

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ZOOLOGIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vliv estrogenů na spermie savců

Praha 2010

Školitel bakalářské práce:

Autor:

RNDr. Kateřina Hortová, Ph.D.

Adéla Šidlová

Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Kateřině Hortové, Ph.D. za její odborné vedení, trpělivost a ochotnou spolupráci v průběhu tvorby této bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala své rodině a příteli za pomoc a vytvoření příjemné atmosféry pro tvorbu bakalářské práce.

Obsah

Obsah

Obsah	3
Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
Cíle práce.....	7
1. Stavba savčí spermie	8
1.1. Hlavička spermie	9
1.1.1. Jádro	9
1.1.2. Akrozóm	10
1.2. Biččík	11
1.3. Plazmatická membrána.....	13
2. Estrogeny jako steroidní hormony.....	14
2.1. Biologický efekt estrogenů.....	14
2.2. Strukturální rysy estrogenů.....	15
2.3. Zdroje estrogenů.....	16
2.3.1. Biosyntetické endoestrogeny.....	16
2.3.2. Endokrinní disruptory.....	18
2.3.2.1. Fytoestrogeny.....	19
2.3.2.2. Xenoestrogeny	20
2.4. Transport a metabolismus estrogenů.....	20
2.5. Estrogenní receptory.....	21
2.5.1. Estrogenní receptor α (ER α) a β (ER β)	21
2.5.2. GPR30/GPER.....	22
2.6. Mechanismus estrogenní akce	22
3. Estrogeny a samčí reprodukční trakt	24
3.1. Syntéza estrogenů v savčích varlatech	24
3.1.1. Cytochrom P450 aromatáza	25
3.2. Receptory estrogenů v samčím reprodukčním traktu	25
3.2.1. Lokalizace ER v savčích varlatech a spermích	25
3.2.2. Transgenní modely myši (ER α KO, ArKO).....	26
3.2.2.1. ER α KO (estrogen-receptor α knock-out myš).....	26
3.2.2.2. ArKO (aromatase knock out).....	27
3.3. Pochody spermatogeneze ovlivněné estrogeny	27

4. Negativní vliv environmentálních estrogenů na plodnost savčích samců.....	29
4.1. Zhoršení kvality savčích spermií.....	29
4.2. Zvýšený výskyt kryptorchismu a hypospadie.....	30
4.3. Zvýšený výskyt rakoviny varlat.....	31
4.4. Změna poměru pohlaví	31
Závěr.....	32
Použitá literatura	33

Abstrakt

Po mnoho let byly estrogény brány jako typicky samičí pohlavní hormony. Dnes už je jisté, že jsou velmi důležité i v regulaci samčí reprodukce. A to ať už je jejich účinek pozitivní či negativní.

Endogenní estrogény jsou u savčích samců důležitou částí endokrinního systému. Estrogény hrají významnou roli při růstu a udržování kostní hmoty, stejně jako při vývoji zárodečných buněk a při pochodech spermatogeneze. Zdravé spermie jsou esenciální pro úspěšnou reprodukci. A právě endogenní estrogény se svým vlivem částečně podílejí v regulaci správného vývoje spermií.

Vedle pozitivního vlivu endogenních estrogenů je zde ovšem i negativní vliv estrogenů z vnějšího prostředí, tzv. environmentálních estrogenů. Mezi environmentální estrogény patří chemické látky vznikající lidskou činností, xenoestrogény, které čím dál více kontaminují životní prostředí. Nebezpečí těchto látek estrogení povahy se skrývá v jejich schopnosti fungovat jako endokrinní disruptory, které způsobují defekty v řadě aspektů savčí reprodukce.

Vzhledem k tomu, že v dnešní době se vyskytuje v prostředí čím dál více environmentálních estrogenů, které mohou interferovat s hormonální drahou savců a ovlivňovat tak jejich reprodukci, je důležité se tomuto tématu věnovat. Reprodukční poruchy, které mohou být vyvolány endokrinními disruptory nepředstavují riziko jen pro nás, ale i pro další generace.

Klíčová slova: spermie, estrogény, environmentální estrogény, xenoestrogény, endokrinní disruptory

Abstract

For many years, estrogens have been considered typically female sex hormones. It is now certain that they are also very important in the regulation of male reproduction, whether their effect is positive or negative.

Endogenous estrogens in mammalian males are an important part of the endocrine system. Estrogens play an important role in the growth and maintenance of bone mass, as well as in the development of germ cells and in the maturation of spermatogenesis. Healthy sperm are essential for successful reproduction. Effect of endogenous estrogens is partly involved in the regulation of proper development of sperm.

Besides the positive effect of endogenous estrogens, there is also a negative effect of estrogens from the external environment, so-called environmental estrogens. Environmental estrogens are man-made chemicals, xenoestrogens, which increasingly contaminate the environment. Hazards of these estrogenic substances in nature is hidden in their ability to act as endocrine disruptors, which cause defects in many aspects of mammalian reproduction.

With regards to the fact that there are more and more substances in current environment that can interfere with hormonal path of mammalian reproduction, it is important to look at this issue. Reproductive disorders that may be caused by endocrine disruptors pose a risk not only for us but for future generations.

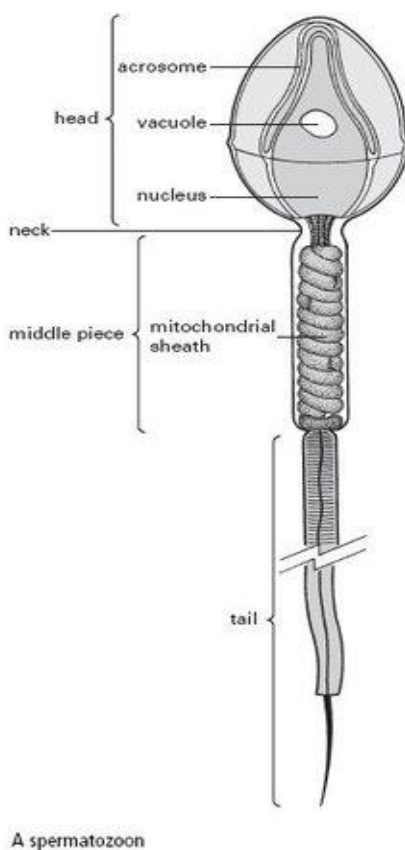
Key words: sperm, estrogens, environmental estrogens, xenoestrogens, endocrine disruptors

Cíle práce

- Popsat stavbu savčí spermie
- Seznámit se s obecnou funkcí estrogenů
- Osvojit si souvislosti mezi estrogeny a samčím reprodukčním traktem
- Popsat negativní vliv environmentálních estrogenů na samčí reprodukční trakt a plodnost u samců savců

1. Stavba savčí spermie

Spermie jsou samčí gamety, které mají vysoce specializovanou strukturu a funkci. Jsou konečným produktem spermatogeneze probíhající v semenotvorných kanálcích varlat. Následně spermie maturují v nadvarlatech a tím získávají schopnost pohybu. Savčí spermie se skládají ze dvou strukturně a morfologicky odlišných složek: hlavičky s uloženou DNA a bičíku, který zajišťuje pohyb neboli motilitu spermie. Obě tyto části jsou obaleny plazmatickou membránou spermie. Specializovaná struktura spermiím umožňuje opustit tělo, spojit se s vajíčkem (oocyt), vytvořit zygotu a dát tak za vznik novému organismu. Hlavní funkcí spermie je tedy oplodnit oocyt, ale také ho aktivovat, aby mohlo dokončit druhé meiotické dělení. Spermie neobsahují cytoplazmatické organely jako ribozomy, endoplazmatické retikulum či Golgiho aparát, které jsou nepotřebné pro přenos jádra. Na druhou stranu obsahují pro spermii specializované organely jako je akrozóm, napomáhající při akrozomální reakci k průniku spermie skrze zona pellucida a mitochondriální pochvu, obsahující velké množství mitochondrií, které jsou umístěny tak, aby co nejefektivněji poháněly bičík.

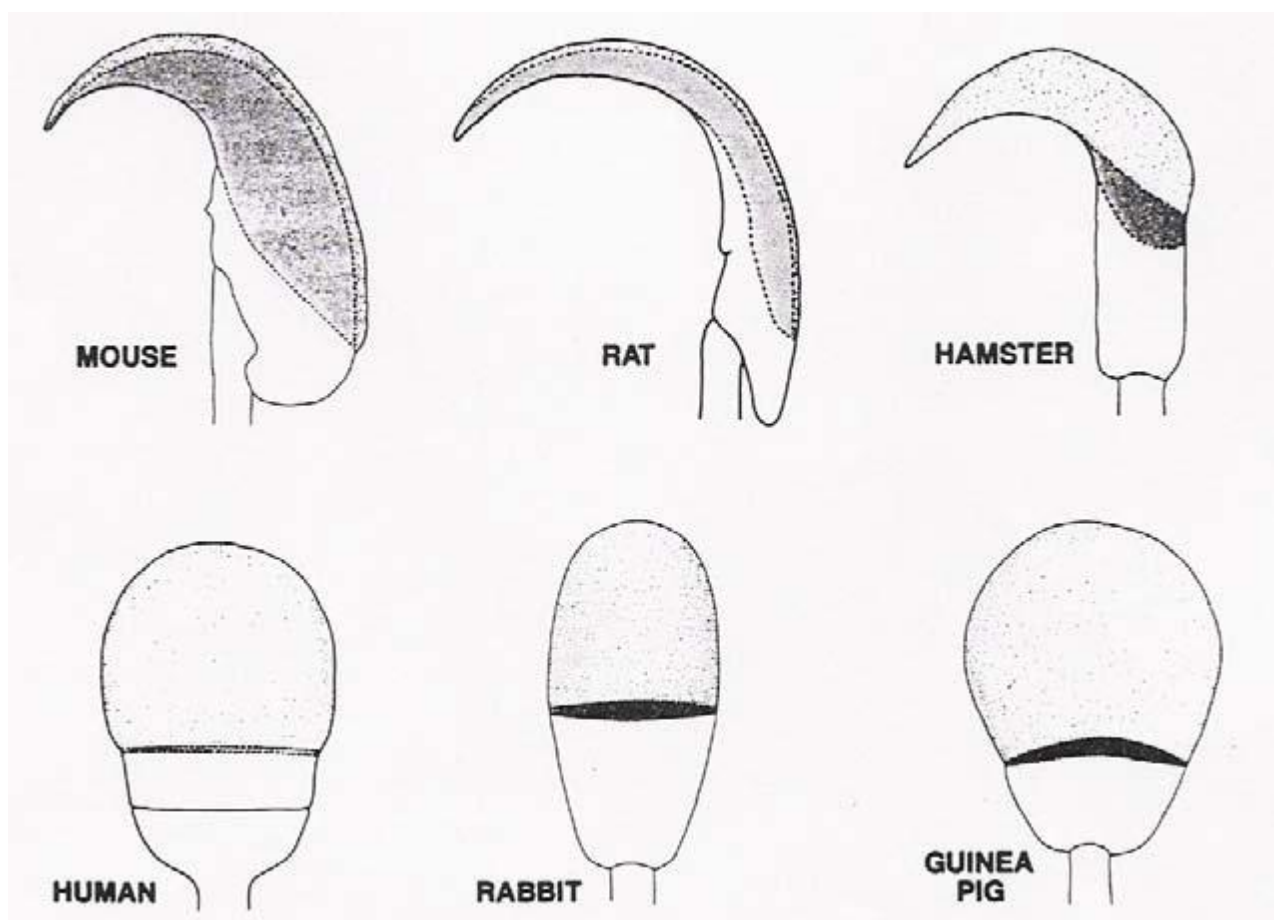


Obr. 1 Stavba savčí spermie ([http://www.jrank.org/health/pages/31094/spermatozoon-\(sperm\)-n-\(pl-spermatozoa\).html](http://www.jrank.org/health/pages/31094/spermatozoon-(sperm)-n-(pl-spermatozoa).html))

1.1. Hlavička spermie

K tvarování a organizaci hlavičky savčí spermie dochází během spermatogeneze prostřednictvím různých buněčných a molekulárních procesů. Tyto události zahrnují sekvenční změny v jádře- prodloužení a kondenzace chromatid a tvorbu akrozómu, který pochází z Golgiho aparátu, v součinnosti s tvorbou přechodné struktury předních svazků mikrotubulů. Hlavička savčí spermie má velikost přibližně 4,6-12,1 μm a skládá se z haploidního jádra a akrozómu, které jsou obklopeny malým množstvím cytoplazmy a cytoskeletárních struktur. Většina cytoplazmy je eliminována během zrání spermií, ponechávají se pouze organely, které jsou modifikované pro spermatické funkce. (Gilbert 2000). Akrozóm leží v anteriorní oblasti hlavičky a překrývá jádro. Cytoskeletární struktury se nachází v oblasti mezi vnější akrozomální membránou a plazmatickou membránou, vnitřní akrozomální membránou a jádrem (perinukleární theca) a v postakrozomálním segmentu a slouží k udržení tvaru hlavičky spermie.

