

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

---

Studijní program: Analytická chemie



**Mgr. Tereza Bosáková**

**Multidisciplinární charakterizace interakcí mezi estrogenními  
hormony a jejich receptory při kapacitaci spermií**

Multidisciplinary characterization of interactions between oestrogen hormones  
and their receptors during sperm capacitation

Disertační práce

Školitel: Doc. RNDr. Kateřina Komrsková, Ph.D.

Školitel-konzultant: Doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Praha, 2022

**Prohlášení:**

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, 12. 2. 2022

.....

Mgr. Tereza Bosáková

Tato disertační práce vznikla na základě výsledků získaných v letech 2017 až 2021 během mého doktorského studia na Katedře analytické chemie a Katedře zoologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy a ve Skupině reprodukční biologie v Biotechnologickém ústavu AV ČR, Biocev. Výzkum byl podporován grantem Univerzity Karlovy GAUK (693118) a projektem SVV 260560 a grantem GAČR (GA-18-11275S a GC-20-20217J).

Školitel:

Doc. RNDr. Kateřina Komrsková, Ph.D.  
Katedra zoologie  
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova  
Skupina reprodukční biologie  
Biotechnologický ústav AV ČR, BIOCEV

Školitel-konzultant:

Doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.  
Katedra analytické chemie  
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova  
Ústav soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN  
1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova

**Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Kateřině Komrskové, Ph.D. za odborné vedení, veškeré rady, připomínky, ochotu a trpělivost během celého mého studia. Ráda bych poděkovala i svému školiteli-konzultantovi Doc. RNDr. Radomíru Čabalovi, Dr. za cenné rady a konzultace. Disertační práci bych ráda věnovala svému dědečkovi.

Předkládaná disertační práce je založena na následujících vědeckých pracích, které byly publikovány v mezinárodních impaktovaných časopisech. Práce jsou seřazeny chronologicky.

- I. **Bosakova, T.**; Tockstein, A.; Sebkova, N.; Simonik, O.; Adamusova, A.; Albrechtova, J.; Albrecht, T.; Bosakova, Z.; Dvorakova-Hortova, K.: *New Insight into Sperm Capacitation: A Novel Mechanism of 17 $\beta$ -Estradiol Signalling*. Int. J. Mol. Sci. 2018, 19(12), 4011.
- II. **Bosakova, T.**; Tockstein, A.; Sebkova, N.; Cabala, R.; Komrskova, K.: *Kinetic Model of the Action of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol on the Capacitation of Mouse Sperm, Monitored by HPLC-MS/MS*. Catalysts. 2020, 10, 124.
- III. **Bosakova, T.**; Tockstein, A.; Bosakova, Z.; Komrskova, K.: *Kinetic Study of 17 $\alpha$ -Estradiol Activity in Comparison with 17 $\beta$ -Estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol*. Catalysts. 2021, 11, 634.
- IV. **Bosakova, T.**; Tockstein, A.; Šanovec, O.; Komrskova, K.: *Comparative study of 17 $\alpha$ -estradiol mechanism during capacitation of mouse and rat sperm*. V přípravě.

Experimentální výsledky byly prezentovány i formou plakátového sdělení a přednášek na mezinárodních konferencích.

- I. *32<sup>nd</sup> International Symposium on Chromatography*, Cannes-Mandelieu, Francie; 23.-27. 9. 2018; přednáška a poster.
- II. *15<sup>th</sup> ISC Modern Analytical Chemistry*, Praha, Česká republika; 19.-20. 9. 2019; přednáška.
- III. *49<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, Kjoto, Japonsko; 1.-5. 12. 2019; poster.

# ABSTRAKT

Tato disertační práce byla zaměřena na multidisciplinární charakterizaci interakcí mezi hormony a jejich receptory při kapacitaci spermií, která je finálním krokem maturace spermií u savců a je k oplození vajíčka klíčová. Pro studium byly vybrány tři estrogenní hormony (17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\alpha$ -estradiol ( $\alpha$ E2), 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2)), které jsou součástí znečištění životního prostředí. Tyto hormony, jsou nazývané jako endokrinní disruptory, neboť mohou vyvolat u živočichů poruchy hormonálního systému, a tím negativně ovlivnit fyziologické procesy včetně reprodukce. Nově vyvinutou analytickou HPLC-MS/MS metodou byly sledovány koncentrační změny daných estrogenů (E2,  $\alpha$ E2 a EE2) během časově závislé kapacitace myšič, resp. potkaních, spermií *in vitro*. Pro jednotlivé estrogény byly definovány závislosti koncentrace volného, na spermie nevázaného hormonu na čase kapacitace pro tři vsádkové koncentrace jednotlivých hormonů (200, 20 a 2  $\mu$ g/L). Získané koncentrační hodnoty byly převedeny na hodnoty relativních koncentrací, které byly podrobeny kinetické analýze. Pro interakci jednotlivých hormonů se spermiemi byly navrženy kinetické modely, které byly popsány systémem diferenciálních rovnic s optimalizací rychlostních konstant a molárního poměru. Optimalizace probíhala na základě hledání minima absolutních hodnot rozdílu mezi teoretickými a experimentálně získanými hodnotami relativní koncentrace  $B_t$ . Optimalizované konstanty byly použity pro výpočet teoretických  $B(t)$  křivek a ve všech případech byla dosažena dobrá shoda mezi změřenými a vypočítanými hodnotami relativní koncentrace. Z kinetického hlediska byl pro všechny tři studované hormony pozorován obdobný průběh signalizace, předpokládající autokatalytickou interakci mezi hormonem a cytoplazmatickými receptory spermie za tvorby nestálého aduktu, který se následně rozpadá. Kinetická schémata navržená pro působení jednotlivých hormonů se však lišila ve způsobu jejich transportu skrze cytoplazmatickou membránu. Výsledky této disertační práce prokázaly, že kinetická analýza má potenciál být využita jako nástroj pro sledování a predikci specifických molekulárních mechanismů zapojených do buněčné signalizace v širokém spektru fyziologických i patologických procesů.

## ABSTRACT

This doctoral thesis was focused on the multidisciplinary characterization of interactions between hormones and their receptors during sperm capacitation, which is the final step in sperm maturation in mammals and the key event to achieve egg fertilization. Three oestrogenic hormones ( $17\beta$ -estradiol (E2),  $17\alpha$ -estradiol ( $\alpha$ E2),  $17\alpha$ -ethynylestradiol (EE2)), which are part of environmental pollution, were selected for the study. These hormones are called endocrine disruptors as they can cause disorders of the hormonal system in animals, thereby adversely affecting physiological processes, including reproduction. A new analytical HPLC-MS/MS method was developed for monitoring of concentration changes of oestrogens (E2,  $\alpha$ E2 and EE2) during time-dependent capacitation of mouse and rat sperm *in vitro*. For individual oestrogens, the concentration dependences of free, unbound hormone on the capacitation time were measured for three concentrations of individual hormones (200, 20 and 2  $\mu\text{g/L}$ ). The obtained concentration data were converted into values of relative concentrations, which were subjected to kinetic analysis. Kinetic models were proposed for the interaction of individual hormones with sperm, which were described by a system of differential equations with optimization of rate constants and molar ratio. The optimization was performed on the basis of searching the minimum of absolute values of the difference between the theoretical and experimentally obtained values of the relative concentration  $B_t$ . The optimized constants were used to calculate the theoretical  $B(t)$  curves and a good agreement between the measured and calculated relative concentration values was obtained. From a kinetic point of view, a similar trend was observed for all three studied hormones, assuming an autocatalytic reaction between the hormone and the cytoplasmatic receptors of sperm to form an unstable adduct, which subsequently decomposes. However, the kinetic scheme is proposed to differ in transportation of individual hormones across the sperm cytoplasmic membrane. The results obtained in this doctoral thesis showed that kinetic analysis has the potential to be used as a tool for monitoring and predicting specific molecular mechanisms involved in cell signaling in a wide range of physiological and pathological processes.

**Předmětová hesla:** analytická chemie, separační metody, reprodukční biologie

**Klíčová slova:** endokrinní disruptory, estrogenní hormony, kapacitace spermií, vysokoučinná kapalinová chromatografie, tandemová hmotnostní spektrometrie, kinetická analýza

**Subject words:** analytical chemistry, separation methods, reproductive biology

**Key words:** endocrine disrupting chemicals, oestrogen hormones, sperm capacitation, high-performance liquid chromatography, tandem mass spectrometry, kinetic analysis



# OBSAH

<b>SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ</b> .....	<b>10</b>
<b>ÚVOD</b> .....	<b>12</b>
<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>14</b>
<b>1. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>15</b>
1.1 Endokrinní disruptory .....	15
1.2 Receptory a buněčná signalizace .....	16
1.2.1 Estrogenní receptory .....	17
1.3 Steroidní hormony .....	19
1.3.1 Estrogeny .....	20
1.4 Spermie .....	25
1.4.1 Kvalita spermií .....	26
1.4.2 Kapacitace spermií .....	27
1.5 Stanovení estrogenů .....	29
1.6 Metoda HPLC s MS detekcí .....	31
1.7 Western Blot .....	33
1.8 Kinetická analýza .....	33
<b>2. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>35</b>
2.1 Chemikálie .....	35
2.2 Instrumentace a pomůcky .....	35
2.3 HPLC-MS/MS podmínky .....	36
2.4 Laboratorní zvířata .....	37
2.5 Příprava biologických vzorků .....	37
2.6 SDS-PAGE a Imunoblotting .....	38
2.7 Kinetická analýza .....	39
<b>3. VÝSLEDKY A DISKUZE – KOMENTÁŘE K PUBLIKACÍM</b> .....	<b>40</b>
3.1 Publikace I: Nový mechanismus signalizace 17 $\beta$ -estradiolu v průběhu kapacitace spermií. ....	40
3.2 Publikace II: Kinetický model působení 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu na kapacitaci myších spermií, monitorovanou metodou HPLC-MS/MS. ....	49
3.3 Publikace III: Kinetická studie aktivity 17 $\alpha$ -estradiolu v porovnání s 17 $\beta$ -estradiolem a 17 $\alpha$ -ethynylestradiolem. ....	56
3.4 Připravovaná publikace IV: Srovnávací studie působení 17 $\alpha$ -estradiolu u spermií myší a potkanů během jejich kapacitace. ....	62
<b>4. ZÁVĚR</b> .....	<b>66</b>
<b>5. POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>69</b>
<b>6. PŘÍLOHY</b> .....	<b>90</b>

## SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization)
AR	akrozomální reakce (Acrosomal Reaction)
ACN	acetonitril
ATP	adenosintrifosfát
BIOCEV	Biotechnologické a biomedicínské centrum AV ČR a UK ve Vestci
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumine)
cER	cytoplazmatický receptor (Cytoplasmatic Estrogen Receptor)
CASA	počítačem řízená analýza spermií (Computer Assisted Sperm Analysis)
CE	kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
DAD	detektor diodového pole (Diode Array Detector)
DNS-Cl	dansylchlorid
EDC	endokrinní disruptor (Endocrine Disrupting Chemical)
e-EDC	estrogenní endokrinní disruptor (Estrogene Endocrine Disrupting Chemical)
E1	estron
E2	17 $\beta$ -estradiol
E2-d3	deuteriovaný 17 $\beta$ -estradiol
E3	estriol
EE2	17 $\alpha$ -ethynylestradiol
ELISA	enzymoimunoanalýza (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
ER	intracelulární estrogenní receptor (Estrogen Receptor)
ER-X	typ membránového estrogenního receptoru
ESI	ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
FD	fluorescenční detektor (Fluorescent Detector)
FITC	fluorescein isothiokianát
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GPCR	receptory spřažené s G-proteinem (G Protein-coupled Receptors)
GPER	specifický estrogenní receptor 1 spřažený s G proteinem (G Protein-coupled Estrogen Receptor 1, GPR30)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)

IgG	Imunoglobulin G
IS	vnitřní standard (Internal Standard)
IT	iontová past (Ion Trap)
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie (Micellar Electrokinetic Chromatography)
mER	membránový estrogenní receptor (Membrane Estrogen Receptor)
MRM	mód monitorování více reakcí (Multiple Reaction Monitoring)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
<i>m/z</i>	poměr molekulové hmotnosti a nábojového čísla
nER	jaderný receptor (Nuclear Estrogen Receptor)
ppb	jedna miliardtina (parts per billion)
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PTK	tyrosinkinasa
Q	kvadrupól (Quadrupole)
QqQ	trojitý kvadrupól
SCA	analyzátor kvality spermií (Sperm Class Analyzer)
SCAN	základní sken hmotnostních spekter v určitém rozsahu <i>m/z</i>
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (Sodium Dodecyl Sulfate–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)
SIM	selektivní záznam vybraného iontu (Selected Ion Monitoring)
TOF	průletový analyzátor (Time of Flight)
TyrP	tyrosinová fosforylace (Tyrosine Phosphorylation)
<i>v/v</i>	objem/objem
$\alpha$ E2	17 $\alpha$ -estradiol

# ÚVOD

Estrogenní látky jsou přítomné v organismech a řídí rozsáhlou oblast fyziologických a biochemických procesů v přípravě oplození vajíčka, včetně maturace spermií. Shodné estrogenní látky či jejich farmakologické modifikace se v podobě odpadních produktů dostávají do životního prostředí, kde mohou negativně ovlivňovat fyziologické procesy organismu a působit jako tzv. endokrinní disruptory (EDC). Výskyt těchto látek je důsledkem zvýšené produkce a konzumace řady léčiv (zejména antikoncepčních tablet), podpůrných látek nebo krmiv. Endokrinní disruptory představují toxikologické reprodukční riziko již při velmi nízkých koncentracích (ng - µg/L) [1]. Riziko jejich přítomnosti spočívá v tom, že mohou simulovat chování endogenních hormonů vazbou na jejich receptory [2]. V důsledku jejich působení se může inhibovat sekrece gonadotropin-vylučujícího hormonu a následně luteinizačního hormonu. Tato porucha hormonálního systému vede ke snižování funkce varlat a ovlivnění průběhu spermatogeneze, což je proces tvorby a vývoje spermií, na jejímž konci je zralá, morfologicky diferencovaná a funkční samčí pohlavní buňka [3, 4]. O aktuálnosti této problematiky svědčí i fakt, že kvalita spermioqramu u živočichů, včetně člověka, se zhoršuje [5]. Na základě popsaných negativních účinků těchto látek je důležité mechanismy jejich působení detailně studovat.

Spermie produkované ve varlatech nejsou zralé a po ejakulaci nemohou po vniknutí do samičího pohlavního ústrojí oplodnit vajíčko [6]. Zatímco se spermie pohybují samičím pohlavním ústrojím, podléhají mnohým biochemickým a molekulárním změnám, souhrnně nazývaných zráním neboli maturací, kde zásadním stádiem je tzv. kapacitace [7]. Ke kapacitaci *in vivo* dochází v děloze a vejcovodech a tento proces je aktivován látkami, vylučovanými ze samičího pohlavního traktu. Pouze kapacitované spermie získávají tzv. progresivní motilitu a jsou schopny proniknout obaly vajíčka při procesu známém jako akrozomální reakce (AR) a oplodnit jej [8]. Sledování průběhu kapacitace a AR *in vivo* by nebylo technicky možné, neboť probíhají v reprodukčním traktu samice, a proto se veškeré experimenty tohoto druhu provádí *in vitro* v kultivačním médiu, simulujícím *in vivo* prostředí [9]. Pro kapacitaci *in vitro* musí být spermie nejprve inkubovány v médiu za přesně daných podmínek. Aby bylo možné studovat vliv do média přidaných hormonů, je důležité zjistit, do jaké míry je spermie schopna tyto hormony v průběhu kapacitace vyvazovat a jaká je dynamika tohoto procesu [10].

Tradičně byly estrogény považovány za samičí pohlavní hormony, ale tyto steroidní hormony hrají důležitou roli také u samců. Jsou syntetizovány z androgenních prekurzorů ve varlatech a jejich působení je nezbytné jak během spermatogeneze, procesu, při kterém se tvoří

spermie, tak i pro funkci již zralých spermií. Estrogenní receptory jsou zastoupeny nejen ve varlatech, ale také v mozku a dalších důležitých orgánech [11, 12]. Nejaktivnějším a zároveň nejdůležitějším estrogenem u samic i samců je  $17\beta$ -estradiol (E2), který reguluje rozmnožování u obou pohlaví, účastní se vývoje a dozrávání samičích a samčích gamet i jejich vzájemnou komunikaci před oplozením. Jeho nefyziologicky vysoké dávky mohou způsobit zvýšení apoptózy (buněčné smrti) samčích zárodečných buněk a snížení počtu spermií [13,14]. Jeho stereoisomerem je  $17\alpha$ -estradiol ( $\alpha$ E2), estrogen, který byl považován za biologicky neaktivní. Nedávné studie ukázaly, že  $\alpha$ E2 je schopný se vázat na obě formy jaderných receptorů (ER $\alpha$  a ER $\beta$ ) podobně jako E2, jen s mnohem menší afinitou. Mechanismus jeho působení není ještě zcela objasněn [15]. Mimo fyziologické hormony se mezi estrogeny řadí také syntetický  $17\alpha$ -ethynylestradiol (EE2), který je součástí orálních kontraceptiv a jeho možný negativní vliv na životní prostředí, potažmo člověka, je rozsáhle studovaným tématem [16].

Metody studia vlivu externě přidaných estrogenních hormonů na kapacitaci spermií jsou v literatuře publikovány pouze ojediněle. Pro studium vlivu estrogenů na kapacitaci kančích spermií *in vitro* byly použity imunochemické metody (ELISA, průtoková cytometrie) [17]. Bylo zjištěno, že stimulační nebo inhibiční vliv závisí na době kapacitace, konkrétním estrogenem a konkrétním jedinci. Současně, bylo ukázáno, že některé estrogény jsou schopné přeprogramovat epigenetickou informaci s potenciálně negativním vlivem na samčí (mužskou) reprodukci [18].

## CÍL PRÁCE

Tato disertační práce byla zaměřena na využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS) pro stanovení vybraných estrogenních hormonů v kapacitačním médiu během kapacitace myších a potkaních spermií. Studiu byly podrobeny tři estrogenní hormony, fyziologický hormon E2, jeho stereoisomer  $\alpha$ E2 a syntetický EE2. Všechny vybrané hormony jsou jako endokrinní disruptory přítomny v životním prostředí a v určitých typech potravin, což pro živočichy, včetně člověka, představuje rizikový faktor s potenciálně negativním dopadem na zdraví [19].

Cílem této disertační práce bylo zjistit, zda hormony E2,  $\alpha$ E2 a EE2 mohou se spermiemi během jejich kapacitace interagovat a pokud ano, jaký je mechanismus této interakce. V rámci experimentální části byly myši (resp. potkaní) spermie vystaveny působení jednotlivých hormonů během časově ohraničené kapacitace. Pomocí nově vyvinuté HPLC-MS/MS metody byly následně sledovány koncentrační změny studovaných hormonů v jednotlivých časech kapacitace. Získané výsledky byly podrobeny kinetické analýze a pro působení jednotlivých hormonů byly navrženy příslušné kinetické modely. Získané výsledky ukázaly, že aplikace kinetické analýzy může sloužit jako vhodný nástroj k predikci nebo potvrzení průběhu biologických procesů, které jsou modifikovány externími faktory. Tento nový, multidisciplinární přístup může díky detailnějšímu popisu dynamiky děje přispět k hlubšímu pochopení mechanismu působení estrogenních hormonů na receptory spermií během procesu kapacitace.

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Endokrinní disruptory

Žlázy s vnitřní sekrecí (endokrinní systém) vylučují hormony, které svým specifickým účinkem zajišťují chod organismu. Řídí jeho výživu, růst a reprodukci a podílí se také na udržování homeostázy. Endokrinní disruptory (EDC) jsou environmentální chemické látky s možným negativním vlivem na tyto procesy endokrinního systému živočichů, potažmo i člověka [20]. Důsledkem jejich působení je simulace fyziologických funkcí v těle, nejčastěji hormonální regulace vazbou na receptory hormonů [21]. EDC mohou působit na jedince, populace, ale i na celý ekosystém a následkem bioakumulace v živých tkáních mohou ovlivňovat také jedince jiného živočišného druhu. Evropská komise pro životní prostředí klasifikuje EDC jako „exogenní látky, popř. jejich směsi, které ovlivňují funkce endokrinního systému a následně způsobují vedlejší zdravotní účinky v celém organismu, jeho potomstvu nebo v subpopulacích“ [22].

EDC působí dvěma mechanismy: i) receptor-dependentním efektem a ii) receptor-independentním efektem. V prvním případě se jedná o vazbu EDC na specifický receptor, čímž se mohou aktivovat či blokovat hormonální funkce, které jsou pak kvalitativně i kvantitativně rozdílné od fyziologického stavu [23, 24]. Je také známo, že EDC mohou současně interferovat s různými hormonálními systémy a nahrazovat či modifikovat funkci endogenních hormonů jako jsou estrogény a androgeny. V druhém případě zahrnuje mechanismus účinku interferenci EDC se syntézou, metabolismem nebo transportem hormonů, který je na receptorech nezávislý [25].

U člověka byl zjištěn negativní vliv EDC na fertilitu, reprodukci, vývoj plodu i celkový stav metabolismu [26-28]. U zvířat byly zjištěny negativní vlivy nejen na reprodukci, ale také na chování napříč různými druhy, zahrnujícími ryby, ptáky i savce [29-32]. Příkladem může být feminizace samců ryb či ptáků v blízkosti čistíren odpadních vod nebo jiného vodního zdroje [33].

Počet známých EDC stále roste, chemická povaha EDC je různorodá a zahrnuje širokou škálu látek, jejichž koncentrace se v přírodě zvyšuje působením člověka [34-36]. Mezi EDC se řadí i tzv. estrogenní endokrinní disruptory (e-EDC), estrogény nebo chemikálie, které napodobují vliv konkrétních estrogenních hormonů na organismus. Negativní vliv těchto látek na živočichy je různě silný. E-EDC se do životního prostředí dostávají vypouštěním odpadních vod nebo likvidací živočišného odpadu a zahrnují hormony jak přírodního charakteru, např. E2, tak syntetické povahy, např. EE2. Četné studie uvádějí přítomnost E2 a EE2 v povrchových

vodách v koncentracích ng/L až µg/L [37-44]. Oba uvedené estrogény byly také detekovány ve vzorcích kalů a sedimentů [42, 45-47], což ukazuje na jejich schopnost dlouhodobě přetrvávat v životním prostředí [48]. Ve velmi nízkých koncentracích (ppb) mohou být přítomny i v pitné vodě [49-51].

## 1.2 Receptory a buněčná signalizace

Receptory jsou tvořeny proteiny, které jsou přítomny uvnitř či na povrchu buňky, na kterých je identifikován určitý chemický signál. Chemický signál se tvoří vazbou ligandu (signální molekuly) na specifický receptor, kterým buňka komunikuje s jinou buňkou, případně sama se sebou. Samotnou vazbou pak vzniká kaskáda reakcí, zahrnující transkripci, translaci nebo dokonce změnu morfologie celé buňky. Nejčastěji je pouze jeden ligand schopný vázat se na jeden receptor a zprostředkovat tzv. buněčnou odpověď neboli buněčnou signalizaci.

Existuje několik různých typů buněčných signalizací, závisejících právě na typu ligandu a na jeho vazbě na příslušný receptor, které mohou být rozděleny na autokrinní, synaptické, parakrinní a endokrinní (hormonální). Autokrinní signalizací komunikuje buňka sama se sebou, uvolní tedy ligand, který se váže na její vlastní receptor. Synapticky komunikují sousední buňky, které jsou v blízkém kontaktu. Parakrinní signalizací se popisuje děj mezi buňkami, které od sebe nejsou daleko a při endokrinní signalizaci buňka vyšle ligand (nejčastěji hormon) k receptoru jiné buňky přes krevní oběh [52].

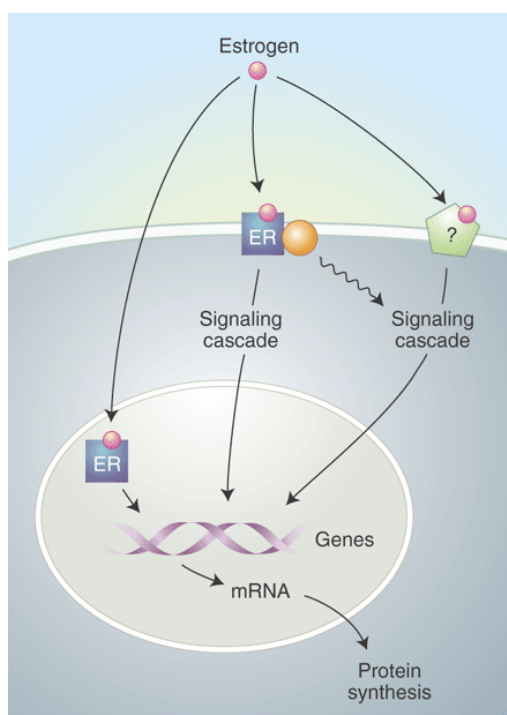
Buněčné receptory se rozdělují na intracelulární a transmembránové, které se dále dělí na receptory spřažené s G-proteinem (GPCRs), spřažené s enzymem a ionotropní. Na jaký receptor se bude vázat jaký ligand je dáno schopností ligandu rozpouštět se ve vodě. Hydrofóbní ligandy mohou prostoupit cytoplazmatickou membránou buňky a reagovat tak s intracelulárními receptory. Naopak hydrofilní ligandy se váží na transmembránové receptory na povrchu buňky.

Intracelulární receptory, cytoplazmatické (cER) nebo jaderné (nER), podle toho, kde jsou v buňce umístěny, působí jako transkripční faktory DNA a po navázání signální molekuly, např. hormonu, vstupují receptory do jádra a regulují transkripci genů [53-55]. Celý tento proces se označuje jako genomický mechanismus účinku hormonu. Genomický mechanismus trvá řádově minuty až hodiny a jde o relativně pomalou reakci. Na druhou stranu, tzv. negenomický, rychlý mechanismus přenosu signálu v cytosolu, který trvá v řádu sekund až minut, se vyskytuje u membránových proteinů [56, 57]. Rozdíl mezi oběma mechanismy je nejenom v rychlosti jejich působení, resp. aktivaci, ale současně i v mechanismu inhibice.



Genomický mechanismus oproti negenomickému vede přes inhibitory RNA-polymerasy (cykloheximid nebo aktinomyocin D). Přes odlišné působení se oba mechanismy mohou navzájem ovlivňovat a pak je výsledný děj dán jejich spolupůsobením [58]. Zjednodušené schéma působení obou mechanismů je ukázáno na obr. 1.

Většina intracelulárních receptorů nepotřebuje tzv. sekundární posly k předání signálu. Naopak u transmembránových receptorů dochází po navázání ligandu k signální transdukci, tzn. k přenosu signálu z receptoru do nitra buňky. Následuje intracelulární signalizace, která zahrnuje sekundární posly, díky kterým dojde ke změně chování buňky [59, 60].



**Obr. 1.** Zjednodušené schéma genomického a negenomického mechanismu interakce estrogenu s receptorem [61].

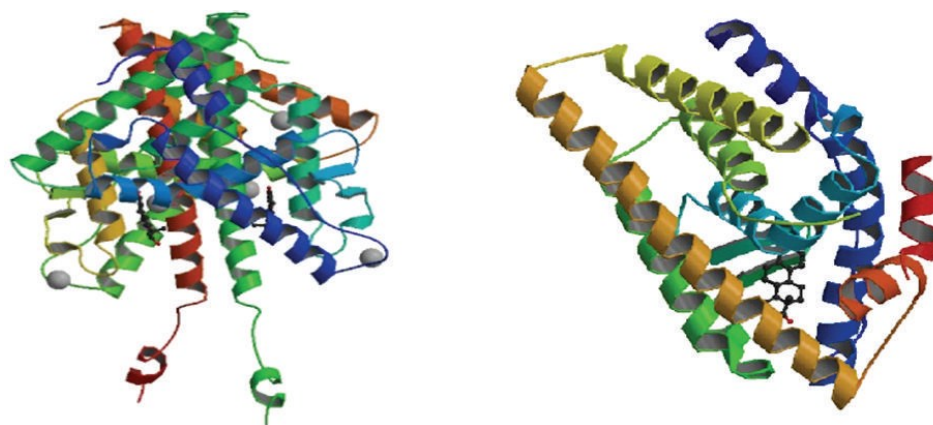
### 1.2.1 Estrogenní receptory

Estrogenní receptory (ER) se řadí mezi steroidní intracelulární receptory, na které se váží pohlavní hormony estrogeny. V tkáních reprodukčních orgánů se nacházejí jak u samic v děloze, vaječnicích a samičích zárodečných buňkách, tak u samců, a to v nadvarlatech, varlatech, ale jsou přítomny i na povrchu spermií [62-67].

