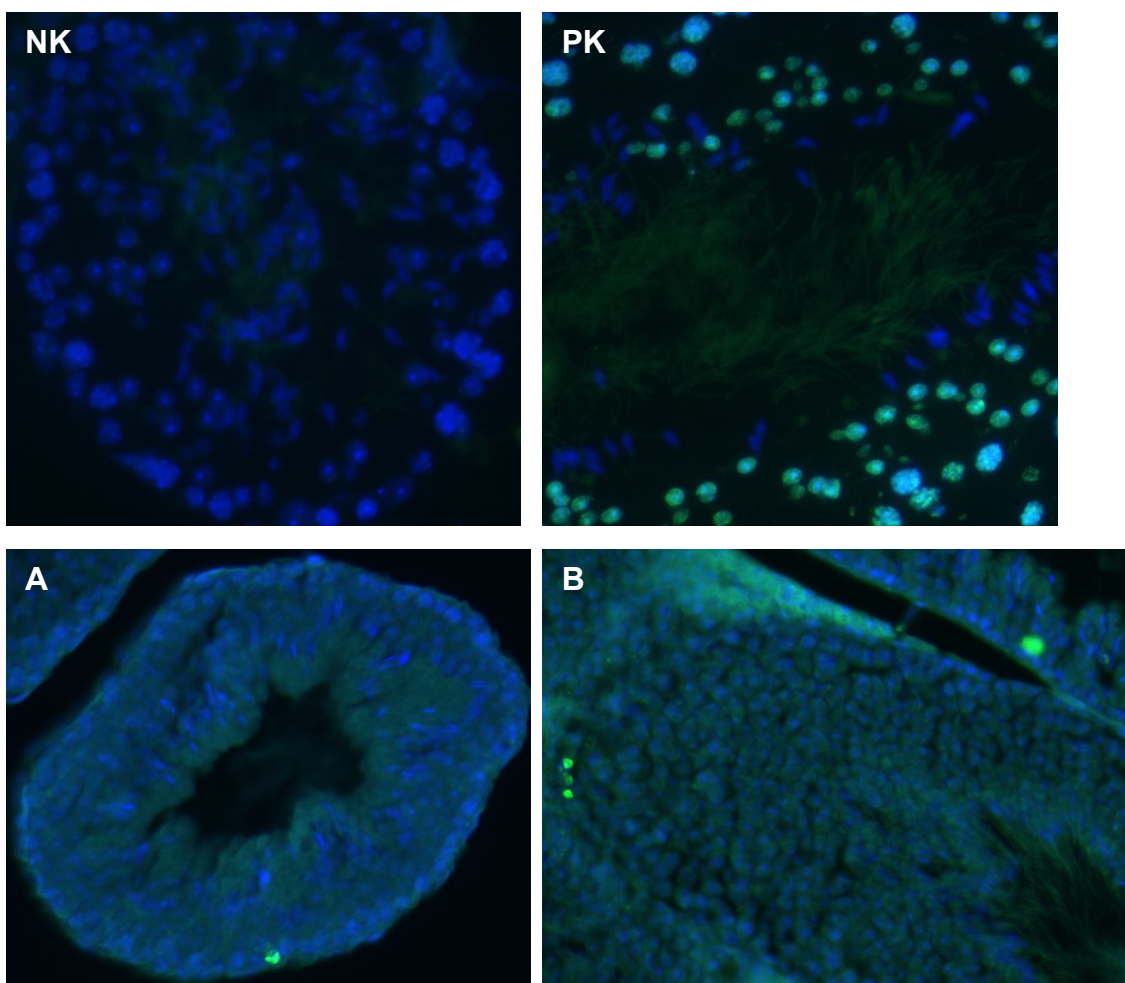
4.6 TUNEL analýza na histologických řezech

Metoda TUNEL byla použita k detekci apoptotických buněk na histologických řezech testes. U skupiny B byl pozorován mírně vyšší výskyt apoptotických buněk, rozdíl ale nebyl statisticky signifikantní (Obr. 15).

TUNEL pozitivní buňky se vyskytovaly převážně ve vnějších buněčných vrstvách semenotvorného kanálku (viz Obr. 16 – A a B), tzn. nejčastěji byla apoptóza detekována u spermatogonií.



Obr. 15: Vliv ZEA na počet TUNEL pozitivních buněk v deseti semenotvorných kanálcích. U skupiny B byl pozorován nárůst, který ovšem nebyl statisticky signifikantní. Mean±SD. N=6



Obr. 16: Fotografie z fluorescenčního mikroskopu – řezy varlat značené metodou TUNEL (zeleně), jádra značena DAPI (modře). NK) negativní kontrola, PK) pozitivní kontrola, A) a B) semenotvorné kanálky s TUNEL pozitivními buňkami. Zvětšení 400x.

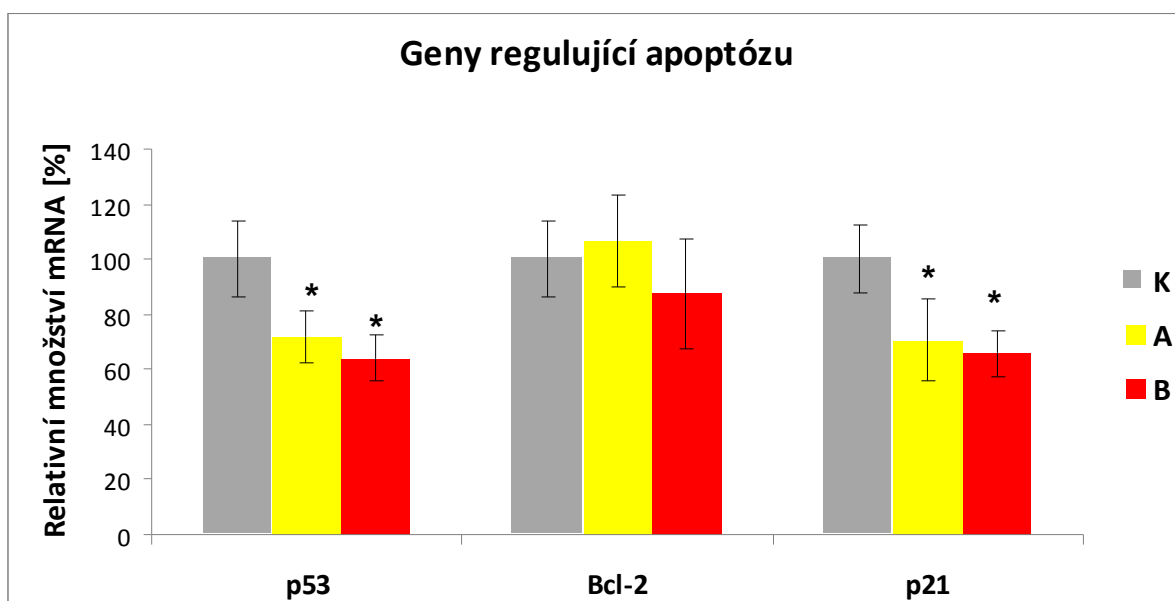
4.7 Analýza genové exprese

Analýza exprese vybraných genů byla provedena metodou kvantitativní Real Time PCR na čipu za použití přístroje BioMark. Testovali jsme, zda se u myší ovlivněných zearalenonem bude lišit expresní profil těchto genů, a zda bude případný rozdíl záviset na podávané koncentraci ZEA.

Celkově bylo hodnoceno 29 genů (seznam genů viz Tabulka 2). Pro přehlednější hodnocení byly geny rozděleny do pěti skupin v závislosti na jejich funkci – geny pro proteiny regulující apoptózu (Bcl-2, p21, p53), geny exprimované v germinálních buňkách (*Vegfa*, *Sycp3*, *Sycp1*, *Anapc11*, *Ccna1*, *Meig1*, *Grth*, *Prm1*, *Tnp1*, *Tnp2*, *Mas1*), geny Sertoliho buněk (*Sox9*, *Wt1*, *Eps8*, *Itgb1bp1*), geny související s hormonální odpovědí (*Ar*, *Fkbp5*, *Tff1*, *Igfbp4*, *Igfbp5*, *Ctsd*, *Fshr*) a geny hrající roli v epigenetice (*Ccnd1*, *Crem*, *Kdm4a*, *Dnmt1*).