Tvar hlavičky spermie se liší u jednotlivých druhů savců. Rozlišujeme čtyři základní morfologické typy hlaviček: kulaté (člověk, králík), oválné (kanec, norek), háčkovité neboli falciformní (myš, potkan) a hlavičky s velkým akrozómem (veverka, morče) (Millette 1999). U lidí, ale můžeme nalézt časté variability ve tvaru a velikosti hlavičky (Eddy & O'Brien 1994).



Obr. 2 Morfologické typy hlavičky spermie (Eddy & O'Brien 1994)

1.1.1. Jádro

Jádro spermie má specializovanou strukturu, odlišnou od jiných somatických buněk. V jádře spermie je chromatin více kondenzovaný a obsahuje poloviční sadu chromozomů, jádro je tedy haploidní, a to díky dvěma meiotickým dělením, které se uskuteční během spermatogeneze. Transkripce genů je ve spermatickém jádře zastavena a vysoká kondenzace chromatinu umožňuje minimalizování velikosti jádra, čímž se usnadňuje jeho přenos do vajíčka. Histony, vyskytující se u somatických buněk jsou u DNA spermie během konečné fáze spermatogeneze nahrazeny bazickými proteiny, protaminy. Tyto specializované proteiny obsahují velké množství argininu a cysteinu a vysoce kondenzovaná DNA v komplexu s protaminy je stabilizovaná disulfidickými můstky mezi protaminy (Eddy & O'Brien 1994). Díky disulfidickým můstkům vzniká rigidní útvar, který chrání DNA před mechanickým poškozením při přesunu do oocyty. Ovšem ne všechny histony jsou během spermatogeneze nahrazovány. Na kondenzaci chromatinu v nerozpustný komplex se také podílí histon H1, jehož přítomnost v jádrech neporušených spermií byla potvrzena v roce 2008 M. L. Sánchez-Vázquez et al.

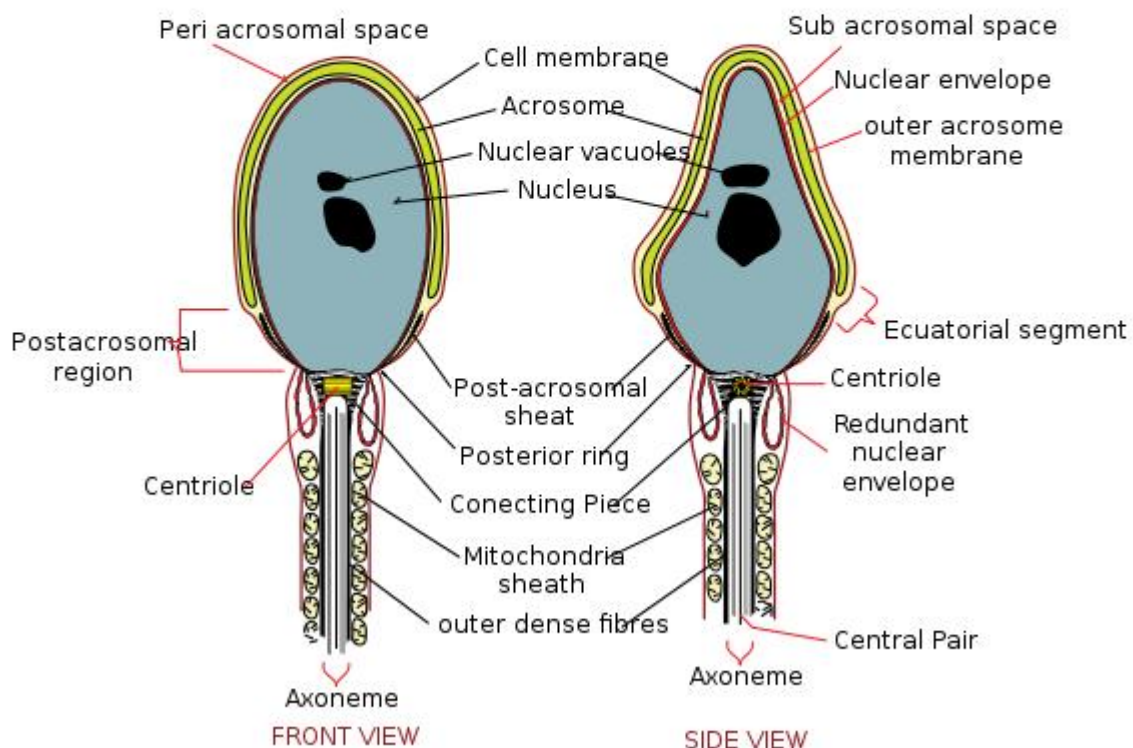
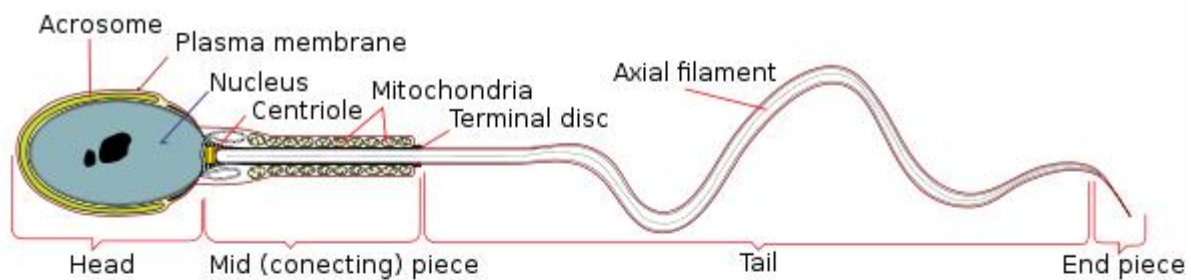
Jádro spermie je obaleno specializovaným jaderným obalem, který se skládá ze dvou částí- vnitřní a vnější membrány. Ty jsou od sebe vzdáleny 7-10 nm, u ostatních somatických buněk je tato vzdálenost 40-60 nm. Další rozdílnou charakteristikou jaderného obalu spermie je rozmístění pórů- vyskytují se pouze na kaudální části zadního prstence, kde vytváří stočené struktury.

Vnitřní povrch jaderného obalu pokrývá jaderná lamina, proteinová síť poskytující strukturální podporu membrány a umožňuje ukotvení chromatinu. Jaderná lamina je tvořena proteiny, které se nazývají laminy a jsou homologické s proteiny nalezenými v intermediálních filamentech somatických buněk (Millette 1999).

1.1.2. Akrozóm

Akrozóm je membránová struktura, váček, který je uložen na anteriorním konci hlavičky spermie a obklopuje až dvě třetiny jádra spermie. Vnější akrozomální membrána těsně přiléhá k plazmatické membráně spermie a vnitřní akrozomální membrána obklopuje vnější jaderný obal, prostor mezi těmito membránami se nazývá perinukleární theca.

Akrozóm vzniká zvětšením Golgiho aparátu spermatidy, tedy v pozdní fázi spermiogeneze. Obsahuje receptory nezbytné pro vazbu na zona pellucida oocyty a lytické enzymy, proteázy, nezbytné pro penetraci přes zona pellucida. Jiné akrozomální enzymy slouží k fúzi membrán spermie a vajíčka, nebo napomáhají vaječné exocytóze kortikálních granul zabraňující polyspermii (Millette 1999).



Obr. 3Lidská spermie (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Complete_diagram_of_a_human_spermatozoa.svg)

1.2. Bičík

Bičík spermie je komplexní struktura, která dává spermii schopnost motility a tak jí umožňuje transport k oocytu, následnou penetraci skrze oocyt a jeho oplození. Je to tedy struktura, která je nezbytná pro úspěšnou fertilizaci. Délka bičíku savčích spermíí se značně liší- od 60 μm u člověka až po 250 μm u čínského křečka.

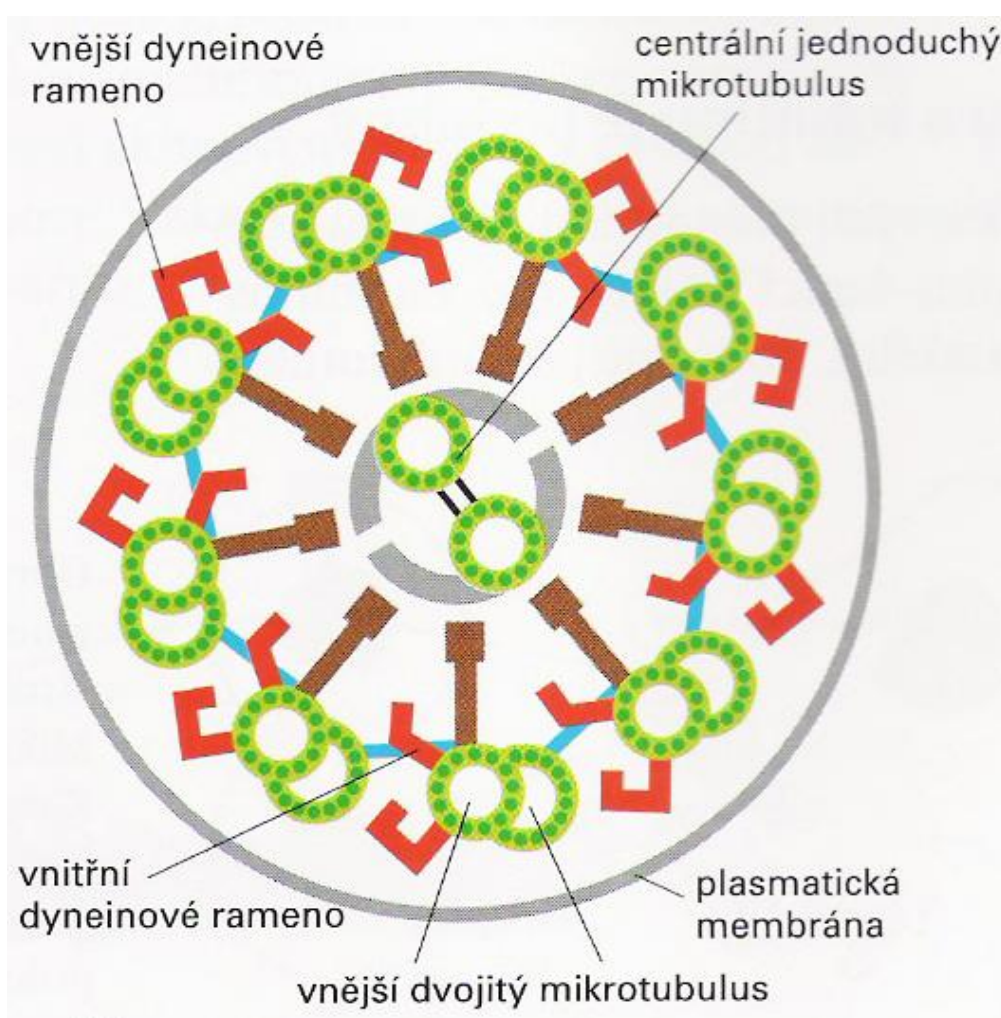
Bičík se dělí od anteriorního k posteriornímu konci na čtyři části:

1. krček, spojovací segment
2. střední část
3. hlavní část

4. koncová část

Hlavními komponentami bičíku je axonema, mitochondriální pochva, vnější hustá vlákna a fibrózní pochva.