Jak bylo popsáno výše, existují dva mechanismy působení estrogenu na ER, a to pomalý genomický mechanismus a rychlý negenomický mechanismus [68]. Primární mechanismus

působení zahrnuje genovou expresi jádra, resp. transkripční aktivitu, v němž se estrogen váže na estrogení receptory a jejich konformační změny moderují míru exprese mRNA (efekt se počítá v řádech hodin po expozici estrogenem). Před vazbou s estrogenem se receptory nacházejí v cytosolu buňky, konkrétně navázané v komplexu s chaperonem HDP90. Hydrofóbní ligandy, jako je např. E2, prochází membránou samovolnou difúzí a mohou se tedy navázat na receptory uvnitř buňky [8, 15]. Navázání estrogenu na receptor uvolní chaperon z komplexu a receptor je tak schopen konformačních změn, které následně umožňují transkripci specifického genu [57, 69]. Tento model spadá do genomické kategorie a vyžaduje čas a transkripční aktivitu buňky. Druhý, tzv. nengenomický mechanismus, není spojen s genovou expresí a předpokládá vznik rychlé signalizační kaskády, která může být vyvolána vazbou estrogenu jak na jaderné estrogení receptory nebo na receptory lokalizované v cytoplazmě či mitochondriích, tak na receptory asociované s cytoplazmatickou membránou [13, 70]. Po navázání estrogenu interagují membránové receptory se specifickými proteiny tak, aby stimulovaly rychlé signály a spouštěly aktivaci několika transdukčních drah. Výsledkem je aktivace transkripčních faktorů, což vede k regulaci genové exprese [71-73].

Jaderné estrogení receptory existují ve dvou formách, a to jako ER $\alpha$  a ER $\beta$ , mající velmi podobnou sekvenci a mechanismus působení, avšak rozdílnou velikost vazebné domény [74, 75]. Vliv estrogenů, a tedy i funkce a exprese estrogeních receptorů je předmětem mnoha studií již po řadu let [76]. Zjistilo se, že oba podtypy receptorů jsou exprimovány v mnoha buňkách a tkáních a řídí klíčové fyziologické funkce v různých orgánových systémech stejně tak jako ve specifických tkáních. ER $\alpha$  má významnější roli na zachování kosterní homeostázy a regulaci metabolismu, naopak ER $\beta$  má hlubší účinek na centrální nervový a imunitní systém [64, 77-79]. Konkrétně pak v samčím reprodukčním traktu jsou obě formy přítomny v somatických i zárodečných buňkách varlete a nadvarlete v závislosti na druhu [80-83]. Uvádí se, že ER $\beta$  je exprimován v rámci celého reprodukčního traktu samců, na rozdíl od ER $\alpha$ , který je specifitější a je exprimován pravděpodobně pouze Leydigovými buňkami varlat a semenotvorným epitelem napříč různými druhy savců [80-83]. Přítomnost ER $\alpha$  a ER $\beta$  a jejich aktivita byly sledovány u rozdílných živočišných druhů za využití široké palety metod, a možné interpretace jsou doposud součástí bádání [84]. Struktura obou forem je ukázaná na obr. 2.

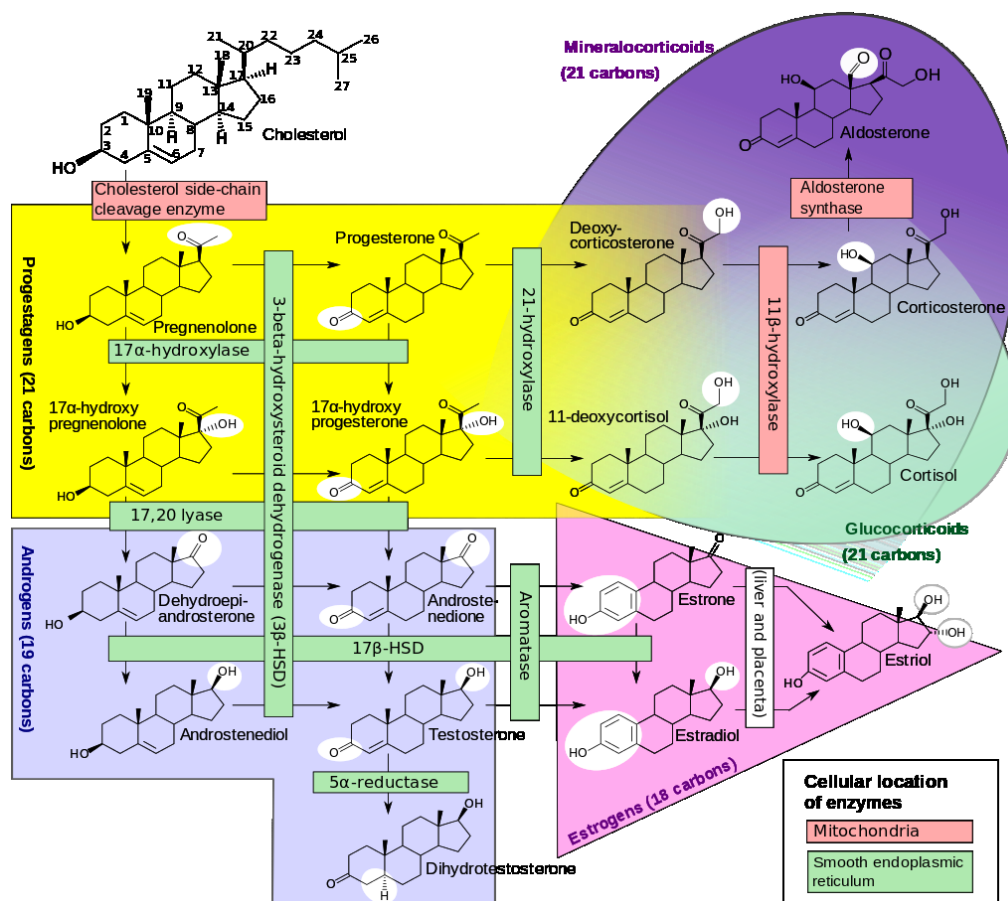


**Obr. 2.** 3D krystalická struktura ER $\alpha$  (vlevo - dimer) a ER $\beta$  (vpravo) s navázaným E2 [67].

Mimo jaderné receptory existují také příklady estrogenních receptorů, nacházejících se na membráně, např. estrogenní receptor 1 spřažený s G-proteinem (GPER), jejichž přítomnost je dobře popsána ve varlatech [85-88]. Estrogeny se na ně však váží s menší afinitou, než na jaderné ER [89-91]. Jak ER, tak GPER, se účastní buněčné signalizace a pravděpodobně působí koordinovaným způsobem. Jednotlivé typy estrogenních receptorů se liší na základě genetických, biologických a biochemických parametrů a vykazují odlišné fyziologické funkce. Kromě toho jsou tyto receptory lokalizovány v různých subcelulárních prostředích, mají jedinečnou vazebnou charakteristiku a odlišně interagují se selektivními ligandy podporujícími specifické reakce [91-96].

### 1.3 Steroidní hormony

Steroidní hormony, ke kterým patří estrogeny, androgeny, gestageny (progestiny) a kortikosteroidy, jsou lipofilní, nízkomolekulární a biologicky aktivní látky. Jsou syntetizovány z cholesterolu, který je tvořen cyklopentaperhydrofenantrenovým skeletem, také označovaným jako steran, procesem zvaným steroidogeneze, který je uveden na obr. 3 [97, 98]. Jednotlivé skupiny steroidů se liší v pozicích funkčních skupin na steranu nebo ve stupni oxidace tohoto skeletu. Funkční skupiny steroidů mohou být navíc jak v ekvatoriální, tak v axiální rovině, díky čemuž jsou biologicky aktivní. Steroidní hormony mohou být rozděleny do dvou skupin, a to na endogenní a exogenní hormony [99].



Obr. 3. Schéma procesu steroidogeneze [97].

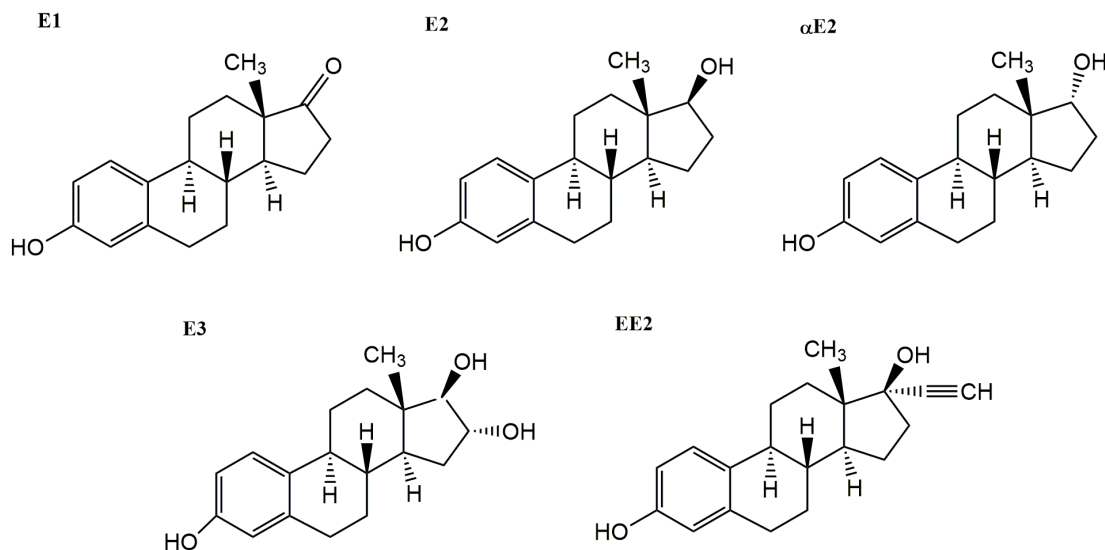
### 1.3.1 Estrogeny

Estrogeny jsou steroidní látky, reprezentující samičí pohlavní hormony, které současně hrají klíčovou roli v reprodukci samic i samců. U samic stimuluje vývoj sekundárních pohlavních znaků a jsou zodpovědné za metabolické, behaviorální a morfologické změny, ke kterým dochází během reprodukčních fází [100]. Způsobují růst a vývoj dělohy, pochvy a vejcovodů, ale i řady dalších tkání. U samců regulují reprodukci, např. transport a koncentraci testikulární kapaliny a anaboličnou aktivitu androgenů [101, 102]. Kromě reprodukce jsou estrogeny důležité i v metabolismu proteinů, tuků, minerálů a cukrů. Během posledních let výzkumu bylo zjištěno, že estrogeny, interakcí s řadou neurotransmiterů v mozku zvířat i lidí, ovlivňují proces poznávání, náladu a mají i protizánětlivý efekt [101, 103-106].

U samic jsou estrogeny syntetizovány z testosteronu primárně ve vaječnících a placentě, u samců naopak v malé koncentraci ve varlatech, ale také v játrech, tukové tkáni, srdci a mozku [107-109]. Jak bylo popsáno v kapitole „1.2.1 Estrogenní receptory“, přítomnost estrogenů

v samčím reprodukčním traktu mnoha savců je stále předmětem diskuzí. U samců jsou estrogény přeměňovány z androgenů pomocí aromatasu cytochromu P450 spermatogenními buňkami všech stádií a somatickými buňkami varlete [110]. Vyšší koncentrace estrogenů byla popsána v reprodukčním traktu a spermatu než v séru [81]. Mnohé studie prokázaly vazbu estrogenů v řadě samčích tkáních, kde tyto vazby na konkrétní receptory způsobují změnu nejen v samčím chování, ale i ve vývoji a funkci reprodukčních orgánů. Podávání estrogenů vyvolalo různé reprodukční patologie, a to zejména během vývoje savců. Studie na transgenních myších s narušenou estrogení signalizací prokázaly klíčový vliv těchto hormonů na fyziologické funkce organismu. Například funkce nadvarlat je závislá na vazbě estrogenů na ER a v případě nefunkčnosti této vazby docházelo k nefyziologickému transportu iontů a resorpci vody, což mělo za následek vznik abnormálních spermií. Nefunkčnost vazby estrogenů na ER či absence aromatasu cytochromu P450 také ovlivňuje tkáně mimo reprodukční trakt, jako je mozek, tuková tkáň, kosterní svaly, kosti nebo kardiovaskulární tkáň samců [111-114].

Estrogény mají tetracyklickou strukturu, skládající se z jednoho fenolického, dvou cyklohexanových a jednoho cyklopentanového kruhu. Navzájem se liší konfigurací na uhlících C16 a C17 cyklopentanového kruhu [115, 116]. Struktury estrogenů jsou uvedeny na obr. 4.



**Obr. 4.** Chemická struktura estrogenů: estron (E1), 17β-estradiol (E2), 17α-estradiol (αE2), estriol (E3) a 17α-ethynylestradiol (EE2).

Ze struktur přírodních estrogenů je patrné, že jde většinou o hydrofobní látky, málo rozpustné ve vodě. Rozpustnost ve vodě, charakterizována koeficientem  $S_w$ , a rozdělovací

koeficient oktanol/voda  $K_{ow}$  jsou považovány za klíčové parametry z hlediska posouzení chování estrogenů v životním prostředí [43, 117, 118]. Sloučeniny s velkou molekulovou hmotností a hodnotami  $\log K_{ow}$  vyššími než 5 jsou považovány za velmi hydrofobní, mají vysoký sorpční potenciál a mohou být primárně odstraněny koagulací [43, 119, 120]. Pro estrogeny se hodnota  $\log K_{ow}$  pohybuje okolo 4 a rozpustnost ve vodě je okolo 13 mg/L. Jejich konjugáty (sulfáty nebo glukuronáty), vzniklé biotransformací, nejsou biologicky aktivní, ale jsou daleko více rozpustné ve vodě než původní estrogeny [121]. Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti estrogenů jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tabulka 1.** Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti estrogenů [120].

hormon	vzorec	bod tání °C	$M_r$	$\log K_{ow}$	pKa	rozpustnost (mg/L)
estron	$C_{18}H_{22}O_2$	258–260	270,4	3,43	10,3	13
estriol	$C_{18}H_{24}O_3$	280–282	288,4	2,45	10,5	13,3
17 $\alpha$ -estradiol	$C_{18}H_{24}O_2$	178–179	272,4	4,01	10,3	13,3
17 $\beta$ -estradiol	$C_{18}H_{24}O_2$	178–179	272,4	3,94	10,6	13
17 $\alpha$ -ethynylestradiol	$C_{20}H_{24}O_2$	182–183	296,4	3,67	10,4	4,8

Hydrofobní charakter estrogenů jim dovoluje prostupovat cytoplazmatickou membránu volnou difúzí a vázat se na hydrofobní povrch proteinů nebo dalších makromolekul. To umožňuje estrogenům vázat se jak na membránové receptory, tak na receptory intracelulární a zajišťuje jim řadu biochemický účinků s různou kinetikou [88, 122, 123].

## 17 $\beta$ -Estradiol

17 $\beta$ -Estradiol je nejaktivnější endogenní estrogen, a tedy i nejdůležitější estrogen u obratlovců. Prakticky veškeré poznatky, které byly popsány v kapitole „1.3.1 Estrogeny“, se týkají hormonu E2. Jak již bylo popsáno, E2 kromě jiného reguluje reprodukci u samic a samců, účastní se vývoje a dozrávání gamet a jejich vzájemné komunikace před oplozením [124]. Biologická aktivita E2 je jako u všech estrogenů závislá na jeho vazbě na jaderné estrogení receptory, kdy je schopný vázat se se stejnou afinitou na obě jeho formy (ER $\alpha$  a ER $\beta$ ) [125].

Interakce mezi E2 a ER byla popsána nejen prostřednictvím jaderných receptorů, ale také membránových (mER) a cytoplazmatických receptorů (cER). Tyto receptory mohou mít stejné složení a jsou pouze translokovány z jádra do membrány nebo mohou představovat nový

typ ER. Kromě ER byla schopnost vázat a přenášet E2 přes cytoplazmatickou membránu popsána i pro neestrogenní, s membránou asociované proteiny. Na koncích transportních receptorů je E2 schopen pronikat skrze cytoplazmatickou membránu dokonce bez další pomoci [61].

Koncentrace E2 a dalších estrogenů je pohlavně i druhově specifická, stejně jako exprese steroidních receptorů [126]. U samců se koncentrace estrogenů v krevní plazmě pohybuje v rozmezí 2-180 pg/mL, konkrétně u potkanů a myši se koncentrace E2 pohybuje v rozmezí 2-25 pg/mL, ale v tekutině *rete testis* (síť kanálků na zadní straně varlete) je 250 pg/mL [127, 128]. Sérová koncentrace E2 u samic potkanů se pohybuje v rozmezí 30-90 pg/mL [129], v ovariální tekutině u potkanů a myši se pohybuje v rozmezí 145-2100 pg/mL v závislosti na fázi estrálního cyklu [126]. Podobně u mužů je koncentrace E2 v krvi z periferních žil okolo 20 pg/mL ale 50krát vyšší (1 ng/mL) je ve spermatické véně [130]. Jeho nefyziologicky vysoké dávky však mohou způsobit zvýšení apoptózy samčích zárodečných buněk a snížení počtu spermií [13, 14].

## 17 $\alpha$ -Estradiol

17 $\alpha$ -Estradiol je přírodní endogenní stereoisomer hormonu E2. Je produkován v malých množstvích v ovariálních folikulárních buňkách u netěhotných žen a následně přeměněn na estron či E2. Avšak na rozdíl od jiných estrogenů není schopen vyvolat růst dělohy [131, 132]. Jeho biologická aktivita, druhově i tkáňově specifická, se pohybuje mezi 1,5 až 5 % aktivity E2 [133-135]. Bylo zjištěno, že  $\alpha$ E2 je schopný vázat se na obě formy jaderných receptorů (ER $\alpha$  a ER $\beta$ , genomický mechanismus), podobně jako E2, jen s mnohem menší afinitou [136]. Stejně tak je schopný vázat se na mER receptory přítomné v mozku (ER-X, nengenomický mechanismus), kdy má tato vazba vliv např. na relaxaci děložních měkkých svalů a aktivitu mozku [137-140]. Zvýšené koncentrační hladiny  $\alpha$ E2 byly nalezeny také v postnatálním a dospělém mozku a nadledvinkách u obou pohlaví myši a hypoteticky je  $\alpha$ E2 v mozku i lokálně syntetizován. Jeho vazba na ER-X pravděpodobně souvisí s autokrinními a parakrinními funkcemi na vyvíjející se i dospělý mozek [139]. V malých koncentracích byl hormon nalezen také v lidské moči či séru [141].

$\alpha$ E2 má řadu bioaktivních vlastností, které zahrnují např. protizánětlivé a antioxidační účinky, ale také schopnost inhibovat aktivitu 5 $\alpha$ -reduktasy, enzymu, který mění testosteron na dihydrotestosteron. Hormon má také silnou neuroprotektivní aktivitu a schopnost chránit buňky před oxidačním stresem [142-145].

Fakt, že pouze myši samci, ale ne kastrování samci či samice, reagovali na léčbu pomocí  $\alpha$ E2 naznačuje, že je hormon pohlavně specifický [15]. Působení  $\alpha$ E2 bylo také studováno v souvislosti s modulací obezity, zprostředkované ovariektomií a úbytku kostní hmoty [133, 146, 147]. Bylo ukázáno, že léčba myších samců hormonem  $\alpha$ E2 prodlužuje jejich průměrnou délku života [15, 133, 148, 149] a zlepšuje toleranci na glukózu [150, 151].

Nové studie ukázaly, že  $\alpha$ E2 hraje důležitou roli v metabolismu savců jako je regulace homeostázy glukózy u obou pohlaví myši a produkce a uvolňování inzulínu u samců, vliv na regulaci glukoneogeneze nebo zlepšení metabolických parametrů u samců myši i potkanů [15, 152]. Mechanismus jeho působení však zůstává předmětem diskuze, i když  $\alpha$ E2 vyvolává podobnou genomickou vazbu a transkripční aktivaci prostřednictvím estrogenních receptorů jako E2 [15].

### **17 $\alpha$ -Ethinylestradiol**

17 $\alpha$ -Ethinylestradiol je syntetický hormon odvozený od přírodního E2, který byl poprvé syntetizován v roce 1938 Inhoffenem a Hohlwegem. Na rozdíl od E2 má v pozici C17 cyklopentanového kruhu ještě navázanou ethynylovou skupinu. V roce 1961 byl poté použit jako první kontraceptivum a díky jeho odolnosti vůči jaternímu odbourávání je dodnes využíván společně s progestiny jako hlavní složka v hormonální antikoncepci [16]. Kromě antikoncepce se mezi další aplikace EE2 v humánní medicíně řadí také léčba např. menopauzálního a postmenopauzálního syndromu, rakoviny prostaty (inhibicí 5 $\alpha$ -reduktasy v epididymální tkáni, snižující hladinu testosteronu), rakoviny prsu u žen po menopauze, osteoporózy nebo estrogenová substituční terapie [16, 153-157].

Právě důsledkem používání antikoncepce se EE2 vylučuje z těla močí, buď ve volné formě nebo jako glukuro- či sulfokojugát, a dostává se tak do odpadních, povrchových a podzemních vod, kde funguje jako e-EDC [158, 159]. Jeho koncentrace se v podzemních a povrchových vodách pohybuje v rozmezí setin až jednotek ng/L, v odpadních vodách se může pohybovat do desítek až stovek  $\mu$ g/L [160, 161]. Kvůli své vysoké odolnosti vůči biodegradaci a tendenci akumulovat se v sedimentu a půdě představuje v životním prostředí velmi vysoké riziko. Substitucí ethynylu na C17 se stává extrémně stabilní vůči oxidaci [162-165]. U lidí je vazebná afinita EE2 k oběma formám ER jeden až dvakrát vyšší než v případě E2 a ukázalo se, že u některých druhů ryb je až pětikrát vyšší. Tato vyšší afinita k receptoru ukazuje, že EE2 může být účinnější estrogenní sloučeninou, pokud jde o vyvolání estrogenní reakce (změna určení pohlaví, oddálení pohlavní dospělosti, snížení sekundárních pohlavních znaků) ve



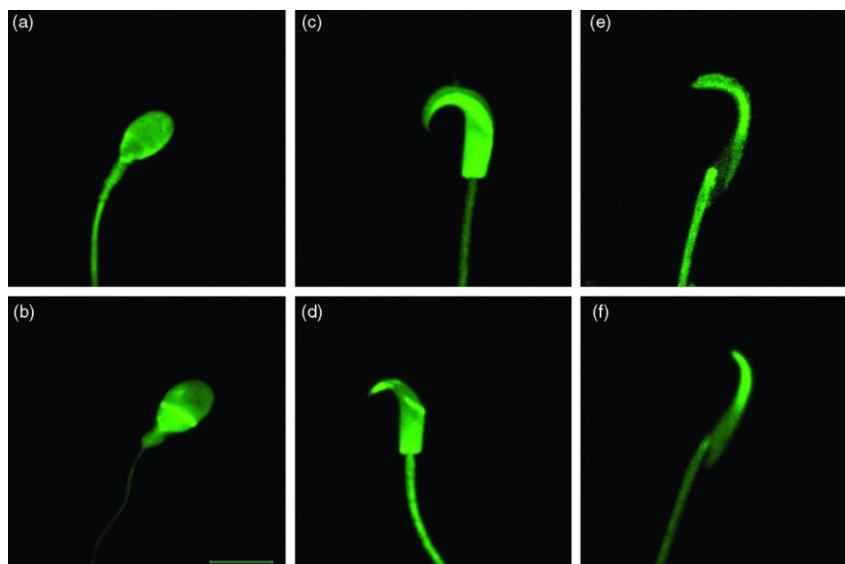
srovnání s přirozeně produkovaným E2, a to již při velmi nízkých koncentracích (ng/L) [43, 166, 167].

## 1.4 Spermie

Samčí pohlavní buňka, spermie, vzniká ve varlatech procesem spermatogeneze, kdy v procesu meiosis z diploidní samčí pohlavní buňky, tzv. spermatogonie, vzniká haploidní spermatocyt a následně v procesu spermateliosy se morfologicky diferencuje druhově specifická funkční pohlavní buňka, spermie. Ta je tvořena hlavičkou, krčkem a bičíkem. Hlavička je složena převážně z jádra a akrozomu, které obklopuje cytoplazmatická membrána. Krček slouží jako spojovací část mezi hlavičkou a bičíkem a bičík, který se rozděluje na hlavní, střední a koncovou část, a slouží k pohybu spermie [168].

Jednou ze zásadních komponent spermie z hlediska interakce spermie a vajíčka je cytoplazmatická membrána obklopující hlavičku spermie. Ta je tvořena zejména fosfolipidovou dvojvrstvou obsahující cholesterol a receptory. Cytoplazmatická membrána hlavičky spermie je strukturována na jednotlivé domény, tzv. kompartmenty, jejichž složení je druhově specifické a prochází změnami během epididymální maturace, ejakulace a následné maturace v reprodukčním traktu samice, zakončené finálním maturačním procesem tzv. kapacitací. V průběhu těchto procesů dochází v cytoplazmatické membráně hlavičky spermie k změnám v obsahu cholesterolu, který určuje její tekutost (viz kapitola „1.4.2 Kapacitace spermie“), v reorganizaci a aktivitě interakčních a vazebných proteinů, jakožto i receptorů včetně ER [7, 169].

Morfologické znaky spermií, včetně tvaru hlavičky a délky bičíku, ale i počtu produkovaných spermií, se u savců liší, a přitom neplatí, že čím větší hmotnost savce, tím delší spermie [170]. I samotný samčí reprodukční trakt má u savců vliv na morfologii spermie [171]. Obecně platí, že šířka a délka hlavičky spermie se mezi různými druhy savců liší kvůli rozdílné velikosti akrozomu a jádra. Rozdíly v bičíku mezi jednotlivými druhy bývají nejčastěji v délce jeho střední a hlavní části [170, 172]. Právě délka těchto částí může být kritická při určování rychlosti pohybu spermií a oplodnění vajíčka jako odpověď na reprodukční chování příslušného druhu, odrážející se v morfologii spermie [173-175].



**Obr. 5.** Odlišné morfologické tvary hlavičky spermie před (a, c, e) a po akrozomální reakci (b, d, f), vizualizované pomocí imunofluorescenčního značení F-aktinu (faloidin – FITC), a, b) lidská spermie, c, d) spermie křečka, e, f) spermie potkana; měřítko = 5  $\mu\text{m}$  [176].

### 1.4.1 Kvalita spermií

Morfologie některých spermií může být patologická, např. příliš velká či malá hlavička, počet hlaviček nebo bičíků, a v takovém případě není spermie schopná oplodnit vajíčko. Morfologie spermií odráží zejména průběh spermatogeneze [177]. Mimo morfologii se kvalita spermií také hodnotí objemem ejakulátu, koncentrací spermií, celkovým množstvím spermií v ejakulátu, motilitou (pohyblivostí) a viabilitou (životaschopnost) spermií [178, 179].

Během dozrávání spermií v samičím reprodukčním traktu, při kapacitaci, procesu nezbytném pro oplodnění vajíčka, který je detailně popsán v kapitole „1.4.2 Kapacitace spermie“, procházejí spermie změnami, zahrnujícími změnu motility [180, 181]. Spermie izolované z *cauda epididymis* (ocas nadvarle) vykazují po kapacitaci *in vitro* progresivní motilitu, která se vyznačuje vysokou rychlostí a symetrickým ohybem bičíku s nízkou amplitudou [182]. Shodně při fyziologickém oplození, spermie po ejakulaci do samičího reprodukčního traktu kapacitují a po izolaci z vejcovodů rovněž vykazují intenzivní a progresivní motilitu [183]. Tato změna motility, označovaná jako hyperaktivace, je nutná pro oplodnění vajíčka a usnadňuje průnik spermie přes extracelulární obal vajíčka tzv. *zona pellucida* [7, 184, 185].