4.7.1 Geny regulující apoptózu

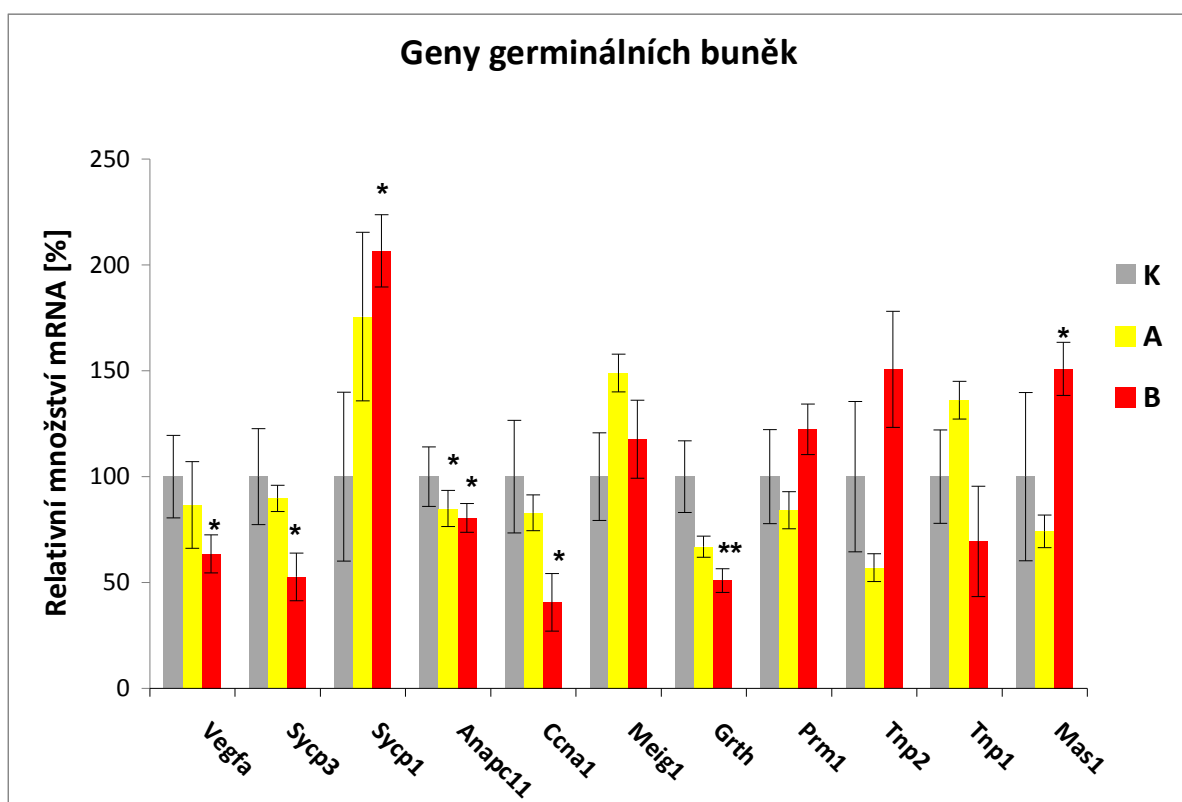
První hodnocenou skupinou jsou geny důležité pro regulaci apoptózy. U skupiny A i B byla snížena exprese genů pro proteiny p53 a p21. Pro oba geny byl navíc tento efekt o něco výraznější u skupiny B, než u skupiny A. Změna exprese genu pro antiapoptotický protein Bcl-2 nebyla detekována (Obr. 17).



Obr. 17: Relativní exprese genů regulujících apoptózu - p53, Bcl-2 a p21. Mean±SD. N=8. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

4.7.2 Geny exprimované v germinálních buňkách

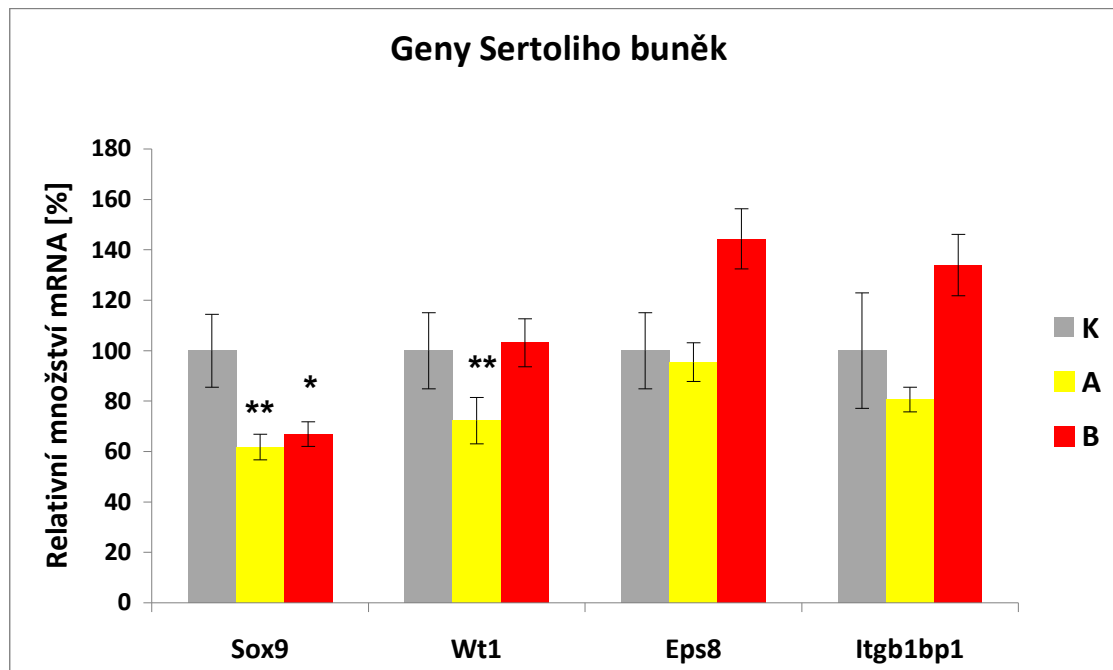
Do skupiny genů exprimovaných v germinálních buňkách bylo zařazeno celkem 11 genů. Největší změny v expresi byly zaznamenány u skupiny B. Pokles genové aktivity byl detekován u genu *Vegfa*, který je exprimován ve spermatogoniích. Další snížení genové exprese bylo pozorováno u genů *Sycp3*, *Anapc11*, *Ccna1* a *Grth*, což jsou geny specifické pro spermatocyty. Naopak nárůst byl pozorován v expresi genů *Sycp1* a *Mas1*. Gen *Sycp1* je také exprimován ve spermatocytech, kdežto gen *Mas1* byl nalezen u všech vývojových stádií. Ve skupině A byla detekována pouze jediná změna, a to snížení exprese genu *Anapc11*. U zbylých čtyř genů (*Meig1*, *Prm1*, *Tnp1* a *Tnp2*) nebyl pozorován signifikantní rozdíl oproti kontrole (Obr. 18).



Obr. 18: Relativní exprese genů exprimovaných v germinálních buňkách. Mean±SD. N=8. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

4.7.3 Geny Sertoliho buněk

Geny *Sox9*, *Wt1*, *Eps8* a *Itgb1bp1* jsou geny exprimované v Sertoliho buňkách (Obr. 19). U genů *Eps8* a *Itgb1bp1* nebyla u skupiny A ani B detekována signifikantní změna. Ve skupině A byla pro geny *Sox9* a *Wt1* zaznamenána snížená exprese oproti kontrolní skupině. U genu *Sox9* byla navíc exprese snížena i u skupiny B, i když v menším rozsahu, než u skupiny A.