Axonema neboli osní vlákno prochází bičíkem, je hlavní motorickou částí bičíku a je tvořena mikrotubuly, které vychází z centrioly na bázi jádra. Je to struktura, která je velmi účinná pro přenos energie a tedy pohyb spermie, což se dá usuzovat ze shodného uspořádání u většiny bičíků eukaryotických buněk. Jádro axonemy je tvořeno ze dvou centrálních mikrotubulů, které jsou obklopeny devíti dvojicemi mikrotubulů. Axonema má tedy uspořádání 9+2. Základním strukturálním proteinem je tubulin, základním funkčním proteinem je dynein, kterým jsou navzájem propojeny jednotlivé dvojice mikrotubulů. Dynein hydrolyzuje ATP a konvertuje uvolněnou chemickou energii na energii mechanickou, která umožňuje pohyb spermie. ATP potřebné pro hydrolyzu pochází z mitochondriální pochvy ve střední části bičíku a uvolněná energie umožňuje klouzání vnějších dvojic mikrotubulů, což způsobuje ohyb bičíku a tedy pohyb spermie.



Obr. 4 Příčný řez střední částí bičíku (Alberts et al. 1998)

Axonema je ve střední a hlavní části bičíku obalena vnějšími hustými vlákny, které dodávají bičíku výztuhu a elastické vlastnosti. Tato vlákna jsou ve střední části vsunuta mezi mitochondriální pochvu a axonemu. V hlavní části obklopuje tato vlákna fibrózní pochva (Millette 1999).

1.3. Plazmatická membrána

Plazmatická membrána obklopuje celý povrch spermie, hlavičku i bičík. Stejně jako ostatní struktury spermie, je i její plazmatická membrána vysoce specializovaná a v mnoha aspektech se liší od plazmatické membrány somatických buněk.

Díky stavebním i funkčním odlišnostem můžeme membránu rozdělit na :

1. akrozomální oblast- na anteriorním konci hlavičky leží apikální část, na povrchu akrozómu leží hlavní část a na posteriorní části akrozómu leží ekvatoriální segment. Apikální a hlavní segment společně vytvářejí tzv. akrozomální čepičku

2. postakrozomální oblast

Těsné spojení mezi plazmatickými fragmenty hlavičky a bičíku vytváří posteriorní prstenec. Střední a hlavní část plazmatické membrány jsou vzájemně odděleny anulem- fibrózním prstencem, který je součástí cytoskeletu bičíku a přiléhá k vnitřnímu povrchu plazmatické membrány (Eddy & O'Brien 1994).

2. Estrogeny jako steroidní hormony

Steroidní hormony jsou látky, které vznikají biotransformací cholesterolu a fungují jako regulátoři mnoha vývojových a fyziologických procesů. Steroidní hormony jsou produkovány žlázami s vnitřní sekrecí a jejich koncentrace v krvi periodicky kolísá a reaguje na různé fyziologické či patologické změny. Žlázami, které u savců steroidní hormony produkují, jsou: kůra nadledvin, vaječníky a varlata. Placenta vyvíjející se během těhotenství se stává čtvrtým zdrojem steroidních hormonů. Podle typu žlázy se steroidní hormony dělí na kortikosteroidy produkované kůrou nadledvin (kortikosteroidy se ještě rozlišují na glukokortikoidy a mineralokortikoidy), estrogeny a gestageny produkované vaječníky a androgeny produkované varlaty. Pohlavní steroidy, jak už název říká, ovlivňují diferenciaci a růst reprodukčního systému, navozují a udržují pohlavní znaky a modulují reprodukční chování, tedy kontrolují všechny aspekty reprodukce. Jelikož jsou to pohlavní hormony, jsou syntetizovány v pohlavních žlázách. Zde buďto lokálně skrze gonády podporují oogenezi a spermatogenezi nebo jsou sekretovány do periferního oběhu, odkud ovlivňují reprodukční trakt, sexuální fenotyp a druhotné samčí a samičí sexuální znaky (Terry R. Brown 1999).

Efekt jednotlivých steroidů závisí zejména na jejich specifických receptorech a na povaze, která slouží jako základ pro klasifikaci steroidních hormonů (V. Giguere 1988). Steroidní receptory byly popsány jako klasické ligandem-aktivované transkripční faktory, které zprostředkovávají dlouhodobý genomový efekt v hormonálně ovlivňovaných tkáních. Nyní je jasné, že steroidní hormony také zprostředkovávají rychlé signalizační akce tradičně spojované s receptory pro růstový faktor a s receptory spojené s G-proteiny (E. R. Prossnitz 2008). Steroidní hormony regulují buněčné procesy vazbou na intracelulární receptor a interakcí s nukleotidovými sekvencemi ovlivňují genovou expresi.

2.1. Biologický efekt estrogenů

Estrogeny jsou skupinou steroidních hormonů, které jsou primárně produkovány ve vaječnících, ale v menší míře jsou produkovány i v nadledvinách a tukové tkáni, což je důvod proč podváha či nadváha negativně ovlivňuje plodnost. Po vyloučení do krve koordinují fyziologické funkce důležité pro samičí reprodukci. V centrální nervové soustavě hrají estrogeny dominantní roli při koordinaci nervové činnosti, tedy v chování a fyziologických událostech, které jsou esenciální pro úspěšnou reprodukci (L. Uphouse & S. Maswood 1999).

Fyziologicky jsou estrogeny, estron a 17β -estradiol, nejdůležitější ovariální folikulární steroidy. Jejich triviální název se odráží od role v indukci sexuální vnímavosti (estrus) u samic savců. Estrogeny u samic navozují vývoj sekundárních pohlavních znaků, ovlivňují růst endometria a další regulace menstruačního cyklu. Ačkoliv jsou estrogeny nejvíce známy jako modulátory samičího reprodukčního chování, jejich efekt přesahuje akt reprodukce. Nejstarší známý efekt estrogenů je jejich posílení lokomoční aktivity, dále ovlivňují paměť a učení či potravní chování.

Po mnoho let byly estrogeny brány primárně jako samičí pohlavní hormony, přispívající ke zdraví a plodnosti samic (Osiguwa-Adeoya et al. 2003). Nicméně v poslední době se ukázalo, že hrají důležitou roli i v samčím reprodukčním traktu- viz kapitola 3.

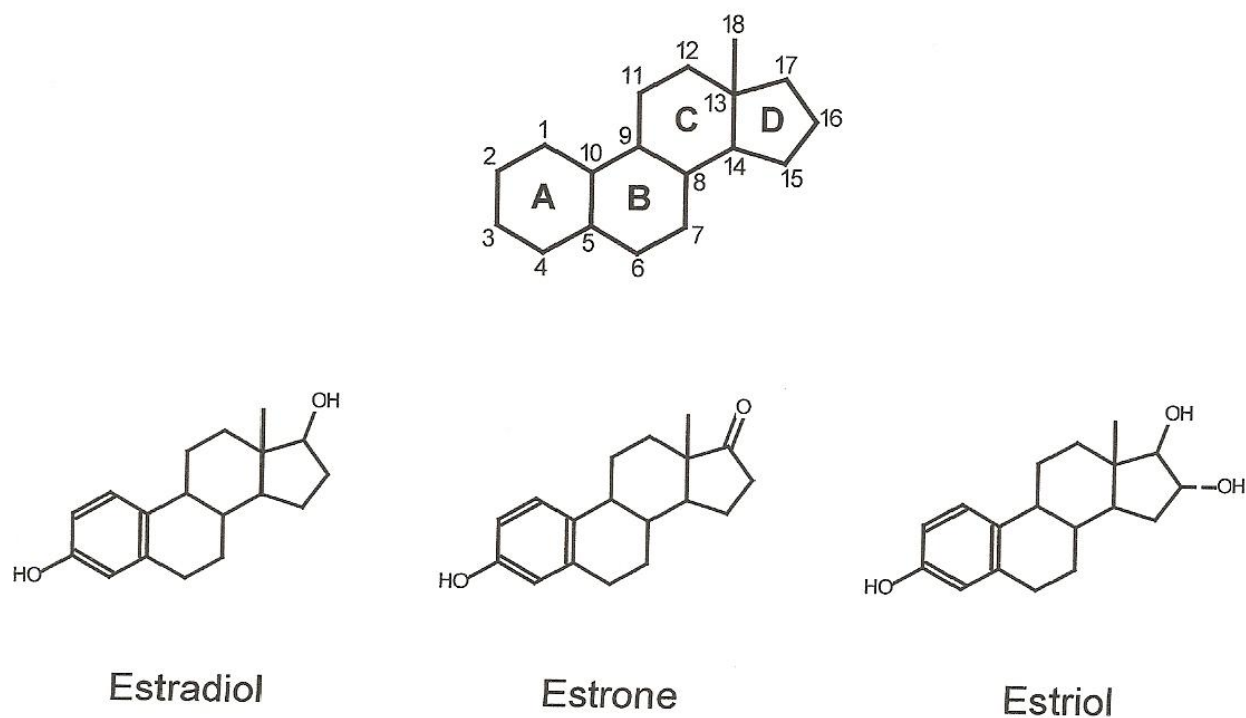
2.2. Strukturální rysy estrogenů

Jelikož jsou steroidní hormony hydrofobní molekuly, mohou po biosyntéze difundovat skrze buněčnou membránu do krevního řečiště, aniž by byly uzavřeny do intracelulárních váčků.

S ohledem na reprodukci se steroidní hormony dělí na tři hlavní skupiny: progestiny, androgeny a estrogeny. Progestiny jsou z většiny reprezentovány sloučeninami C21, androgeny sloučeninami C19 a estrogeny sloučeninami C18. Ke steroidnímu jádru, jsou připojeny další komponenty, které se liší v závislosti na třídě steroidů. Cholestan, který obsahuje steroidní jádro s metylovou skupinou na C10 a C13 a osmičlenný postranní řetězec na C17, je mateřskou sloučeninou cholesterolu a ostatních sterolů, biosyntetických prekurzorů všech steroidů.

Estrogeny jsou steroidní hormony. Estrogenní jádro tedy obsahuje 18 uhlíkových atomů uskupených do 4 kruhů. Řada rysů estrogenů je rozhodující pro jejich hormonální aktivitu, nejpozoruhodnější z nich je aromatický kruh s fenolovou hydroxylovou skupinou lokalizovanou na C3 pozici. Kyslíkový atom ve formě hydroxylové nebo ketonové skupiny na C17 pozici je také velmi důležitý. Nejvýznamnějším, přirozeně se vyskytujícím estrogenem je 17β -estradiol, který obsahuje 3-hydroxylovou a 17β -hydroxylovou skupinu. Mezi další estrogeny patří estron a estriol. Estrony obsahují ketonovou skupinu na C17 pozici namísto hydroxylové u 17β -estradiolu. Estrioly se od 17β -estradiolu liší přidáním 16α -hydroxylové skupiny.

Biologické aktivity estrogenů jsou dány zejména jejich schopností vázat se na receptor a aktivovat jej. Estrony a estrioly jsou méně účinné než 17β -estradiol, což je odraženo ve snížené afinitě estrogenního receptoru k těmto estrogenům (Carolyn L. Smith 1999).