Techniky, které zkoumají pohyb spermie, poskytují podrobné analýzy dynamiky pohybu bičíku i hlavičky a jsou zvláště užitečné pro určení, zda kapacitace u spermií proběhla,

či nikoliv [7, 8]. Ideálním systémem pro hodnocení motility spermií je počítačem řízená analýza spermií známá jako systém CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), která kombinuje mikroskopické pole, videokameru s vysokým rozlišením a počítačový software. Motilita spermie je určena tak, že počítač identifikuje a sleduje každou spermii, která se nachází v mikroskopickém poli na pracovním sklíčku. Během zlomku sekundy je analyzována dráha, kterou spermie urazí a následně je určeno několik kinematických parametrů, např. celková motilita (procento spermií vykazujících jakýkoli pohyb), progresivní motilita (procento spermií pohybujících se rychle a lineárně – špatná < 30 %, uspokojivá 30-59 %, dobrá  $\geq$  60 %), rychlost spermií (na stupnici od 0 – nehybné, až 4 – rychlé) a linearita (procento spermií pohybujících se po přímé dráze) [186, 187].

V dnešní době je na trhu několik systémů CASA, např. Sperm Class Analyzer (SCA), který měří koncentraci a pohyblivost spermií zpracováním snímků, získaných mikroskopii s fázovým kontrastem. Hlavní výhodou je vysoká přesnost a spojení s rozsáhlou databází, která zahrnuje více než 60 různých živočišných druhů [188].

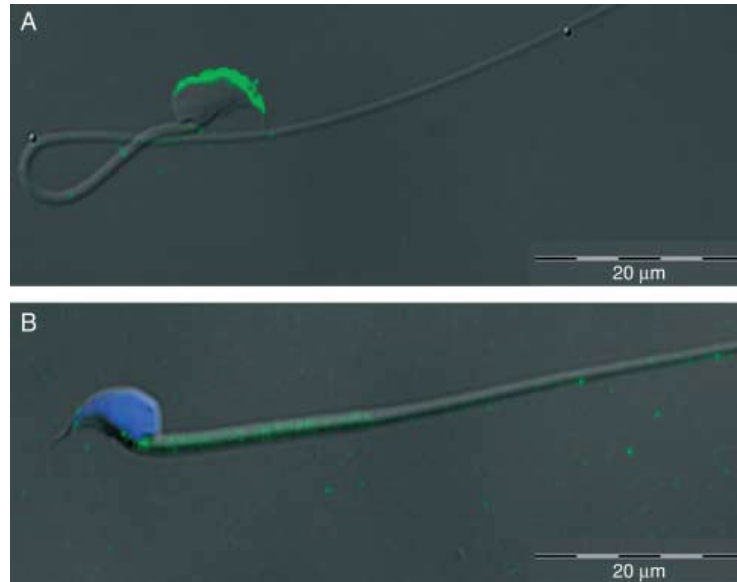
#### 1.4.2 Kapacitace spermií

Kapacitace je finálním dějem v maturaci spermií savců, ke které dochází v reprodukčním traktu samice a je klíčovým dějem, nezbytným pro schopnost spermie oplodnit vajíčko [8]. Zahrnuje kaskádu biochemických i fyziologických změn, mezi které patří nárůst fluidity cytoplazmatické membrány snížením koncentrace cholesterolu (tzv. cholesterolový eflux), otevření iontových kanálů ke zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů a s tím spojené zvýšení intracelulárního pH a fosforylace proteinů, zvláště na tyrosinových zbytcích. *In vivo* probíhá kapacitace hlavně v samičí děloze a vejcovodu, kde spermie setrvává až do ovulace samice, aby došlo k synchronizaci kapacitace a uvolnění vajíčka připraveného k oplodnění [8, 189].

Celý průběh kapacitace je usnadněn látkami nacházejícími se v samičím pohlavním traktu, konkrétně v ovidukální tekutině, např. pomocí přítomného albuminu, který zajišťuje uvolňování cholesterolu z cytoplazmatické membrány hlavičky spermie [190-192]. Během kapacitace se také mění membránový potenciál z přibližně -30 na -60 mV. Tento pokles je způsoben náhlým uvolněním draselných iontů z buňky, které následně ovlivňují kanály pro transport vápenatých iontů [189, 193, 194]. Kanály se otevírají a extracelulární vápenaté ionty vnikají do buňky. Vápenaté ionty jsou nutné pro akrozomální reakci a také fúzi samčí a samičí

membrány během oplození [192]. Následuje tyrosinová fosforylace (TyrP), ovlivňující chování proteinů [192, 195].

TyrP je základní posttranslační modifikací proteinů, která je nezbytná pro modulaci aktivity proteinů i jejich interakčního potenciálu a je klíčová pro přenos signálu v buňce i mezi buňkami [196]. TyrP je zprostředkována protein tyrosinkinasami (PTK), enzymy, které katalyzují přenos  $\gamma$ -fosfátu z adenosintrifosfátu (ATP) na hydroxylovou skupinu tyrosinového zbytku příslušného proteinového substrátu. Reverzní reakce, tedy štěpení fosfát-esterové vazby, která má relativně vysokou vazebnou energii, katalyzuje vznik ATP [197, 198]. Zralé spermie jsou sice diferencované a vysoce kompartmentované buňky, ale postrádají jakoukoli větší transkripční nebo translační aktivitu. Proto je u nich TyrP tak důležitá [189]. Aktivace specifických signálních transdukčních drah vedoucích k TyrP je součástí změn při kapacitaci spermie. Právě zvýšení TyrP je důležitým markerem, který pomáhá určit, zda kapacitace u spermii proběhla, či nikoliv [7, 8]. Nedávná studie ovšem ukázala, že zvýšení TyrP nemusí mít zásadní negativní dopad na plodnost a nedostatek TyrP *in vivo* lze obejít dosud neznámým mechanismem [199].



**Obr. 6.** Imunofluorescenční detekce fosforylace tyrosinu proteinů u epididymálních spermii myši. (A) TyrP-pozitivní hlavička spermie a (B) TyrP-negativní hlavička spermie a pozitivní střední část bičíku; měřítko = 20  $\mu\text{m}$  [200].

Po dokončení kapacitace je zralá spermie schopna projít akrozomální reakcí (AR), která je nezbytná pro oplodnění vajíčka. Intaktní spermie se před AR váží na *zona pellucida* specifickými receptory, které jsou lokalizovány na anteriorní části hlavičky spermie. Vazbou spermie k *zona pellucida* se aktivují specifické GPER-proteiny v cytoplazmatické membráně spermie, které hrají úlohu ve zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů, nutné pro zdárný průběh AR. Při AR dochází k uvolnění lytických enzymů, díky nimž je spermie schopna projít vnějšími obaly vajíčka [189, 192, 201].

*In vitro* lze proces kapacitace uskutečnit za přesně vymezených podmínek, a to pomocí inkubace spermií při teplotě 37 °C v atmosféře s 5% obsahem CO<sub>2</sub> v kapacitačním médiu, které simuluje oviduktální tekutinu a mimo jiné obsahuje albumin a vápenaté ionty [7, 189]. Bylo prokázáno, že kapacitaci *in vitro* ovlivňují EDC, včetně estrogenů, které mohou také zvýšit její rychlost [17, 126, 202-204]. E2 a jeho analogy indukovaly nejen fyziologickou, ale i spontánní AR [205]. Naopak zvýšená koncentrace E2 negativně ovlivňuje, resp. snižuje, úspěšnost AR v přítomnosti progesteronu, který je sekretován v reprodukčním traktu samic a je rovněž součástí ovulační tekutiny. Bylo ukázáno, že E2 snižuje schopnost spermií projít progesteronem indukovanou AR [203, 205] a zapříčiňuje snížení hyperaktivace [206-208] a TyrP [207, 208].

## 1.5 Stanovení estrogenů

Pro identifikaci a stanovení estrogenů (nejčastěji E2 a EE2) v biologických matricích bylo vyvinuto a publikováno několik metod. V minulosti se pro jejich stanovení v tekutých biologických matricích jako je sérum nebo plazma používala zejména immunoanalýza [209, 210]. Tato technika je však časově náročná a trpí zkříženou „cross“ reaktivitou, což znamená, že může vykazovat pozitivní výsledky i pro jiné, podobné analyty a tím vykazovat nízkou správnost a omezenou citlivost [209-211]. Proto metody, založené na bázi reakce s protilátkami, velice často vyžadují oddělené testování pro každý biomarker, to znamená, že každý estrogen musí být kvantifikován zvlášť. Z tohoto důvodu se v analýze estrogenů začaly více uplatňovat analytické metody jako je kapilární elektroforéza (CE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) a zejména plynová chromatografie (GC) a kapalinová chromatografie (HPLC) s různými způsoby detekce. To omezilo či eliminovalo zkříženou reaktivitu, podstatně zvýšilo citlivost stanovení a umožnilo současné stanovení testosteronu vedle EE2 a dalších estrogenů [212-214]. V poslední době bylo vyvinuto i několik biosenzorů, umožňujících rychlý screening E2 v moči [215-218].

GC je obecně rychlá a citlivá metoda, ale v případě estrogenních hormonů o nízké molekulové váze a malé těkavosti je před vlastní analýzou nutná jejich derivatizace. Pro detekci přírodních i syntetických estrogenních hormonů v biologických matricích bylo vyvinuto několik způsobů derivatizace, např. s *N,O*-bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamidem [219]. Derivatizační krok je však časově náročný a může při něm dojít ke ztrátě vzorku. Proto v posledních letech převažuje pro analýzu estrogenních hormonů kapalinová chromatografie, která není limitována těkavostí analytů, ani jejich teplotní nestabilitou. Zejména spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní, potažmo tandemovou hmotnostní spektrometrickou detekcí (LC-MS, LC-MS/MS), se při analýze estrogenních hormonů v biologických matricích uplatňuje nejčastěji, o čemž svědčí řada publikací [214, 220-222]. V podstatně menší míře je používána detekce diodovým polem (DAD) nebo fluorescenční detekce (FD) [223, 224].

V případě LC-MS techniky se pro ionizaci estrogenních hormonů (zejména E2 a EE2) může použít ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) nebo fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), jak v pozitivním, tak negativním ionizačním módu. Při měření v pozitivním ionizačním módu mohou být hormony předem derivatizovány dansylchloridem (DNS-Cl), aby se dosáhlo vyšší účinnosti ionizace [225-227]. To bylo využito např. při stanovení 12 endogenních estrogenů a jejich intaktních konjugátů v krvi a moči s detekcí dansylovaných estrogenů v pozitivním ionizačním módu a detekcí jejich intaktních konjugátů v negativním módu [227]. Komplikujícím faktorem stanovení bývá požadavek na vysokou citlivost. Vzhledem k tomu, že se jedná o látky s hormonální aktivitou, je často nutné je měřit na nízkých koncentračních hladinách, pohybujících se okolo ng/mL, v některých případech i pg/mL. Dalším kritickým bodem při analýze různých reálných vzorků jsou matriční efekty. Přítomnost různých látek či nečistot v matrici může výrazně ovlivnit ionizační účinnost. Zejména při jejich koeluci s cílovým analytem může dojít k snížení nebo naopak zvýšení původního signálu analytu. Takže přečištění vzorku před vlastní analýzou a použití izotopicky značeného vnitřního standardu (IS) jako jsou deuterované sloučeniny (nejlépe deuterovaná verze cílového analytu), umožňují kontrolu a eliminaci matričních efektů [42]. Publikované výtěžnosti pro E2 i EE2 v biologických matricích se pohybovaly v rozmezí 70-130 % pro plazmu, 90-120 % pro rybí tkáň a 75-100 % pro mléčné vzorky, což jsou biologické matrice, ve kterých byly estrogeny sledovány nejčastěji [228].

Vylučování steroidních hormonů produkty, uplatňujícími se v lidské populaci, včetně hospodářské produkce, se považuje za hlavní příčinu výskytu e-EDC v životním prostředí. Jsou přítomny zejména v odpadních vodách, které procházejí čistírnou odpadních vod, kde by mělo dojít k jejich eliminaci. Stupeň odstranění závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech

hormonů, typu čistícího procesu a mikrobiální aktivitě, takže eliminační rychlost je pro jednotlivé estrogény rozdílná (až 90 %), nicméně čistírny odpadních vod v současnosti nejsou schopny odstranit estrogény kompletně [44]. V poslední době se přítomnosti estrogenních hormonů v životním prostředí věnuje mnohem větší pozornost než dříve, zejména kvůli jejich prokázanému negativnímu vlivu na živé organismy, i když jsou přítomny ve velmi nízkých koncentracích, řádově v ng/L. Z důvodu co největší vypovídající hodnoty monitorování estrogenních hormonů zejména E2 a EE2 v životním prostředí, je nutné sledovat estrogenní hormony přednostně v přítoku a odtoku z čistíren odpadních vod, v povrchových vodách, aktivním kalu, sedimentu, ale i v dalších složkách životního prostředí. Většina publikovaných prací se soustředila na výskyt a stanovení estrogenních hormonů ve vodných matricích (povrchová a odpadní voda), zatímco jejich přítomnost v kalu nebo sedimentech, kde se dlouhodobě mohou akumulovat, byla přehlížena, pravděpodobně v důsledku složité matrice [42, 229].

Souhrnný článek z roku 2021 porovnává koncentrace EE2 v povrchových vodách mezi 32 zeměmi na 7 kontinentech. Koncentrace se velmi lišily, ale obecně lze říci, že byly mnohem vyšší v rozvojových zemích než ve vyspělých, navíc dominantním zdrojem ve všech zemích byla blízkost komunální čistírny odpadních vod. Dalším významným zdrojem EE2 znečištění byly odpadní vody z nemocnic a z farmaceutických továren nebo blízkost farem s domácími zvířaty [230]. Pro analýzu estrogenních hormonů se nejčastěji používá metoda HPLC v reversním separačním módu s C18 stacionární fází (výjimečně C8) v kombinaci s binární mobilní fází, složenou z vody nebo vodného pufru a organického modifikátoru, nejčastěji methanolu nebo acetonitrilu [231].

## 1.6 Metoda HPLC s MS detekcí

V dnešní době je HPLC jednou z nejpoužívanějších technik v analytické chemii. Zvolení správného způsobu detekce je, vedle výběru vhodné kolony (stacionární fáze), velmi důležitým parametrem, ovlivňujícím úspěšné provedení analýzy. V poslední době je stále častěji používán hmotnostní spektrometr (MS), založený na principu určení hodnoty  $m/z$  (kde  $m$  je relativní molekulová hmotnost vzniklého iontu a  $z$  je nábojové číslo, tedy počet elementárních nábojů iontů (bez ohledu na polaritu), vznikajících ionizací a následnou fragmentací molekuly analytu. Tyto ionty se pak dělí různými fyzikálními způsoby podle tohoto poměru.

Existuje několik různých typů provedení hmotnostního spektrometru, ale všechny typy se skládají ze tří základních částí: iontového zdroje, analyzátoru a detektoru částic. Iontový

zdroj převádí neutrální molekuly na nabitě částice (kladné nebo záporné ionty), které jsou následně analyzovány v hmotnostním analyzátoru [232]. Samotná separace iontů je prováděna v hmotnostním analyzátoru, ve kterém dochází k separaci iontů na základě poměru  $m/z$ . Pro tento účel se mohou využít magnetický hmotnostní analyzátor, kvadrupólový analyzátor (Q), průletový analyzátor (TOF) nebo iontová past (IT).

Již zmíněný kvadrupólový analyzátor je tvořen čtyřmi tyčemi s hyperbolickým nebo kruhovým průřezem, připojenými ve dvou protilehlých párech ke stejnosměrnému a střídavému napětí. Za přesně zvolené kombinace hodnot těchto napětí putují do detektoru ionty o odpovídajícím poměru  $m/z$ , zatímco ostatní jsou vychýleny a zachyceny na tyčích, a tudíž na detektor nedopadají a nejsou detekovány.

V posledních letech se stále více používají tzv. hybridní analyzátory neboli sériové (tandemové) zapojení dvou a více různých (nebo stejných) analyzátorů, kde dochází ke spojení jejich výhod. Jedním z nich je trojitý kvadrupól (QqQ) [233]. Toto zapojení se skládá ze dvou klasických kvadrupólů (Q), které po vhodně zvoleném napětí slouží jako filtry, propouštějící ionty pouze o definovaném poměru  $m/z$ . Mezi nimi je umístěna kolizní cela (q), která je naplněna kolizním plynem, sloužícím k fragmentaci iontů. Trojitý kvadrupól je vhodný zejména pro kvantitativní analýzu díky svému širokému dynamickému koncentračnímu rozsahu, vysoké citlivosti a vysoké skenovací rychlosti. Naopak mezi jeho nevýhody patří nižší přesnost určení poměru  $m/z$ , nižší rozlišovací schopnost a nižší hmotnostní rozsah [234]. Hmotnostní spektrometr v tandemovém zapojení umožňuje pracovat různými způsoby, v tzv. módech. Tyto módy dokáží podat rozdílné informace o analyzované látce díky odlišné kombinaci užití jednotlivých kvadrupólů. Základní módy, v nichž může trojitý kvadrupól pracovat, jsou: Scan, SIM, Product Ion a MRM mód. MRM mód je nejselektivnější hmotnostní mód, při kterém jsou aktivní všechny tři kvadrupóly a MS tedy pracuje v režimu trojitého kvadrupólu. Prvním kvadrupólem projde zvolený iont o definované hodnotě  $m/z$ , tzv. prekurzorový iont a ten je štěpen v kolizní cele na fragmenty. Třetím kvadrupólem projde pouze fragment – zvolený iont o definované hodnotě  $m/z$ , tzv. produktový iont, a ten je následně detekován. Díky tomuto skenu lze získat vysokou selektivitu, založenou na tzv. přechodu mezi prekurzorovým a produktovým iontem sledované látky [235].



## 1.7 Western Blot

Western Blot je biochemická metoda, která se využívá pro separaci a detekci proteinů. Prvním krokem je elektroforetická separace proteinů, pro kterou se nejčastěji využívá gelová elektroforéza SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS)). Vlivem SDS jsou proteiny denaturovány, získávají záporný náboj a pohybují se tak v elektrickém poli od záporného pólu ke kladnému. Díky rozdílnému pohybu v gelu jsou od sebe jednotlivé proteiny separovány na základě své hmotnosti a již separované a obarvené proteiny jsou následně přeneseny na membránu. Přítomnost daného proteinu je na membráně detekována pomocí tzv. primární protilátky vůči tomuto proteinu. Aby se protilátka navázala pouze na proteiny (resp. na své antigeny) a ne na celou membránu, je nutným krokem inhibice nescifických míst, tedy blokování membrány. Primární protilátka se naváže na protein, následuje promývání membrány a snížení pozadí, které by mohlo detekci ztěžovat. Samotnou primární protilátku není možné vizualizovat, a proto je nutné na ní navázat značenou sekundární protilátku. Přítomnost sekundární protilátky je detekována chemiluminiscenčně, a to v závislosti na značení, které sekundární protilátka nese. Velikost signálu je vyhodnocována srovnáním s naneseným proteinovým markerem, což je komerčně dostupná směs proteinů o známé velikosti [236].

## 1.8 Kinetická analýza

Cílem kinetické analýzy chemických či biochemických reakcí je objasnit jejich reakční mechanismy a prokázat či zamítnout navržený model, tzv. reakční schéma. Vývoj a řešení reakčních schémat kinetickou analýzou rychlostních rovnic, nebo jejich integrovaných forem, se často používá pro homogenní chemické reakce, zvláště když se předpokládá, že součástí celkového mechanismu jsou nestabilní látky, které nelze přímo prokázat [237]. Dokonce i komplexní reakční mechanismy mohou být vyřešeny metodami kinetické analýzy [238, 239]. Bylo však publikováno pouze několik článků týkajících se aplikace kinetické studie na biologické jevy [240-243].

Reakční schéma je výsledkem tvaru a časového průběhu veličiny, užití pro sledování reakce. Reakční schéma je vyjádřeno soustavou kinetických rovnic, popisujících koncentrační změny jednotlivých složek reakce v čase a tento popis je diferenciálního tvaru. Obvykle je možné soustavu diferenciálních rovnic zjednodušit na nejmenší počet proměnných, a tak zavést relativní koncentrace zbylých reakčních komponent, čímž se počet proměnných sníží. Popis navrženého reakčního schématu pomocí diferenciálních rovnic je dán součinem rychlostních

konstant a součinem reagujících komponent. Úhrnný výpis jednotlivých reakčních kroků pomocí těchto kinetických součinů tvoří kostru matematického popisu navrženého schématu. Protože se výsledné kinetické rovnice většinou nedají integrovat v uzavřeném tvaru, musí se soustava integrovat numericky a hledat přitom příslušné rychlostní konstanty kinetických součinů.

Reakční schéma, které poskytne při numerické integraci rychlostní konstanty, které budou platit pro celý koncentrační rozsah (konstanty nezávisí především na zředění a lze jimi popsat průběh reakce v rozsahu několika řádů) lze pokládat za věrohodný důkaz o správnosti uvažovaného schématu. Nevyhovují-li zjištěné rychlostní konstanty po dosazení do kinetických rovnic, (teoretické hodnoty sledované veličiny se značně liší od hodnot experimentálních), pak je nutné schéma zamítnout.

Jaké reakční komponenty se zvolí k popisu reakce není libovolné, v případě reakce hormonů se osvědčilo chromatograficky sledovat koncentraci volného, na spermie nevázaného hormonu na čase kapacitace myších spermií. Jak již bylo popsáno výše, diferenciální rovnice obsahují rychlostní konstanty, na nichž řešení těchto rovnic závisí. Ty konstanty, při kterých řešení co nejlépe popisuje naměřené experimentální hodnoty relativních koncentrací reakčních komponent, se získají jako minimum absolutních hodnot rozdílu mezi experimentální hodnotou sledované veličiny a její teoretickou hodnotou získanou jako řešení diferenciálních rovnic z reakčního schématu. Integrace systému kinetických rovnic se provádí metodou Runge-Kutta 2. řádu s krokem  $h = 10^{-4}$  [244].

## 2. MATERIÁL A METODIKA

### 2.1 Chemikálie

- 17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\alpha$ -estradiol ( $\alpha$ E2), 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) a 17 $\beta$ -estradiol-d3 (E2-d3) (čistota  $\geq$  98,0 %, Sigma – Aldrich, Německo)
- M2 médium s 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonovou kyselinou (HEPES) bez penicilinu a streptomycinu, vhodné pro myší embrya, s 0,4% obsahem BSA (hovězí sérový albumin) (Sigma – Aldrich, Německo)
- acetonitril (čistota LC-MS, Sigma – Aldrich, Německo)
- ethanol (čistota  $\geq$  99,9 %, Sigma – Aldrich, Německo)
- mravenčí kyselina (čistota 98-100 %, Merck, Německo)
- deionizovaná voda (vodivost 1,85  $\mu$ S, Milli-Q Millipore, USA)
- parafinový olej (Nr 8904.1, Carl Roth, Německo)
- Precision Plus Protein™ Dual Color standardy (Bio – Rad, Německo)
- monoklonální protilátka MAB anti-fosfotyrosin P-Tyr-01 (Exbio, Vestec, Česká republika)
- fosfátový pufr PBS (Sigma – Aldrich, Německo)
- kozí protilátka proti myším IgG (Immunoglobulin G) značená peroxidasou (Sigma – Aldrich, Česká republika)
- primární protilátka proti  $\beta$  tubulinu (Abcam, MA, USA)
- kozí protilátka proti králičímu IgG značená peroxidasou (Bio – Rad, Německo)
- barvivo Super Signal West Dura (Thermo Fisher, Česká republika)

### 2.2 Instrumentace a pomůcky

- HPLC Agilent Technologies 1290 Infinity (Agilent Technologies, Německo), sestávající z odplyňovače mobilní fáze, kvartérní pumpy, automatického dávkovače a kolonového termostatu
- MS/MS Triple Quad LC-MS Agilent Technologies 6460 tandemový hmotnostní spektrometr (Agilent Technologies, Německo)
  - sběr dat byl proveden v programu Agilent MassHunter Workstation Acquisition verze B.03.01 (Agilent Technologies, CA, USA)
  - zpracování dat bylo provedeno v programu Agilent MassHunter Qualitative Analysis verze B.03.01 (Agilent Technologies, CA, USA), Microsoft Excel 2010 Professional (Microsoft Co., USA) a OriginPro 8.0 (OriginLab Co., CA, USA)

- kolona Kinetex EVO C18 (100 x 3,0 mm, 2,6  $\mu$ m, Phenomenex, CA, USA)
- analytické váhy APX-100 (Denver Instrument, Německo)
- ultrazvuk Ultrasonic 480 W (Ulsonix, Německo)
- centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf, Německo)
- inkubátor NB-203 (N-BIOTEK, Korea)
- světelný mikroskop Olympus CX 21 (Olympus, Česká republika)
- Flow box EN 12469 Biohazard CleanAir (Telstar, Španělsko)
- Petriho misky 35 mm x 10 mm (Corning, NY, USA)
- Sperm Class Analyzer (SCA) – CASA (Microptic S.L., Španělsko)
- Bürkerova komůrka (Sigma – Aldrich, Česká republika).

### 2.3 HPLC-MS/MS podmínky

Separace byly prováděny na koloně Kinetex EVO C18. Separční metody byly vypracovány s ohledem na separaci sledovaných hormonů v kapacitačním M2 médiu. Po optimalizaci byla pro všechny hormony zvolena jednotná mobilní fáze o složení 50/50 (v/v) voda/acetonitril (ACN) s přídavkem 0,1% mravenčí kyseliny (HCOOH) do obou složek a průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,3 mL/min. Teplota kolony byla udržována na  $21 \pm 0,5$  °C. Nástřík vzorku byl 7,5  $\mu$ L. E2-d3 byl přidáván ke každému vzorku jako vnitřní standard (IS) v konečné koncentraci 25  $\mu$ g/L. Za těchto podmínek byly retenční časy jednotlivých hormonů následující: E2 – 3,1 min, EE2 – 3,7 min,  $\alpha$ E2 – 3,4 min, IS – 3,0 min. Jelikož je M2 komplexní médium, které obsahuje mnoho anorganických a organických látek, některé složky, jako např. BSA (4,0 g/L), mohou ztížit separaci i následnou detekci, a proto byl eluát od 0 do 2,5 min nejprve veden do odpadu a až poté do MS.

Měření MS-MS bylo provedeno v módu monitorování více reakcí (MRM), který poskytuje velmi selektivní detekci, s použitím ESI ionizace v pozitivním režimu (ESI (+)). Jako nebulizační a sušící plyn byl použit dusík.

- Optimalizované podmínky ESI (+) v MRM módu: napětí na kapiláře: 4000 V; tlak nebulizačního spreje: 60 psi; teplota sušícího plynu: 350 °C; a průtok dusíku: 10 L/min.
- pro E2:
  - měřeno v MRM módu při přechodu  $m/z$  255,5  $\rightarrow$  158,9 (napětí fragmentoru: 120 V, kolizní energie: 14 V, parametr dwell: 400 ms)

- pro E2-d3:
  - měřeno v MRM módu při přechodu  $m/z$  258,5 → 158,9 (napětí fragmentoru: 120 V, kolizní energie: 14 V, parametr dwell: 400 ms)
- pro  $\alpha$ E2:
  - měřeno v MRM módu při přechodu  $m/z$  255,5 → 158,9 (napětí fragmentoru: 120 V, kolizní energie: 14 V, parametr dwell: 200 ms)
- pro EE2:
  - měřeno v MRM módu při přechodu  $m/z$  279,1 → 133,0 (napětí fragmentoru: 100 V, kolizní energie: 15 V, parametr dwell: 400 ms)

## 2.4 Laboratorní zvířata

- laboratorní myš domácí, inbrední kmen BALB/c a kmen C57BL/6Nvel (Velaz, Česká republika)
- laboratorní potkan obecný, inbrední kmen Wistar (Velaz, Česká republika)
- Myši, resp. potkani, byly umístěny ve zvěřinci Ústavu molekulární genetiky AV ČR, BIOCEV. Jídlo a voda byly dodávány *ad libitum*. Všechny postupy na zvířatech a všechny experimentální protokoly byly schváleny Výborem pro ochranu zvířat AV ČR (Etické číslo 66866/2015-MZE-17214).