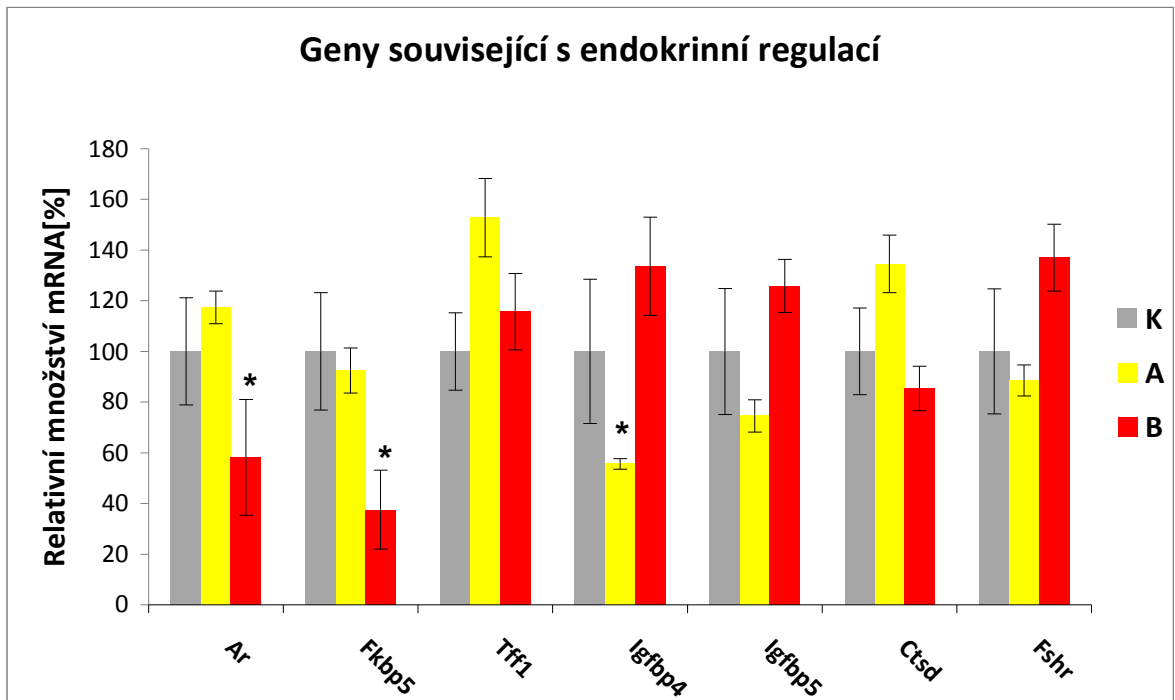


Obr. 19: Relativní exprese genů specifických pro Sertoliho buňky. Mean±SD. N=8. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

4.7.4 Geny související s endokrinní regulací

Další skupinou jsou geny, které se podílí na regulaci hormonální odpovědi nebo je jejich exprese různými hormony regulována (Obr. 20). Snížená exprese genu pro androgenní receptor (*Ar*) a komponentu steroidních receptorů *Fkbp5* byla pozorována u skupiny B.

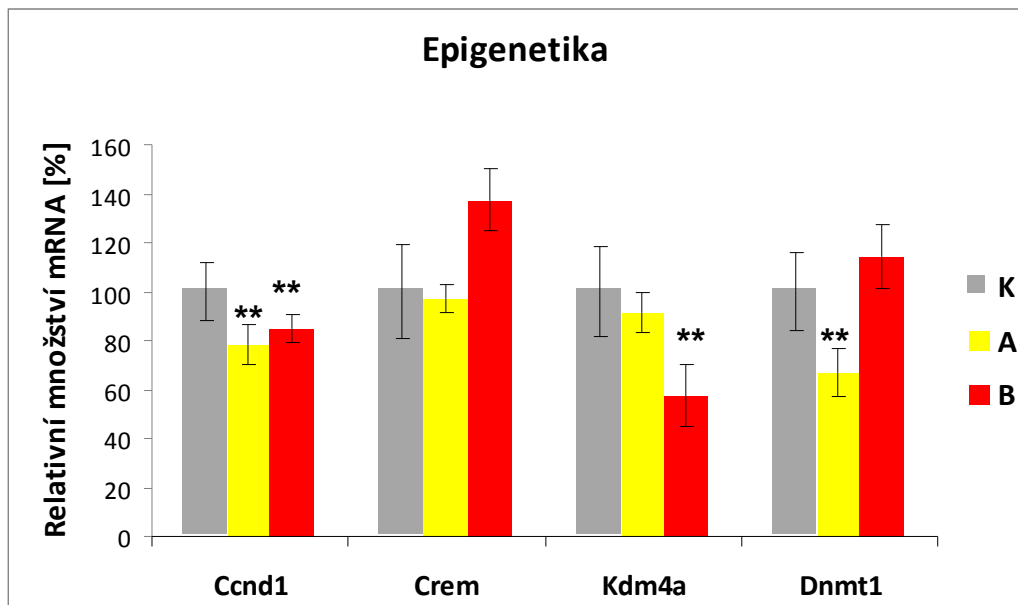
Z genů, které reagují na změny hladiny estrogenu (*Tff1*, *Igfbp4*, *Igfbp5* a *Ctsd*), byla snížena exprese pouze u *Igfbp4*, a to ve skupině exponované ZEA ve vyšší koncentraci (A). Exprese genu pro receptor folikulostimulačního hormonu (*Fshr*) nebyla signifikantně změněna.



Obr. 20: Relativní exprese genů souvisejících s hormonální regulací. Mean±SD. N=8.
*P < 0.05, **P < 0.01, ***P

4.7.5 Epigenetika

Do skupiny genů hrajících roli v epigenetických procesech byly vybrány 4 geny: *Ccnd1*, *Crem*, *Kdm4a* a *Dnmt1*. U genu kódující cyklin D1 (*Ccnd1*) byla zaznamenána snížená exprese v obou ovlivněných skupinách, přičemž efekt byl větší u skupiny A, tedy u skupiny exponované vyšší dávkou ZEA. Ve skupině B byla detekována snížená exprese genu *Kdm4a*. Exprese genu pro DNA methyltransferázu (*Dnmt1*) byla naopak snížena jen u skupiny A (Obr. 21).

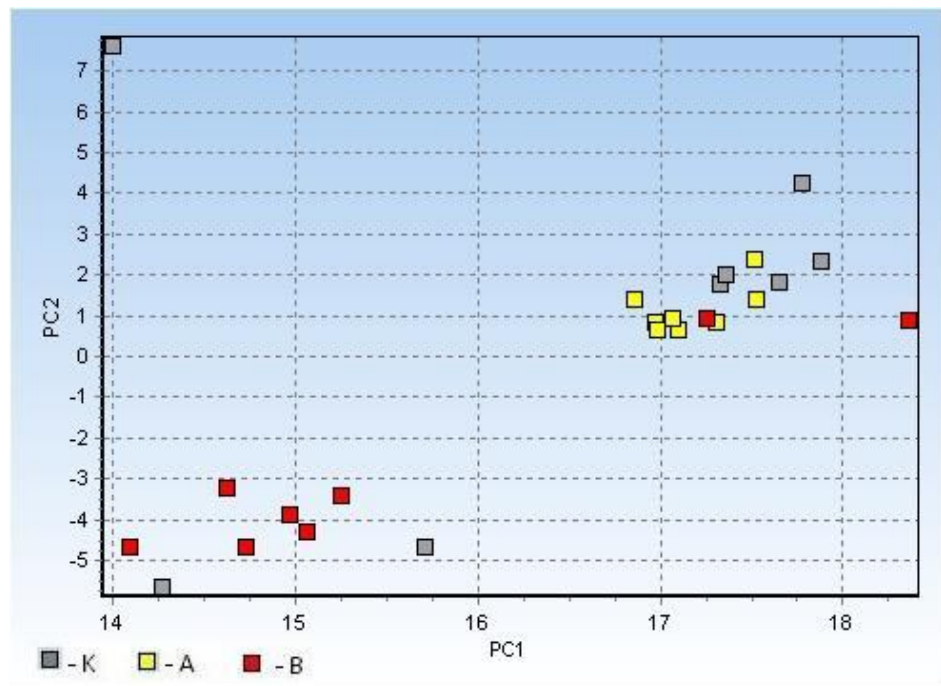


Obr. 21: Relativní exprese genů hrajících roli v epigenetických procesech. Mean±SD. N=8.
*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

4.7.6 PCA analýza

PCA analýza, neboli analýza hlavních komponent byla využita k analýze všech dat získaných testováním 29 genů (Obr. 22). Výsledek PCA určuje relativních podobnost jedinců z jednotlivých skupin.