Obr. 5 Chemická struktura estrogenů-C18 steroidních hormonů (Encyclopedia of Reproduction)

2.3. Zdroje estrogenů

2.3.1. Biosyntetické endoestrogeny

Biosyntéza estrogenů závisí na prekurzorové molekule a na typu steroidogenního enzymu. Steroidogenní enzymy můžeme rozdělit do dvou skupin.

První skupinou jsou hydroxylázy, kódované geny patřící do P450 superrodiny. Enzymy P450 superrodiny lokalizované v mitochondriích využívají ferredoxin jako donory elektronů, zatímco ty lokalizované v endoplazmatickém retikulu (mikrozomální) využívají P450 flavoprotein redukováný NADPH-reduktázou. Druhou skupinou jsou steroid dehydrogenázy, které patří do jedné ze dvou odlišných skupin-alkoholdehydrogenáz/reduktáz nebo do aldo-keto reduktáz. Steroidní dehydrogenázy využívají NAD^+/NADH nebo $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ jako kofaktory. Obě tyto skupiny enzymů, P450 a dehydrogenázy, jsou nezbytné pro steroidogenezi v pohlavních žlázách, placentě a nadledvinách (Margarete M. Hinshelwood 1999).

Všechny steroidogenní tkáně mají stejné enzymatické dráhy vedoucí k biosyntéze estrogenů. Hlavní fyziologické změny na úrovni enzymů jsou obvykle spojeny s paralelními změnami v genové expresi. Úroveň exprese každého steroidogenního enzymu se liší ve třech charakteristikách:

1. tkáňovou a buněčně specifickou expresí, která je určena během tkáňové a buněčné diferenciace
2. bazální expresí při absenci trofické hormonální stimulace
3. hormonálním signálem regulovaným expresí

Každý z těchto tří typů exprese pravděpodobně představuje fungování různých genových regulačních elementů. U dospělých steroidogenních tkáních je hladina většiny buněčně- a tkáňově-specifických enzymů závislá hlavně na trofické hormonální stimulaci, která je zprostředkována komplexní sítí systémů signální transdukce (Israel HanukogI 1992).

Steroidy jsou syntetizovány z cholesterolu, který je odvozen ze tří potencionálních zdrojů:

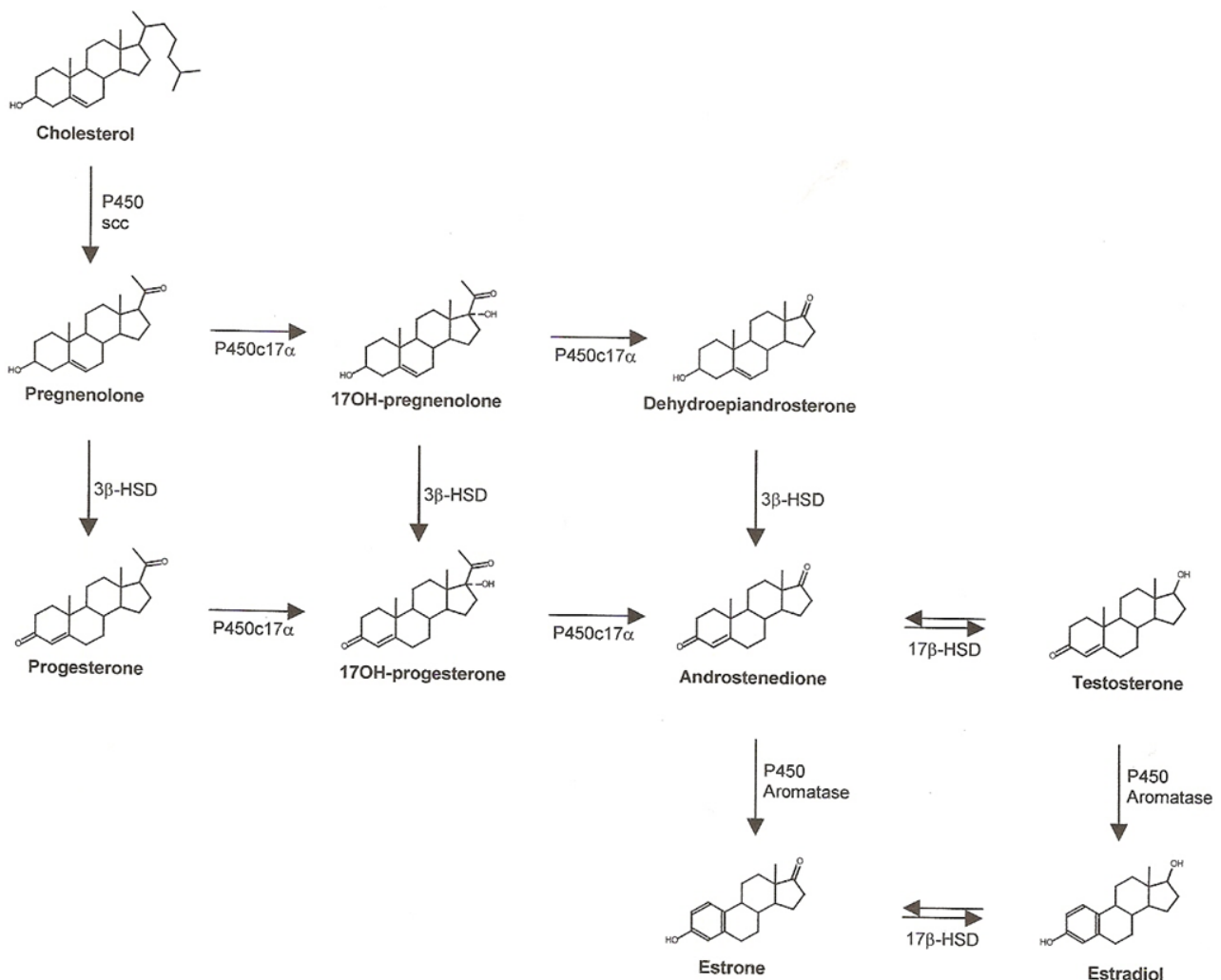
1. preformovaný cholesterol z krve, především ve formě cirkulujících lipoproteinů
2. preformovaný cholesterol uložený ve steroidogenních buňkách jako volný cholesterol, složka buněčných membrán nebo uvolněný z cholesterolových esterů uložených v cytoplazmatických lipidových kapičkách
3. cholesterol syntetizovaný de novo ve steroidogenních buňkách z dvou-uhlíkatých sloučenin odvozených od metabolismu karbohydrátů, tuků nebo proteinů v rámci buňky. V závislosti na cévním zásobení a na převládajících fyziologických podmínkách mohou být zdroje cholesterolu variabilní v rámci tkání a druhů.

Vstřebávání cholesterolu z krve zahrnuje vazbu extracelulárního lipoproteinu přes jejich apoproteinovou komponentu na specifický receptor lokalizovaný na buněčných membránách, následuje internalizace komplexu lipoproteinu s receptorem do lysozomu, degradace lipoproteinu lysozomálními

esterázami a uvolnění volného cholesterolu, který je přístupný steroidogenním enzymům. Vstřebávání LDL a HDL je regulováno na úrovni jejich receptorů.

Steroidogenní buňky skladují také značné množství cholesterolu v intracelulárních tukových kapičkách, hlavně jako estery mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Rovnováha mezi cholesterolem esterů mastných kyselin z intracelulárních zásobáren a volným cholesterolem je nastavena poměrem mezi dvěma enzymy: cholesterol-ester syntetázou a cholesterol esterázou (hydrolýza esterů cholesterolu na cholesterol, tento enzym může být aktivován luteinizačním hormonem LH). Aktivita obou enzymů jsou rychlost určujícím krokem, který je pod kontrolou hormonální a navíc by měly být regulovány intracelulární hladinou cholesterolu. Poměrné využití těchto zdrojů pro steroidogenezi se může značně lišit na základě fyziologického stavu (Terry R. Brown 1999).

Estrogeny jsou steroidní hormony, jsou tedy odvozeny od cholesterolu. Biosyntéza estrogenů vyžaduje tři na železu založené cytochrom P450 enzymové komplexy a dvě dehydrogenázy. Rychlost regulujícím krokem je odštěpení postranního řetězce cholesterolu pomocí mitochondriálního enzymu cytochrom P450, čímž vzniká skupina C21 steroidů, pregnenolon. Následuje konverze C21 steroidů v C19 steroidy pomocí enzymu endoplazmatického retikula, 17 α -hydroxylázy a oxidace hydroxylové skupiny na C3 pozici na keto skupinu pomocí 3 β -hydroxysteroid dehydrogenázy. Výsledkem je syntéza C19 estrogenního prekursoru, androstenedionu. Androstenedion je pomocí dalšího enzymu endoplazmatického retikula, cytochrom P450 aromatázy, konvertován v estrony- C18 steroidy. Aromatáza katalyzuje aromatizaci A-kruhu androstenedionu na fenolický A-kruh typický pro estrogeny. Androstenedion i estron jsou substráty pro 17 β -hydroxysteroid dehydrogenázu, která reverzibilně konvertuje tyto oxosteroidy na testosteron a 17 β -estradiol. Toto je konečný krok v produkci androgenů a estrogenů (Carolyn L. Smith 1999).



Obr. 6 Enzymatické dráhy biosyntézy estrogenů

2.3.2. Endokrinní disruptory

Endokrinní disruptory jsou látky přítomné jako kontaminanty v životním prostředí a představují toxikologické reprodukční riziko. Tyto látky mohou napodobovat nebo interferovat s funkcí endogenních hormonů. Dělíme je na xenoestrogeny a fytoestrogeny. Tyto látky mají vliv na celou řadu aspektů savčí reprodukce (reprodukční orgány, gamety) (J. Pěkníková 2007).

Endokrinní disruptory jsou tedy exogenní látky, které ovlivňují produkci, uvolňování, dopravu, metabolismus, vázání, činnost nebo odstranění přirozených ligandů odpovědných za udržování homeostázy a regulaci vývoje tkání. Endokrinní disruptory jsou endogenním hormonům strukturálně podobné, jsou schopné interagovat s proteiny jejich hormonální dopravy nebo narušovat jejich metabolismus, jsou schopné napodobovat nebo v některých případech blokovat účinky endogenních hormonů. Endokrinní disruptory jsou látky, které mohou způsobit nerovnováhu v endokrinním systému, který má vazbu na všechny hormon-produkující orgány, které udržují tělesnou homeostázu. Mnoho různých endokrinních disruptorů je přítomno v různých složkách prostředí (ovzduší, voda a půda) a v potravinách (rostlinného a živočišného původu). Mohou pocházet z potravinových obalů, produktů hoření, přípravků na ošetření

rostlin, detergentů a z chemického průmyslu obecně. Tyto látky mohou mít účinky na dospělé organizmy a na citlivost embryí a plodů pro mnohé cizorodé látky, které mohou procházet přes placentu.

Hlavním regulátorem vyspělého reprodukčního systému je osa hypotalamus-hypofýza-gonády, která funguje jako systém s negativní zpětnou vazbou. Endokrinní disruptory tedy mohou působit na kterékoli úrovni této osy, ale vývoj a programování osy během fetálního života je zřejmě nejcitlivější pro navození trvalých změn homeostatického mechanismu endokrinního systému. Nejvíce ohroženými fázemi pro působení endokrinních disruptorů jsou tedy fáze prenatální a částečně postnatální, kdy orgány a nervový systém prodělávají nejrychlejší změny. Změny způsobené endokrinními disruptory mohou být dočasné či trvalé, mohou způsobovat reprodukční anomálie (morfologické a funkční dysfunkce, např. neplodnost) a vrozené vady (změny embryonálního či fetálního intrauterinního vývoje) (Moustafa R. M. et al 2007).