## 2.5 Příprava biologických vzorků

Studium působení estrogenních hormonů na myší spermie bylo v rámci biologického pokusu se spermiemi zaměřeno na tři různé vsádkové (dávkovací) koncentrace (200, 20 a 2  $\mu$ g/L). Nejprve byly připraveny roztoky standardů hormonu v ethanolu o koncentraci 200 mg/L. Z tohoto zásobního roztoku pak byly připraveny pracovní ethanolické roztoky hormonů o koncentraci 20 a 2 mg/L. Biologický vzorek, tedy směs M2 média, ethanolického roztoku standardu jednotlivých hormonů a myších spermií, byl připravován na pracovišti Laboratoře reprodukční biologie, BTÚ AV ČR, BIOCEV následujícím způsobem:

Nejprve byl v laminárním boxu připraven ethanolický roztok hormonu v M2 médiu v poměru 1:1000 za použití zásobní koncentrace hormonů (200, 20 nebo 2 mg/L) tak, aby vznikla finální testovaná koncentrace (200, 20 nebo 2  $\mu$ g/L) a obsah ethanolu ve vzorku byl minimální a konstantní, což je důležité pro zachování viability později přidávaných spermií. Roztok ve zkumavce byl řádně promíchán a následně bylo pipetováno po 100  $\mu$ L do 8 malých

fertilizačních Petriho misek. Napipetovaná směs byla v Petriho misce převrstvena 1,5 mL parafinového oleje, aby se zajistilo vyvazování cholesterolu z membrány spermií při kapacitaci a současně zabránilo vypařování. Všechny vzorky (misky) pak byly vloženy do inkubátoru na 60 min temperaci, probíhající při teplotě 37 °C a pod 5% CO<sub>2</sub> ve vzduchu. V mezičase (během 60 min temperace) byl usmrčen myší samec cervikální dislokací, kterému byl následně vyňat pravý i levý ocas nadvarlete (*cauda epididymis*). Z obou *caudae epididymidae* byl poté odebrán čtvrtý a pátý region (distální část), který obsahuje nejvíce zralých spermií. Pod světelným mikroskopem byla zkontrolována pohyblivost (motilita) spermií. Následně byly *caudae* vloženy do nachystaných fertilizačních Petriho misek s M2 médiem a parafinovým olejem na 10 min do inkubátoru, aby došlo k uvolnění spermií. Po 10 min byla opět zkontrolována motilita spermií pod mikroskopem. Do každé Petriho misky, obsahující již vytemperovaný roztok hormonu v M2 médiu, bylo napipetováno 5 µL uvolněných spermií ( $5 \times 10^6$  spermie/mL) a takto připravené misky byly opět inkubovány za stejných podmínek po různě dlouhou dobu, a to 0, 30, 60, 90, 120, 150 a 180 min, během které probíhala kapacitace spermií. Po uplynutí jednotlivých časů byl ze všech 8 Petriho misek odpipetován roztok M2 média se spermiemi bez parafinového oleje do jedné mikrozkuhavky (Eppendorfy) a poté centrifugován po dobu 10 min při 12 000 otáčkách/min. Tímto způsobem byly odděleny spermie od roztoku a 600 µL získaného supernatantu bylo napipetováno do vialky a připraveno pro následnou analýzu, prováděnou optimalizovanou HPLC-MS/MS metodou. Takto připravený vzorek reprezentoval jeden čas odběru během kapacitace. Blank (referenční vzorek) byl připraven stejným experimentálním způsobem jako vlastní biologický vzorek, avšak bez přídavku myších spermií. Pro každý proměřovaný čas odběru (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 min) bylo tedy nachystáno šestnáct misek, do osmi byly po 60 min temperaci přidávány myší spermie, do osmi zbylých nikoliv. Ty posloužily jako blank. Ke každému vzorku byl před každou analýzou přidán vnitřní standard (E2-d<sub>3</sub>) tak, aby jeho výsledná koncentrace ve vzorku byla 25 µg/L.

## 2.6 SDS-PAGE a Imunoblotting

Pro potvrzení, zda proběhla TyrP, byla použita elektroforéza SDS-PAGE a Imunoblotting, konkrétně Western Blot, pomocí protokolů založených na standardních metodách [245, 246]. Pro tuto metodu byly použity spermie uvolněné z *cauda epididymis* pro kapacitaci. Nejprve byly vzorky pro SDS-PAGE odebrány v 0, 60 a 90 min kapacitace *in vitro* a naředěny fosfátovým pufrům (PBS) tak, aby byla finální koncentrace spermií  $5 \times 10^6$  spermie/mL. Finální koncentrace byla stanovena pomocí Bürkerovy komůrky. Následně byly

pelety spermií resuspendovány ve stejném objemu vzorkovacího pufru pro SDS-PAGE a zahřáté na 97 °C po dobu 3 min. Vzorky obsahující proteiny kapacitovaných spermií ( $5 \times 10^6$  spermie/mL) byly separovány v 5% zaostřovacím a 10% separačním polyakrylamidovém gelu s přísávkem SDS spolu s molekulovými standardy (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards) pro odečet molekulových hmotností proteinů. Po přenesení proteinu na nitrocelulózu membránu byla nespecifická místa proteinu blokována blokovacím roztokem PBS (5% odstředěné sušené mléko a 0,05% Tween 20). Ty proteiny, u kterých proběhla fosforylace na tyrosinových zbytcích, byly identifikovány pomocí primární protilátky, MAB (monoklonální protilátka) anti-fosfotyrosin P-Tyr-01, zředěné 1:300. Primární protilátka byla následně rozpoznána sekundární protilátkou, a to kozí protilátkou proti myšimu IgG (Immunoglobulin G) značenou peroxidasou, ředěnou 1:5000.  $\beta$  tubulin byl detekován primární protilátkou proti  $\beta$  tubulinu, ředěno 1:200. Tato primární protilátka byla detekována kozí protilátkou proti králíčimu IgG značenou peroxidasou, ředěnou 1:3000. Detekce proteinů byla následně provedena pomocí chemiluminiscence za použití barviva Super Signal West Dura. Tyto experimenty byly provedeny čtyřikrát s podobnými výsledky.

## 2.7 Kinetická analýza

Pro samotnou implementaci Runge-Kuttovy metody a následnou optimalizaci rychlostních konstant bylo použito matematické programovací prostředí a programovací jazyk MATLAB [247]. Pro nalezení optimálních rychlostních konstant byla použita procedura *fsolve*, která je standardní součástí prostředí MATLAB a která pomocí aproximace derivací hledá bod, ve kterém zvolená matematická funkce nabývá hodnoty 0 (nebo blízké nule) [248]. Funkce, která byla takto optimalizována, byla daná jako součet absolutních hodnot rozdílů experimentálně změřených relativních koncentrací a hodnot, získaných integrací diferenciálních rovnic. Tato funkce závisí na rychlostních konstantách (prostřednictvím řešení diferenciálních rovnic), vůči kterým byla funkce optimalizována a byly tak nalezeny hledané rychlostní konstanty.

### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE – KOMENTÁŘE K PUBLIKACÍM

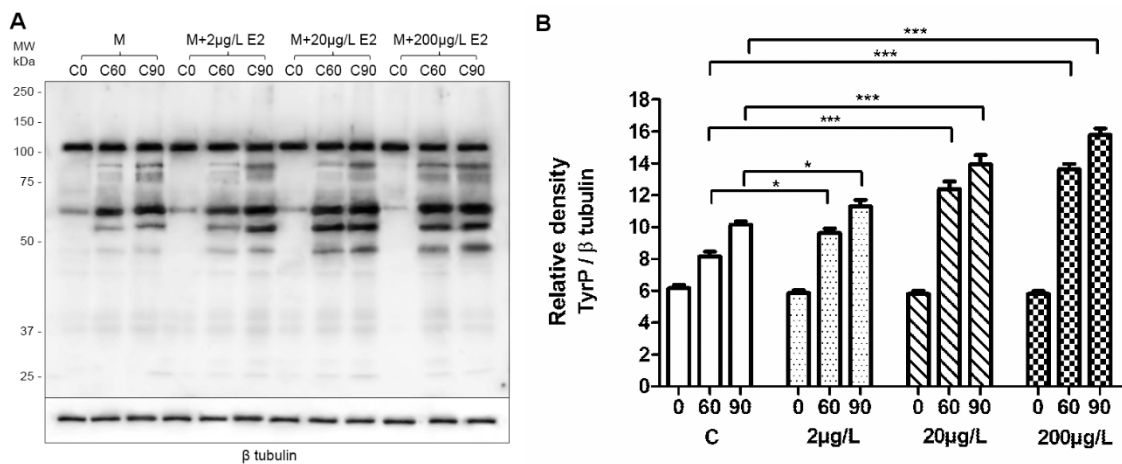
#### 3.1 Publikace I: Nový mechanismus signalizace 17 $\beta$ -estradiolu v průběhu kapacitace spermií.

(New insight into sperm capacitation: A novel mechanism of 17 $\beta$ -estradiol signalling.)

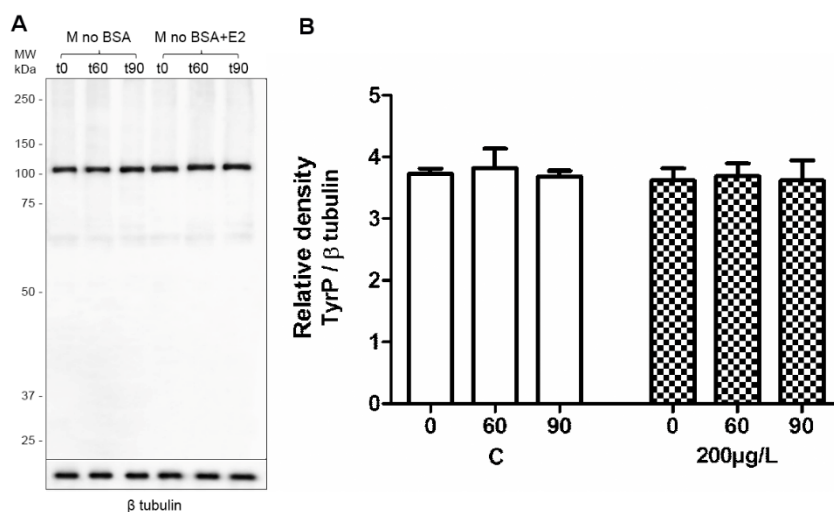
Tato práce se zabývá vlivem 17 $\beta$ -estradiolu (E2) na myší spermie během kapacitace *in vitro*. Jak již bylo popsáno v teoretické části, E2 je endogenní estrogení hormon regulující reprodukci, jejíž součástí je vývoj, zrání a komunikace gamet. Dávky tohoto hormonu vyšší, než fyziologické mohou zvyšovat apoptózu samčích zárodečných buněk a snižovat jejich počet. Přestože je E2 endogenním hormonem, vyskytuje se recentně v životním prostředí jako estrogení endokrinní disruptor (e-EDC), jehož přítomnost v organismech může negativně ovlivňovat hormonální aktivitu buněk, včetně spermií. Prvním cílem této práce bylo objasnit, jaký vliv má přítomnost exogenního E2 na kapacitaci spermií, jejich motilitu a na akrozomální reakci (AR) (modelový organismus myš). Druhým cílem bylo kvantifikovat interakci E2 s estrogenními receptory a navrhnout model hormonálního působení E2 během kapacitace pomocí kinetické analýzy experimentálně získaných dat. Pro experimenty byly použity dva myší kmeny, a to BALB/c a C57BL/6Nvel a získaná data v závislosti na kmenu srovnána.

Během kapacitace spermií dochází k fosforylaci proteinů (kapitola „1.4.2. Kapacitace spermií“), zejména na proteinových tyrosinových zbytcích (TyrP), která je klíčovým indikátorem úspěšně probíhajícího procesu kapacitace (finální maturace spermií). Aby bylo zjištěno, zda kapacitace probíhá i v přítomnosti externě přidaného hormonu E2, byla TyrP proteinů sledována v čase kapacitace 0, 60 a 90 min jak pro vzorky spermií obsahující E2, tak i pro kontroly bez přítomnosti E2, za kapacitujících (viz obr. 7) i nekapacitujících podmínek (viz obr. 8) pomocí metody Western Blot v kombinaci s denzitometrickou analýzou.





**Obr. 7.** Výsledky časově závislé TyrP proteinů pomocí (A) Western Blotu v kapacitujícím prostředí kapacitačního média bez přítomnosti E2 (první sloupec) a za přítomnosti E2 o různých koncentracích (2, 20 a 200 µg/L), (B) denzitometrickou analýzou v kapacitujícím prostředí.



**Obr. 8.** Výsledky časově závislé TyrP proteinů v nekapacitujícím prostředí (médiu bez přítomnosti BSA) pomocí (A) Western Blotu bez přítomnosti E2 (první sloupec) a za přítomnosti E2 o koncentraci 200 µg/L, (B) denzitometrická analýza.

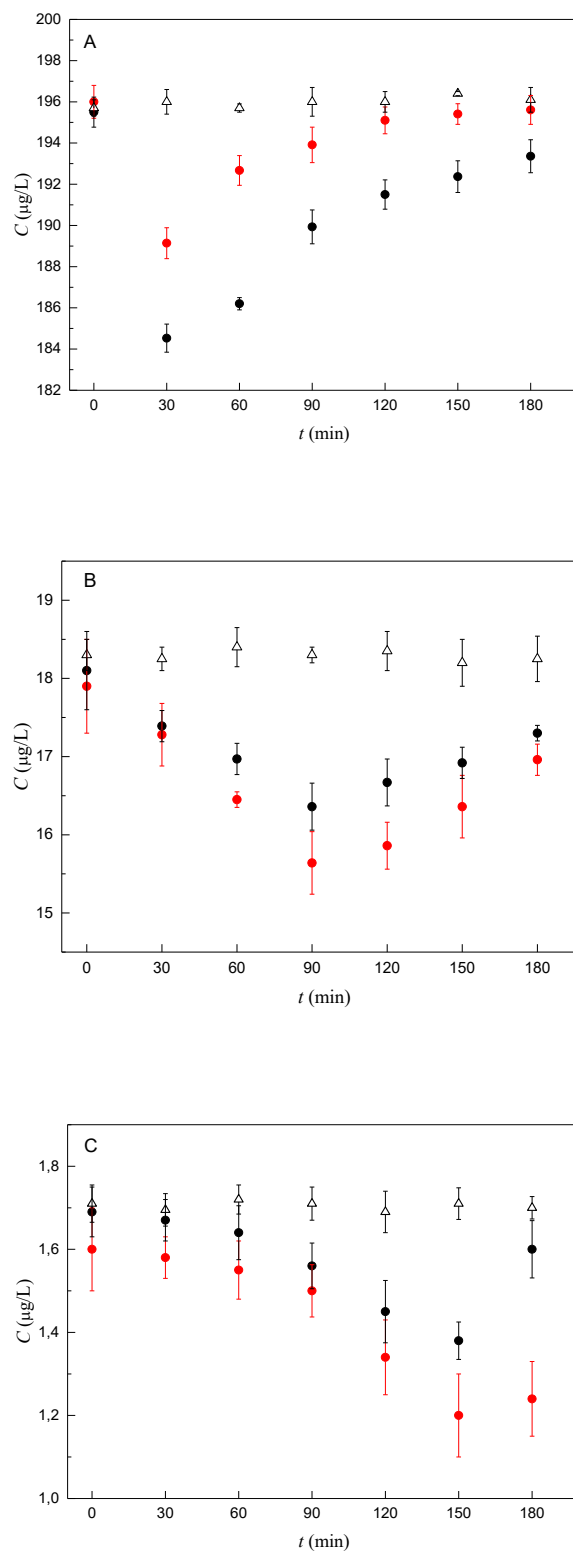
Z obr. 7. je vidět, že se stupeň TyrP proteinů s delším časem (C0, C60 a C90) zvyšuje jak u kontrolního vzorku bez přítomnosti E2, tak i v přítomnosti E2, a dokonce, že zvyšující se koncentrace přítomného E2 podporuje množství proteinů fosforylovaných na tyrozinových zbytcích. Naopak v nekapacitujícím prostředí (v médiu bez BSA) nedochází ke kapacitaci spermii u kontrolního vzorku bez přídatku E2, ani v přítomnosti E2 (obr. 8). Získané analýzy

tudíž potvrdily, že kapacitace myších spermií probíhá i v přítomnosti externě přidaného E2 o různých koncentracích.

Pohyblivost spermií a jejich hyperaktivace byly studovány metodou CASA. Bylo zjištěno, že se parametr bočního posunu hlavičky spermie (ALH) u vzorků s přítomností E2 o testované koncentraci 20  $\mu\text{g/L}$  oproti kontrole mírně zvýšil, naopak parametr křivočaré rychlosti (VLC) se u vzorků s E2 koncentracích 2 a 20  $\mu\text{g/L}$  oproti kontrole mírně snížil. Nicméně změny v daných parametrech se částečně lišily mezi studovanými kmeny myši C57BL/6Nvel a BALB/c.

Pro studium dynamiky vyvazování E2 spermiemi myší během jejich kapacitace *in vitro* byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS). S využitím kolony Kinetex EVO C18 byla vyvinuta metoda, umožňující separaci E2 v kapacitačním M2 médiu (specifikace složení v kapitole „2. Materiál a metodika“). Vzhledem k tomu, že M2 médium obsahuje mimo vysokou koncentraci vápenatých iontů i značné množství BSA (4,0 g/L), bylo při optimalizaci složení mobilní fáze nutné snížit obsah organického modifikátoru – acetonitrilu (ACN) až na 50 obj. %, aby nedocházelo k precipitaci BSA během vlastního separačního procesu. Výsledné složení optimalizované mobilní fáze bylo 50:50 (v/v) ACN/voda s přídavkem 0,1% mravenčí kyseliny (HCOOH) v obou složkách s průtokovou rychlostí 0,3 mL/min. Pro spektrometrickou detekci byla použita ionizace elektrosprejem (ESI) v pozitivním i negativním ionizačním módu a jako citlivější se ukázal být pozitivní mód. Kvantifikaci E2 byla provedena s přídavkem vnitřního standardu (IS) a jako vnitřní standard byl použit deuteriovaný E2 (E2-d<sub>3</sub>). Separace byla monitorována v módu násobných reakcí (MRM), který poskytuje vysokou citlivost stanovení a také dobře eliminuje matriční efekty. Pro kvantifikaci E2 byl použit přechod  $m/z$  255,5  $\rightarrow$  158,9 a pro IS přechod 258,5  $\rightarrow$  158,9. V tomto systému eluoval E2 v čase 3,1 min a E2-d<sub>3</sub> v čase 3,0 min. V optimalizovaných podmínkách byly proměřeny kalibrační závislosti E2. Získané poměry ploch (výšek) píku analytu a IS byly vyhodnoceny metodou lineární regrese, byl určen lineární dynamický rozsah metody (1,1-250  $\mu\text{g/L}$ ), hodnota limitu detekce (LOD) jako 0,3  $\mu\text{g/L}$  a limitu kvantifikace (LOQ) jako 1,1  $\mu\text{g/L}$  (bližší podrobnosti, viz Experimentální část a Appendix B publikace I).

Při vlastním experimentu studia dynamiky interakce hormonu se spermiemi, byly použity tři různé vsádkové koncentrace hormonu E2, a to 200, 20 a 2  $\mu\text{g/L}$  a během časově ohraničené kapacitace (0-180 min) byla sledována koncentrace hormonu, který nebyl vázán na spermie. Výsledky, získané pro dva rozdílné kmeny experimentálních myších samců, jsou uvedeny na obr. 9.



**Obr. 9.** Závislost koncentrace volného, na myši spermie nevázaného E2 na kapacitaci pro vsádkovou koncentraci E2 v M2 médiu 200 (A), 20 (B) a 2 (C)  $\mu\text{g/L}$ , získaná pro dva různé kmene myši (červená kolečka – spermie myšního kmene BALB/c, černá kolečka – spermie myšního kmene C57BL/6Nvel), prázdné trojúhelníky – blank), odchylkové úsečky jsou počítány jako standardní odchylky z pěti pokusů.

Z obr. 9. je patrné, že zatímco hodnoty blanku zůstávaly po celou dobu kapacitace spermií prakticky konstantní, koncentrace E2 se měnila. Nejprve klesala a po dosažení minima, jehož pozice se se snižující vsádkovou koncentrací hormonu posouvala k vyššímu času kapacitace, začala opět stoupat. Tento trend byl pozorovatelný pro oba kmeny myších spermií. Průběh závislostí naznačoval autokatalytický průběh, proto byly z koncentračních hodnot spočítány hodnoty relativních koncentrací, definované jako  $B_t = C_t/C_0$  a ty byly podrobeny kinetické analýze. Vypočítané  $B_t$  hodnoty jsou uvedena v tabulce 2.

**Tabulka 2.** Relativní koncentrace  $B_t$ , vypočítané ze změřených hodnot časově závislé koncentrace  $C_t$ , získané během kapacitace spermií pro tři vsádkové koncentrace E2 a dva kmeny laboratorních myši (viz obr. 9A-C); průměr  $\pm$  směrodatná odchylka průměru.

čas (min)	$B_t$					
	200 $\mu\text{g/L}$		20 $\mu\text{g/L}$		2 $\mu\text{g/L}$	
	BALB/c	C57BL/6N	BALB/c	C57BL/6N	BALB/c	C57BL/6N
0	1,000 $\pm$ 0,003	1,000 $\pm$ 0,003	1,000 $\pm$ 0,028	1,000 $\pm$ 0,023	1,000 $\pm$ 0,050	1,000 $\pm$ 0,070
30	0,965 $\pm$ 0,005	0,944 $\pm$ 0,004	0,965 $\pm$ 0,033	0,958 $\pm$ 0,024	0,987 $\pm$ 0,055	0,988 $\pm$ 0,073
60	0,983 $\pm$ 0,004	0,952 $\pm$ 0,003	0,919 $\pm$ 0,026	0,938 $\pm$ 0,024	0,969 $\pm$ 0,061	0,982 $\pm$ 0,079
90	0,989 $\pm$ 0,005	0,968 $\pm$ 0,005	0,874 $\pm$ 0,031	0,904 $\pm$ 0,025	0,938 $\pm$ 0,055	0,923 $\pm$ 0,071
120	0,995 $\pm$ 0,004	0,979 $\pm$ 0,004	0,886 $\pm$ 0,028	0,921 $\pm$ 0,025	0,838 $\pm$ 0,046	0,858 $\pm$ 0,069
150	0,997 $\pm$ 0,004	0,984 $\pm$ 0,005	0,914 $\pm$ 0,032	0,929 $\pm$ 0,023	0,751 $\pm$ 0,062	0,826 $\pm$ 0,066
180	0,998 $\pm$ 0,005	0,989 $\pm$ 0,005	0,958 $\pm$ 0,028	0,956 $\pm$ 0,022	0,773 $\pm$ 0,058	0,947 $\pm$ 0,074

Bylo navrženo kinetické schéma, které bylo popsáno:

- kinetickým součinem pro počáteční průchod hormonu E2 cytoplasmatickou membránou (rovnice 1a)

$$k_1 n_a (E2) (cER) \quad 1a$$

- kde  $k_1$  je rychlostní konstanta, odpovídající tvorbě aduktu,  $n_a$  je počet míst na povrchu cytoplazmatické membrány,  $(E2)$  a  $(cER)$  jsou molární koncentrace hormonu, resp. cytoplazmatického receptoru

- kinetickým součinem pro tvorbu aduktu, obohaceného autokatalytickou reakcí (rovnice 1b)

$$k_2 (E2) (cER) S \quad 1b$$

- kde  $k_2$  je rychlostní konstanta odpovídající zvyšující se fluiditě cytoplazmatické membrány, podmíněné tvorbou aduktu v cytoplazmě,  $(E2)$  a  $(cER)$  jsou molární koncentrace hormonu, resp. cytoplazmatického receptoru a  $S$  je stupeň aktivity, spojený s autokatalýzou

- kinetickým součinem pro rozpad aduktu (rovnice 1c)

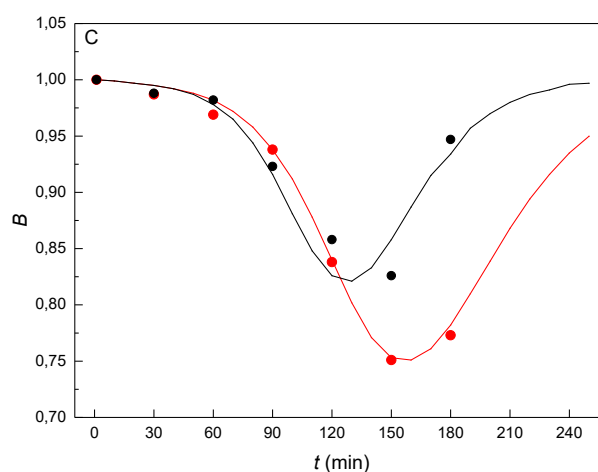
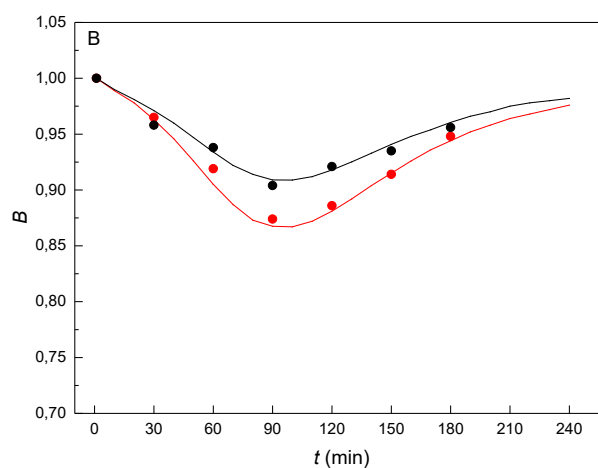
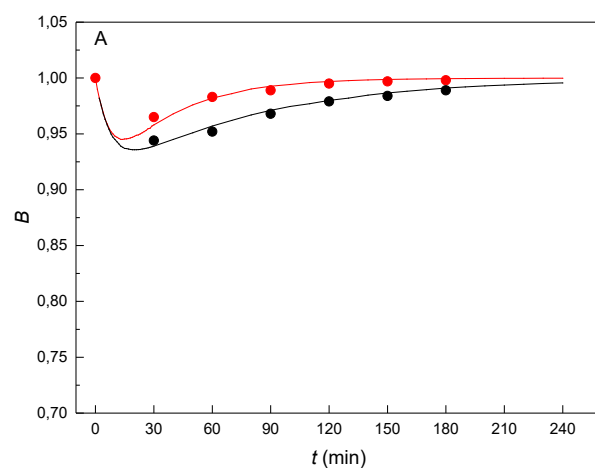
$$k_3 ((E2)/(cER)) \tag{1c}$$

- kde  $k_3$  je rychlostní konstanta odpovídající rozpadu aduktu a  $((E2)/(cER))$  je molární koncentrace aduktu

Rovnice 1a-1c byly přepsány do systému diferenciálních rovnic pro celkové rychlostní konstanty, které byly řešeny numerickou integrací za současné optimalizace rychlostních konstant, následně použitých pro výpočet teoretických  $B(t)$  křivek. Získané hodnoty celkových rychlostních konstant  $K_2$  a  $K_3$  a molárního poměru  $n$  jsou spolu s ředěním  $D$  (vzájemný poměr vsádkových koncentrací) uvedeny v tabulce 3 a průběh  $B(t)$  křivek je znázorněn na obr. 10. Z obr. 10 je vidět velmi dobrá shoda experimentálně získaných  $B_t$  bodů s teoretickým průběhem  $B(t)$  křivek. Detaily sestavení rovnic a jejich řešení jsou uvedeny v publikaci I, v Appendixu A.