Z obrázku vyplývá, že nejhomogennější skupinou byla skupina A, která zároveň vykazuje větší podobnost vůči kontrolní skupině, než skupina B. Dva z osmi jedinců ve skupině B a tři ve skupině K nespĺňují očekávaný trend.



Obr. 22: PCA analýza dat z genové exprese určuje relativní vzájemnou podobnost zkoumaných jedinců.

5. Diskuze

Vliv endokrinních disruptorů na zdraví živočichů byl v posledních desetiletích předmětem mnoha studií. Většina publikací zabývajících se zearalenonem testovala jeho efekt na prasatech (Olsen et al., 1985; Benzoni et al., 2008) která jsou k jeho reprodukčně toxickému efektu nejnáchylnější, nebo případně na jiných chovných zvířatech, jako jsou ovce, skot nebo koně (Minervini and Dell'Aquila, 2008).

Cílem této práce bylo popsat vliv mykotoxinu zearalenonu na reprodukční parametry a expresi vybraných genů u CD1 outbredních myší. Experimentálním zvířatům byl podáván ZEA rozpuštěný ve vodě ve dvou dávkách - 150 µg/l (skupina A) a 0,15 µg/l (skupina B); kontrolní skupina (K) byla bez ovlivnění. Koncentrace ZEA pro tento experiment byla vypočítána z průměrné denní dávky ZEA pro dospělého člověka, která byla stanovena na cca 1,5 µg/den (Scientific Committee on Food, 2000). Počítáme-li průměrnou váhu dospělého muže jako 70 kg, myš je cca 2400x lehčí než člověk a vypije 5 ml vody denně. Po zaokrouhlení pak dostaneme hodnotu 0,00015 µg/ml, což je 0,15 µg/l která odpovídá dávce podávané skupině B. Skupina A byla ovlivňována koncentrací 1000x vyšší, 150 µg/l. Tyto dávky odpovídají hodnotám 0,025 (B) a 25 (A) µg/kg tělesné váhy na den.

ZEA byl myším podáván od prvního dne březosti matek, až do 70. dne věku mláďat, kdy byla zvířata usmrcena a materiál použit na další experimenty. Ovlivnění mláďat během prenatalního vývoje nebylo v naší práci pozorováno - počet mláďat ani poměr samců a samic ve vrhu nebyl změněn (Tab. 6), na rozdíl od studie jiných autorů, kteří u potkanů zjistili jeho negativní vliv, ovšem v dávkách několikanásobně vyšších (1, 2, 4, a 8 mg/kg tělesné váhy na den během březosti) (Collins et al., 2006).

Dále byl sledován vliv ZEA na anogenitální vzdálenost (AGD), váhu těla a váhu samčích reprodukčních orgánů (testes, prostata, semenné vaky, epididymis). Ani jeden z těchto parametrů nebyl zearalenonem signifikantně ovlivněn (Tab. 7). V již zmíněné studii na potkanech byla AGD měřena ještě nenarozeným plodům a bylo prokázáno její zkrácení. V naší studii byla AGD měřena až v dospělosti a dávka ZEA navíc byla mnohem menší. V jiné studii, která se zaměřila také na myši, popsali po expozici ZEA a α -ZOL sníženou váhu těla, zvýšenou váhu testes a sníženou váhu epididymis, ale i v této práci byly expoziční dávky ZEA a α -ZOL

mnohonásobně vyšší (25, 50, 75 mg/kg tělesné váhy na den) než v naší studii (Yang et al., 2007).

Spermatologické parametry jako koncentrace, morfologie, životnost spermií, vazba intra-akrozomálních protilátek a apoptotického markeru annexinu V byly hodnoceny u epididymálních spermií (Tabulka 8). Sníženou koncentrací a procento morfologicky normálních spermií jsme pozorovali u skupiny B, tedy nižší koncentrace ZEA. Koncentrace spermií klesla téměř o 40%. Počet morfologicky normálních spermií byl u skupiny A i B velmi podobný, avšak statisticky signifikantní pouze u skupiny B, celkově byl rozdíl oproti kontrole o 2%. Vliv ZEA na životnost spermií nebyl prokázán. Ve výše jmenované studii s vyššími expozičními dávkami (Yang et al., 2007) zjistili negativní vliv ZEA a α -ZOL na počet živých spermií a jejich kvalitu i zhoršení akrozomální integrity při barvení giemsou. V naší studii byl stav akrozomu hodnocen pomocí intra-akrozomálních protilátek HS-14 a HS-8, které jsou pro tento účel v naší laboratoři standartně používány (Peknicova et al., 2002, 2005). U skupiny A i B bylo zaznamenáno vyšší procento buněk vážících protilátka HS-14 a to téměř shodně v obou skupinách cca o 4%, nedošlo tedy k poškození akrozomu. Počet značených akrozomů pomocí protilátky HS-8 o 4% klesl u skupiny A (vyšší koncentrace ZEA). Doplnková imunodetekce proteinů s protilátkou HS-14 ukázala pokles ve skupině A a potvrdila nárůst ve skupině B (Obr. 13). Vysvětlení „paradoxního navýšení“ proteinu může souviset s fyziologickým stavem a zralostí spermie. Při hodnocení stavu akrozomu na lidských ejakulovaných spermiích je u spermií s patologickým spermiogramem jasný pokles akrozomálních proteinů (Tepla et al., 2006), u myši pracujeme s epididymálními spermiemi, které mohou mít změněnou stabilitu a integritu plasmatické i akrozomální membrány oproti zralé ejakulované spermii.

Histologická analýza na řezech varlat jak pomocí histologického barvení hematoxylin-eosinem, tak i pomocí metody TUNEL neprokázala morfologické změny ani zvýšený výskyt apoptotických buněk (Obr. 14, 15 a 16). V jiných studiích byly popsány různé morfologické změny semenotvorných kanálků (přítomnost vakuol, snížený počet germinálních buněk) po působení ZEA, ale opět jen při použití vyšších dávek (Yang et al., 2007; Lopez-Casas et al., 2012). V jiné publikaci byla morfologie myších testes hodnocena po dvoudenní expozici ZEA *in utero* v koncentraci 150 μ g/kg tělesné váhy na den. U plodů byla zaznamenána abnormální diferenciace spermatických buněk a změny v Leydigových buňkách, ale i zde byla koncentrace

ZEA 6x vyšší, než naše koncentrace A (PerezMartinez et al., 1996). Metoda TUNEL byla použita i v další studii sledující vliv ZEA na apoptózu, kde autoři odhalili více apoptotických buněk na řezech testes a zhoršení morfologie spermií po aplikaci 10 µg ZEA/myš/den (Yuan et al., 2010) – pro srovnání v naší studii je to pro koncentraci A 0,75 µg ZEA/myš/den a koncentrace B je 1000x nižší.

Tato studie byla kromě hodnocení makroskopických a mikroskopických změn reprodukčních parametrů zaměřena i na detekci změn genové exprese. Celkově bylo hodnoceno 29 genů, které byly rozděleny do pěti skupin.

První skupinou jsou geny regulující apoptózu (Obr. 17). p53 je evolučně velmi konzervovaný tumor supresorový protein, který reguluje buněčný cyklus, opravy DNA i apoptózu a zároveň je i transkripčním faktorem genu pro protein p21 a proapoptického proteinu Bax. V naší studii byla po expozici ZEA snížena exprese genů pro p53 a p21 u obou ovlivněných skupin, u skupiny B (nižší dávka ZEA) byl navíc efekt o něco výraznější. Vzhledem k tomu, že exprese p53 a p21 spolu úzce souvisí, není překvapivé, že změna v jejich expresi byla téměř totožná. Fakt, že tyto geny byly downregulovány značí o tom, že ZEA pravděpodobně nemá přímý vliv na poškození DNA. Exprese genu kódující antiapoptický protein Bcl-2 nebyla změněna a ani naše předchozí výsledky (TUNEL) nezaznamenaly apoptotické změny v testes. Ve studii provedené na myších ovlivněných endokrinním disruptorem TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin) byla metodou Western blot zjištěna zvýšená exprese p53 a proapoptického proteinu Bax (Jin et al., 2010). Výsledky studie na rybách *Kryptolebias marmoratus*, které byly vystavovány různým endokrinním disruptorům (ED) jako bisfenol A, 4-nonylfenol a 4-tert-octylfenol, prokázaly zvýšení exprese p53 krátce po podání ED, ovšem při dlouhodobém působení byla exprese p53 snížena. Autoři z těchto výsledků usuzují, že takový organizmus může být náchylnější k potenciálnímu vzniku rakoviny (Lee et al., 2008).