2.3.2.1. Fytoestrogeny

Fytoestrogeny jsou nesteroidní přirozené látky obsažené v rostlinách, které jsou svou strukturou vzdáleně podobnou estrogenům a díky tomu jsou schopné se vázat na estrogení receptory. Společným strukturním rysem je fenolové jádro. Dalším společným rysem s estrogeny je metabolismus, fytoestrogeny jsou rovněž vstřebávány střevem, podléhají enterohepatálnímu cyklu a konjugáty jsou vylučovány v moči a žluči. Fytoestrogeny se dají podle své estrogení aktivity rozdělit do 4 skupin (izoflavony, kumestany, stilbeny, lignany) a mezi hlavní fytoestrogeny patří **genistein, daidzein, resveratrol, coumestrol, formononetin a biochanin**. Mezi rostliny, které fytoestrogeny obsahují, patří řepa, sójové boby, jílek vytrvalý, pšenice, vojtěška, jetel, jablka a třešně. V rostlinách mají fytoestrogeny ochrannou funkci, chrání rostlinu před patogeny.

Estrogení receptory mají dva podtypy, ER α a ER β , lišící se afinitou k ligandům, strukturou N a C konce a výskytem v organismu. Fytoestrogeny se váží hlavně na ER β , který se vyskytuje převážně v kostech, plicích, prostatě, močovém měchýři, kůži, mozku. Z toho tedy můžeme usuzovat funkci estrogenů v těle savců. Fytoestrogeny mohou působit spolu s estrogeny na kostní tkáň. V mozku a hypofýze snižují hladinu gonadotropinů (více ovlivňují FSH nežli LH). Tímto mechanismem mohou ovlivnit změny nálady, spánek, deprese, ale i cévní změny, mírnit příznaky z nedostatku estrogenů. Nepůsobí téměř na mléčnou žlázu a na dělohu, které obsahují převážně α -ER. Spolu s estrogeny se fytoestrogeny chovají jako agonisté (vazbou na ER blokují účinek endogenních estrogenů), při vysokých dávkách mohou působit i jako antagonisté. Při estrogením deficitu působí jako slabé estrogeny (Vrzáňová, Heresová 2004). Genistein a daidzein, které patří do skupiny izoflavonů, působí v těle savců na játra, kde zvyšují tvorbu SHBG, který v krvi vyvazuje estrogeny, ale i androgeny, čímž snižuje jejich dostupnost v tkáních. Další účinek fytoestrogenů je přes ovlivnění enzymů, např. inhibicí aromatáz limitují lokální konverzi prekurzorů na estrogeny, ovlivňují aktivitu enzymu konvertující testosteron na aktivní dihydrotestosteron a díky inhibici specifických tyrozin kináz jsou fytoestrogeny brány jako látky protinádorové. Tyrozin kinázy jsou totiž potřebné pro správný účinek růstových hormonů při novotvorbě cév rostoucího nádoru. Izoflavony tuto neovaskularizaci inhibují.

Mnohé studie ukázaly, že fytoestrogeny mají u savců v určité koncentraci příznivý vliv na jejich zdraví a to díky korelaci s nízkým výskytem nádorových a kardiovaskulárních onemocnění. V souvislosti s plodností savců se objevilo několik studií, které uvádí či neuvádí fytoestrogeny jako látky ovlivňující jejich plodnost. Studie poukazující na negativní vliv fytoestrogenů na plodnost savců byla provedena na ovcích pasoucích se na pastvinách s vysokou koncentrací fytoestrogenů, což způsobilo tzv. jetelovou nemoc ovců, tyto ovce byly neplodné. Nicméně další studie prováděné na myších neuvádí fytoestrogeny jako látky poškozující reprodukční orgány a spermie.

2.3.2.2. Xenoestrogeny

Xenoestrogeny jsou látky vznikající lidskou činností s estrogenními účinky. Patří mezi ně odpady výrobních procesů či pesticidy, které díky rozvoji industrializace zatěžují životní prostředí čím dál více. Testování těchto látek ukázalo negativní vliv na reprodukci savců. (více viz kapitola 4)

Mezi xenoestrogeny patří **diethylstibestrol** (DES), který byl v 50. -70. letech jako lék podáván těhotným ženám a měl negativní vliv na fertilitu dospělých synů. DES velmi výrazně ovlivnil reprodukci testovaných myší, ve druhé generaci byla nalezena úplná neplodnost. Výsledkem působení DES byla snížená kvalita i počet spermií, ale i ostatní parametry jako je váha myší či jednotlivých orgánů. Přičemž působení v nižších dávkách (2ng) mělo silnější efekt než působení vyšších dávek (20ng) (J. Pěkníková 2007).

Dalším xenoestrogenem je **bisfenol A** (BPA), monomer používaný v plastidech, polykarbonátech a epoxidových pryskyřicích. Oligomery bisfenolu A se uvolňují při polymeraci či tepelnou degradací a to i z vnitřní vrstvy potravinových konzerv, kompozitních zubních výplní či PET lahví. Uvolňování bisfenolu A z potravních obalů závisí na kyselosti potravy či nápoje, čím je kyselost větší, tím se bisfenol A více uvolňuje.

V tucích živočichů se hromadí xenoestrogen **para-nonylfenol** (NP), který se vyskytuje v polyvinylchloridech (PVC) používaných pro balení potravin, používá se jako aditivum lubrikačních olejů a plastů. Kyselová *et al.* (2003) zkoumali vliv NP na tělesnou hmotnost, váhu orgánů a reprodukční zdatnost na outbreďním kmeni CD-1 myší. Jejich výsledky poukázali na to, že expozice NP má vliv na hmotnost reprodukčních orgánů (varlata, nadvarlata, prostata, semenné vajíčky) a také na redukci integrity akrozómu.

Dioxiny jsou vedlejší produkty výroby pesticidů a papírových výrobků. Představují velké nebezpečí pro samčí reprodukční systém (Stefankiewicz *et al.* 2006). Samčí potomci vystaveni expozici dioxinů před narozením vykazovali zmenšení varlat a redukované množství spermatogenních buněk (Johnson *et al.* 1998TH THornung *et al.* 1996, HTZabel and Peterson 1996).

Pesticidy jsou chemické látky používané pro hubení škůdců. Působení **DDE** (dichloro-difenyl-dichloroethylen) je spojováno s celosvětovým poklesem počtu lidských spermií (Keiding & Skakkebaek 1993, Stone 1994, Swan *et al.* 1997). DDE dále způsobuje zhoršenou motilitu a abnormální morfologii spermií (Hauser *et al.* 2002; Toft *et al.* 2006).

Polychlorované bifenyly (PCB) způsobují redukci kvality semene, zejména snížení pohyblivosti, snížení koncentrace spermií a abnormální morfologii spermií (Hauser *et al.* 2002; Rozati *et al.* 2002; Hauser 2006).

2.4. Transport a metabolismus estrogenů

Estrogeny jsou syntetizovány pohlavními žlázami a z nich jsou sekretovány do krevního oběhu. Ze sekretovaného množství estrogenů zůstává volných pouze jen okolo 2 %, přibližně 60 % se váže na albumin a okolo 38 % se váže na SHBG (95kDa glykoprotein, sex-hormon vázající globulin), který je znám také jako testosteron-estrogen-vázající globulin. Transport estrogenů je tedy zprostředkován zejména vazbou na SHBG nebo albumin. Vazba na albumin je nízkofinitní oproti vysokoafinitní vazbě na globuliny, tudíž i přes nižší celkové procento je vazba na globuliny významnější. Tato vazba estrogenů na proteiny je pro funkci estrogenů velmi významná, jelikož vazbou na protein se estrogen inaktivuje a pouze volný estrogen může vstupovat do cílových buněk a vyvolávat biologický efekt.

Metabolický obrat estrogenů závisí na jejich afinitě k vazebným proteinům plazmy a tedy i na koncentraci těchto proteinů. SHBG je syntetizován v játrech. Jeho koncentrace je ovlivňována klinickými podmínkami, jako je těhotenství, diabetes, obezita a jeho syntéza je ovlivňována pohlavními steroidy. Estrogeny syntézu SHBG zvyšují, naopak androgeny a gestageny ji snižují, což vysvětluje vyšší koncentraci SHBG u samic v porovnání se samci.

Cirkulující estrogeny jsou rychle metabolizovány v játrech na inaktivní, ve vodě rozpustné sloučeniny, které jsou v 50-80% vyloučeny v moči a přibližně v 20% ve stolici. Druhou hlavní skupinou katabolických produktů jsou katechol-estrogeny, zejména 2-hydroxyestrogeny. Většina těchto sloučtin je vyloučena močí jako glukuronosidy. Alternativně mohou katechol O-methyl transferázy metabolizovat katechol-estrogeny na jejich methoxy- formy, které mají také rychlý metabolický obrat. Estrogeny mohou být v játrech také hydroxylovány na C16 pozici D kruhu, což vede k formování 16 α -hydroxylovaných derivátů, zejména estradiol-glukuronidů, které jsou vyloučeny močí (Carolyn L. Smith 1999).

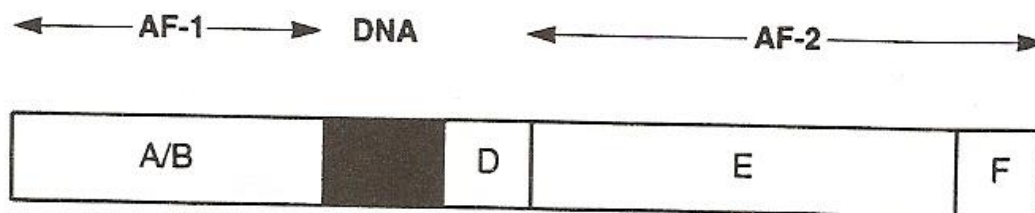
2.5. Estrogenní receptory

Funkce estrogenů je zprostředkována expresí dvou klasických estrogenních receptorů ER α a ER β . Toto je klasická cesta estrogenní akce. V poslední době je však známo, že estrogenní akce mohou fungovat i prostřednictvím receptorů spřažených s G-proteiny. V cílové buňce se hormony vážou na vysokoafinitní estrogenní receptory (ER) fungující jako transkripční faktory, které aktivují či potlačují cíl genové exprese. Estrogenní receptory jsou syntetizovány v cytoplazmě a vytváří makrokomplexy s heat shock proteiny (Hsp), které pomáhají proteinům, aby se sbalily do správné konformace. Většina receptorů je lokalizována do jaderného kompartmentu, ale některé mohou zůstat v cytoplazmě.

2.5.1. Estrogenní receptor α (ER α) a β (ER β)

Izofomy ER α a ER β se liší silou afinity k hormonu (např. 17 β -estradiol se váže se čtyřikrát vyšší afinitou na ER α) a redukcí N- konce, naopak homologie izoforem je v DNA- vazebné a hormon-vazebné doméně. Molekulární hmotnost ER β je díky redukcí N-konce menší než molekulární hmotnost ER α asi o 20 kDa. Existence dvou izoforem ER rozšiřuje různorodost možných reakcí na estrogenní sloučeniny, vede k možnosti vazby ER dimerů na estrogen-response elementy na DNA a umožňuje změny genové exprese (Terry R. Brown 1999). ER jsou proteiny složené z 6 funkčních domén (na obrázku A – F). E doména je ligand-vázající doména dlouhá asi 302-595 aminokyselin a je lokalizována na C-konci ER. Po vazbě estrogenu dochází ke konformační změně E domény, která spočívá ve sbalení do více kompaktní struktury, což zřejmě umožňuje interakci s ostatními proteiny nezbytnými pro změnu genové exprese. Další doménou je DNA-vazebná doména, která je nejvíce konzervovaná a je dlouhá asi 60 aminokyselin (doména C, na obrázku zobrazená jako plný region). C doména je cystein-bohatá oblast formovaná do motivu dvou „zinkových prstů“, jejichž struktura je stabilizována dvěma ionty zinku. DNA-vazebnou doménou se ER váže na estrogen responzivní elementy na DNA, po homodimerizaci ER. Domény AF-1 a AF-2 jsou dvě aktivační domény, důležité pro transkripční funkci ER. AF-1 je konstitutivně aktivovaná a na ligandu nezávislá N-terminální doména zapojená do receptor-receptor interakce a iniciace transkripce, AF-2 obsahuje E doménu a její schopnost aktivovat genovou expresi je závislá na vazbě estrogenu. AF-1 doména ER α je

velmi aktivní při stimulaci genové exprese z různých estrogen responzivních elementů v různých buněčných liniích, naopak činnost AF-1 domény ER β je za stejných podmínek zanedbatelná (Stefan Nilsson et al 2001). F doména je důležitá pro modulaci schopnosti estradiolu stimulovat genovou transkripci nebo antiestrogenů, které naopak inhibují genovou expresi (Carolyn L. Smith 1999).