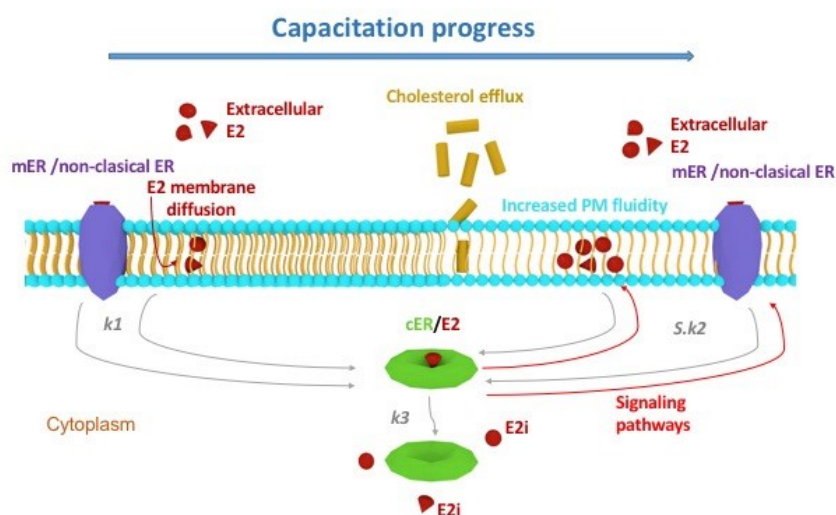
**Tabulka 3.** Vypočítané hodnoty molárního poměru  $n$  a celkových rychlostních konstant  $K_2$  a  $K_3$  pro tři různá zředění  $D$  vsádkových koncentrací hormonu E2, získané pro dva kmeny myší.

konstanty	200 $\mu\text{g/L}$		20 $\mu\text{g/L}$		2 $\mu\text{g/L}$	
	BALB/c	C57BL/6N	BALB/c	C57BL/6N	BALB/c	C57BL/6N
$D$	1	1	0,1	0,1	0,01	0,01
$n$	12	12	1,2	1,2	0,12	0,12
$K_2$	4,0	2,0	4,5	4,0	4,5	5,5
$K_3$	3,0	1,3	4,3	6,0	3,5	6,5



**Obr. 10.** Teoretické  $B(t)$  křivky (červená křivka – BALB/c, černá křivka – C57BL/6Nvel), získané s optimalizovanými parametry  $K_2$ ,  $K_3$  a  $n$  pro tři různá zředění  $D$  (viz tabulka 3) spolu s experimentálně získanými hodnotami  $B_t$  (červená kolečka – BALB/c, černá kolečka – C57BL/6Nvel), vsádková koncentrace E2: (A) 200, (B) 20 a (C) 2  $\mu\text{g/L}$ .

Průběh křivek lze z kinetického hlediska vysvětlit počáteční adsorpcí E2 na specifická centra cytoplazmatické membrány, která je řízena Langmuirovou adsorpční izotermou s následným průnikem hormonu přes cytoplazmatickou membránu do cytoplazmy, kde dochází k vytváření aduktu mezi hormonem a cytoplazmatickými receptory. Tvorba aduktu působí autokatalyticky na cytoplazmatickou membránu směrem k její větší fluiditě. To umožňuje průnik stále většího množství extracelulárního hormonu E2 skrz cytoplazmatickou membránu do cytoplazmy, a tedy k nárůstu vytvářeného aduktu (strmě klesající část křivky). Adukt však není stálý a rozkládá se za uvolnění obou složek (tedy hormonu i receptoru) v cytoplazmě, kde hormon E2 zůstává internalizován ( $E2_i$ ) a nemůže se již nadále účastnit dalších interakcí s receptory (stoupající část křivky). Koncentrace E2 změřené metodou HPLC-MS/MS v sobě zahrnují přítomnost jak extracelulárního, aktuálně přítomného E2, tak i hormonu internalizovaného v cytoplazmě ( $E2_i$ ), avšak nevázaného v aduktu. Schematicky tento děj vystihuje obr. 11.



**Obr. 11.** Zjednodušená interpretace výsledků kinetické analýzy působení E2 na myši spermie během kapacitace. Modrá šipka naznačuje kapacitační proces v čase, při kterém dochází k zvyšování fluidity cytoplazmatické membrány (PM), tzv. cholesterolovému efluxu, typickému ději pro kapacitaci. E2 je extracelulárně přítomný hormon mimo cytoplazmu, mER je membránový receptor, cER je cytoplazmatický receptor,  $E2_i$  je hormon internalizovaný v cytoplazmě a cER/E2 označuje nestálý adukt, vytvořený v cytoplazmě. Adsorpce je řízená Langmuirovou adsorpční izotermou. Rychlostní konstanta  $k_1$  se vztahuje k primární tvorbě aduktu (bez autokatalýzy), tvorba aduktu podmiňuje zvyšování fluidity cytoplazmatické membrány, což umožňuje zrychlující se tvorbu aduktu autokatalytickým krokem, řízeným součinem rychlostní konstanty  $k_2$  a stupněm aktivity  $S$ , rozpad aduktu je řízen rychlostní konstantou  $k_3$ .

Jedním z kritérií spolehlivosti kinetických rovnic je nezávislost rychlostních konstant na koncentračních podmínkách (viz kapitola „1.8 Kinetická analýza“). Stanovené hodnoty optimalizovaných celkových rychlostních konstant  $K_2$  a  $K_3$  splňují tyto podmínky přes dva řády. Správnost použitého modelu dále potvrzují polohy a tvary minim na  $B(t)$  křivkách, které jsou ve shodě s experimentálními hodnotami  $B_i$ . Oblasti kolem minim jsou velmi citlivé na hodnoty rychlostních konstant. Hewitt popsal dva mechanismy průchodu E2 cytoplazmatickou membránou, z nichž jeden je pomalý a druhý rychlý [61]. V navrženém kinetickém modelu probíhá pomalý proces s rychlostní konstantou  $k_1$  současně s rychlým (autokatalytickým) procesem s rychlostní konstantou  $k_2$  násobenou stupněm aktivity  $S$ .



### 3.2 Publikace II: Kinetický model působení 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu na kapacitaci myších spermií, monitorovanou metodou HPLC-MS/MS.

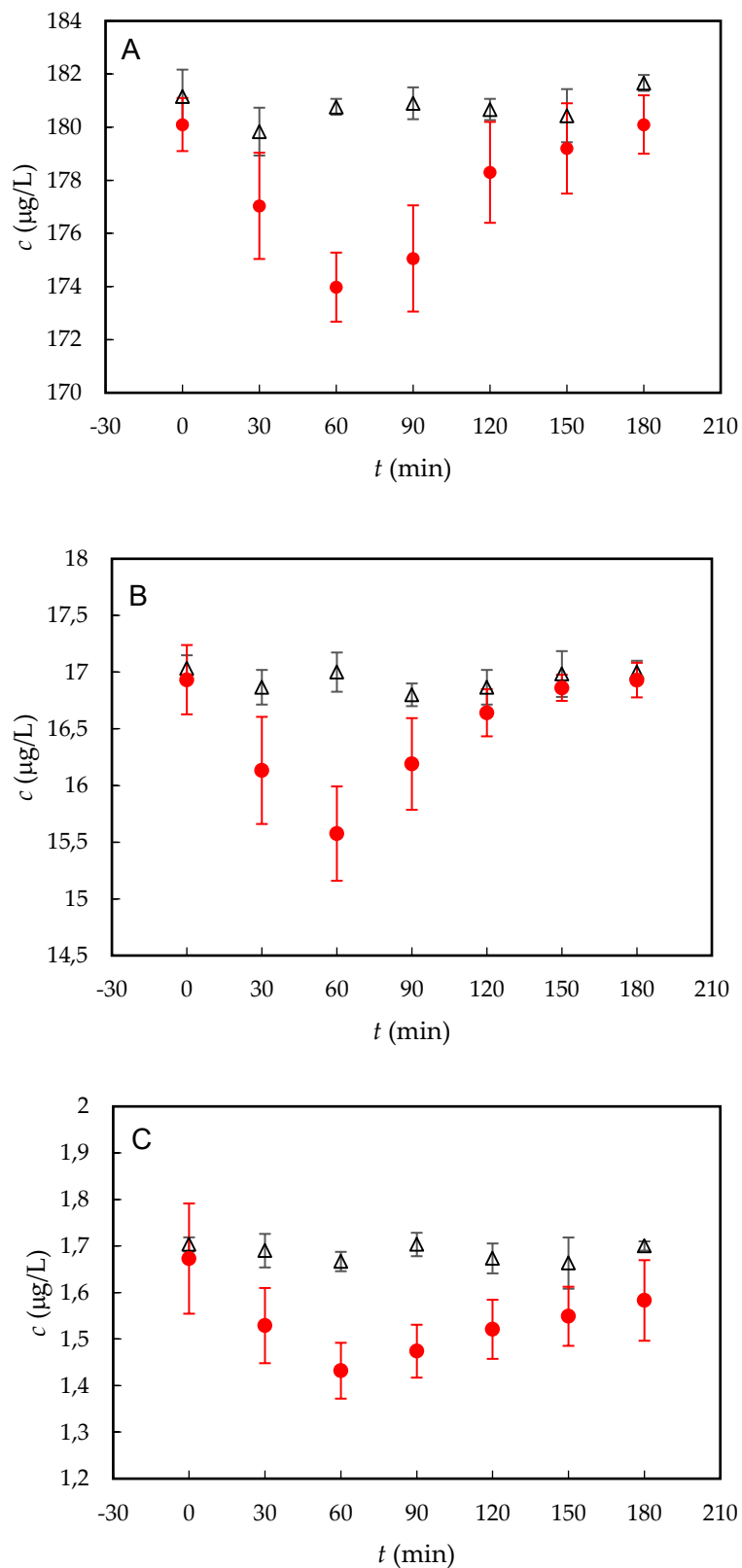
(Kinetic model of the action of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on the capacitation of mouse sperm, monitored by HPLC-MS/MS.)

Na rozdíl od E2 je 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) syntetický estrogen, používaný jako estrogenní složka antikoncepčních pilulek. Je odolný vůči jaternímu odbourávání a je vylučován močí. Chemicky je velmi stabilní, a tudíž představuje zátěž pro životní prostředí, jako látka spadající do skupiny e-EDC s potenciálně negativním dopadem na endokrinní systém živočichů.

Cílem této práce bylo zjistit, zda tento syntetický estrogen může interagovat se spermii během kapacitace, a pokud ano, jak se tento interakční model liší od modelu navrženého pro E2 (modelový organismus myš). Za tímto účelem byla nejprve vyvinuta HPLC-MS/MS metoda pro stanovení EE2 v kapacitačním M2 médiu (specifikace složení v kapitole „2. Materiál a metodika“). Pro separaci byla použita kolona jako v případě E2 Kinetex EVO C18 v kombinaci s mobilní fází 50/50 (v/v) voda/ACN, s přídavkem 0,1% mravenčí kyseliny v obou složkách. Pro kvantifikaci EE2 byl použit přechod  $m/z$  279,1  $\rightarrow$  133,0 a pro E2-d<sub>3</sub> jako IS přechod 258,5  $\rightarrow$  158,9. V tomto systému eluoval E2-d<sub>3</sub> v čase 3,0 min a EE2 v čase 3,7 min. Metoda byla validována a byl určen limit detekce (LOD) jako 0,88  $\mu\text{g/L}$  a limit kvantifikace (LOQ) jako 1,21  $\mu\text{g/L}$ .

V této studii byly použity tři různé vsádkové koncentrace hormonu EE2, a to 200, 20 a 2  $\mu\text{g/L}$  a během časově ohraničené kapacitace (0-180 min) byla sledována koncentrace hormonu, který nebyl spermii vázán. Vzhledem k tomu, že se ve studii s E2 (publikace I) neukázaly velké rozdíly mezi dvěma testovanými kmeny myší (BALB/c a C57BL/6Nvel), byl v této práci použit pouze kmen BALB/c.

Pro všechny tři testované vsádkové koncentrace EE2 vykazovaly vzorky obdobné časové koncentrační závislosti jako v případě E2 (viz obr. 12). Z jednotlivých naměřených koncentrací byly získány hodnoty relativních koncentrací, definovaných jako  $B_t = C_t/C_0$ , které jsou uvedeny v tabulce 4 a které byly následně podrobeny kinetické analýze.



**Obr. 12.** Závislost koncentrace volného, na myší spermie nevázaného EE2, na kapacitaci pro vsádkovou koncentraci EE2 v M2 médiu (A) 200, (B) 20, (C) 2 µg/L (vzorek – červená kolečka, blank – prázdné trojúhelníky), odchylkové úsečky jsou počítány jako standardní odchylky ze tří pokusů.

**Tabulka 4.** Průměrné hodnoty relativní koncentrace  $B_t$ .

čas (min)	$B_t$		
	200 $\mu\text{g/L}$	20 $\mu\text{g/L}$	2 $\mu\text{g/L}$
0	1,000	1,000	1,000
30	0,983	0,953	0,914
60	0,966	0,920	0,856
90	0,972	0,956	0,881
120	0,990	0,983	0,909
150	0,994	0,996	0,926
180	1,000	1,000	0,946

Pokud by se experimentálně získanými  $B_t$  body proložila křivka, vykazovala by autokatalytický charakter, o čemž svědčí dva parametry:

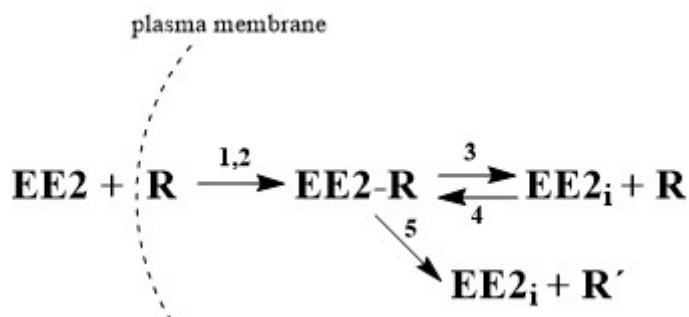
- Směrnice (tangent) závislosti měřené veličiny (koncentrace volného, nevázaného EE2) na čase kapacitace se stává během času (interakce) strmější. To znamená, že rychlost interakce hormonu s receptorem za tvorby aduktu se s časem zvyšuje.
- Adukt je nestálý a následně se rozpadá za uvolnění hormonu, jehož volná koncentrace opět vzrůstá.

Koncept autokatalytického působení hormonu EE2 je založen na faktu, že obdobné chování již bylo popsáno pro hormon E2. To znamená, že prvotní průnik extracelulárního hormonu cytoplazmatickou membránou (krokem bez autokatalýzy) a následná tvorba nestálého aduktu v cytoplazmě vede ke zvýšené fluiditě cytoplazmatické membrány, která se tím stává propustnější pro stále větší množství extracelulárního hormonu (autokatalytický krok). V podstatě jsou hypoteticky možné čtyři možnosti rozkladu nestálého aduktu:

- rozkladem se uvolňuje hormon, který zůstává internalizovaný v cytoplazmě ( $EE2_i$ ), a cytoplazmatický receptor (R), oba schopné dalších interakcí
- rozkladem se uvolňuje aktivní hormon  $EE2_i$ , a inaktivní receptor  $R'$ , neschopný následných interakcí
- rozkladem se uvolňuje inaktivní hormon  $EE2_i'$ , neschopný následných interakcí a aktivní receptor R
- rozkladem se uvolňuje inaktivní hormon  $EE2_i'$  a inaktivní receptor  $R'$

Možnosti c) a d) lze zamítnout vzhledem k experimentálně získaným výsledkům, indikujícím, že na konci interakce hormonu s receptorem se koncentrace hormonu vrací na počáteční hladinu, takže lze uvažovat pouze o možnosti a) a b). Protože v případě a) jsou produktem rozpadu obě složky aktivní, je snadné si představit zpětnou (reversní) rovnováhu

interakce hormonu s receptory v cytoplazmě. Naopak v případě b), vedoucí k inaktivnímu receptoru, je reakce jednosměrná. Obě reakce mohou probíhat současně jako pseudo-rovnovážná reakce. Celý proces je schematicky znázorněn na obr. 13.



**Obr. 13.** Navržené kinetické schéma, kde hormon EE2 reprezentuje extracelulárně přítomný hormon, R reprezentuje aktivní cytoplazmatický estrogenní receptor, EE2-R reprezentuje vzniklý adukt, EE2<sub>i</sub> reprezentuje v cytoplazmě internalizovaný hormon, R' reprezentuje inaktivní cytoplazmatický estrogenní receptor a „plasma membrane“ reprezentuje cytoplazmatickou membránu; 1 a 2 reprezentují rychlostní konstanty tvorby aduktu bez autokatalýzy (1) a s autokatalýzou (2), které probíhají simultánně, 3 a 5 reprezentují rychlostní konstanty rozkladu aduktu a 4 reprezentuje rychlostní konstantu zpětné reakce.

Navržené kinetické schéma je vyjádřené formou diferenciální rovnic 1a-1c, kde je pro jednoduchost vyjádřena: molární koncentrace extracelulárního hormonu EE2 jako  $E$ , molární koncentrace cytoplazmatických receptorů cER jako  $R$ , molární koncentrace interního v cytoplazmě lokalizovaného, hormonu EE2<sub>i</sub> jako  $E_i$ , molární koncentrace aduktu jako  $ER$  a  $\varepsilon$  je relativní koncentrace volného hormonu vně membrány.

$$\frac{-dE}{dt} = E \times R(K_1 + K_2 \times (1 - \varepsilon)) \quad 1a$$

$$\frac{-dR}{dt} = E \times R(K_1 + K_2 \times (1 - \varepsilon)) + K_4 \times E_i \times R - K_3 \times (ER) \quad 1b$$

$$\frac{d(ER)}{dt} = E \times R(K_1 + K_2 \times (1 - \varepsilon)) + K_4 \times E_i \times R - (K_3 + K_5) \times (ER) \quad 1c$$

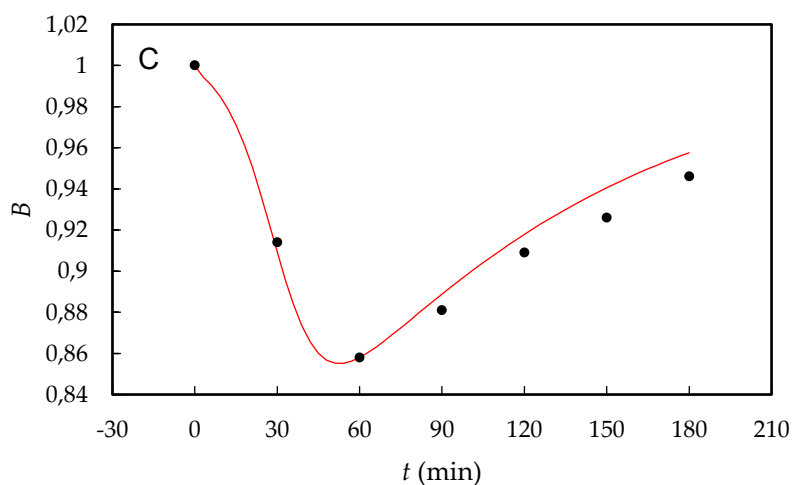
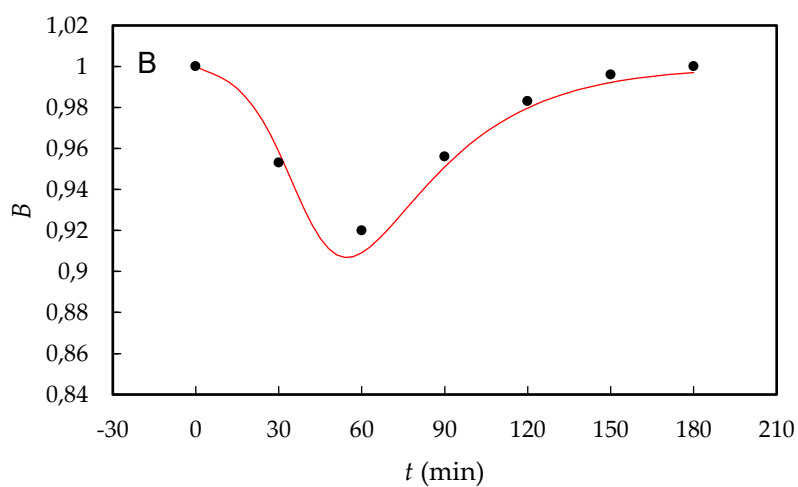
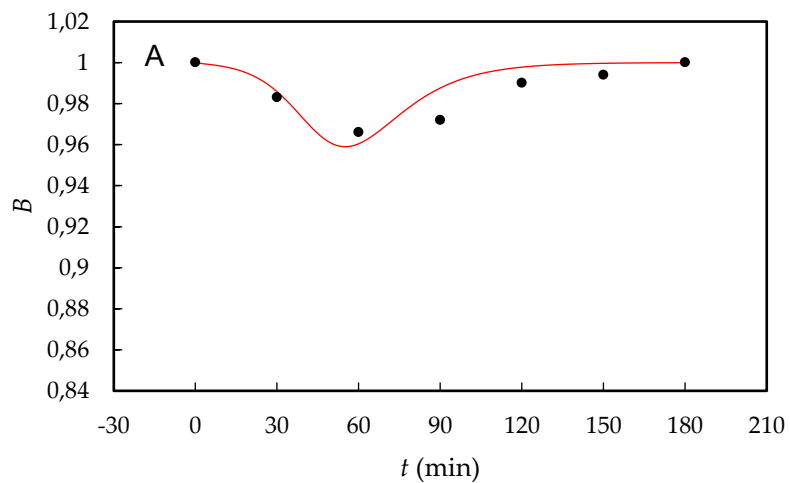
- rovnice (1a) popisuje koncentrační úbytek hormonu reakcí s cytoplazmatickými receptory reakcí bez autokatalýzy (celková rychlostní konstanta  $K_1$ ) a autokatalytickou reakcí (celková rychlostní konstanta  $K_2$ )

- rovnice (1b) popisuje koncentrační úbytek cytoplazmatických receptorů reakcí s extracelulárním  $\alpha E2$  (s celkovými rychlostními konstantami  $K_1$  a  $K_2$ ) a interně, v cytoplazmě lokalizovaným hormonem  $EE2_i$  (celková rychlostní konstanta  $K_4$ ) a následný přírůstek receptorů rozpadem aduktu (celková rychlostní konstanta  $K_3$ )
- rovnice (1c) popisuje koncentrační přírůstek aduktu ER díky reakci bez autokatalýzy i autokatalytické reakci receptorů s externím  $EE2$  (s celkovými rychlostními konstantami  $K_1$  a  $K_2$ ) a reversní reakcí s interním  $EE2_i$  (s rychlostní konstantou  $K_4$ ) a koncentrační úbytek související s rovnovážnou (celková rychlostní konstanta  $K_3$ ) a pseudo-rovnovážnou (celková rychlostní konstanta  $K_5$ ) reakcí

Tyto diferenciální rovnice byly řešeny metodou Runge-Kutha pro získání číselných hodnot  $K_0$ - $K_5$  a hodnoty molárního poměru mezi reagujícím hormonem a receptorem  $n$ , použitých pro konstrukci teoretických  $B(t)$  křivek. Tyto hodnoty byly optimalizovány hledáním minima absolutní hodnoty rozdílu mezi experimentální a teoretickou hodnotou  $B_i$  pomocí programu MATLAB. Výsledky získané pro všechny tři vsádkové koncentrace 200, 20 a 2  $\mu\text{g/L}$  jsou uvedeny v tabulce 5.  $B(t)$  křivky, získané s optimalizovanými parametry (viz tabulka 5), jsou uvedeny na obr. 14, ze kterého je vidět shoda experimentálních bodů s teoretickými křivkami, vypočtenými pro jednotlivé vsádkové koncentrace.

**Tabulka 5.** Vypočítané hodnoty celkových rychlostních konstant  $K_0$ - $K_5$  a molárního poměru  $n$ .

$C$ ( $\mu\text{g/L}$ )	$K_1 = K_0/n$	$K_2$	$K_3' = (K_3 + K_5)/R_0$	$K_4$	$K_5' = K_5/R_0$	$n$	$K_0 = K_1 n$
200	0,029	10	49	12	20	2,440	0,0725
20	0,098	10	49	12	20	0,770	0,0734
2	0,270	10	49	12	20	0,265	0,0715



**Obr. 14.** Teoretické  $B(t)$  křivky, získané s optimalizovanými parametry (viz tabulka 5) spolu s experimentálně získanými hodnotami  $B_t$  (černá kolečka), vsádková koncentrace EE2: (A) 200, (B) 20 a (C) 2 µg/L.

Získané výsledky kinetické analýzy ukázaly, že průběh  $B(t)$  křivek může být při spolupůsobení rovnovážné a pseudo-rovnovážné reakce popsán stejnými rychlostními konstantami a pouze jednoduchou změnou molárního poměru  $n$  lze postihnout zředění přes dva řády ( $200 \rightarrow 2 \mu\text{g/L}$ ). To je chování, ve kterém popis kinetického schématu odráží jeho vhodnost. Správnost navrženého modelu dále potvrzují polohy minim na  $B(t)$ , křivkách, které jsou v souladu s experimentálními hodnotami. Kinetický model a pozice jednotlivých kinetických rovnic ukazují, že EE2 se rychle váže na receptory, ale že se jedná o velmi slabou vazbu. Tomu odpovídá i charakter hodnot rychlostních konstant rozkladu, které jsou větší než rychlostní konstanty tvorby aduktu. Adukt je nestabilní a je spojen s inaktivací vazebného receptoru. Zpětná reakce postupuje poměrně snadno.

### 3.3 Publikace III: Kinetická studie aktivity 17 $\alpha$ -estradiolu v porovnání s 17 $\beta$ -estradiolem a 17 $\alpha$ -ethynylestradiolem.

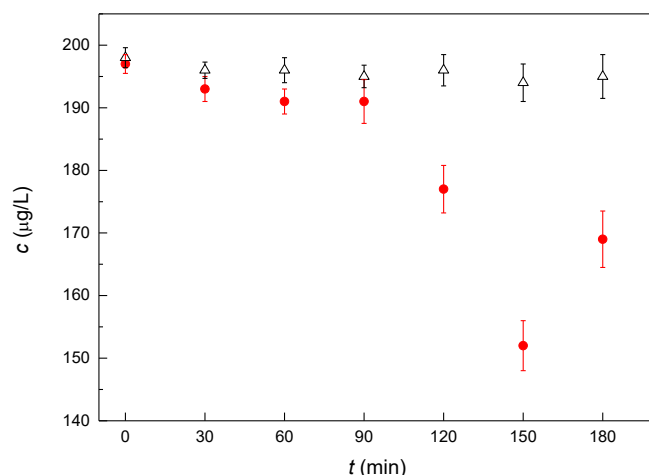
(Kinetic study of 17 $\alpha$ -estradiol activity in comparison with 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol.)

Jak již bylo popsáno v kapitole „1.3.1 Estrogeny“, 17 $\alpha$ -estradiol ( $\alpha$ E2) je endogenní stereoisomer hormonu E2 a je schopný vázat se na estrogení receptory. Je tedy schopen vazby jak na receptory ER $\alpha$ , tak i na ER $\beta$ . Jeho chování je podobné hormonu E2, avšak vykazuje výrazně nižší biologickou aktivitu. Biologická aktivita  $\alpha$ E2 se pohybuje mezi 1,5-5 % aktivity E2 s ohledem na druhovou a tkáňovou specifitu. Nedávné výzkumy s myšimi samci, kteří na rozdíl od kastrovaných samců a samic reagovali na podávaný  $\alpha$ E2, naznačují i pohlavní specifitu jeho působení. Vzhledem k tomu, že publikace I byla zaměřena na studium mechanismu interakce E2 s myšimi spermii, bylo z výše uvedených důvodů zajímavé studovat, zda podobný interakční model, jako v případě E2 bude vykazovat i  $\alpha$ E2. Pro tento účel byla opět použita metoda HPLC-MS/MS pro monitorování koncentrace volného, spermii nevázaného  $\alpha$ E2 během časově ohraničené kapacitace myších spermií (0-180 min). Separační a detekční podmínky byly stejné, jako v případě analýzy E2. Pro kvantifikaci  $\alpha$ E2 byl použit přechod  $m/z$  255,5  $\rightarrow$  158,9 a pro E2-d<sub>3</sub> jako IS přechod 258,5  $\rightarrow$  158,9. V tomto systému eluoval E2-d<sub>3</sub> v čase 3,0 min a  $\alpha$ E2 v čase 3,4 min. Metoda byla validována a byl určen limit detekce (LOD) jako 0,52  $\mu$ g/L a limit kvantifikace (LOQ) jako 1,49  $\mu$ g/L. Změřené koncentrační hodnoty  $\alpha$ E2 v biologickém vzorku, získané pro jednotlivé časy kapacitace, byly poté převedeny na hodnoty relativní koncentrace  $B_t$  a ty byly podrobeny kinetické analýze.

Změřené koncentrace volného, na myší spermie nevázaného  $\alpha$ E2 během kapacitace jsou pro vsádkovou koncentraci 200  $\mu$ g/L uvedeny na obr. 15. Z obr. 15 je vidět, že se hodnoty koncentrace, nalezené ve vzorku, nejprve příliš nelišily od blanku. K prudkému poklesu koncentrace ve vzorku došlo až po 90. min, aby po dosažení minima okolo 150. min hodnota koncentrace opět mírně stoupla.

Vypočítané hodnoty relativních koncentrací  $B_t$  ( $B_t = C_t/C_0$ ) jsou uvedeny v tabulce 6. Pro vsádkovou koncentraci 20 a 2  $\mu$ g/L se koncentrace  $\alpha$ E2, změřené ve vzorcích, výrazně nelišily od blanků a pohybovaly se v intervalu 17,8-18,6  $\mu$ g/L pro vsádkovou koncentraci 20  $\mu$ g/L a v intervalu 1,7-1,8  $\mu$ g/L pro vsádkovou koncentraci 2  $\mu$ g/L. Z toho důvodu nebyly již dále zpracovávány.