Druhou skupinou jsou geny germinálních buněk (Obr. 18). Geny pro protamin 1 (*Prm1*) a tranziční jaderné proteiny (*Tnp1* a *Tnp2*), specificky exprimované ve spermatidách, nebyly zearalenonem signifikantně ovlivněny. Dalším neovlivněným genem byl *Meig1*, také jeden z klíčových genů pro spermiogenezi. K signifikantním změnám došlo, až na jeden případ, vždy ve skupině B (nižší dávka ZEA). Jedinou změnou ve skupině A bylo snížení ve spermatocytech exprimovaného genu *Anapc11*, ke kterému ovšem došlo i ve skupině B. Největší

pokles exprese byl zaznamenán u genu pro cyklin A1 (o 60%) a GHRT (o 50%). Podle literatury vede ztráta genu *Ccna1* k nadměrné apoptóze a následné sterilitě (Liu et al., 1998). V naší studii byla exprese *Ccna1* snížena o více než polovinu, ale signifikantní zvýšení apoptózy jsme na rozdíl od jmenované práce nezaznamenali (Obr. 15). Absence genu *Grth* u myší způsobuje narušení spermatogeneze a nedostatečnou produkci spermií (Dufau and Tsai-Morris, 2007). My jsme i po snížení exprese genu *Grth* změny ve spermatogenezi nepozorovali. Bylo také publikováno, že exprese GRTH je stimulována LH a androgeny (Dufau and Tsai-Morris, 2007). Koncentrace jednotlivých hormonů v krvi ovlivněných myší v naší studii měřeny nebyly, takže nemůžeme soudit, zda by příčinou snížení exprese mohly být změny hladin těchto hormonů. Ke snížení exprese došlo i u *Vegfa*, genu důležitého pro proliferaci a stimulaci spermatogoniálních kmenových buněk (Caires et al., 2012). Zajímavý je také expresní profil synaptonemálních proteinů 1 a 3, kdy po ovlivnění dávkou v nižší koncentraci ZEA (B) exprese *Sycp3* klesla o 50% a naopak exprese *Sycp1* vzrostla až na 206%. Není ovšem příliš pravděpodobné, že by se tyto dva proteiny mohly funkčně nahradit, protože v synaptonemálním komplexu tvoří SYCP1 transverzální filamenta a SYCP3 laterální filamenta (Zheng et al., 2009). Druhým genem, u kterého byla zvýšena exprese (na 150%) po expozici nižší dávkou ZEA (B) je gen *Mas1*, jehož absence byla dříve popsána u testes s narušenou spermatogenezí (Reis et al., 2010). Na tomto místě můžeme spekulovat o tom, zda downregulace *Ccna1* a *Grth*, která by mohla mít negativní vliv na spermatogenezi mohla být vykompenzována potenciálně pozitivním vlivem upregulace *Mas1*.

Třetí skupinou testovaných genů jsou geny exprimované v Sertoliho buňkách (Obr. 19). Snížená exprese genu *Sox9* byla detekována u obou použitých koncentrací ZEA, přičemž tento efekt byl výraznější u skupiny ovlivněné vyšší dávkou ZEA (snížení o 38%) než u skupiny s nižší expozicí (o 32%). Nižší exprese genu *Wt1* (o 28%) byla zaznamenána pouze u skupiny A. *Sox9* a *Wt1* mají během embryonálního vývoje zásadní roli pro vznik samčí pohlavní soustavy, a tedy i pro determinaci pohlaví (Brennan and Capel, 2004; Kobayashi et al., 2005). V naší studii nebyl prokázán vliv ZEA na pohlaví mláďat po expozici *in utero* (Tabulka 6). Geny *Eps8* a *Itgb1bp1* nebyly signifikantně ovlivněny.

Čtvrtou skupinou jsou geny, které se podílejí na regulaci hormonální odpovědi nebo je jejich exprese různými hormony regulována (Obr. 20). Androgenní receptor

(*Ar*) je pro správný vývoj testes nezbytný, necitlivost *Ar* k testosteronu ústí v neplodnost (Verhoeven et al., 2010). Snížená hladina exprese po ovlivnění nižší dávkou ZEA (B) byla zaznamenána u genu pro androgenní receptor *Ar* (o 42%) a genu *Fkbp5* (o 62%). *Fkbp5* je komponentou steroidních receptorů, a jeho exprese je stimulována androgeny (Magee et al., 2006). Z genů regulovaných estrogenem (*Tff1*, *Igfbp4*, *Igfbp5* a *Ctsd*) došlo k signifikantní změně pouze u *Igfbp4* a to ke snížení exprese po expozici vyšší dávkou ZEA (A). *Igfbp4* se váže na IGF (inzulinu podobný růstový faktor) a inaktivuje tak jeho funkci. U buněk rakoviny tlustého střeva byl jeho zvýšený výskyt spojován se zvýšenou expresí genu pro proapoptotický protein Bax a naopak se sníženou expresí antiapoptotického proteinu Bcl-2 (Durai et al., 2007). V naší studii nebyla zaznamenána změna exprese genu *Bcl-2*. Folikulostimulační hormon je klíčovým hormonem pro proliferaci Sertoliho buněk a pro správný vývoj testes (Verhoeven et al., 2010). Signifikantní změna exprese genu pro receptor folikulostimulačního hormonu (*Fshr*) nebyla detekována. Při použití ZEA v koncentracích 0,025 (B) a 25 (A) $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné váhy na den nebyl z genové analýzy pozorován zásadní estrogení účinek.

Poslední skupinou jsou geny, které se podílejí na epigenetických procesech (Obr. 21). Exprese genu pro cyklin D, která bývá regulována metylací jeho promotoru, byla snížena u skupiny A i B, přičemž u skupiny A, tedy u vyšší dávky ZEA, byl tento efekt o něco větší. Cyklin D spolu s cyklin dependentními kinázami 4 a 6 regulují přechodu buněčného cyklu z fáze G1 do S (Vermeulen et al., 2003). Ke snížení exprese u skupiny A došlo i u genu pro udržovací DNA methyltransferázu 1 (*Dnmt1*) a to 33%. Naopak exprese demethylázy Kdm4a poklesla o 43% u skupiny B, tedy po expozici nižší dávkou ZEA. Signifikantní změna v expresi genu *Crem* nebyla zaznamenána. Některé enviromentální faktory mohou mít vliv na epigenetické změny, a v případě, že jsou přítomny u germinálních buněk, mohou být přeneseny i do další generace. Snížený výskyt methylcytosinu také bývá často spojován se vznikem rakoviny (Dada et al., 2012).

Analýza genové exprese ukázala, že až na dvě výjimky (*Sycp1* a *Mas1*), byly námi zkoumané geny po působení ZEA downgerulovány, nebo jejich exprese nebyla signifikantně změněna. Je pravděpodobné, že na snížení genové exprese mohl mít vliv nižší počet buněk v zearalenonem ovlivněných vzorcích. Celkově bylo více rozdílů oproti kontrole detekováno u skupiny B, tedy u skupiny ovlivněné nižší dávkou ZEA, u které byl zaznamenán i pokles koncentrace spermií (Tabulka 8).