Obr. 7 Struktura estrogenního receptoru

ER α jsou exprimovány v děloze, varlately, hypofýze, vaječnících, ledvinách, nadvarlately a nadledvinách. ER β jsou exprimovány ve vaječnících, prostatě, plicích, močovém měchýři, mozku, děloze a varlately (Terry R. Brown 1999).

Estrogenní receptory ER α a ER β jsou exprimovány i v lidských ejakulovaných spermích (Aquila et al. v roce 2003) (viz kapitola 3).

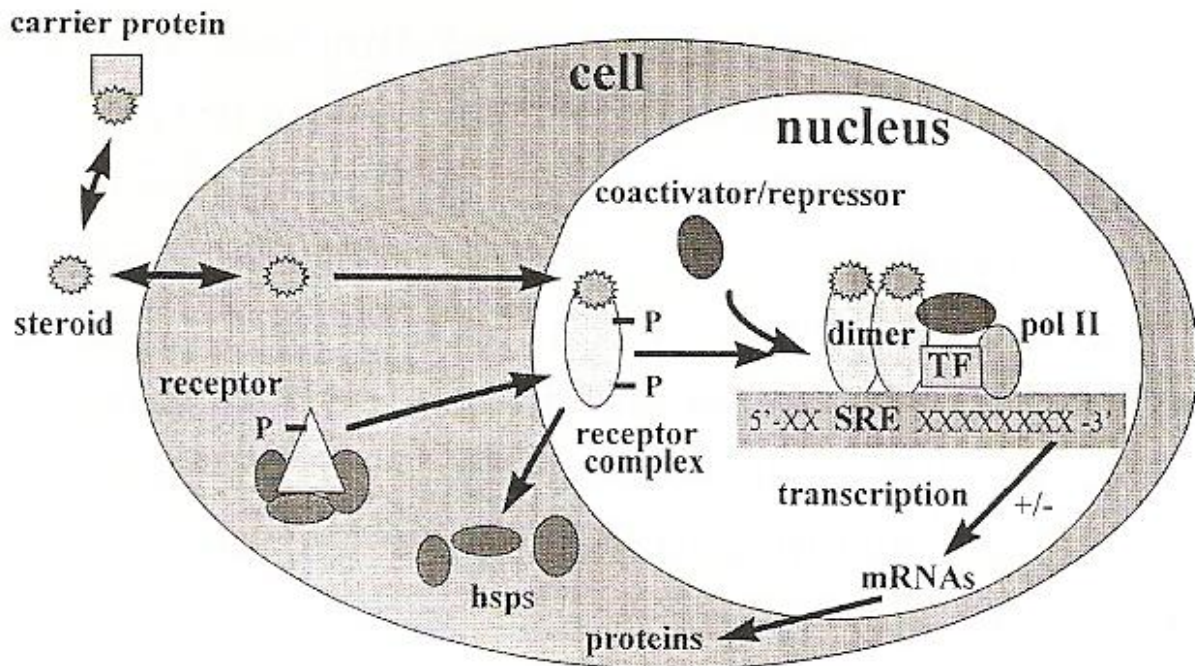
2.5.2. GPR30/GPER

Kromě klasických estrogenních receptorů ER α a ER β , které zprostředkovávají dlouhodobou genomovou odpověď, estrogeny fungují i pomocí receptorů růstových faktorů a receptorů spřažených s G-proteiny, které naopak zprostředkovávají rychlou signalizaci. Na rozdíl od jaderných ER jsou GPR30 transmembránové receptory, které aktivují protein-kinázovou dráhu, mění elektrické vlastnosti membrány a modulují tok iontů (Paul Micevych et al 2009). GPR30 jsou receptory spřažené s heterotrimerickými G-proteiny se 7 transmembránovými doménami, N-konec směřuje ven z buňky a zbytky kaseliny asparagové mohou být glykosilovány, C-konec je lokalizován do cytoplazmy. GPR30 svou aktivitou mění aktivitu efektorových proteinů, kterými jsou např. adenylát cyklázy, fostolipázy, fosfodiesterázy a iontové kanály.

2.6. Mechanismus estrogení akce

Estrogeny jsou steroidní hormony, jsou to tedy lipofilní molekuly, které mohou difundovat přes buněčné membrány. Po transportu přes membránu hormony způsobí aktivaci komplexu receptor-Hsp (heat shock proteiny), dojde k disociaci Hsp a transportu do jádra, kde komplex receptor-hormon dimeruje a váže se na specifické sekvence DNA, čímž ovlivňuje genovou expresi. Tato vazba je zprostředkována specifickou sekvencí DNA, estrogen responzivním elementem a DNA-vazebnou doménou ER. Estrogen responzivní element je regulační sekvence obvykle v 5' regionu estrogeně regulovaných genů, na který se váže homodimer receptorů s navázaným estrogenem. Jako transkripční faktor může receptor fungovat díky interakcím s různými mobilními koaktivátory či korepresory, které interagují s RNA polymerázou II

transkripčního iniciačního faktoru. Koaktivátory a korepresory mají histonacetylázovou či deacetylázovou aktivitu a tím podporují či potlačují remodelaci chromatinu ovlivňující transkripci. Výsledkem estrogenní akce je tedy aktivace či represe syntézy nových proteinů vedoucí ke změně funkce, růstu či diferenciaci cílové buňky (Carolyn L. Smith 1999).



Obr. 8 Buněčný mechanismus steroidních hormonů (Encyclopedia of Reproduction)

3. Estrogeny a samčí reprodukční trakt

3.1. Syntéza estrogenů v savčích varlatech

Varlata jsou orgánem, který má dvě hlavní funkce- syntézu steroidních hormonů a tvorbu samčích pohlavních buněk, spermií. Varlata jsou složena ze dvou kompartmentů- semenotvorných kanálků a intersticiálního prostoru mezi kanálky. Tyto dva kompartmenty zahrnují pouze tři hlavní typy buněk. Germinální neboli zárodečné buňky, které jsou obklopeny a vyživovány plazmou procházející skrze semenotvorné kanálky ze Sertoliho buněk a Leydigovy buňky intersticiálního prostoru, které syntetizují testosteron (Hess R. A. et al. 1995)

Syntéza estrogenů u samců savců je důležitou částí endokrinního systému. Estrogeny hrají významnou roli při růstu a udržování kostní hmoty, stejně jako při vývoji zárodečných buněk a při pochodech spermatogeneze. Například estradiol je velmi důležitý pro správnou motilitu a životaschopnost spermií a jejich penetraci do oocyty (Idaomar et al. 1989). Estrogeny jsou syntetizovány pomocí cytochrom P450 aromatázy a přes estrogení receptory ER α a ER β , které jsou ve většině testikulárních buněk a ostatních částech pohlavního ústrojí, působí na cílové buňky.

Funkce endogenních estrogenů u samců se dá nejlépe zjistit při poruchách dráhy estrogeního působení či při deficitu aromatázy. V lidské populaci bylo několik těchto poruch a deficitů pozorováno. Tito muži většinou vykazovali poruchy v růstu, byli velmi vysokí a rostli i v dospělosti. Nevykazovali maskulinizační poruchy, ale měli vysoké hladiny testosteronu, luteinizačního hormonu (LH) a folikul-stimulujícího hormonu (FSH) (Delbčs G. et al. 2006). Tito muži měli také nízkou životaschopnost spermií (Smith et al. 1994), snížené množství spermií a horší motilitu spermií (Herrmann et al. 2002), s bilaterálním kryptorchidismem v jednom případě (Maffei et al. 2004).

Myši samci s inaktivovanými geny pro estrogení receptory (ER α KO, ER β KO a ER $\alpha\beta$ KO) nebo aromatázu (ArKO) vykazovali reprodukční poruchy. ER α KO a ArKO myši jsou sterilní kvůli nedostatečné životaschopnosti spermií v důsledku nedostatečné epididymální reabsorpce tekutin u myši ER α KO a poruchách ve spermatogenezi u ArKO myši (O'Donnell et al. 2001). V kontrastu, ER β KO myši nevykazují žádné změny ve spermatogenezi a vykazují normální reprodukční chování (Kregeet al. 1998). Ale v nedávné studii Delbčs a jeho spolupracovníci (2006) uvádí, že inaktivace ER β genu vede k 50% zvýšení počtu gonocytů během 2. a 6. dne po narození, díky nárůstu proliferace a snížení apoptózy těchto buněk, bez změn v počtu Sertoliho či Leydigových buněk.

Studie tedy ukazují, že negativní účinky na reprodukční funkce samců savců má jak přebytek estrogenů či xenoestrogenů, tak i nedostatek endoestrogenů, z čehož vyplývá esenciální funkce estrogenů v samčí reprodukci.

3.1.1. Cytochrom P450 aromatáza

Syntéza estrogenů u samců probíhá irreverzibilní konvergencí androgenů na estrogény, která je katalyzována membránově vázaným enzymem cytochrom P450 aromatázou. P450 aromatáza je mikrozomální enzymatický komplex skládající se ze dvou proteinů: NADPH cytochrom P450 reduktázy a cytochrom P450 aromatázy, který obsahuje steroidy vázající místo (Serge Carreau et al. 2003). U lidí je P450 aromatáza produktem jediného genu s názvem Cyp19, který patří do cytochrom P450 genové rodiny, která obsahuje více než 500 členů (Simpson E. R. et al. 1994). Pro správnou funkci potřebuje aromatáza koenzym, kterým je NADPH. Akce aromatázy zahrnuje oxidaci, odstranění methylové skupiny na 19. uhlíku a odstranění vodíku na 1. uhlíku testosteronu nebo androstenediolu (Hans-Udo Schweikert 2003).

Bylo provedeno mnoho studií ohledně lokalizace aromatázy, která je podmínkou pro syntézu estrogenů. V dospělosti jsou hlavním zdrojem estrogenů Leydigovy buňky, zatímco Sertoliho buňky jsou hlavní estrogením zdrojem během fetálního a neonatálního života. Nicméně bylo ukázáno, že zárodečné buňky u dospělého samce představují nový zdroj estrogenů (Carreau S. et al. 2002). Ve skutečnosti množství transkriptu P450 aromatázy je větší ve spermatocytech než ve spermatidách a než ve zralých spermích. Naopak aktivita aromatázy je vyšší u haploidních zárodečných buněk než u mladších zárodečných buněk. Kromě toho byla u potkana potvrzena existence transkriptu P450 aromatázy v epiteliálních buňkách nadvarlat (Wiszniewska B. 2002). Ve varlatech dospělých mužů byla potvrzena přítomnost aromatázy v cytoplazmě okolo protáhlých spermatid (Turner et al. 2002) a v cytoplazmatických kapičkách ejakulovaných spermíí (Rago et al. 2003).