**Obr. 15.** Závislost koncentrace volného, na myši spermie nevázaného  $\alpha E2$  na kapacitaci pro vsádkovou koncentraci  $\alpha E2$  v M2 médiu 200  $\mu\text{g/L}$  (vzorek – červená kolečka, blank – prázdné trojúhelníky), odchylkové úsečky jsou počítány jako standardní odchylky ze tří pokusů.

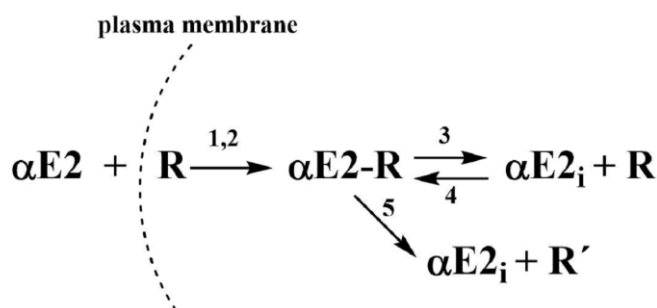
**Tabulka 6.** Relativní koncentrace  $B_t$ , vypočítané z průměrných hodnot koncentrací  $C$ , získaných pro vsádkovou koncentraci  $\alpha E2$  200  $\mu\text{g/L}$  během časově ohraničené kapacitace; průměr  $\pm$  směrodatná odchylka průměru.

čas (min)	0	30	60	90	120	150	180
$B_t$	1,000 $\pm$ 0,002	0,985 $\pm$ 0,002	0,981 $\pm$ 0,003	0,979 $\pm$ 0,008	0,899 $\pm$ 0,010	0,772 $\pm$ 0,012	0,863 $\pm$ 0,013

Na první pohled se zdá, že pokud by se  $B_t$  body, získanými pro  $\alpha E2$ , proložila křivka, tak by vykazovala podobný průběh, jaký byl získán pro hormony E2 i EE2. To by znamenalo autokatalytickou tvorbu nestálého aduktu mezi daným hormonem a estrogenními receptory, lokalizovanými v cytoplazmě, projevující se nejprve snižujícími se a následně zvyšujícími se hodnotami  $B_t$ . Na základě publikovaných dat pro EE2, může rozklad aduktu probíhat hypoteticky dvěma způsoby, aplikovatelnými i pro působení  $\alpha E2$ :

- rozklad aduktu produkuje aktivní vnitřní hormon, zůstávající v cytoplazmě ( $\alpha E2_i$ ) a aktivní receptor (R), jež oba jsou následně schopni dalších interakcí
- rozklad produkuje aktivní vnitřní hormon ( $\alpha E2_i$ ), ale inaktivní receptor, neschopný dalších interakcí (R').

V prvním případě, kdy jsou obě složky hypoteticky aktivní, se jedná o reversní (rovnovážnou) reakci mezi oběma složkami, v druhém případě jde o jednosměrnou reakci, vedoucí k deaktivaci vazebného receptoru. Obě reakce, (a) i (b), mohou působit simultánně, což může být považováno za porušování rovnováhy, tedy za tzv. pseudo-rovnovážnou reakci. Navržené kinetické schéma, popisující mechanismus interakce  $\alpha E2$  s estrogenními cytoplazmatickými receptory, je ukázáno na obr. 16.



**Obr. 16.** Navržené kinetické schéma, kde  $\alpha E2$  reprezentuje extracelulárně přítomný hormon,  $R$  reprezentuje aktivní cytoplazmatický estrogenní receptor,  $\alpha E2-R$  reprezentuje adukt,  $\alpha E2_i$  reprezentuje v cytoplasmě přítomný aktivní hormon,  $R'$  reprezentuje inaktivní cytoplazmatický estrogenní receptor a plasma membrane reprezentuje cytoplazmatickou membránu, jejíž vnější povrch je orientován směrem k externímu zdroji hormonu a vnitřní povrch směrem do cytoplazmy; 1 a 2 reprezentují rychlostní konstanty tvorby aduktu bez autokatalýzy (1) a autokatalytické (2) tvorby aduktu, která probíhá simultánně, 3 a 5 reprezentují rychlostní konstanty rozkladu aduktu a 4 reprezentuje rychlostní konstantu zpětné reakce.

Navržené kinetické schéma je vyjádřeno formou diferenciální rovnic 1a-1c, kde je pro jednoduchost vyjádřena molární koncentrace externího hormonu  $\alpha E2$  jako  $E$ , molární koncentrace cytoplazmatických receptorů  $cER$  jako  $R$ , molární koncentrace interního, v cytoplasmě lokalizovaného hormonu  $\alpha E2_i$  jako  $E_i$ , molární koncentrace aduktu jako  $ER$  a  $\varepsilon$  je relativní koncentrace volného hormonu vně membrány.

$$\frac{-dE}{dt} = E \times R(K_1 + K_2 \times (1 - \varepsilon)) \quad 1a$$

$$\frac{-dR}{dt} = E \times R(K_1 + K_2 \times (1 - \varepsilon)) + K_4 \times E_i \times R - K_3 \times (ER) \quad 1b$$

$$\frac{d(ER)}{dt} = E \times R(K_1 + K_2 \times (1 - \varepsilon)) + K_4 \times E_i \times R - (K_3 + K_5) \times (ER) \quad 1c$$

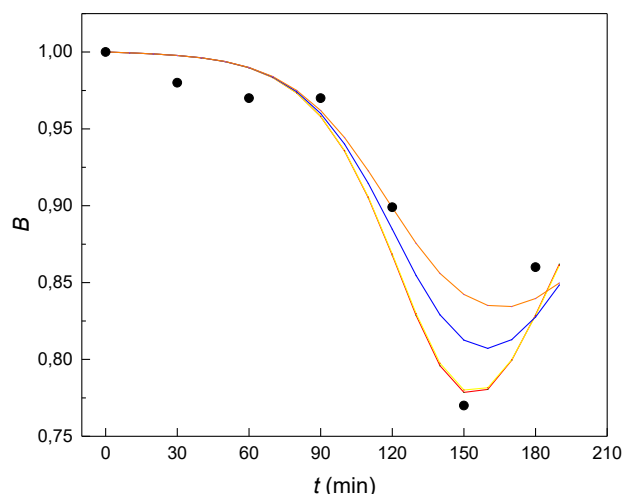
- rovnice (1a) popisuje koncentrační úbytek hormonu reakcí s cytoplazmatickými receptory reakcí bez autokatalýzy (celková rychlostní konstanta  $K_1$ ) a autokatalytickou (celková rychlostní konstanta  $K_2$ ) reakcí
- rovnice (1b) popisuje koncentrační úbytek receptorů reakcí s extracelulárně přítomným  $\alpha E_2$  (s celkovými rychlostními konstantami  $K_1$  a  $K_2$ ) a interně, v cytoplazmě lokalizovaným hormonem  $\alpha E_{2i}$  (celková rychlostní konstanta  $K_4$ ) a následný přírůstek receptorů rozpadem aduktu (celková rychlostní konstanta  $K_3$ )
- rovnice (1c) popisuje koncentrační přírůstek aduktu ER díky reakci bez autokatalýzy i autokatalytické reakci receptorů s extracelulárním  $\alpha E_2$  (s celkovými rychlostními konstantami  $K_1$  a  $K_2$ ) a reversní reakci s interním  $\alpha E_{2i}$  (s rychlostní konstantou  $K_4$ ) a koncentrační úbytek aduktu související s rovnovážnou (celková rychlostní konstanta  $K_3$ ) a pseudo-rovnovážnou (celková rychlostní konstanta  $K_5$ ) reakcí

Tyto diferenciální rovnice byly řešeny metodou Runge-Kutha pro získání číselných hodnot  $K_1$ - $K_5$  a hodnoty molárního poměru  $n$  mezi reagujícím hormonem a receptorem, použitých pro konstrukci teoretické  $B(t)$  křivky. Tyto hodnoty byly optimalizovány hledáním minima absolutní hodnoty rozdílu mezi experimentální a teoretickou a hodnotou  $B_t$  pomocí programu MATLAB. Výsledky získané pro vsádkovou koncentraci 200  $\mu\text{g/L}$  jsou uvedeny v tabulce 7.

**Tabulka 7.** Vypočítané hodnoty celkových rychlostních konstant  $K_1$ - $K_5$  a molárního poměru  $n$ , vsádková koncentrace  $\alpha E_2$  200  $\mu\text{g/L}$ .

$K_1$	$K_2$	$K_3$	$K_4$	$K_5$	$n$
0,01	4,0	5,0	0	0	0,01

$B(t)$  křivky, získané s celkovými rychlostními konstantami  $K_1$ - $K_5$  (viz tabulka 7) pro různé hodnoty  $n$  jsou spolu s experimentálně získanými body uvedeny na obr. 17. Jednotlivé barvy křivek znázorňují jednotlivé  $B(t)$  křivky, získané pro různé hodnoty  $n$ . Z obr. 17 je vidět, že tvar  $B(t)$  křivek a zejména jejich minima jsou citlivé na hodnotu  $n$  a nejlepší shody mezi experimentálně získanými body (černá kolečka) a křivkou je dosaženo pro extrémně malé hodnoty  $n$  (červená  $n = 0,01$  a žlutá  $n = 0,1$  křivka).

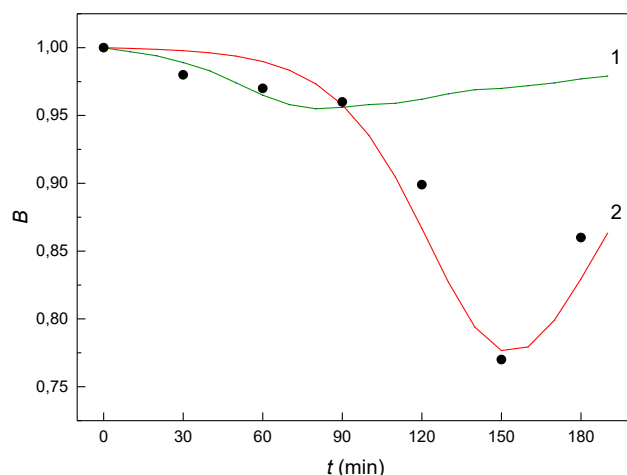


**Obr. 17.** Tvar teoretických  $B(t)$  křivek vypočtených s konstantami  $K_1-K_5$  (viz tabulka 7) pro různé hodnoty  $n$  (červená křivka:  $n = 0,01$ , žlutá křivka:  $n = 0,1$ , modrá křivka:  $n = 1$  oranžová křivka:  $n = 2$ ) spolu s experimentálně získanými  $B_t$  body (černá kolečka).

Z obr. 17 je také patrné, že zatímco průběh červené  $B(t)$  křivky, získané pro  $n = 0,01$ , je od 90. min kapacitace ve velmi dobré shodě s experimentálně získanými  $B_t$  body, tak v počátečních fázích kapacitace tomu tak není. Z tohoto důvodu byla provedena nová optimalizace parametrů  $K_1-K_5$  s ohledem na dosažení lepší shody teoretické  $B(t)$  křivky s experimentálně získanými  $B_t$  body v počátečních fázích kapacitace (0-90 min). Výsledky nové optimalizace jsou uvedeny v tabulce 8 a znázorněny na obr. 18 (zelená křivka 1).

**Tabulka 8.** Nově vypočítané hodnoty celkových rychlostních konstant  $K_1-K_5$ .

$K_1$	$K_2$	$K_3$	$K_4$	$K_5$	$n$
7	10	49	12	20	0,01



**Obr. 18.** Experimentálně získané hodnoty  $B_t$  (černá kolečka) spolu s  $B(t)$  křivkou: získanou s optimalizovanými parametry z tabulky 8 (zelená křivka 1) a získanou s optimalizovanými parametry z tabulky 7 (červená křivka 2).

Výsledným modelem by byla křivka, vzniklá kombinací křivky (1) a (2), se zlomem v 90. min kapacitace, jejíž počáteční větev (0-90 min kapacitace) by byla tvořena křivkou (1). Tento průběh odpovídá hypotetickým obtížím při průniku hormonu cytoplazmatickou membránou. Hormon nejprve pronikne vnější vrstvou cytoplazmatické membrány a shromažďuje se ve fosfolipidové dvojvrstvě cytoplazmatické membrány za vzrůstajícího napětí. Když množství nahromaděného hormonu dosáhne kritické hodnoty, vnitřní stěna cytoplazmatické membrány propustí nahromaděné množství  $\alpha E2$  do cytoplazmy, kde hormon velmi rychle, autokatalyticky reaguje s cytoplazmatickými receptory za tvorby aduktu (strmě klesající část křivky (2)), který je však nestálý a časem se rozpadá (stoupající část křivky (2)). Protože kritické množství hormonu je vzhledem k celkovému obsahu cytoplazmatických receptorů malé, je i výsledná hodnota molárního poměru  $n$  velmi nízká.

V analogickém kinetickém modelu pro vsádkovou koncentraci 20  $\mu\text{g/L}$ , potažmo 2  $\mu\text{g/L}$ , by dosažení kritického množství hormonu, nahromaděného ve fosfolipidové dvojvrstvě, bylo podstatně pomalejší než v případě vsádkové koncentrace 200  $\mu\text{g/L}$ , a proto by ke zlomu na křivce (1) z obr. 18 došlo v podstatně delším čase kapacitace (po 180. min), což je za standardní délkou monitorování procesu kapacitace *in vitro*. Tomu by odpovídal i fakt, že se koncentrace volného, v aduktu nevázaného  $\alpha E2$ , změřené ve vzorcích s přídatkem spermií a blanku navzájem nelišily a vykazovaly prakticky konstantní hodnotu.

### 3.4 Přípravovaná publikace IV: Srovnávací studie působení 17 $\alpha$ -estradiolu u spermií myši a potkanů během jejich kapacitace.

(Comparative study of 17 $\alpha$ -estradiol mechanism during capacitation of mouse and rat sperm.)

Je známo, že  $\alpha$ E2 je schopný se vázat na estrogenní receptory, ale jeho biologická aktivita je menší než v případě E2 a je druhově a tkáňově specifická. Bylo popsáno, že  $\alpha$ E2 reguluje expresi mRNA v nádorových buňkách hypofýzy u potkanů, citlivých na estrogen, ale tato indukce není zprostředkována klasickou cestou estrogenního receptoru [249]. Bylo zjištěno, že část mozku, která ovlivňuje prostorovou paměť, je bohatá na receptory citlivé na steroidní hormony. Potkani po ovariektomii prokazovali po podání estradiolu lepší výkony a pro  $\alpha$ E2 stačily nižší dávky hormonu než pro E2, na rozdíl od transkripčních estrogenních odpovědí, které jsou obvykle citlivější na izomer E2 [250, 251]. Účinek  $\alpha$ E2 naznačuje, že hormonální substituční terapie s použitím tohoto steroidu by mohla být klinicky užitečná při zmírňování dopadu nízké endogenní produkce estrogenu na rozvoj a progresi neurodegenerativních poruch [252].

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem byl v této práci proveden obdobný experiment sledování  $\alpha$ E2 a jeho vlivu na kapacitaci potkaních spermií jako v případě myši (viz Komentář k publikaci III). Během časově ohraničené kapacitace *in vitro* byl sledován hormon  $\alpha$ E2 přidáný k potkaním spermiím na začátku jejich kapacitace o vsádkové koncentraci 200  $\mu$ g/L. Metodou HPLC-MS/MS byla během kapacitace sledována změna koncentrace volného, na spermie nevázaného  $\alpha$ E2 a ze získaných koncentračních hodnot  $c$  byly vypočítány hodnoty relativních koncentrací  $B_t$ , které jsou uvedeny v tabulce 9.

**Tabulka 9.** Průměrné hodnoty  $B_t$ , získané pro jednotlivé časy kapacitace.

čas (min)	0	30	60	90	120	150	180
$B_t$	1,000	0,860	0,810	0,750	0,810	0,830	0,890

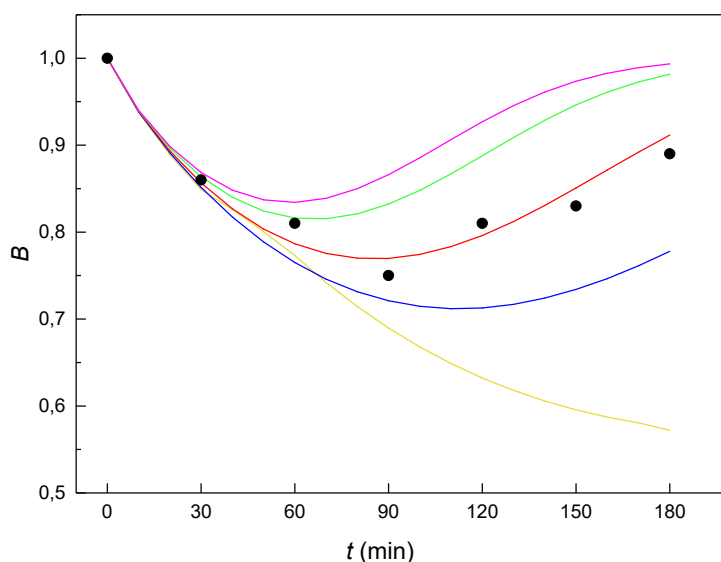
Tyto hodnoty byly následně podrobeny kinetické analýze, pro kterou byl převzat kinetický model, navržený pro interakci  $\alpha$ E2 s myšními spermiemi, spolu se základními diferenciálními rovnicemi (1a-1c, viz komentář k publikaci III). Soustava diferenciálních rovnic byla řešena metodou Runge-Kutta. Aby se výsledná  $B(t)$  křivka co nejúžeji přimykala k experimentálním bodům, byly zvoleny optimalizované konstanty (viz tabulka 10).

Z tabulky 10 je vidět, že hodnota konstanty  $K_2$ , vztahující se k autokatalytické tvorbě nestálého aduktu, musí být nulová. Jestliže je autokatalýza spojena se změnou fluidity cytoplazmatické membrány (shodně E2, EE2 a  $\alpha$ E2 při interakci s myšími spermii), pak průběh bez autokatalýzy by měl znamenat, že vzniklý adukt ER (komplex  $\alpha$ E2 – estogenní receptor R) neovlivňuje změnu fluidity membrány.

**Tabulka 10.** Konstanty vypočítané pro vsádkovou koncentraci  $\alpha$ E2 200  $\mu$ g/L, kde  $K_1$ - $K_5$  jsou celkové rychlostní konstanty a  $n$  je molární poměr.

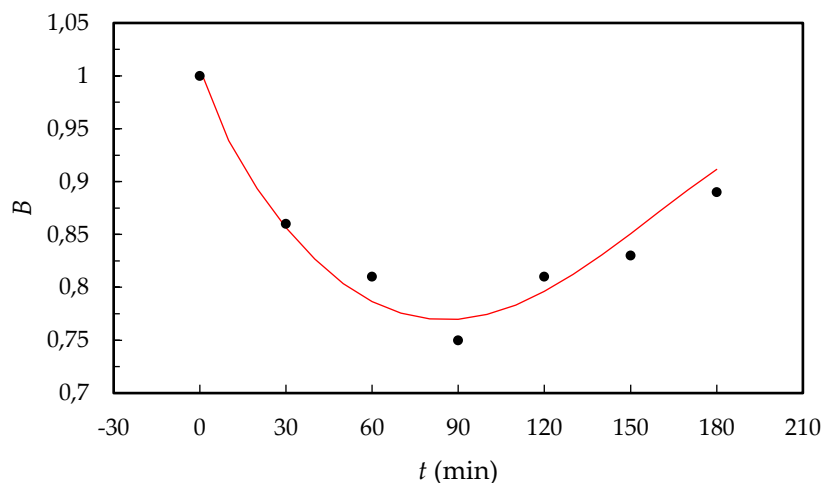
$K_1$	$K_2$	$K_3$	$K_4$	$K_5$	$n$
0,77	0,0	5,00	12,00	6,00	0,5

Použijeme-li tyto konstanty do kinetického schématu, navrženého pro myší spermie (viz obr. 16), pak je vidět, že v případě potkaních spermií je nejpravděpodobnějším procesem zpětná tvorba aduktu ER (konstanta  $K_4$ ). Jak hodnota molárního poměru  $n$  ovlivňuje průběh teoretických  $B_t$  křivek je vidět na obr. 19, ze kterého jasně vyplývá, že teoreticky nejvhodnější hodnota molárního poměru  $n$  je 0,5 (červená křivka).



**Obr. 19.** Tvar teoretických  $B(t)$  křivek spočítaných s optimalizovanými konstantami  $K_1$ - $K_5$  (viz tabulka 10) pro různé hodnoty molárního poměru  $n$  (žlutá křivka:  $n = 0,1$ ; modrá křivka:  $n = 0,3$ ; červená křivka:  $n = 0,5$ ; zelená křivka:  $n = 0,8$ ; fialová křivka:  $n = 1,0$ ; černá kolečka – experimentální body).

Jak je vidět z porovnání obr. 18 versus 20, průběh  $B(t)$  křivek se v případě myších a potkaních spermií výrazně liší.



**Obr. 20.** Shoda experimentálně získaných  $B_t$  hodnot s teoretickou  $B(t)$  křivkou, získanou pro  $n = 0,5$  (černá kolečka – experimentální body).

Jak již bylo popsáno v kapitole „3.3 Publikace III“, v případě myších spermií (viz obr. 18) představuje počáteční plochá část větve křivky (1) až do průsečíku s křivkou (2) (při 90 min kapacitace) obtíže s průnikem hormonu  $\alpha E2$  skrz cytoplazmatickou membránu. Hormon se hromadí mezi fosfolipidovou dvojvrstvou cytoplazmatické membrány za zvyšujícího se napětí. Když množství nahromaděného hormonu dosáhne kritické hodnoty, vnitřní vrstva fosfolipidové dvojvrstvy propustí nahromaděný hormon, ten je internalizován v cytoplazmě, kde rychle, autokatalyticky reaguje s cytoplazmatickým receptorem za vytvoření nestabilního aduktu (strmě klesající část křivky (2)), který se následně rozkládá (stoupající část křivky (2)). Jelikož je kritické množství  $\alpha E2$  ve srovnání s celkovým obsahem receptorů v cytoplazmě velmi malé, je malá také hodnota molárního poměru  $n$  (0,01). Obtížím při průniku  $\alpha E2$  cytoplazmatickou membránou také odpovídá poloha minima křivky (2) na časové ose, kde se nachází až okolo 150. min kapacitace.

V případě potkaních spermií (viz obr. 20) dostáváme pouze jednu, prakticky symetrickou křivku s minimem při 90 min kapacitace. Aby se dosáhlo dobré shody experimentálně získaných bodů s vypočítanou  $B(t)$  křivkou, je nutné, aby kinetický model neobsahoval autokatalytický krok, tedy aby platilo, že  $K_2 = 0$ . Průběh křivky odpovídá plynulému průniku hormonu přes cytoplazmatickou membránu za vytvoření nestabilního aduktu hormonu s receptory (klesající část křivky), avšak bez signalizace směrem k větší změně



fluidity cytoplazmatické membrány, a prakticky symetrickému rozkladu nestabilního aduktu. Také hodnota molárního poměru  $n$  je vyšší ( $n = 0,5$ ) než v případě myších spermií ( $n = 0,01$ ). Jestliže porovnáme vstupní hodnoty rychlostních konstant  $K_1$  vypočítaných pro reakci hormonů s myšími spermii, pro EE2 ( $K_1 = 0,03$ ) a pro  $\alpha$ E2 ( $K_1 = 0,01$ ), s hodnotou  $K_1$  získanou pro potkaní spermie ( $K_1 = 0,77$ ) je vidět, že reakce  $\alpha$ E2 se spermii potkana je podstatně rychlejší, což lze vidět i na strmosti křivky.

Výsledky získané pro interakci hormonu  $\alpha$ E2 s potkaními spermii během časově ohraničené kapacity *in vitro* a navržený kinetický model ukazují na odlišný mechanismus interakce než ten, který byl popsán pro působení hormonu  $\alpha$ E2, potažmo E2 a EE2, na spermie myši. V případě potkaních spermií nebyla pozorována autokatalýza (nulová hodnota  $K_2$ ) a tento výsledek reprezentuje zásadní rozdíl oproti kinetickým modelům, navrženým pro interakci výše zmíněných hormonů s myšími spermii. Vypočítaná hodnota rychlostní konstanty pro primární tvorbu aduktu ( $K_1$ ) ukazuje v případě potkaních spermií na podstatně rychlejší, avšak plynulou tvorbu nestálého aduktu, než tomu je v případě myších spermií. Zdá se, že i v tomto případě se projevuje druhová specifita působení hormonu  $\alpha$ E2.

## 4. ZÁVĚR

Pro popsání možné interakce mezi estrogenními hormony a spermii, a tedy pro stanovení koncentrace volných, na spermie nevázaných hormonů, byla ve všech studiích použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS). Jako modelový organismus sloužily spermie myši, resp. potkana. Měření probíhala v systému trojitého kvadrupólu, který je díky své vysoké citlivosti vhodný pro kvantifikaci látek na nízkých koncentračních hladinách. Studované hormony (E2, EE2,  $\alpha$ E2) byly ionizovány elektrosprejem v pozitivním ionizačním módu (ESI), který byl podstatně citlivější než negativní mód. Pro sledování jednotlivých hormonů v kapacitačním médiu byl využit MRM mód, který umožňuje identifikaci i kvantifikaci látek v složitých biologických maticích. Za optimalizovaných separačních a detekčních podmínek byly pro všechny studované hormony stanoveny limity detekce a limity kvantifikace, které se pohybovaly v desetínách (0,30-0,88), resp. v jednotkách (1,10-1,49)  $\mu\text{g/L}$ . Byly testovány tři různé vsádkové (dávkové) koncentrace hormonů (200, 20 a 2  $\mu\text{g/L}$ ). Během časově ohraničené kapacitace spermií (0-180 min) byla metodou HPLC-MS/MS monitorována koncentrace volného, na spermie nevázaného hormonu ( $C$ ). Z hlediska kinetické analýzy to znamená, že byla sledována koncentrace hormonu (obecně  $E + E_i$ ), který nebyl v daný čas kapacitace vázaný v aduktu (obecně ER). Změřené hodnoty  $C$  pak byly pro jednotlivé kapacitační časy přepočítány na hodnoty relativní koncentrace  $B_t$  a ty byly podrobeny kinetické analýze.

Výsledky kinetické analýzy experimentálních hodnot relativní koncentrace ( $B_t$ ), získaných pro jednotlivé časy kapacitace, ukazují, že tvorba aduktu (ER) mezi hormony (E2, EE2,  $\alpha$ E2) a cytoplazmatickými estrogenními receptory (R) je u myších spermií výsledkem jednotného procesu. Vzniklé adukty jsou nestabilní a rozkládají se na původní volné hormony (E2, EE2,  $\alpha$ E2) a cytoplazmatické receptory (R). Pokud rozklad aduktu vede k nezměněnému, aktivnímu receptoru (R), který může dále reagovat s hormonem, přítomným v cytoplazmě ( $E_i$ ) za vzniku dalšího aduktu zpětnou (reversní) reakcí, pak se jedná o rovnovážnou reakci. Pokud je přítomen neaktivní receptor ( $R'$ ), který již není schopen dále reagovat, pak je rovnovážná reakce přerušena a vede k tzv. pseudo-rovnovážné reakci.

Tvorbu aduktu je možné popsat jako autokatalytickou reakci, charakterizovanou skutečností, že tečna ke křivce  $B(t)$  se stává během reakce strmější. Vytvořený adukt ovlivňuje fluiditu cytoplazmatické membrány a usnadňuje tak průchod hormonů (E2, EE2,  $\alpha$ E2) cytoplazmatickou membránou za zvyšující se tvorby aduktu. Jde o opakující se proces. Na

základě výsledků kinetické analýzy se zdá, že rozdíl v chování jednotlivých hormonů je způsoben odlišným způsobem transportu hormonů cytoplazmatickou membránou.