Vzhledem k tomu, že metoda TUNEL neodhalila nárůst apoptotických buněk v semenotvorných kanálcích, dá se předpokládat, že ke snížení počtu buněk mohlo dojít už na úrovni spermatogonií. Nasvědčovalo by tomu i snížení exprese ve spermatogoniích exprimovaného genu *Vegfa* (Obr. 18). Analýza hlavních komponent (PCA, Obr. 22) také potvrdila větší podobnost skupiny A s kontrolní skupinou. Navíc se zdá, že ZEA má vliv na unifikaci jedinců. Také při použití inbredního kmene myší by nejspíš výsledky genové analýzy byly homogennější, ovšem v toxikologických testech běžně používaná outbrední linie CD1 zase lépe reprezentuje lidskou heterogenitu.

Tato práce je specifická tím, že na rozdíl od mnoha jiných studií byla zaměřena na nízkou koncentraci ZEA (skupina B), se kterou se lidé v životním prostředí mohou běžně setkat. Většinou je v publikacích uváděno, že nižší koncentrace než řádově v mg/kg tělesné váhy na den nemají žádný pozorovaný vliv (Yang et al., 2007). Některé naše výsledky tyto závěry podporují. Mláďata exponovaná *in utero* se narodila zdravá, nebyl ovlivněn jejich počet ani poměr pohlaví. U dospělých samců nedocházelo ke snížení hmotnosti těla ani reprodukčních orgánů, semenotvorné kanálky v testes byly morfologicky normální, spermatogeneze probíhala. První detekované změny byly zjištěny až na mikroskopické úrovni, kdy jsme zaznamenali sníženou koncentraci spermií, vliv na morfologii spermií a častější vazbu apoptotického markeru annexinu V. Nutno dodat, že snížení koncentrace spermií u skupiny B bylo o téměř 40%, což při počáteční koncentraci 38,7 milionů spermií/ml, stále zanechává dostatečný počet spermií pro bezproblémovou reprodukci. V případě, že by ZEA měl podobný efekt i na člověka, by při současném trendu 15 (i méně) milionů spermií/ml mohlo být 40% již citelnou ztrátou.

Zearalenon u outbrední linie myší ovlivnil reprodukční parametry hlavně na mikroskopické a genetické úrovni. V mnoha případech byl větší efekt způsoben nižší dávkou ZEA (skupina B). Podobný výsledek byl v naší laboratoři zjištěn u endokrinního disruptoru bisfenolu A (BPA), kdy nižší dávka měla vyšší negativní vliv na stav spermií a ve svém důsledku na oplození *in vivo* (Peknicova et al., 2002). Vysvětlit tento výsledek není jednoduché, ale v endokriologii i v imunologii jsou takové případy popsány. Vyšší dávka může potenciálně vést k většímu nasazení kompenzačních mechanismů, nebo může aktivovat jaterní detoxikační enzymy, jako P450 (Guengerich, 2006).

6. Závěr

Tato studie ukázala, že endokrinní disruptor zearalenon (ZEA) měl u outbrední linie myši vliv na reprodukční parametry, a to konkrétně na koncentraci a morfologii spermií, stav akrozomu a vazbu apoptotického markeru. Zároveň ovlivnil i expresi vybraných genů buněk testes. Negativní efekt byl zjištěn jak u nízké dávky, běžně se vyskytující v životním prostředí lidí, tak u vyšší dávky, obě vykazovaly změny v různých testovaných parametrech.

Testovaná zvířata byla chována za ideálních podmínek, s minimálním množstvím dalších negativních faktorů. Volně žijící živočichové i lidé jsou každodenně vystavováni současnému působení mnoha negativních faktorů, s nimiž se jejich organismus musí vypořádat. Tyto faktory ohrožují reprodukci živočichů a mohou mít dopad i na reprodukci člověka.

7. Literatura

Agarwal, M. L., Taylor, W. R., Chernov, M. V., Chernova, O. B. and Stark, G. R. (1998). The p53 network. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 1-4.

Alm, H., Greising, T., Brussow, K. P., Torner, H. and Tiemann, U. (2002). The influence of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenol on in vitro maturation of pig oocytes and in vitro culture of pig zygotes. *Toxicology in Vitro* **16**, 643-648.

Anway, M. D. and Skinner, M. K. (2008). Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the prostate transcriptome and adult onset disease. *Prostate* **68**, 517-529.

Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: Signaling and modulation. *Science* **281**.

Augereau, P., Miralles, F., Cavailles, V., Gaudalet, C., Parker, M. and Rochefort, H. (1994). Characterization of the proximal estrogen-responsive element of human cathepsin-D gene. *Molecular Endocrinology* **8**.

Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology* **8**.

Batistatou, A. and Greene, L. A. (1993). Internucleosomal DNA cleavage and neuronal cell-survival death. *Journal of Cell Biology* **122**, 523-532.

Benzoni, E., Minervini, F., Giannoccaro, A., Fornelli, F., Vigo, D. and Visconti, A. (2008). Influence of in vitro exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality. *Reproductive Toxicology* **25**, 461-467.

Bettgowda, A. and Wilkinson, M. F. (2010). Transcription and post-transcriptional regulation of spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **365**.

Biehl, M. L., Prelusky, D. B., Koritz, G. D., Hartin, K. E., Buck, W. B. and Trenholm, H. L. (1993). Biliary-excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology* **121**, 152-159.

Billig, H., Furuta, I., Rivier, C., Tapanainen, J., Parvinen, M. and Hsueh, A. J. W. (1995). Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* **136**.

Bottalico, A., Visconti, A., Logrieco, A., Solfrizzo, M. and Mirocha, C. J. (1985). Occurrence of zearalenols (diastereometric mixture) in corn stalk rot and their production by associated *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* **49**, 547-551.

Brener, E., Rubinstein, S., Cohen, G., Shternall, K., Rivlin, J. and Breitbart, H. (2003). Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction* **68**, 837-845.

Brennan, J. and Capel, B. (2004). One tissue, two fates: Molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature Reviews Genetics* **5**, 509-521.

Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. and Wang, X. D. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **15**.

Burak, W. E., Quinn, A. L., Farrar, W. B. and Brueggemeier, R. W. (1997). Androgens influence estrogen-induced responses in human breast carcinoma cells through cytochrome P450 aromatase. *Breast Cancer Research and Treatment* **44**.

Caires, K. C., de Avila, J. M., Cupp, A. S. and McLean, D. J. (2012). VEGFA Family Isoforms Regulate Spermatogonial Stem Cell Homeostasis in Vivo. *Endocrinology* **153**, 887-900.

Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. and Skakkebaek, N. E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal* **305**, 609-613.

Choudhury, D. R., Small, C., Wang, Y. F., Mueller, P. R., Rebel, V. I., Griswold, M. D. and McCarrey, J. R. (2010). Microarray-Based Analysis of Cell-Cycle Gene Expression During Spermatogenesis in the Mouse. *Biology of Reproduction* **83**, 663-675.

Clermont, Y. and Trott, M. (1969). Duration of cycle of seminiferous epithelium in mouse and hamster determined by means of 3H-thymidine and radioautography. *Fertility and Sterility* **20**.

Collins, T. F. X., Sprando, R. L., Black, T. N., Olejnik, N., Eppley, R. M., Alam, H. Z., Rorie, J. and Ruggles, D. I. (2006). Effects of zearalenone on in utero development in rats. *Food and Chemical Toxicology* **44**, 1455-1465.

Cooper, K. F. and Strich, R. (2011). Meiotic control of the APC/C: similarities & differences from mitosis. *Cell Division* **6**.

Cooper, T. G. (2007). Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian Journal of Andrology* **9**, 533-539.

Cooper, T. G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. W. G., Behre, H. M., Haugen, T. B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M. T. et al. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update* **16**, 231-245.

Costa, Y., Speed, R., Ollinger, R., Alsheimer, M., Semple, C. A., Gautier, P., Maratou, K., Novak, I., Hoog, C., Benavente, R. et al. (2005). Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *Journal of Cell Science* **118**, 2755-2762.

Crisp, T. M., Clegg, E. D., Cooper, R. L., Wood, W. P., Anderson, D. G., Baetcke, K. P., Hoffmann, J. L., Morrow, M. S., Rodier, D. J., Schaeffer, J. E. et al. (1998). Environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. *Environmental Health Perspectives* **106**, 11-56.