Přítomnost aktivní aromatázy byla objevena i u ejakulovaných spermíí (Aquila S. et al. 2002), přičemž její aktivita je spojena s kapacitací a akrozomální reakcí (Aquila S. et al. 2003). Z toho se tedy dá odvodit, že spermie nejsou vystaveny estrogenům jen v ženském pohlavním traktu, ale samy představují lokální zdroj estrogenů, které parakrinním či intrakrinním způsobem modulují extratestikulární maturaci spermíí (Aquila S. et al. 2004)

3.2. Receptory estrogenů v samčím reprodukčním traktu

3.2.1. Lokalizace ER v savčích varlatech a spermích

Estrogenní receptory existují ve dvou formách ER α a ER β . Oba tyto receptory se uplatňují při regulaci samčí reprodukce. ER β jsou zapojeny do gametogeneze, ER α jsou zapojeny ve steroidogenních procesech (Delbes G. et al. 2006). Lokalizace ER se liší v rámci druhů. Expresi ER α v Leydigových buňkách varlat holdavců publikoval Zhou *et al.* V roce 2002, zatímco v Leydigových buňkách varlat potkanů k expresi

ER α nedochází (Goyal *et al.* 1997). ER β transkript je přítomen v zárodečných buňkách varlat potkanů a to zejména v gonocytech, a také v Sertoliho buňkách a Leydigových buňkách (Mowa & Iwanaga 2001, Van Pelt 1999), ale jiné studie potvrzují expresi ER β (protein, mRNA) v zárodečných buňkách varlat hlodavců (Saunders *et al.* 1998, Van Pelt *et al.* 1999, Zhou *et al.* 2002). ER β protein je přítomen ve třech testikulárních typech buněk potkanů, ale u myši je přítomen pouze v gonocytech (Sauderst *et al.* 1998, Jefferson *et al.* 2000).

Rozporuplné jsou i údaje o lokalizaci ER v semenotvorných kanálcích u mužů. Pelletier & El-Alfy (2000) nepozorovali žádný tubulární výskyt ER α či ER β . Naopak Mäkinen *et al.* (2001) a Saunders *et al.* (2001) detekovali ER β ve spermatogoniích, spermatocytech a časných stádiích spermatid, ale ne v prodloužených spermatidách a maturovaných spermích. Nebyl pozorován žádný výskyt ER α ve varlatech. Pentikadnen *et al.* (2000) prokázali přítomnost ER α v lidských zárodečných buňkách a Durkee *et al.* (1998) a Luconi *et al.* (1999) prokázali existenci ER α v lidských ejakulovaných spermích. Tyto nesourodé výsledky mohou být vysvětleny různými přístupy a metodami používaných ve studii daného tématu.

Lambart *et al.* ve své studii z roku 2004 potvrzují expresi ER (protein i mRNA) v lidských zárodečných buňkách. V ejakulovaných spermích potvrdili přítomnost proteinu i mRNA ER α , ale pouze mRNA ER β . Přítomnost ER v savcích zárodečných buňkách je dobře zdokumentována, přičemž většina studií upřednostňuje ER β jako převládající formu (Saunders *et al.* 2002, Zhou *et al.* 2002).

Aquila *et al.* v roce 2003 publikovali studii o expresi ER α i ER β v lidských ejakulovaných spermích, ovšem jejich lokalizace se liší. Zatímco ER α je lokalizován hlavně v midpiece, ER β je lokalizován zejména v bičíku. V proximální oblasti bičíku se výskyt ER α a ER β překrývá. ER se uplatňují při poskytování signálu přežití, přičemž každý z receptorů interaguje s jinou složkou dráhy přenosu.

3.2.2. Transgenní modely myši (ER α KO, ArKO)

3.2.2.1. ER α KO (estrogen-receptor α knock-out myš)

Estrogen-receptor α knock-out myš ukazuje jednoznačné důkazy, že estrogény hrají důležitou roli v samčí plodnosti, struktuře a funkci samčího reprodukčního traktu (Hess R. A. *et al.* 2000). V tomto transgenním modelu myši jsou velmi brzy po porodu (20dní) vidět morfologické rozdíly varlat, dilatace semenotvorných kanálků a ztenčování epitelu semenotvorných kanálků, který je charakteristický zkrácenými mikrovily a redukcí endocytického aparátu a lyzozomálních granulí (Eddy E. M. *et al.* 1996, Hess R. A. *et al.* 1997, Hess R. A. *et al.* 2000). V 10-12 týdnu je pozorováno veliké rozšíření rete testis a následná degenerace

semenotvorných kanálků (Eddy E. M. Et al. 1996). Tyto histopatologické změny jsou v důsledku nedostatečné reabsorbce tekutiny z lumen těchto kanálků (Hess R. A. Et al. 1997).

Na myším modelu bylo prokázáno, že ER α hrají významnou roli při udržování odpovídající morfologie a fyziologie rete testis a ductus efferent během pubertální a dospělé fáze života (Lee K. H. Et al. (2000).

3.2.2.2. ArKO (aromatase knock out)

ArKO myši, myši s deficientem aromatázy v důsledku inaktivace genu pro aromatázu, se stali neplodnými kvůli poruchám spermiogeneze spojených s poklesem pohyblivosti spermií a neschopností oplodnit oocyty (Robertson et al. 1999, 2001). Šest případů nedostatku estrogenů způsobených mutacemi genu Cyp19 bylo popsáno (Morishima et al. 1995, Carani et al. 1997, Deladoey et al. 1999, Murata et al. 2001, Herrman et al. 2002, Kottler et al. 2002), analýza spermatických parametrů u tří pacientů odhalila snížení motility (Carani et al. 1997, Herrman et al. 2002, Kottler et al. 2002).

Působením inhibitoru aromatázy dochází ve varleti potkana ke snížení počtu spermií (Gerardin et al. 2002).

3.3. Pochody spermatogeneze ovlivněné estrogeny

Estrogeny jsou velmi důležité hormony ovlivňující pochody spermatogeneze. Pod jejich kontrolou je zejména stanovení počtu kmenových zárodečných buněk a maturace spermatid. Počet zárodečných buněk během vývoje plodu se zvýší díky pozitivnímu vlivu estrogenního deficitu. Naopak estrogenní deficit během dospělosti má negativní vliv, samec se stává neplodným. Proliferace gonocytů potkana je indukována 17 β -estradiolem (Li et al. 1997).

Estradiol je také asociován s přežíváním spermií, ale mechanismus, kterým estradiol dává spermiím signál přežití, není dosud znám. Nicméně bylo zjištěno, že pod vlivem estradiolu dochází ke zvýšené fosforylaci proteinů, které se zapojují do přenosu signálu přežití a potlačení fosforylace poukazuje na roli estrogenů a estrogenních receptorů v přežívání spermií. (Aquila et al. 2003)

Durkee a jeho kolegové (1999) prokázali, že lidské spermie obsahují membránově vázané estrogenní receptory, které mohou být spojeny se signální dráhou zahrnující rychlou odpověď prostřednictvím vápníkových kanálů a kalcium/kalmodulinového komplexu, které jsou spojené s motilitou spermií a kapacitací (Herrero M. B. and Gagnon C. 2001).

U hypogonadálních myších, u kterých vývoj zárodečných buněk nepostupuje nad rámec pachytenního stádia, došlo při léčbě estradiolem k vývoji protáhlých stadií spermatid (Ebling et al. 2000).

Výraznou roli mají estrogény, 17β -estradiol, v regulaci kapacity a akrozomální reakce. Pro úspěšné oplození musí spermie projít procesem kapacity a poté akrozomální reakcí. V průběhu kapacity spermie získává schopnost motility, dochází ke změnám v plazmatické membráně (disociace molekul seminální plazmy, které pokrývají membránu spermie, změn v náboji buněčného povrchu, fluiditě a permeabilitě membrány) a akrozómu (redistribuce proteinů a lipidů) a k odstranění nevhodných spermií. Díky kapacitaci může spermie podstoupit akrozomální reakci a oplodnit tak oocyt. Kapacitace je tedy zásadní děj, bez kterého nedojde k úspěšnému oplození. To, že je pod kontrolou estrogenů, ukazuje jejich významnost v regulaci samčí reprodukce.

4. Negativní vliv environmentálních estrogenů na plodnost savčích samců

V posledních letech se role estrogenů v samčí reprodukci stala častým tématem mnoha studií a vědeckých prací. Stejně jako vliv látek s estrogení aktivitou z prostředí na vývoj samců a jejich plodnost. Články pojednávají například o feminizaci rybích samců nebo o snižování plodnosti mužů, kteří pijí vodovodní vodu vlivem přítomnosti environmentálních estrogenů. Tyto estrogény pocházely buď z chemického průmyslu a výrobních procesů nebo z moči žen, které užívají hormonální antikoncepci. Bylo prokázáno, že dlouhodobá expozice těmto látkám způsobuje poruchy reprodukce. Studie z posledních 50 let jasně prokazují korelaci mezi poklesem kvality spermatu mužů s vyšší koncentrací environmentálních estrogenů v prostředí (Delbes G. Et al 2006). První pozorování vlivu environmentálních estrogenů (ES) na reprodukci savčích samců bylo prováděno u volně žijících zvířat. Expozice environmentálním estrogenům může vést až k trvalým změnám, jako je feminizace nebo změny v reprodukčním chování (Vos et al. 2000).

Hlavními účinky ES na samčí plodnost je zhoršení kvality spermií, zvýšený výskyt kryptorchismu (nesestouplá varlata) a hypospadie (vrozená anomálie močové trubice, která končí na ventrální straně penisu), zvýšený výskyt rakoviny varlat a změna poměru pohlaví. Díky pozorování výskytu těchto poruch bylo zjištěno, že všechny tyto poruchy jsou navzájem propojeny. Například srovnávací studie v evropských zemích ukázaly, že výskyt každé z těchto abnormalit byl maximální v Dánsku a minimální ve Finsku (Virtanen et al. 2005). Navíc kryptorchismus zvyšuje riziko výskytu dalších abnormalit. Podobně hypospadie zvyšuje riziko výskytu rakoviny varlat a oligospermie (snížené množství spermií v ejakulátu pod normu 20 mil pohlavních buněk na 1ml ejakulátu) je pozorována více u mužů s počátečním vývojem rakoviny varlat. Proto bylo navrženo, že tyto změny jsou příznaky jednoho syndromu, TDS- testicular dysgenesis syndrome (Skakkebaek et al. 2001, Skakkebaek & Jorgensen 2005). Experimentální a epidemiologické studie naznačují, že TDS je výsledkem narušení embryonálního programování a gonadální vývoj během fetálního života (Skakkebaek N. E. 2003).

Provedené studie poskytly poznatky ohledně citlivosti na estrogení látky zevního prostředí, ale tato citlivost závisí na druhu a kmeni zvířat a na dávkách ES, kterým byla vystavena. Nicméně všechny studie naznačují, že vystavení vysokým koncentracím ES během těhotenství může vyvolat několik příznaků TDS.

4.1. Zhoršení kvality savčích spermií

Zdravé spermie jsou esenciální pro úspěšnou reprodukci. Pokud se zaměříme na lidskou populaci, zjistíme, že v posledních letech se vyskytuje čím dál více párů v reprodukčním věku, které mají s reprodukcí problémy. V roce 2005 to bylo 15% párů, přičemž až z 60% je důvodem mužská neplodnost (WHO). Mužská neplodnost má několik příčin, mezi které patří vliv environmentálních estrogenů jako endokrinních disruptorů. Za posledních 50 let poklesla kvalita a množství spermií mnohdy o více než 50%. Před 20 lety

obsahoval 1 ml ejakulátu asi 50 miliónů spermií, z čehož 50% bylo morfologicky normálních. Dnes obsahuje 1 ml ejakulátu asi 20 miliónů spermií, z čehož je morfologicky normálních pouze 30% (WHO). Příčinou poklesu množství spermií může být špatná regulace spermiogeneze zahrnující řadu endokrinních, intartestikulárních a intercelulárních procesů. Populace gonocytů určena během vývoje plodu hraje roli při určování počtu zárodečných kmenových buněk přítomných v dospělosti, protože experimentální snížení počtu gonocytů během fetálního vývoje vede ke snížení počtu spermií v dospělosti (Moreno et al. 2001). Podobné výsledky byly získány v případě snížení počtu Sertoliho buněk během prenatálního života (Orth et al. 1988). Produkce zdravých spermií v dospělosti tedy závisí na fetální gametogenezi a částečně na schopnosti gonocytů diferencovat v gonády.