E2 je endogenní estrogenní hormon, který k vytvoření požadované odpovědi vyžaduje definované membránové estrogenní receptory. Počet receptorů na povrchu spermie je dán Langmuierovou adsorpční izotermou a E2 může proniknout skrz cytoplazmatickou membránu a vytvořit adukt pouze prostřednictvím těchto receptorů. Protože Langmuierova adsorpční izoterma je úměrná koncentraci extracelulárně přítomného hormonu E2, tvorba aduktu je také závislá na stejném procesu. Poloha minima na  $B(t)$  křivkách vzhledem k časové ose je důležitým prvkem a je závislá na vsádkové koncentraci hormonu (na dávce). Se snižující se hodnotou vsádkové koncentrace se minimum posouvá k pozdějším časům kapacity. Hloubka minima na  $B(t)$  křivce se prohlubuje s klesající hodnotou molárního poměru  $n$ . Poměr dvou sousedních hodnot  $n_1/n_2$ , vypočtený pro dvě sousední vsádkové koncentrace (200; 20  $\mu\text{g/L}$ ) nebo (20; 2  $\mu\text{g/L}$ ), se rovná 1/10, a to je v souladu s poměrem dvou sousedních dávkovaných koncentrací. Představuje tak další charakteristické chování hormonu E2. Kinetický model, navržený pro interakci hormonu E2 s estrogenními receptory, však nešel aplikovat v případě hormonů EE2 a  $\alpha\text{E2}$ .

V případě EE2 jsou experimentálně zjištěné hodnoty  $n$  pro jednotlivé vsádkové koncentrace mnohem menší než odpovídající hodnoty  $n$  pro E2. Z kinetického hlediska se nezdá, že by hormon EE2 vyžadoval specifický membránový estrogenní receptor, aby prošel cytoplazmatickou membránou spermie, a proto je reakce hormonu EE2 s receptory rychlá. Charakteristickým rysem působení EE2 je skutečnost, že časové souřadnice minima jsou prakticky konstantní, a proto jsou nezávislé na koncentraci dávky hormonu.

Pro hormon  $\alpha\text{E2}$  je průchod cytoplazmatickou membránou podstatně složitější. Nezdá se, že by  $\alpha\text{E2}$  primárně procházel i vnitřní vrstvou cytoplazmatické membrány, ale naopak se hromadí mezi fosfolipidovou dvojvrstvou cytoplazmatické membrány. To se projevuje poměrně dlouhou plochou částí  $B(t)$  křivky. Když množství  $\alpha\text{E2}$  dosáhne v cytoplazmatické membráně kritické hodnoty, vnitřní vrstva membrány se stane pro  $\alpha\text{E2}$  průchodnou, s následnou internalizací  $\alpha\text{E2}$  v cytoplazmě. Zde hormon rychle, autokatalyticky reaguje s cytoplazmatickými receptory a tvoří nestabilní adukt, projevující se prudkým poklesem  $B(t)$  křivky do minima. Kritické množství tohoto hormonu je malé ve srovnání s celkovým množstvím estrogenních receptorů v cytoplazmě, takže hodnota parametru  $n$  je také extrémně nízká. Výsledky získané pro interakci hormonu  $\alpha\text{E2}$  s potkaními spermii ukazují na odlišný mechanismus interakce. V případě potkaních spermii nebyla pozorována autokatalýza, takže se zdá, že tvorba nestálého aduktu neovlivňuje fluiditu cytoplazmatické membrány.

Navržené matematické modely, ověřené experimentálními daty, umožnily vyvinout hypotézy o možných interakcích mezi estrogenními hormony a estrogenními receptory pomocí modelu kapacity spermií. Toto chápání dynamiky interakce estrogenní hormon/estrogenní receptor je zcela nové a má potenciál být přínosné pro další rozvoj v oblasti pochopení buněčné signalizace.

## 5. POUŽITÁ LITERATURA

- 1) López de Alda, M.J.; Barceló, D.: Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2000, 892, 391- 406.
- 2) Della Seta, D.; Farabollini, F.; Dessì-Fulgheri, F.; Fusani, L.: Environmental-like exposure to low levels of estrogen affects sexual behavior and physiology of female rats. *Endocrinology*. 2008, 149, 5592-5598.
- 3) Safe, S.H.; Pallaroni, L.; Yoon, K.; Gaido, K.; Ross, S.; Saville, B.; McDonnell, D.: Toxicology of environmental estrogens. *Reprod. Fertil. Dev.* 2001, 13, 307-315.
- 4) Kumar, V.; Majumdar, C.; Roy, P.: Effects of endocrine disrupting chemicals from leather industry effluents on male reproductive system. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2008, 111, 208-216.
- 5) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, World Health Organization, 6. vyd., 2021.
- 6) Yoshida, M.; Kawano, N.; Yoshida, K.: Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008, 65, 3446-3457.
- 7) Yanagimachi, R.: Mammalian fertilization. In: *The physiology of reproduction*. Knobil E., Neill J.D. (Eds). Raven Press; New York, NY, USA, 1994, p. 189-317.
- 8) Visconti, P.E.; Bailey, J.L.; Moore, G.D.; Pan, D.; Olds-Clarke P., Kopf G.S.: Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. 1995, 121, 1129-1137.
- 9) Abou-haila, A.; Tulsiani, D. R. P.: Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 2009, 485, 72-81.
- 10) Tan, E.; Lu, T.; Pang, K.S.: Futile cycling of estrone sulfate and estrone in the recirculating perfused rat liver preparation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, 297, 423-436.
- 11) Longcope, C.; Kato, T.; Horton, R.: Conversion of blood and androgens to estrogens in normal adult men and women. *J. Clin. Invest.* 1969, 48(12), 2191-2201
- 12) Schulster, M.; Bernie, A.M.; Ramasamy, R.: The role of estradiol in male reproductive function. *Asian J. Androl.* 2016, 18(3), 435-40.

- 13) Dostalova, P.; Zatecka, E.; Dvorakova-Hortova, K.: Of oestrogens and sperm: a review of the roles of oestrogens and oestrogen receptors in male reproduction. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18(5), 904.
- 14) Carreau, S.; Bouraima-Lelong, H.; Delalande, C.: Estrogens in male germ cells. *Spermatogenesis*, 2011,1(2), 90-94.
- 15) Mann, S.M.; Hadad, N.; Holte, M.N.; Rothman, A.R.; Sathiaseelan, R.; Mondal, S.A.; Agbaga, M.P.; Unnikrishnan, A.; Subramaniam, M.; Hawse, J.: Health benefits attributed to 17 $\alpha$ -estradiol, a lifespan-extending compound, are mediated through estrogen receptor  $\alpha$ . *eLife*. 2020, 9.
- 16) National center for biotechnology information. PubChem compound summary for CID 5991, Ethinylestradiol. Dostupné z URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethinylestradiol> [cit. 5.1. 2022]
- 17) Děd, L.; Dostálová, P.; Dorosh, A.; Dvořáková-Hortová, K; Pěkníková, J.: Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2010, 8, 87.
- 18) Mirbahai, L.; Chipman, J. K.: Epigenetic memory of environmental organisms: a reflection of lifetime stressor exposures. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2014, 10, 764-765.
- 19) Caldwell, D.J.; Mastrocco, F.; Nowak, E.; Johnston, J.; Yekel, H.; Pfeiffer, D.; Hoyt, M.; DuPlessie, B. M.; Anderson, P. D.: An assessment of potential exposure and risk from estrogens in drinking water. *Environ. Health Perspect.* 2010, 118, 338–344.
- 20) Mendes, A J. J.: The endocrine disrupters: A major medical challenge. *Food Chem. Toxicol.* 2002, 40(6), 781-788.
- 21) Colborn, T. F. S.; vom Saal; Soto, A.M.: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect. Environ. Health Perspect.* 1993, 101(5), 378-384.
- 22) European commission Dostupné z URL: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/index_en.htm) [cit. 17. 1. 2022].
- 23) Hotchkiss, A.K.; Rider, C.V.; Blystone, Ch.R.; Wilson, V.S.; Hartig, P.C.; Ankley, G.T.; Foster, P.M.; Gray, C.L.; Gray, L.E.: Fifteen years after “wingspread”- Environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicol. Sci.* 2008, 105 (2), 235-259.
- 24) Kortenkamp, A.: Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.* 2007, 115, 98-105.

- 25) Kirk, C.J.; Bottomley, L.; Minican, N.; Carpenter, H.; Shaw, S.; Kohli, N.; Winter, M.; Taylor, E.W.; Waring, R.H.; Michelangeli, F.; Harris, R. M.: Environmental endocrine disrupters dysregulate estrogen metabolism and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in fish and mammals via receptor-independent mechanisms. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2003, 135, 1-8.
- 26) Golub, M.S.; Collman, G.W.; Foster, P.M.; Kimmel, C.A.; Rajpert-De Meyts, E.; Reiter, E.O.; Sharpe, R.M.; Skakkeback, N.E.; Toppari, J.: Public health implications of altered puberty timing. *Pediatrics.* 2008, 121, 3, 218-230.
- 27) Anway, M.D.; Skinner, M.K.: Epigenetic programming of the germ line: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease. *Reprod. Biomed.* 2008, 16, 23-25.
- 28) Newbold, R.R.; Padilla-Banks, E.; Jefferson, W.N.; Heindel, J.J.: Effects of endocrine disruptors on obesity. *Int. J. Androl.* 2008, 31, 201-208.
- 29) Weiss, B.: Can endocrine disruptors influence neuroplasticity in the aging brain? *Neurotoxicology.* 2007, 28(5), 938-950.
- 30) Markman, S.; Leitner, S.; Catchpole, C.; Barnsley, S.; Müller, C. T.; Pascoe, D.; Buchanan, K.L.: Pollutants increase song complexity and the volume of the brain area HVC in a songbird. *PLoS One.* 2008, 27, 3(2), 1674.
- 31) Jobling, S.; Tyler, C.R.: Introduction: The ecological relevance of chemically induced endocrine disruption in wildlife. *Env. Health Persp.* 2006, 114, 1, 7-8.
- 32) Matthiessen, P.; Wheeler, J.R.; Weltje, L: A review of the evidence for endocrine disrupting effects of current-use chemicals on wildlife populations. *Crit. Rev. Toxicol.* 2018, 48(3), 195-216.
- 33) Berg, C.; Halldin, K.; Brunström, B.; Brandt, I.: Methods for studying xenoestrogenic effects in birds. *Toxicol. Lett.* 1998 102-103, 671-676.
- 34) Pombo, M.; Castro-Feijóo, L.: Endocrine disruptors. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2005, 18,1145-1155.
- 35) Liu, Z. H. K.; Mamoru, Y.; Yamamoto, I. A.: Profile and removal of endocrine disrupting chemicals by using an ER/AR competitive ligand binding assay and chemical analyses. *J. Environ. Sci.* 2009, 21 (7), 900-906.
- 36) Giesy, J.P.; Hilscherová, K.; Jones, P.D.; Kannan, K.; Machala, M.: Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Mar. Pollut. Bull.* 2002 45, 3-16.

- 37) Xu, N.; Xu, Y.F.; Xu, S.; Li, J.; Tao, H.C.: Removal of estrogens in municipal wastewater treatment plants: a Chinese perspective. *Environ. Pollut.* 2012, 165, 215-224.
- 38) Li, J.; Fu, J.; Zhang, H.; Li, Z.; Ma, Y.; Wu, M.; Liu, X.: Spatial and seasonal variations of occurrences and concentrations of endocrine disrupting chemicals in unconfined and confined aquifers recharged by reclaimed water: a field study along the Chaobai river, Beijing. *Sci. Total Environ.* 2013, 450, 162-168.
- 39) Pereira, R.O.; Postigo, C.; Lopez de Alda, M.; Daniel, L.A.; Barcelo, D.: Removal, of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. *Chemosphere.* 2011, 82, 789-799.
- 40) Atkinson, S.K.; Marlatt, V.L.; Kimpe, L.E.; Lean, D.R.S.; Trudeau, V.L.; Blais, J.M.: The occurrence of steroidal estrogens in south-eastern Ontario wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 2012, 430, 119-125.
- 41) Fayad, P.B.; Prevost, M.; Sauve, S.: On-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters. *Talanta.* 2013, 115, 349-360.
- 42) Gabet, V.; Miege, C.; Bados, P.; Coquery, M.: Analysis of estrogens in environmental matrices. *Trends Anal. Chem.* 2007, 26, 1113-1131.
- 43) Silva, C.P.; Otero, M.; Esteves, V.: Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: a review. *Environ. Pollut.* 2012, 165, 38-58.
- 44) Combalbert, S.; Hernandez-Raquet, G.: Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 86, 1671-1692.
- 45) Chen, Q.; Shi, J.; Wu, W.; Liu, X.; Zhang, H.: A new pretreatment and improved method for determination of selected estrogens in high matrix solid sewage samples by liquid chromatography mass spectrometry. *Microchem. J.* 2012, 104, 49-55.
- 46) Wang, L.; Ying, G.G.; Zhao, J.L.; Liu, S.; Yang, B.; Zhou, L.J.; Tao, R.; Su, H.C.: Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao river system in northeast China using combined chemical and biological tools. *Environ. Pollut.* 2011, 159, 148-156.
- 47) Buchinger, S.; Heininger, P.; Schluesener, M.; Reifferscheid, G.; Claus, E.: Estrogenic effects along the river saale. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2013, 32, 526-534.
- 48) Ribeiro, A.R.; Nunes, O.C.; Pereira, M.F.R.; Silva, A.M.T.: An overview on the advanced oxidation processes applied for the treatment of water pollutants defined in the recently launched Directive 2013/39/EU. *Environ. Int.* 2015, 75, 33-51.



- 49) Benfenati, E.; Barceló, D.; Johnson, I.; Galassi, S.; Levsen, K.: Emerging organic contaminants in leachates from industrial waste landfills and industrial effluent. *Trends Anal. Chem.* 2003, 22, 757-765.
- 50) Petrović, M.; Eljarrat, E.; Lopez de Alga, M.; Barceló, D.: Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *J. Chromatogr.* 2002, 974, 23-51.
- 51) Petrović, M.; Barceló, D.: Determination of anionic and nonionic surfactants, their degradation products, and endocrine-disrupting compounds in sewage sludge by liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2000, 72, 4560-4567.
- 52) Miller, E.J; Lappin, S.L.: Physiology, Cellular Receptor. StatPearls [Internet], 2021.
- 53) Li, C.; Briggs, M.R.; Ahlborn, T.E.; Kraemer, F.B.; Liu, J.: Requirement of Sp1 and estrogen receptor alpha interaction in 17beta-estradiol-mediated transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene expression. *Endocrinology.* 2001, 142,1546-1553.
- 54) Stossi, F.; Likhite, V.S.; Katzenellenbogen, J.A.; Katzenellenbogen, B.S.: Estrogen-occupied estrogen receptor represses cyclin G2 gene expression and recruits a repressor complex at the cyclin G2 promoter. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 16272-16278.
- 55) Germain, P.; Staels, B.; Dacquet, C.; Spedding, M.; Laudet, V.: Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.* 2006, 58(4), 685-704.
- 56) Voňka, P.; Hrstka, R.: Overview of current findings about the role of oestrogen receptor alpha in cancer cell signaling pathways, *Klin. Onkol.* 2019, 32(3), 34-38.
- 57) Girgert, R.; Günter, E.; Gründker, C.: Estrogen signaling in ER $\alpha$ -negative breast cancer: ER $\beta$  and GPER. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2019, 9, 781.
- 58) Wilkenfeld, S.R.; Lin, Ch.; Frigo, D.E.: Communication between genomic and non-genomic signaling events coordinate steroid hormone actions. *Steroids.* 2018, 133: 2-7.
- 59) Glass, C.K.; Rosenfeld, M.G.: The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 2000, 14, 121-141.
- 60) McKenna, N.J.; O'Malley, B.W.: Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell.* 2002, 108, 465-474.
- 61) Hewitt, S.C.; Deroo, B.J.; Korach, K.S.: Signal transduction. A new mediator for an old hormone? *Science.* 2005, 307, 1572-1573.
- 62) Amenyogbe, E.; Chen, G.; Wang, Z.; Lu, X.; Lin, M.; Lin, A.Y.: A review on sex steroid hormone estrogen receptors in mammals and fish. *Int. J. Endocrinol.* 2020.

- 63) Bridgham, J.T.; Brown, J.E.; Rodriguez-Mari, A.; Catchen, J.M.; Thornton, J.W.: Evolution of a new function by a degenerative mutation in cephalochordate steroid receptors. *PLoS Genetics*. 2008, 4 (9).
- 64) Nishimiya, O.; Katsu, Y.; Inagawa, H.; Hiramatsu, N.; Todo, T.; Hara, A.: Molecular cloning and characterization of hagfish estrogen receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2017, 165, 190-201.
- 65) Osborne, C.K.: Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998, 51(3), 227-238.
- 66) Xia, Z.; Gale, W. L.; Chang, X., et al.: Phylogenetic sequence analysis, recombinant expression, and tissue distribution of a channel catfish estrogen receptor  $\beta$ . *Gen.Comp. Endocrinol.* 2000, 118(1), 139-149.
- 67) Kumar, R.; Zakharov, M.N.; Shagufta; Khan, S.H.; Miki, R.; Jang, H.; Toraldo, G.; Singh, R.; Bhasin, S.; Jasuja, R.: Review – The dynamic structure of the estrogen receptor. *J. Amino Acids*. 2011.
- 68) Pillerová, M.; Borbélyová, V.; Hodosy, J.; Riljak, V.; Renczés, E.; Frick, K.M.; Tóthová, L.: On the role of sex steroids in biological functions by classical and non-classical pathways. An update. *Front Neuroendocrinol.* 2021, 62, 100926.
- 69) Bjornstrom, L; Sjoberg, M.: Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol.* 2005, 19, 833-842.
- 70) Aquila, S.; De Amicis F.: Steroid receptors and their ligands: Effects on male gamete functions. *Exp. Cell Res.* 2014, 328, 303-313.
- 71) Acconcia, F.; Kumar, R.: Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer Lett.* 2006, 238, 1-14.
- 72) Kumar, P.; Wu, Q.; Chambliss, K.L.; Yuhanna, I.S.; Mumby, S.M.; Mineo, C. et al.: Direct interactions with Gai and G $\beta$  $\gamma$  mediate nongenomic signaling by estrogen receptor  $\alpha$ . *Mol. Endocrinol.* 2007, 21, 1370-1380.
- 73) Madak-Erdogan, Z.; Kieser, K.J.; Kim, S.H.; Komm, B.; Katzenellenbogen, J.A. Katzenellenbogen, B.S.: Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors. *Mol. Endocrinol.* 2008, 22, 2116-2127.
- 74) Brzozowski, A.M.; Pike, A.C.; Dauter, Z.; Hubbard, R.E.; Bonn, T.; Engström, O.; Ohman, L.; Greene, G.L.; Gustafsson, J.A.; Carlquist, M.: Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 1997, 389(6652), 753-758.

- 75) Shiau, A.K.; Barstad, D.; Radek, J.T.; Meyers, M.J.; Nettles, K.W.; Katzenellenbogen, B.S.; Katzenellenbogen, J.A.; Agard, D.A.; Greene, G.L.: Structural characterization of a subtype-selective ligand reveals a novel mode of estrogen receptor antagonism. *Nat. Struct. Biol.* 2002, 9(5), 359-64.
- 76) Carreau, S.; Hess, R.A.: Oestrogens and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2010, 27, 365(1546), 1517-1535.
- 77) Petit, F.; Valotaire, Y.; Pakdel, F.: Differential functional activities of rainbow trout and human estrogen receptors expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 1995, 233(2), 584-592.
- 78) Dahlman-Wright, K.; Cavailles, V.; Fuqua, S.A.; Jordan, C.; Katzenellenbogen, J.A.; Korach, K.S.; Maggi, A.; Muramatsu, M.; Parker, M.G.; Gustafsson, J.Å.: International union of pharmacology. LXIV. estrogen receptors. *Pharmacol. Rev.* 2006, 58, 773-781.
- 79) Heldring, N.; Pike, A.; Andersson, S.; Matthews, J.; Cheng, G.; Hartman, J.; Tujague, M.; Ström, A.; Treuter, E.; Warner, M.; Gustafsson, J.Å.: Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol. Rev.* 2007, 87, 905-931.
- 80) Hess, R.A.; Bunick, D.; Lee, K.H.; Bahr, J.; Taylor, J.A.; Korach, K.S.; Lubahn, D.B.: A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature.* 1997, 390(6659), 509-512.
- 81) Hess, R.A.: Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003, 1, 52.
- 82) Hess, R.A.; Carnes K.: The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Anim. Reprod.* 2004, 1, 5-30.
- 83) Sierens, J.E.; Sneddon, S.F., Collins, F.; Millar, M.R.; Saunders, P.T.: Estrogens in testis biology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005, 1061, 65-76.
- 84) Cooke, P.S.; Nanjappa, M.K.; Ko, C.; Prins, G.S.; Hess, R.A.: Estrogens in male physiology. *Physiol. Rev.* 2017, 97, 995-1043.
- 85) Erisman, B.E.; Craig, M.T.; Hastings, P.A.: A phylogenetic test of the size-advantage model: evolutionary changes in mating behavior influence the loss of sex change in a fish lineage. *Am. Nat.* 2009, 174(3).
- 86) Saczko, J.; Michel, O.; Chwiłkowska, A.; Sawicka, E.; Mączyńska, J.; Kulbacka, J.: Estrogen receptors in cell membranes: regulation and signaling. In: Kulbacka, J.; Satkauskas, S. (Eds.): *Transport across natural and modified biological membranes and its implications in physiology and therapy advances in anatomy, Embryology and Cell Biology.* Switzerland: Springer; 2017.

- 87) Martínez-Traverso, G.B.; Pearl, Ch.A.: Immunolocalization of G protein-coupled estrogen receptor in the rat epididymis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2015, 13, 48.
- 88) Sharma, G.; Prossnitz, E.R.: Mechanisms of estradiol-induced insulin secretion by the G protein-coupled estrogen receptor GPR30/GPER in pancreatic beta-cells. *Endocrinology.* 2011, 152(8), 3030-3039.
- 89) Filardo, E.J.; Quinn, J.A.; Bland, K.I.; Frackelton, A.R. Jr.: Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.* 2000, 14, 1649-1660.
- 90) Revankar, C.M.; Cimino, D.F.; Sklar, L.A.; Arterburn, J.B.; Prossnitz, E.R.: A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 2005, 307, 1625-1630.
- 91) Thomas, P.; Pang, Y.; Filardo, E.J.; Dong, J.: Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology.* 2005, 146, 624-632.
- 92) Ahola, T.M.; Manninen, T.; Alkio, N.; Ylikomi, T.: G protein-coupled receptor 30 is critical for a progestin-induced growth inhibition in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology.* 2002, 143, 3376-3384.
- 93) Vivacqua, A.; Bonofiglio, D.; Recchia, A.G.; Musti, A.M.; Picard, D.; Andò, S.; Maggiolini, M.: The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 2006, 20, 631-646.
- 94) Couse, J.F.; Korach, K.S.: Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr. Rev.* 1999, 20(3), 358-417.
- 95) Carreau, S.; Lambard, S.; Delalande, C.; Denis-Galeraud, I.; Bilinska, B.; Bourguiba, S.: Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003, 1, 35.
- 96) Gaudet, H.M.; Cheng, S.B.; Christensen, E.M.; Filardo, E.J.: The G-protein coupled estrogen receptor, GPER: the inside and inside-out story. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2015, 15, 207-219.
- 97) Häggström, M.; Richfield, D.: Diagram of the pathways of human steroidogenesis. *Wiki Journal of Medicine* 2014, 1(1), 5.
- 98) Silbernagl, S. D.; Despopoulos, A.: *Atlas fyziologie člověka.* Praha: Grada publishing spol. s.r.o. 2004.

- 99) Noppe, H.; Le Bizec, B.; Verheydena, K.; De Brabander, H. F.: Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices. *Anal. Chim. Acta.* 2008, 611-616.
- 100) Gillies, G.E.; McArthur, S.: Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol. Rev.* 2010, 62(2), 155-198.
- 101) Saldanha, C.J.: Estrogen as a neuroprotectant in both sexes: stories from the bird brain. *Front. Neurol.* 2020, 11, 497.
- 102) Thornton, M.J.: Estrogens and aging skin. *Dermatoendocrinol.* 2013, 5(2), 264-270.
- 103) Liang, J.; Shang, Y.: Estrogen and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 2013, 75, 225–240.
- 104) Colzato, L.S.; Hommel, B.: Effects of estrogen on higher-order cognitive functions in unstressed human females may depend on individual variation in dopamine baseline levels. *Front. Neurosci.* 2014, 8(65).
- 105) Almey, A.; Milner, T.A.; Brake, W.G.: Estrogen receptors in the central nervous system and their implication for dopamine-dependent cognition in females. *Horm. Behav.* 2015, 74, 125-138.
- 106) Frizell, B.; Dumas, J.A.: Examining the relationship between neurosteroids, cognition, and menopause with neuroimaging methods. *Curr. Psychiatry Rep.* 2018, 20(11), 96.
- 107) Sayed, Y.; Taxel, P.: The use of estrogen therapy in men. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2003, 3, 650-654.
- 108) Schulster, M.; Bernie, A.M.; Ramasamy, R.: The role of estradiol in male reproductive function. *Asian J. Androl.* 2016, 18, 435-440.
- 109) Gruber, C.J.; Tschugguel, W.; Schneeberger, C.; Huber, J.C.: Production and actions of estrogens. *N. Engl. J. Med.* 2002, 346, 340-352.
- 110) Vermeulen, A.; Kaufman, J.M.; Goemaere, S.; van Pottelberg, I.: Estradiol in elderly men. *Aging Male.* 2002, 5, 98-102.
- 111) Finkelstein, J.S.; Lee, H.; Burnett-Bowie, S-A.M.; Pallais, J.C.; Yu E.W.; Borges, L.F. et al.: Gonadal steroids and body composition, strength, and sexual function in men. *N. Engl. J. Med.* 2013, 369, 1011-1022.
- 112) Fox, C.S.; Yang, Q.; Cupples, L.A.; Guo, C-Y.; Atwood, L.D.; Murabito, J.M. et al.: Sex-specific association between estrogen receptor- $\alpha$  gene variation and measures of adiposity: the Framingham heart study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005, 90: 6257-6262.

- 113) Maffei, L.; Murata, Y.; Rochira, V.; Tubert, G.; Aranda, C.; Vazquez; et al.: Dysmetabolic syndrome in a man with a novel mutation of the aromatase gene: effects of testosterone, alendronate, and estradiol treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 2004, 89, 61-70.
- 114) Dakin, R.S.; Walter, B.R.; Secki, J.R.; Hadoke, P.W.F.; Drake, J.: Estrogens protect male mice from obesity complications and influence glucocorticoid metabolism. *Int. J. Obes. (Lond).* 2015, 39(10), 1539-1547.
- 115) Hamid, H.; Eskiciogllu, C.: Fate of estrogenic hormones in waste water and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Res.* 2012, 48(18), 5813-5833.
- 116) LaFleur, A.D.; Schug, K.A.: A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. *Anal. Chim. Acta* 2011, 696, 6-26.
- 117) Hurwitz, A.R.; Liu, S.T.: Determination of aqueous solubility and pKa values of estrogens: *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66, 624.
- 118) Ilardia-Arana, D.; Kristensen, H.G.; A. Mullertz, A.: Biorelevant dissolution media: Aggregation of amphiphiles and solubility of estradiol *J. Pharm. Sci.*, 2006, 95, 248.
- 119) Jones-Lepp, T.L.; Stevens, R.: Pharmaceuticals and personal care products in biosolids/sewage sludge: the interface between analytical chemistry and regulation. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 387, 1173-1183.
- 120) Adeel, M.; Song, X.; Wang, Y.; Francis, D.; Yang, Y.: Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environ. Int.* 2017, 99, 107-119.
- 121) Khanal, S.K. Xie, B.; Thompson, M.L.; Sung, S.W.; Ong, S.K.; Van Leeuwen, J.: Fate, transport, and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems. *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40(21), 6537-6546.
- 122) Sandner, F.; Welter, H.; Schwarzer, J.U.; Köhn, F.M.; Urbanski, H.F.; Mayerhofer, A.: Expression of the oestrogen receptor GPER by testicular peritubular cells is linked to sexual maturation and male fertility. *Andrology.* 2014, 2(5), 695-701.
- 123) Acconcia, F.; Fiocchetti, M.; Marino, M.: Xenoestrogen regulation of ER $\alpha$ /ER $\beta$  balance in hormone-associated cancers. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2017, 457, 3-12.
- 124) Bahr, J. M.: Ovary, Overview. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Knobil, E.; Neill J. D. (Eds.). San Diego: Academic Press, 1998, p. 3-7.