Dada, R., Kumar, M., Jesudasan, R., Fernandez, J. L., Gosalvez, J. and Agarwal, A. (2012). Epigenetics and its role in male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **29**, 213-223.

Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., R., K. and Van der Kraak, G. (2002). Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. WHO publication no. WHO/PCS/EDC/02.2. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

Dufau, M. L. and Tsai-Morris, C. H. (2007). Gonadotropin-regulated testicular helicase (GRTH/DDX25): an essential regulator of spermatogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **18**, 314-320.

Durai, R., Yang, S. Y., Sales, K. M., Seifalian, A. M., Goldspink, G. and Winslet, M. C. (2007). Insulin-like growth factor binding protein-4 gene therapy increases apoptosis

by altering Bcl-2 and Bax proteins and decreases angiogenesis in colorectal cancer. *International Journal of Oncology* **30**, 883-888.

Dym, M. and Fawcett, D. W. (1971). Further observations on numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intracellular bridges in mammalian testis. *Biology of Reproduction* **4**.

Dym, M. (1994). Spermatogonial stem-cells of the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 11287-11289.

Eddy, E. M. (2002). Male germ cell gene expression. *Recent Progress in Hormone Research, Vol 57* **57**.

Eddy, E. M. (2006). The Spermatozoon. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, (ed. J. D. Neill), pp. 3-54. St Louis: Academic Press.

Elzeinova, F., Novakova, V., Buckiova, D., Kubatova, A. and Peknicova, J. (2008). Effect of low dose of vinclozolin on reproductive tract development and sperm parameters in CD1 outbred mice. *Reproductive Toxicology* **26**, 231-238.

Engel, W., Keime, S., Kremling, H., Hameister, H. and Schluter, G. (1992). The genes for protamine-1 and protamine-2 (PRM1 and PRM2) and transition protein 2 (TNP2) are closely linked in the mammalian genome. *Cytogenetics and Cell Genetics* **61**.

Eriksen, G. S., Pennington, J., Schlatter, J., Alexander, J. and Thuvander, A. (2000). International Programme on Chemical Safety - Zearalenone. WHO food additives series:44, Geneva; dopstupné na <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44jec14.htm>.

Fisher, J. S. (2004). Environmental anti-androgens and male reproductive health: focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reproduction* **127**, 305-315.

Gilberts, S. F. (2000). *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Griswold, M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **9**, 411-416.

Guengerich, F. P. (2006). Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *Aaps Journal* **8**, E101-E111.

Harris, M. H. and Thompson, C. B. (2000). The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death and Differentiation* **7**.

Hartwell, L. H. and Kastan, M. B. (1994). Cell-cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821-1828.

Hengartner, M. O. and Horvitz, H. R. (1994). C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene bcl-2. *Cell* **76**.

Hervouet, E., Vallette, F. M. and Cartron, P. F. (2009). Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics* **4**, 487-499.

Hikim, A. P. S. and Swerdloff, R. S. (1999). Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Reviews of Reproduction* **4**, 38-47.

Hirsh, A. (2003). ABC of subfertility - Male subfertility. *British Medical Journal* **327**, 669-673A.

Honda, A., Siruntawineti, J. and Baba, T. (2002). Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Human Reproduction Update* **8**, 405-412.

Huminiecki, L., Chan, H. Y., Lui, S., Poulosom, R., Stamp, G., Harris, A. L. and Bicknell, R. (2001). Vascular endothelial growth factor transgenic mice exhibit reduced male fertility and placental rejection. *Molecular Human Reproduction* **7**, 255-264.

Huynh, H., Nickerson, T., Pollak, M. and Yang, X. F. (1996). Regulation of insulin-like growth factor I receptor expression by the pure antiestrogen ICI 182780. *Clinical Cancer Research* **2**.

Inoue, A., Yoshida, N., Omoto, Y., Oguchi, S., Yamori, T., Kiyama, R. and Hayashi, S. (2002). Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *Journal of Molecular Endocrinology* **29**.

Israels, E. D. and Israels, L. G. (2001). The cell cycle. *Stem Cells* **19**, 88-91.

Jensen, T. K., Toppari, J., Keiding, N. and Skakkebaek, N. E. (1995). Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? *Clinical Chemistry* **41**, 1896-1901.

Jin, M. H., Hong, C. H., Lee, H. Y., Kang, H. J. and Han, S. W. (2010). Toxic Effects of Lactational Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on

Development of Male Reproductive System: Involvement of Antioxidants, Oxidants, and p53 Protein. *Environmental Toxicology* **25**, 1-8.

Kobayashi, A., Chang, H., Chaboissier, M. C., Schedl, A. and Behringer, R. R. (2005). Sox9 in testis determination. *Testicular Cell Dynamics and Endocrine Signaling* **1061**.

Korpelainen, E. I., Karkkainen, M. J., Tenhunen, A., Lakso, M., Rauvala, H., Vierula, M., Parvinen, M. and Alitalo, K. (1998). Overexpression of VEGF in testis and epididymis causes infertility in transgenic mice: Evidence for nonendothelial targets for VEGF. *Journal of Cell Biology* **143**, 1705-1712.

Kuiper, G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, P. and Gustafsson, J. A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**, 4252-4263.

Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M. and Watanabe, H. (1987). Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **7**, 253-306.

Kyselova, V., Peknicova, J., Buckiova, D. and Boubelik, M. (2003). Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vitro fertility of outbred CD-1 mice, vol. 1, pp. 30: *Reprod Biol Endocrinol*.

Kyselova, V., Peknicova, J., Boubelik, M. and Buckiova, D. (2004). Body and organ weight, sperm acrosomal status and reproduction after genistein and diethylstilbestrol treatment of CD1 mice in a multigenerational study. *Theriogenology* **61**, 1307-1325.

Lee, Y. M., Rhee, J. S., Hwang, D. S., Kim, I. C., Raisuddin, S. and Lee, J. S. (2008). p53 gene expression is modulated by endocrine disrupting chemicals in the hermaphroditic fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **147**, 150-157.

Liu, D., Matzuk, M. M., Sung, W. K., Guo, Q. X., Wang, P. and Wolgemuth, D. J. (1998). Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nature Genetics* **20**.

Lopez-Casas, P. P., Mizrak, S. C., Lopez-Fernandez, L. A., Paz, M., de Rooij, D. G. and del Mazo, J. (2012). The effects of different endocrine disruptors defining compound-specific alterations of gene expression profiles in the developing testis. *Reproductive Toxicology* **33**, 106-115.

Lorbeck, M. T., Singh, N., Zervos, A., Dhatta, M., Lapchenko, M., Yang, C. and Elefant, F. (2010). The histone demethylase Dmel\Kdm4A controls genes required for life span and male-specific sex determination in *Drosophila*. *Gene* **450**, 8-17.

Maaroufi, K., Chekir, L., Creppy, E. E., Ellouz, F. and Bacha, H. (1996). Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicol* **34**, 535-540.

Magee, J. A., Chang, L. W., Stormo, G. D. and Milbrandt, J. (2006). Direct, androgen receptor-mediated regulation of the FKBP5 gene via a distal enhancer element. *Endocrinology* **147**, 590-598.

Martin, P. M. D. and Keen, P. (1978). Occurrence of zearalenone in raw and fermented products from Swaziland and Lesotho. *Sabouraudia-Journal of Medical and Veterinary Mycology* **16**, 15-22.

Meistrich, M. L., Mohapatra, B., Shirley, C. R. and Zhao, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* **111**.

Minervini, F., Giannoccaro, A., Cavallini, A. and Visconti, A. (2005). Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. *Toxicology Letters* **159**, 272-283.

Minervini, F. and Dell'Aquila, M. E. (2008). Zearalenone and Reproductive Function in Farm Animals. *International Journal of Molecular Sciences* **9**, 2570-2584.

Mirocha, C. J., Robison, T. S., Pawlosky, R. J. and Allen, N. K. (1982). Distribution and residue determination of H-3-labeled zearalenone in broilers. *Toxicology and Applied Pharmacology* **66**, 77-87.

Moller, H. (2001). Trends in incidence of testicular cancer and prostate cancer in Denmark. *Human Reproduction* **16**, 1007-1011.