Bibbo a jeho kolegové zaznamenali pokles objemu ejakulátu, koncentrace spermií a procenta normálně pohyblivých spermií u synů žen, které byly léčeny diethylstilbestrolem během těhotenství. Další korelací je koncentrace metabolitů polychlorovaných bifenylů (PCB) v krvi a seminální plazmě s pohyblivostí a koncentrací spermií (Dallinga J. W. Et al. 2002).

Z těchto studií je zřejmé, že v mnoha případech by mohly být negativní dopady spojené s působením ES (vedle genetické predispozice). Negativní dopady působení ES byly pozorovány v dobře definovaných senzitivních fázích života, které jsou také nazývány „kritická okna expozice“ (Anderson LMDBA, Fear N. T., Roman E. 2000).

4.2. Zvýšený výskyt kryptorchismu a hypospadie

Kryptorchismus je porucha, kdy není varle schopno sestoupit do své normální polohy v šourku. Podle dvou anglických studií provedených v roce 1950 a 1980 je prevalence kryptorchismu 1% a 5% (Jensen T. K. et al. 1995). Kryptorchismus je výsledkem abnormality v produkci nebo činnosti InsI3 (Insulin-like factor 3, produkovaný Leydigovými buňkami a spolu s testosteronem je důležitý pro maskulinizaci plodu) nebo androgenů regulujících sestup varlat (Kubota et al. 2002). Expoziční studie prokázaly vyšší riziko výskytu kryptorchismu u synů žen, které pracovaly s pesticidy (Weidner I. S. et al. 1998), přičemž byly zjištěny výrazně vyšší koncentrace hexachlorbenzenu a heptachlorepoxydu v tukových tkáních chlapců s testikulární maldescent ve srovnání s těmi z kontrolní skupiny (Hosie S. et al. 2000).

Hypospadie je vrozená anomálie močové trubice, která končí na ventrální straně penisu. Je způsobena defektem v produkci či aktivitě androgenů během fetálního vývoje. Klip a kolegové v roce 2002 uveřejnili studii o zvýšeném výskytu hypospadie u synů žen, které byly vystaveny působení diethylstilbestrolu (DES).

Vzhledem k nespolehlivému datování případů kryptorchismu i hypospadie a různým diagnostickým metodám je třeba přistupovat k těmto datům s obezřetností.

4.3. Zvýšený výskyt rakoviny varlat

Výskyt testikulární rakoviny, která je nejčastější rakovinou u mladých mužů, vzrostl v posledních letech ve všech studovaných zemích. Například v Severní Americe byl zaznamenán vzrůst výskytu z 3,4% v roce 1973 na 5,5% v roce 1997 (Toppari 2002). Testikulární rakovina vzniká z CIS buněk (carcinom in situ cells), které mají svůj původ ve fetální části života, kdy by gonocyty normálně diferencovaly ve spermatogonie. Karcinom in situ (CIS) je lokální maligní léze, která přechází v rakovinu varlat (Skakkebaek et al. 1981). Jak tyto buňky přetrvávají během vývoje a co způsobuje jejich proliferaci po pubertě, není úplně jasné. Pro prosazování CIS buněk a jejich šíření jsou zřejmě důležité faktory, které podporují normální buněčné dělení. Také abnormální intrauterinní hladiny hormonů (snížení androgenů a/nebo zvýšení estrogenů) mohou být v úzké souvislosti s výskytem testikulární rakoviny (Fisher J. S. 2004). Ohlson a Hardell (2000) ohlásili v souvislosti s některými výhradami studii o zvýšeném riziku výskytu rakoviny mezi pracovníky exponujícími polyvinyl chlorid (PVC).

Ve zvýšeném výskytu rakoviny varlat v posledních letech se dají pozorovat geografické rozdíly, což je zřejmě důkaz spojitosti s ES.

4.4. Změna poměru pohlaví

Za „normálních“ podmínek je poměr narozených chlapců k narozeným dívkám větší než jedna. Během posledních let byly zjištěny menší poklesy těchto poměrů v Kanadě, Spojených státech, Dánsku, Nizozemsku a v dalších evropských zemích. Nejvýznamnějším vysvětlením je změna socio-ekonomické situace po druhé světové válce a to, že jsou tyto oblasti blízko průmyslu a tím jsou vystaveny většímu působení environmentálních a průmyslových chemikálií. Podíl chlapců mezi živě narozenými jedinci u komunity Aamjiwnaang v Kanadě nepřetržitě klesá od roku 1990, mezi roky 1990-2003 došlo k poklesu na 0,3 (Mackenzie et al. 2005). Některé studie popisují negativní vliv znečištění životního prostředí na poměr narozených chlapců. V Turecku, matky vystaveny vysoké koncentraci hexachlorbenzenu rodí méně chlapců (Jarrell J. F. Et al. 2002), Gomez a jeho kolegové si všimli pozoruhodného poklesu v počtu synů otců, kteří byli vystaveni působení PCB (polychlorované bifenylly) před (ale ne po) věku 19 let během Yu-Cheng katastrofy.

Závěr

- Popsala jsem stavbu a funkci savčí spermie
- Seznámila jsem se s obecnou funkcí estrogenů jako steroidních hormonů.
- Osvojila jsem si souvislosti mezi estrogeny a samčím reprodukčním traktem.
- Popsala jsem negativní vliv environmentálních estrogenů na samčí reprodukční trakt (spermie) a tím na plodnost savců

Vypracováním této bakalářské práce jsem si osvojila problematiku negativního působení environmentálních estrogenů jako endokrinních disruptorů na plodnost samců savců. Hlavními účinky environmentálních estrogenů na samčí plodnost je zhoršení kvality spermií, zvýšený výskyt kryptorchismu (nesestouplá varlata) a hypospadie (vrozená anomálie močové trubice, která končí na ventrální straně penisu), zvýšený výskyt rakoviny varlat a změna poměru pohlaví. Tyto změny, které se někdy souhrnně nazývají TDS (testicular dysgenesis syndrome), jsou výsledkem narušení embryonálního vývoje gonád.

Koncentrace environmentálních estrogenů v životním prostředí stále roste, což představuje riziko zvýšení jejich negativního vlivu.

Použitá literatura

Aquila S., Sisci D., Gentile M., Middea E., Catalano S., Carpino A., Rago V., Ando S. 2004 Estrogen receptor (ER)alpha and ER beta are both expressed in human ejaculated spermatozoa: Evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*

Alberts Bruce, Johnson Alexander, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, Walter Peter 2002 *Molecular Biology of the cell 4 th*, New York and London, Garland Science

Bland R., Hewison M. 2001 Steroid hormone metabolites and hormone binding assays, *Journal- Methods Mol Bio*

Carreau Serge, Lambard Sophie, Delalande Christelle, Denis-Galeraud Isabelle, Bilinska Barbara, Bourguiba Sonia 2003 Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review, *Journal- Reprod Biol Endocrinol*

Crisp Thomas M., Eric D. Clegg, Ralph L. Cooper, William Wood, David G. Anderson, Karl Baetcke, Jennifer L. Hoffmann, Melba S. Morrow, Donald J. Rodier, John E. Schaeffer, Leslie W. Touart, Maurice G. Zeeman, Yogendra M. Pate 1988 *Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis*, Environmental Health Perspectives

Delbes G., Levacher C., Habert R. 2006 Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development, *Journal- Reproduction*

Ecroyd H. 2009 Testicular descent, sperm maturation and capacitation. Lessons from our most distant relatives, the monotremes. *Reproduction fertility and development*.

Eddy E.M. and Deborah A. O'Brien 1994 *The Spermatozoon. The physiology of Reproduction 2* 29-62. Eds Knobil and J.D. Neil, New York, Raven Press

Esponda P. 1985 *Spermatogenesis and spermatozoa in mammals*

Giguere V., Yang N., Segui P., Evans R. M. 1988 Identification of a new class of steroid-hormone receptors, *Nature*

Gilbert Scott F. 2000 *Development Biology 6 th*, Sinauer Associates Inc.

Habert R., Delbes G., Duquenne C., Livera G., Levacher C. 2006 Effects of estrogens on the development of the testis during fetal and neonatal life, *Journal- Gynecol Obstet Fertil*

Hanukoglu I. 1992 Sterodogenic enzyme- Structure, function and role in regulation of steroid hormone biosynthesis, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*

Christopher J. De Jonge, C. L. R. Barratt 2006 *The Sperm Cell- production, maturation, fertilization, regeneration. 3-7*, United Kingdom, Cambridge University Press

Kierszenbaum Abraham L. 2007 *Molecular biology of sperm head shaping*

Lambard S., Galeraud-Denis I., Saunders P. T. K., Carreau S. 2004 Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors, *Journal of Molecular Endocrinology*

Lee K. H., Hess R. A., Bahr J. M., Lubahn D. B., Taylor J., Bunick D. 2000 Estrogen receptor α has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules, *Biology of Reproduction*

Lodish Harvey, Berk Arnold, Zipursky S. Lawrence, Matsudaira Paul, Baltimore David, Darnell James E. 2000 *Molecular Cell Biology 4th*, New York, W. H. Freeman & Co.

Luconi M., Forti G., Baldi E. 2002 Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*

Micevych P., Kuo J., Christensen A. 2009 Physiology of Membrane Oestrogen Receptor Signalling in Reproduction, *Journal of Neuroendocrinology*

Miller W. L. 1988 *Molecular-biology of steroid-hormone synthesis*, *Endocrine Reviews*

Millette C.F. 1999 Spermatozoa, *Encyclopedia of Reproduction 1* 586-596, Academic Press

Mizukami Yoichi 2010 In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo, *Journal- Endocrinology*

Mostafa R.M.I, Mirghani Z., Moustafa K.M., Moustafa Y.M., El Hefnawi M.H. 2007 New Chapter in Old Story: Endocrine Disruptors and Male Reproductive systém, Journal of Medical Sciences Research

Nilsson S., Gustafsson J. A. 2002 Estrogen receptor action, Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression

Nilsson S., Makela S., Treuter E., Tujague M., Thomsen J., Andersson G., Enmark E., Pettersson K., Warner M., Gustafsson J. A 2001 Mechanisms of estrogen action, Physiological Reviews

Pelletier G., Labrie C., Labrie F. 2000 Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs, Journal of Endocrinology

Pěkníková J. 2007 Vliv endokrinních disruptorů na fertilitu savců, Urol List

Osiguwa-Adeoya S.A., S.Markoulaki, V.Pocock, S.R.Milligan and L.R.Fraser 2003 17b-Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function, Human Reproduction Vol.18

Prossnitz E. R., Arterburn J. B., Smith H.O., Oprea T. I., Sklar L. A., Hathaway H. J. 2008 Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GrPR30, Annual Review of Physiology

Prossnitz E. R., Maggiolini M. 2009 Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30, Molecular and Cellular Endocrinology

Sigman M. 2007 The sperm cell: Production, maturation, fertilization, regeneration, American Journal of Human Biology

Toshimori K. 2009 Dynamics of the Mammalian Sperm Head: Modifications and maturation events from spermatogenesis to egg activation

Toshimori, K. 2003 Formation and organization of the mammalian sperm head

Wood Stephen L., John J. Jarrell, Cheryl Swaby, Sui Chan 2007 Endocrine disruptors and spontaneous premature labor: a case control study, BioMed Central