- 125) Tremollieres, F: Oral combined contraception: Is there any difference between ethinyl-estradiol and estradiol? *Gynecol. Obstet. Fertil.* 2012, 40(2), 109-115.
- 126) Sebkova, N.; Cerna, M.; Ded, L.; Peknicova, J.; Dvorakova-Hortova, K.: The slower the better: how sperm capacitation and acrosome reaction is modified in the presence of estrogens. *Reproduction.* 2012, 143(3), 297-307.
- 127) Free, M.J.; Jaffe R.A.: Collection of rete testis fluid from rats without previous efferent duct ligation. *Biol. Reprod.* 1979, 20(2), 269-278.
- 128) Hess, R.A.; Bunick, D.; Bahr, J.M.: Sperm, a source of estrogen. *Environ. Health Perspect.* 1995, 10, 59-62.
- 129) Faccio, L.; Da Silva, A.S.; Tonin, A.A.; Franca, R.T.; Gressler, L.T.; Copetti, M.M.; et al.: Serum levels of LH, FSH, estradiol and progesterone in female rats experimentally infected by *Trypanosoma evansi*. *Exp. Parasitol.* 2013, 135(1), 110-115.
- 130) Kelch, R.P.; Jenner, M.R.; Weinstein, R.; Kaplan, S.L.; Grumbach, M.M.: Estradiol and testosterone secretion by human, simian, and canine testes, in males with hypogonadism and in male pseudohermaphrodites with the feminizing testes syndrome. *J. Clin. Invest.* 1972, 51(4), 824-830.
- 131) Breuer, H.; Schott, E.: Studies of the metabolism of 17 $\alpha$ -estradiol in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1966, 26, 533-536.
- 132) Banerjee, S.; Saxena, N.; Sengupta, K.; Banerjee, S.K.: 17 $\alpha$ -estradiol-induced VEGF-A expression in rat pituitary tumor cells is mediated through ER independent but PI3K-Akt dependent signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 300(1), 209-215.
- 133) Strong, R.; Miller, R.A.; Antebi, A.; Astle, C.M.; Bogue, M.; Denzel, M.S.; Harrison, D.E.: Longer lifespan in male mice treated with a weakly estrogenic agonist, an antioxidant, an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor or a Nrf2-inducer. *Aging Cell.* 2016, 15, 872-884.
- 134) Edwards, D.P.; McGuire, W.L.: 17  $\alpha$ -Estradiol is a biologically active estrogen in human breast cancer cells in tissue culture. *Endocrinology.* 1980, 107, 884-891.
- 135) Trüeb, R.M.; Lee, W.S.: *Male Alopecia: Guide to Successful Management*; Springer Science & Business Media: New York, NY, USA, 2014; p. 93.
- 136) Perez, E.; Liu, R.; Yang, S.H.; Cai, Z.Y.; Covey, D.F.; Simpkins, J.W.: Neuroprotective effects of an estratriene analog are estrogen receptor independent in vitro and in vivo. *Brain Res.* 2005, 1038, 216-222.

- 137) Perusquía, M.; Navarrete, E.: Evidence that 17 $\alpha$ -estradiol is biologically active in the uterine tissue: Antiuterotonic and antiuterotrophic action. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005, 3, 30.
- 138) Toran-Allerand, C.D.: Estrogen and the brain: beyond ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , and 17 $\beta$ -estradiol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005, 1052, 136-144.
- 139) Toran-Allerand, C.D., Tinnikov, A.A.; Singh, R.J.; Nethrapalli, I.S.: 17 $\alpha$ -estradiol: a brain-active estrogen? *Endocrinology.* 2005, 146, 3843-3850.
- 140) Torre, D.; Lolli, F.; Ciana, P.; Maggi, A.: Sexual dimorphism and estrogen action in mouse liver. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017, 1043, 141-151.
- 141) Sievernich, A.; Wildt, L.; Lichtenberg-Frate, H.: In vitro bioactivity of 17 $\alpha$ -estradiol. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2004, 92, 455-463.
- 142) Moos, W.H.; Dykens, J.A.; Nohynek, D.; Rubinchik, E.; Howell, N.: Review of the effects of 17 $\alpha$ -estradiol in humans: A less feminizing estrogen with neuroprotective potential. *Drug Dev. Res.* 2009, 70, 1-21.
- 143) Schriefers, H.; Wright, M.C.; Rozman, T.; Hevert, F.: Inhibition of testosterone metabolism by 17- $\alpha$ -estradiol in rat liver slices. *Arzneimittelforschung* 1991, 41, 1186-1189.
- 144) Simpkins, J.W., Rajakumar, G.; Zhang, Y.Q.; Simpkins, C.E.; Greenwald, D.; Yu, C.J.; Bodor, N.; Day, A.L.: Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *J. Neurosurg.* 1997, 87, 724-730.
- 145) Gelinas, S., Bureau, G.; Valsatro, B.; Massicotte, G.; Cicchetti, F.; Chiasson, K.; Gagne, B.; Blanchet, J.; Matinoli, M.G.:  $\alpha$ - and  $\beta$ -estradiol protect neuronal but not native PC12 cells from paraquat-induced oxidative stress. *Neurotox. Res.* 2004, 6, 141-148.
- 146) Garratt, M.; Leander, D.; Pifer, K.; Bower, B.; Herrera, J.J.; Day, S.M.; Fiehn, O.; Brooks, S.V.; Miller, R.A.: 17- $\alpha$  estradiol ameliorates age-associated sarcopenia and improves late-life physical function in male mice but not in females or castrated males. *Aging Cell.* 2019, 18, 2.
- 147) Harrison, D.E.; Strong, R.; Allison, D.B.; Ames, B.N.; Astle, C.M.; Atamna, H.; Fernandez, E.; Flurkey, K.; Javors, M.A.; Nadon, N.L.; Nelson J.F.; Pletcher, S.; Simpkins, J.W.; Smith, D.; Wilkinson, J.E.; Miller, R.A.: Acarbose, 17- $\alpha$ -estradiol, and nordihydroguaiaretic acid extend mouse lifespan preferentially in males. *Aging Cell.* 2014, 13, 273-282.
- 148) Stout, M.B.; Steyn, F.J.; Jurczak, M.J.; Camporez, J.G.; Zhu, Y.; Hawse, J.R.; Jurk, D.; Palmer, A.K.; Xu, M.; Pirtskhalava, T.; et al.: 17 $\alpha$ -Estradiol alleviates age-related



- metabolic and inflammatory dysfunction in male mice without inducing feminization. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2017, 72, 3-15.
- 149) Harrison, D.E.; Strong, R.; Reifsnnyder, P.; Kumar, N.; Fernandez, E.; Flurkey, K.; Javors, M.A.; Lopez-Cruzan, M.; Macchiaroni, F.; Nelson, J.F.: 17- $\alpha$ -estradiol late in life extends lifespan in aging UM-HET3 male mice; nicotinamide riboside and three other drugs do not affect lifespan in either sex. *Aging Cell.* 2021, 20(5).
- 150) Garratt, M.; Bower, B.; Garcia, G.G.; Miller, R.A. Sex differences in lifespan extension with acarbose and 17- $\alpha$  estradiol: Gonadal hormones underlie male-specific improvements in glucose tolerance and mTORC2 signaling. *Aging Cell.* 2017, 16, 1256-1266.
- 151) Isola, J.V.V.; Zanini, B.M.; Sidhom, S.; Kopchick, J.J.; Bartke, A.; Masternak, M.M.; Stout, M.B.; Schneider, A.: 17 $\alpha$ -Estradiol promotes ovarian aging in growth hormone receptor knockout mice, but not wild-type littermates. *Exp. Gerontol.* 2020, 129.
- 152) Allard, C.; Morford, J.J.; Xu, B.; Salwen, B.; Xu, W.; Desmoulins, L.; Zsombok, A.; Kim, J.K.; Levin, E.R.; Mauvais-Jarvis, F.: Loss of nuclear and membrane estrogen Receptor- $\alpha$  differentially impairs insulin secretion and action in male and female mice. *Diabetes.* 2019, 68, 490-501.
- 153) Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie.* Praha: Grada publishing spol. s.r.o., 2004.
- 154) Iwase, H.; Yamamoto, Y.; Yamamoto-Ibusuki, M.; Murakami, K.I.; Okumura, Y.; Tomita, S.; Inao, T.; Honda, Y.; Omoto, Y.; Iyama, K.I.: Ethinylestradiol is beneficial for postmenopausal patients with heavily pre-treated metastatic breast cancer after prior aromatase inhibitor treatment: a prospective study. *Br. J. Cancer.* 2013, 109(6), 1537-1542.
- 155) Coelingh Bennink, H.J.T.; Verhoeven, C.; Dutman, A.E.; Thijssen, J.: The use of high-dose estrogens for the treatment of breast cancer. *Maturitas.* 2017, 95, 11-23.
- 156) Lu, T.; Ma, Y.; Hu, H.; Chen, Y.; Zhao, W.; Chen, T.: Ethinylestradiol liposome preparation and its effects on ovariectomized rats' osteoporosis. *Drug Deliv.* 2011, 18(7), 468-477.
- 157) Aris, A.Z.; Shamsuddin, A.S.; Praveena, S.M.: Occurrence of 17  $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environ. Int.* 2014, 69, 104-119.
- 158) Kuster, M.; de Alda, M.J.; Barceló, D.: Estrogens and progestrogens in wastewater, sludge, sediments and soil. *Handb. Environ. Chem.* 2005, 5, 1-24.

- 159) Ingrand, V.; Herry, G.; Beausse, J.; de Roubin, M. R.: Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chrom. A*, 2003, 1020, 99-104.
- 160) Jurado, A.; Vazquez-Sune, E.; Carrera, J.; Lopez de Alda, M. L.; Pujades, E.; Barcelo, D.: Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Sci. Total Environ.* 2012, 440, 82-94.
- 161) Baronti, C.; Curini, R.; D'Ascenzo, G.; Di Corcia, A.; Gentili, A.; Samperi, R.: Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ. Sci. Tec.* 2000, 34 (24), 5059-5066.
- 162) Li, J.; Jiang, L.; Liu, X.; Lv, J.: Adsorption and aerobic biodegradation of four selected endocrine disrupting chemicals in soil – water system. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2013, 76, 3-7.
- 163) Partridge, C.; Boettcher, A.; Jones, A.G.: Short-term exposure to a synthetic estrogen disrupts mating dynamics in a pipefish. *Horm. Behav.* 2010, 58, 800-807.
- 164) Zhang, X.; Gao, Y.; Li, Q.; Li, G.; Guo, Q.; Yan, C.: Estrogenic compounds and estrogenicity in surface water, sediments, and organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2011, 61, 93-100.
- 165) De Wit, M.; Keil, D.; van der Ven, K.; Vandamme, S.; Witter, E.; de Coen, W.: An integrated transcriptomic and proteomic approach characterizing estrogenic and metabolic effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 2010, 167, 190-210.
- 166) Laganà, A.; Bacaloni, A.; Fago, G.; Marino, A.: Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 2000, 14(6), 401-407.
- 167) Tomšíková, H.; Aufartová, J.; Solich, P.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J.; Nováková, J.: High- sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. *Trends Anal. Chem.* 2012, 34, 35-58.
- 168) Gu, N.H.; Zhao, W.L.; Wang, G.S. et al.: Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2019, 17, 66.
- 169) Millette, C. F.: Spermatozoa. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Knobil, E.; Neill J. D. (Eds.). San Diego: Academic Press, 1998, p. 586-596.
- 170) Gage, M.J.: Mammalian sperm morphometry. *Proc. Biol. Sci.* 1998, 265, 97-103.

- 171) Gomendio, M.; Roldan, E.R.: Coevolution between male ejaculates and female reproductive biology in eutherian mammals. *Proc. Biol. Sci.* 1993, 252, 7-12.
- 172) Mortimer, D.: The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. *Mol. Hum. Reprod.* 2018, 24(12), 567-592.
- 173) Firman, R.C.; Simmons, L.W.: Sperm midpiece length predicts sperm swimming velocity in house mice. *Biol. Lett.* 2010, 6(4) 513-516.
- 174) Mossman, J., et al.: Sperm morphology and velocity are genetically codetermined in the zebra finch. *Evolution.* 2009, 63(10), 2730-2737.
- 175) Bennison, C.; Hemmings, N.; Slate, J.; Birkhead, T.: Long sperm fertilize more eggs in a bird. *Proc. Biol. Sci.* 2015, 282.
- 176) Dvořáková, K.; Moore, H. D. M.; Šebková, N.; Paleček, J.: Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction.* 2005, 130(1), 61-69.
- 177) Briz, M.D; Bonet, S.; Pinart, B.; Egozcue, J.; Camps R.: Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis. *J. Androl.* 1995, 16, 175-188.
- 178) Gadea, J.; Matas, C.; Lucas, X.: Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Anim. Reprod. Sci.* 1998, 54, 95-108.
- 179) Gadea, J.; Selles, E.; Marco, M.A.: The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reprod. Domest Anim.* 2004, 39, 303-308.
- 180) Fraser, L.R.: The “switching on” of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 2010, 77, 197-208.
- 181) Visconti, P.E., Westbrook, V.A.; Chertihin, O.; Demarco, I.; Sleight, S.; Diekman, A.B.: Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J. Reprod. Immunol.* 2002, 53, 133, 150.
- 182) Fraser, L.R.: Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation. *J. Exp. Zool.* 1977, 202, 439-444.
- 183) Suarez, S.S.; Osman, R.A.: Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biol. Reprod.* 1987, 36, 1191-1198.
- 184) Yanagimachi, R.: The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J. Reprod. Fertil.* 1970, 23, 193-196.
- 185) Suarez, S.S.: Control of hyperactivation in sperm. *Hum. Reprod. Update.* 2008, 14, 647-657.

- 186) Mortimer, S.T.: CASA-practical aspects. *J. Androl.* 2000, 2, 515-524.
- 187) Brinsko, S.P.; Blanchard, T.L.; Varner, D.D.; Schumacher, J.; Love, Ch. C.; Hinrichs, K.; Hartman, D.L.: *Manual of Equine Reproduction (Third Edition)*, Mosby, 2011.
- 188) Mortimer, S.T.; Gerhard van der Horst, G.; Mortimer, D.: The future of computer-aided sperm analysis. *Asian J. Androl.* 2015, 17(4), 545-553.
- 189) Naz, R. K.; Rajesh, P. B.: Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Rep. Biol. Endocrinol.* 2004, 2, 75-87.
- 190) Cross, N. L.: Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 1998, 59, 7-11.
- 191) Martinez, P.; Morros, A.: Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front. Biosci.* 1996, 1, 103-117.
- 192) Bedford, J. M.; Cross, N. L.: Sperm Capacitation. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Knobil, E.; Neill J. D. (Eds.). San Diego: Academic Press, 1998, p. 597-602.
- 193) Demarco, I. A.; Espinosa, F.; Edwards, J.; Sosnik, J.; De la Vega-Beltran, J.L.; Hockensmith, J. W.; Kopf, G. S.; Darszon, A.; Visconti, P. E.: Involvement of a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in mouse sperm capacitation. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 7001-7009.
- 194) Munoz-Garay, C.; De la Vega-Beltran, J. L.; Delgado, R.; Labarca, P.; Felix, R.; Darszon, A.: Inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in spermatogenic cells: functional expression and implication in sperm capacitation. *Develop. Biol.* 2001, 234, 261-274.
- 195) Mahony, M. C.; Gwathmey, T. Y.: Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1999, 60, 1239-1243.
- 196) Hunter, T.: Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2009, 21(2), 140-146.
- 197) Robinson, D.R.; Wu, Y.M.; Lin, S.F.: The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene.* 2000; 19, 5548-5557.
- 198) Gotink, K.J.; Verheul H.M.: Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis.* 2010; 13, 1-14.
- 199) Alvau, A.; Battistone, M.A.; Gervasi, M.G.; Navarrete, F.A.; Xu, X.; Sánchez-Cárdenas, C.; De la Vega-Beltran, J.L.; Da Ros, V.G.; Greer, P.A.; Darszon, A.; Krapf, D.; Salicioni, A.M.; Cuasnicu, P.S.; Visconti, P.E.: The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. *Development.* 2016, 143 (13), 2325-2333.

- 200) Ded, L.; Sebkova, N.; Cerna, M.; Elzeinova, F.; Dostalova, P.; Peknicova, J.; Dvorakova-Hortova, K.: In vivo exposure to 17 $\beta$ -estradiol triggers premature sperm capacitation in cauda epididymis. *Reproduction*. 2013, 145(3), 255-263.
- 201) Breitbart, H.; Spungin, B.: The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod*. 1997, 3, 195-202.
- 202) Peknicová, J.; Kyselová, V.; Boubelík, M.; Buckiová, D.: Effect of an endocrine disruptor on mammalian fertility. Application of monoclonal antibodies against sperm proteins as markers for testing sperm damage. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2002, 47, 311-318.
- 203) Baldi, E.; Luconi, M.; Muratori, M.; Marchiani, S.; Tamburrino, L.; Forti, G.: Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: Facts and fictions. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2009, 308, 39-46.
- 204) López-Torres, A.S.; Chirinos, M.: Modulation of human sperm capacitation by progesterone, estradiol, and luteinizing hormone. *Reprod. Sci*. 2017, 24(2), 193-201.
- 205) Luconi, M.; Muratori, M.; Forti, G.; Baldi, E. Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects. *J. Clin. Endocrinol. Metabol*. 1999, 84, 1670-1678.
- 206) Noguchi, T.; Fujinoki, M.; Kitazawa, M.; Inaba, N.: Regulation of hyperactivation of hamster spermatozoa by progesterone. *Reprod. Med. Biol*. 2008, 7, 63-74.
- 207) Fujinoki, M.: Suppression of progesterone-enhanced hyperactivation in hamster spermatozoa by estrogen. *Reproduction*. 2010, 140, 453-464.
- 208) Fujinoki, M.: Regulation and disruption of hamster sperm hyperactivation by progesterone, 17 $\beta$ -estradiol and diethylstilbestrol. *Reprod. Med. Biol*. 2014, 13, 143-152.
- 209) Back, D.J.; Breckenridge, A.M.; Crawford, F.E.; MacIver, M.; Orme, M.L.; Rowe, P.H.; Watts, M.J.: An investigation of the pharmacokinetics of ethynylestradiol in women using radioimmunoassay. *Contraception*. 1979, 20(3), 263-273.
- 210) Kharma, K.; Stone, S.; Thorneycroft, I.H.; Nakamura, R.M.; Mishell, D.R.: Cross-reaction of contraceptive steroids in competitive binding assays of progesterone and estradiol. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1972, 112(5), 676-680.
- 211) Giese, R.W.: Measurement of endogenous estrogens: analytical challenges and recent advances. *J. Chromatogr A*. 2003, 1000(1-2), 401-412.

- 212) Contin, M.; Flor, S.; Lucangioli, S.; Tripodi, V.: Molecularly imprinted solid phase extraction before capillary electrophoresis for the analysis of estrogens in serum samples. *Curr. Anal. Chem.*, 2014, 10, 235-240.
- 213) Ganan, J.; Morante-Zarcelero, S.; Gallego-Pico, A.; Garcinuno, R.M.; Fernandez-Hernando, P.; Sierra, I.: Evaluation of a molecularly imprinted polymer for determination of steroids in goat milk by matrix solid phase dispersion. *Talanta*. 2014, 126, 157-162.
- 214) Zhang, F.; Bartels, M.J.; Geter, D.R.; Carr, M.S.; McClymount, L.E.; Marino, T.A.; Klecka, G.M.: Simultaneous quantitation of testosterone, estradiol, ethinylestradiol, and 11-ketotestosterone in fathead minnow fish plasma by liquid chromatography/positive atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 2009, 23, 3637-3646.
- 215) Huang, K.J.; Liu, Y.J.; Shi, G.W.; Yang, X.R.; Liu., Y.M.: Label-free aptamer sensor for 17 beta-estradiol based on vanadium disulfide nanoflowers and Au nanoparticles. *Sens. Actuators B. Chem.* 2014, 201, 579-585.
- 216) Wang, D.; Xie, J.B.; Zhu, X.C.; Li, J.Q.; Zhao, D.Q.; Zhao, M.P.: A recombinant estrogen receptor fragment-based homogeneous fluorescent assay for rapid detection of estrogens. *Biosens. Bioelectron.* 2014, 55, 391-395.
- 217) Wang, Z.G.; Wang, P.; Tu, X.J.; Wu, Y.Y.; Zhan, G.Q.; Li, C.Y.: A novel electrochemical sensor for estradiol based on nanoporous polymeric film bearing poly{1-butyl-3-[3-(N-pyrrole)propyl]imidazole dodecyl sulfonate} moiety. *Sens. Actuators B Chem.* 2014, 193, 190-197.
- 218) Zhang, J.J.; Cao, J.T.; Shi, G.F.; Huang, K.J.; Liu, Y.M.; Chen, Y.H.: Label-free and sensitive electrochemiluminescence aptasensor for the determination of 17 beta-estradiol based on a competitive assay with cDNA amplification. *Anal. Methods*. 2014, 6, 6796-6801.
- 219) Park, K.J.; Mueller, C.T.; Markman, S; Swinscow-Hall, O.; Pascoe, D.; Buchanan, K.L.: Detection of endocrine disrupting chemicals in aerial invertebrates at sewage treatment works. *Chemosphere*. 2009, 77, 1459-1464.
- 220) Fan, H.; Papouskova, B.; Lemr, K.; Wigginton, J.G.; Schug, K.A.: Bulk derivatization and direct injection of human cerebrospinal fluid for trace-level quantification of endogenous estrogens using trap-and-elute liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 2014, 37, 2010-2017.

- 221) Liu, L.P.; Xia, T.W.; Zhang, X.Q.; Barr, D.B.; Alamdar, A.; Zhang, J.; Tian, M.P.; Huang, Q.Y.; Shen, H.Q.: Biomonitoring of infant exposure to phenolic endocrine disruptors using urine expressed from disposable gel diapers. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, 406, 5049-5054.
- 222) Keski-Rahkonen, P.; Huhtinen, K.; Desai, R.; Harwood, D.T.; Handelsman, D.J.; Poutanen, M.; Auriola S.: LC–MS analysis of estradiol in human serum and endometrial tissue: comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization. *J. Mass Spectrom.* 2013, 48, 1050-1058.
- 223) Socas-Rodriguez, B.; Asensio-Ramos, M.; Hernandez-Borges, J.; Rodriguez-Delgado, M.A.: Hollow-fiber liquid-phase microextraction for the determination of natural and synthetic estrogens in milk samples. *J. Chromatogr. A.* 2013, 1313, 175-184.
- 224) Zhong, Q.; Hu, Y.; Hu, Y.; Li, G.: Dynamic liquid–liquid–solid microextraction based on molecularly imprinted polymer filaments on-line coupling to high performance liquid chromatography for direct analysis of estrogens in complex samples. *J. Chromatogr. A.* 2012, 1241, 13-20.
- 225) Wheaton, J.P.; Chambers, E.E.; Fountain, K.J.: Challenges in developing an ultra-sensitive bioanalytical method for ethinylestradiol in human plasma. *Bioanalysis.* 2012, 4, 769-781.
- 226) Bichon, E.; Beasse, A.; Prevost, S.; Christien, S.; Courant, F.; Monteau, F.; Le Bizec, B.: Improvement of estradiol esters monitoring in bovine hair by dansylation and liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis in multiple reaction monitoring and precursor ion scan modes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012, 26, 819-827.
- 227) Zhao, Y.L.; Boyd, J.M.; Sawyer, M.B.; Li, X.F.: Liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of free and conjugated estrogens in breast cancer patients before and after exemestane treatment. *Anal. Chim. Acta.* 2014, 806, 172-179.
- 228) Barreiros, L.; Queiroz, J.F.; Magalhães, L.M.; Silva, A.M.T.; Segundo, M.A.: Analysis of 17- $\beta$ -estradiol and 17- $\alpha$ -ethinylestradiol in biological and environmental matrices — A review. *Microchem. J.* 2016, 126, 243-262.
- 229) Aris, A.Z.; Shamsuddin, A.S.; Praveena, S.M.: Occurrence of 17 alpha-ethinylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environ. Int.* 2014, 69, 104-119.
- 230) Tang, Z.; Liu, Z.H.; Wang, H.; Dang, Z.; Liu, Y.: A review of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) in surface water across 32 countries: Sources, concentrations, and potential estrogenic effects. *J. Environ. Manage.* 2021, 292, 112804.

- 231) De Franca, J.F.; de Oliveria R.A.; Gerenutti, M.; Jozala, F.; Grotto, D.: High performance liquid chromatography applied in hormone contaminations detection. *J. Liq. Chromatogr. Relat.* 2018, 41, 377-383.
- 232) Holcapek, M.; Jirasko, R.; Lisa, M.: Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *J. Chromatogr. A.* 2012, 1259, 3-15.
- 233) Friedecký, D.; Lemr, K.: Úvod do hmotnostní spektrometrie, 1. Díl. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2012, 20 (41), 152-157.
- 234) Himmelsbach, M.: 10 years of MS instrumental developments impact on LCMS/MS in clinical chemistry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2012, 883-884, 3-17.
- 235) Somogyi, A.: Mass spectrometry instrumentation and techniques. In: *Medical applications of mass spectrometry*. Vékey, K.; Telekes, A.; Vertes, A. (Eds.). Amsterdam: Elsevier, 2008, p. 93-140.
- 236) Mahmood, T.; Yang, P.C.: Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N. Am. J. Med. Sci.* 2012, 9, 429-434.
- 237) Frost, A.A.; Pearson, R.G.: *Kinetics and mechanism: A study of homogeneous chemical reactions*. 2nd edition John Wiley; 1961.
- 238) Tockstein, A.: A kinetic model with bistability and oscillations on the thermodynamic branch applicable to a continuously stirred tank reactor system. *Chem. Phys. Lett.* 1987, 141, 95-98.
- 239) Tockstein, A.: Simple kinetic models for a tristable system in a continuously stirred tank reactor. *Chem. Phys. Lett.* 1992, 188, 5-10.
- 240) Mariani, L.; Löhning, M.; Radbruch, A.; Höfer, T.: Transcriptional control networks of cell differentiation: insights from helper T lymphocytes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2004, 86, 45-76.
- 241) Zhdanov, V.P.: Transient stochastic bistable kinetics of gene transcription during the cellular growth. *Chem. Phys. Lett.* 2006, 424, 394-398.
- 242) Zhdanov, V.P.: Effect of cell-cell communication on the kinetics of proliferation and differentiation of stem cells. *Chem. Phys. Lett.* 2007, 437, 253-256.
- 243) Zhdanov, V.P.: Bistability in gene transcription: Interplay of messenger RNA, protein, and nonprotein coding RNA. *Biosystems.* 2009, 95, 75-81.
- 244) Butcher, J.C.: A history of Runge-Kutta methods. *Appl. Numer. Math.* 1996, 20, 247-260.



- 245) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*.1970, 227, 680-685.
- 246) Zigo, M.; Jonakova, V.; Manaskova-Postlerova, P.: Electrophoretic and zymographic characterization of proteins isolated by various extraction methods from ejaculated and capacitated boar sperms. *Electrophoresis*. 2011, 32, 1309-1318.
- 247) Hanselman, D.; Littlefield, B.: *Mastering MATLAB: A comprehensive tutorial and reference*. Prentice-Hall, Inc., 1996.
- 248) Moré, J. J.: The Levenberg-Marquardt algorithm: Implementation and theory. *Numerical analysis*, In: *Lecture Notes in Mathematics*. Watson, G. A. (Ed.), Springer Verlag, 1977, p. 105-116.
- 249) Banerjee, S.; Saxena, N.; Sengupta, K.; Banerjee, S.K.: 17alpha-estradiol-induced VEGF-A expression in rat pituitary tumor cells is mediated through ER independent but PI3K-Akt dependent signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 300(1), 209-215.
- 250) Luine, V.N.; Jacome, L.F.; Maclusky, N.J.: Rapid enhancement of visual and place memory by estrogens in rats. *Endocrinology*. 2003, 144, 2836-2844.
- 251) Lundeen, S.G.; Carver, J.M.; McKean, M.L.; Winneker, R.C.: Characterization of the ovariectomized rat model for the evaluation of estrogen effects on plasma cholesterol levels. *Endocrinology*. 1997, 138,1552-1558.
- 252) MacLusky, N.J.; Luine, V.N.; Hajszan, T.; Leranthy, C.: The 17alpha and 17beta isomers of estradiol both induce rapid spine synapse formation in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats. *Endocrinology*. 2005, 146(1), 287-293.

## 6. PŘÍLOHY