Nantel, F., Monaco, L., Foulkes, N. S., Masquillier, D., LeMeur, M., Henriksen, K., Dierich, A., Parvinen, M. and SassoneCorsi, P. (1996). Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature* **380**, 159-162.

Olsen, M., Malmlof, K., Pettersson, H., Sandholm, K. and Kiessling, K. H. (1985). Plasma and urinary levels of zearalenone and alpha-zearalenol in a prepubertal gilt fed zearalenone. *Acta Pharmacologica Et Toxicologica* **56**, 239-243.

Olsen, M., Pettersson, H., Sandholm, K., Visconti, A. and Kiessling, K. H. (1987). Metabolism of zearalenone by sow intestinal-mucosa in vitro. *Food and Chemical Toxicology* **25**, 681-683.

Park, S. Y. and Jameson, J. L. (2005). Minireview: Transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology* **146**.

Peknicova, J., Kyselova, V., Buckiova, D. and Boubelik, M. (2002). Effect of an endocrine disruptor on mammalian fertility. Application of monoclonal antibodies against sperm proteins as markers for testing sperm damage. *American Journal of Reproductive Immunology* **47**, 311-318.

Peknicova, J., Chladek, D. and Hozak, P. (2005). Monoclonal antibodies against sperm intra-acrosomal antigens as markers for male infertility diagnostics and estimation of spermatogenesis. *American Journal of Reproductive Immunology* **53**, 42-49.

PerezMartinez, C., Garcialglesias, M. J., FerrerasEstrada, M. C., BravoMoral, A. M., EspinosaAlvarez, J. and EscuderoDiez, A. (1996). Effects of in-utero exposure to zeranol or diethylstilboestrol on morphological development of the fetal testis in mice. *Journal of Comparative Pathology* **114**, 407-418.

Placinta, C. M., D'Mello, J. P. F. and Macdonald, A. M. C. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* **78**, 21-37.

Poongothai, J., Gopenath, T. S. and Manonayaki, S. (2009). Genetics of human male infertility. *Singapore Medical Journal* **50**, 336-347.

Prelusky, D. B., Scott, P. M., Trenholm, H. L. and Lawrence, G. A. (1990). Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy-cows. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* **25**, 87-103.

Qin, C. H., Singh, P. and Safe, S. (1999). Transcriptional activation of insulin-like growth factor-binding protein-4 by 17 beta-estradiol in MCF-7 cells: Role of estrogen receptor-Sp1 complexes. *Endocrinology* **140**.

Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W. and Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**, 856-862.

Rao, M. K., Pham, J., Imam, J. S., MacLean, J. A., Murali, D., Furuta, Y., Sinha-Hikim, A. P. and Wilkinson, M. F. (2006). Tissue-specific RNAi reveals that WT1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis. *Genes & Development* **20**, 147-152.

Reis, A. B., Araujo, F. C., Pereira, V. M., Dos Reis, A. M., Santos, R. A. and Reis, F. M. (2010). Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility. *Journal of Molecular Histology* **41**, 75-80.

Ruhr, L. P., Osweiler, G. D. and Foley, C. W. (1983). Effect of the estrogenic mycotoxin zearalenone on reproductive potential in the boar. *American Journal of Veterinary Research* **44**, 483-485.

Russell, L. (1977). Movement of spermatocytes from basal to adluminal compartment of rat testis. *American Journal of Anatomy* **148**, 313-328.

Safe, S. H. (2000). Endocrine disruptors and human health - Is there a problem? An update. *Environmental Health Perspectives* **108**, 487-493.

Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**.

Salzberg, Y., Eldar, T., Karminsky, O.-D., Itach, S. B.-S., Pietrokovski, S. and Don, J. (2010). Meig1 deficiency causes a severe defect in mouse spermatogenesis. *Developmental Biology* **338**.

Sharpe, R. M. and Skakkebaek, N. E. (1993). Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* **341**, 1392-1395.

Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E. and Main, K. M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction* **16**, 972-978.

Strasser, A., O'Connor, L. and Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annual Review of Biochemistry* **69**.

Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J. and Frenette, G. (2005). Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Molecules and Diseases* **35**, 1-10.

Tepla, O., Peknicova, J., Koci, K., Mika, J., Mrazek, M. and Elzeinova, F. (2006). Evaluation of reproductive potential after intracytoplasmic sperm injection of varied human semen tested by antiacrosomal antibodies. *Fertility and Sterility* **86**, 113-120.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.

Toppari, J., Larsen, J. C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L. J., Jegou, B., Jensen, T. K., Jouannet, P., Keiding, N. et al. (1996). Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives* **104**, 741-803.

Tsakmakidis, I. A., Lymberopoulos, A. G., Alexopoulos, C., Boscos, C. M. and Kyriakis, S. C. (2006). In vitro effect of zearalenone and alpha-zearalenol on boar sperm characteristics and acrosome reaction. *Reproduction in Domestic Animals* **41**, 394-401.

Tyler, C. R., Jobling, S. and Sumpter, J. P. (1998). Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology* **28**, 319-361.

van Lipzig, M. M. H., ter Laak, A. M., Jongejan, A., Vermeulen, N. P. E., Wamelink, M., Geerke, D. and Meerman, J. H. N. (2004). Prediction of ligand binding affinity and orientation of xenoestrogens to the estrogen receptor by molecular dynamics simulations and the linear interaction energy method. *Journal of Medicinal Chemistry* **47**, 1018-1030.

Verhoeven, G., Willems, A., Denoet, E., Swinnen, J. V. and De Gendt, K. (2010). Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **365**.

Vermes, I., Haanen, C., Steffensnacken, H. and Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein-labeled annexin-V. *Journal of Immunological Methods* **184**.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. and Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* **36**, 131-149.

Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J. V., Brandt, I. and Vethaak, A. D. (2000). Health effects of endocrine-disrupting chemicals on

wildlife, with special reference to the European situation. *Critical Reviews in Toxicology* **30**, 71-133.

WHO (2010). World Health Organization laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition. Geneva, Switzerland. (ISBN 978 92 4 154778 9)

Wolgemuth, D. J. (2008). Function of cyclins in regulating the mitotic and meiotic cell cycles in male germ cells. *Cell Cycle* **7**.

Wunsch, A., Strothmann, K., Simoni, M., Gromoll, J., Nieschlag, E. and Luetjens, C. M. (2004). Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 (Eps8) expression in maturing testis. *Asian Journal of Andrology* **6**, 195-203.

Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, (eds E. Knobil and J. D. Neil), pp. 189-317. New York: Raven Press.

Yang, H. Y., Wang, G. X., Liu, J. L., Fan, J. J. and Cui, S. (2007). Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice. *Reproductive Toxicology* **24**, 381-387.

Yuan, H., Deng, Y. T., Yuan, L. Y., Wu, J., Yuan, Z. H., Yi, J., Zhang, M., Guo, C. Z., Wen, L. X., Li, R. F. et al. (2010). Gynostemma pentaphyllum protects mouse male germ cells against apoptosis caused by zearalenone via Bax and Bcl-2 regulation. *Toxicology Mechanisms and Methods* **20**, 153-158.

Zhang, Z., Shen, X., Gude, D. R., Wilkinson, B. M., Justice, M. J., Flickinger, C. J., Herr, J. C., Eddy, E. M. and Strauss, J. F., III. (2009). MEIG1 is essential for spermiogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**.

Zheng, Y. H., Rengaraj, D., Choi, J. W., Park, K. J., Lee, S. I. and Han, J. Y. (2009). Expression pattern of meiosis associated SYCP family members during germline development in chickens. *Reproduction* **138**, 483-492.

Internetové zdroje:

Scientific Committee on Food (2000). Opinion on Fusarium Toxins - Part 2: Zearalenone (ZEA) [online]. Stav k 27.8. 2012. Dostupné na:

http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf

DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System Technical Bulletin, Promega [online]. Stav k 27.8. 2012. Dostupné na:

<http://www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/deadend-fluorometric-tunel-system-protocol/>

Technical note: RNA quality control [online]. Stav k 27.8.2012. Dostupné na: http://www.sabiosciences.com/newsletter/Pathways_Fall_2005.pdf