

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Buněčná a vývojová biologie



Bc. Magda Tejnická

**Vliv estrogenních hormonů na kapacitaci a akrozomální
reakci myších spermií *in vitro***

The influence of estrogens on mouse sperm capacitation and
acrosome reaction *in vitro*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Kateřina Hortová, PhD.

Praha, 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala 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, 2. srpna 2011

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Kateřině Hortové, PhD. za její ochotnou spolupráci, vedení, trpělivost v průběhu vzniku mé diplomové práce a za pomoc při jejím dokončení.

Dále děkuji Mgr. Lukáši Dědovi z laboratoře diagnostiky pro reprodukční medicínu za jeho pomoc při zpracování statistických výsledků pro moji diplomovou práci.

Děkuji také členkám laboratoře reprodukční biologie – Ing. Marianě Sitárové za přátelství a spolupráci při výzkumných pokusech, RNDr. Nataše Šebkové za pomoc a rady při osvojení si některých laboratorních technik a paní Marii Nohýnkové za její dobré rady.

Děkuji všem členům rodiny a svým přátelům za jejich podporu a motivaci při tvorbě této práce.

Tato diplomová práce vznikla za finanční podpory MSMT VC 1M06011.

Obsah

ABSTRAKT	5
ABSTRACT.....	6
SEZNAM ZKRATEK	7
1. ÚVOD A CÍLE	9
CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	11
1.1 Studie vlivu vybraných estrogenů na kapacitaci myších spermií in vitro s detekcí míry tyrozinové fosforylace.....	11
1.2 Hodnocení stavu akrozómu myších spermií po kalcium ionoforem indukované akrozomální reakci in vitro.....	11
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	12
2.1 STAVBA A FUNKCE SAVČÍ SPERMIE.....	12
2.1.1 Hlavička spermie	13
2.1.2 Jádro.....	13
2.1.3 Akrozóm spermie a jeho funkce	14
2.1.4 Bičík	15
2.2 SPERMATOGENEZE.....	16
2.3. KAPACITACE	17
2.3.1 Biologie in vivo kapacity.....	19
2.3.2 Tyrozinová fosforylace.....	20
2.3.3 Hyperaktivace spermie	21
2.3.4 Kapacity in vitro.....	22
2.4 AKROZOMÁLNÍ REAKCE.....	22
2.4.1 Indukce akrozomální reakce.....	22
2.4.2 Molekulární mechanismy akrozomální reakce.....	24
2.4.3 Akrozomální reakce in vitro.....	25
2.5 ESTROGENY.....	26
2.5.1 Funkce estrogenů	27
2.5.2 Výskyt estrogenů	28
2.5.3 Struktura estrogenů.....	29
2.5.4 Biosyntéza estrogenů	29
2.5.5 Transportní proteiny estrogenů a metabolismus	30
2.5.6 Terapeutické estrogény a syntetické estrogény	31

2.5.7 Estrogenní receptory	32
2.5.8 Mechanismus účinku estrogenů	33
2.5.9 Role receptorů GPR30 v rychlé signalizační dráze	34
2.6 ROLE ESTROGENŮ V SAMČÍ REPRODUKCI	35
2.6.1 Estrogenní receptory u mužů	36
2.6.2 Estrogeny u myši	37
2.6.3 Knockout modely myši	38
2.7 VYLUČOVANÉ ESTROGENY	38
2.7.1 Hormony ve vodě	39
3. MATERIÁL A METODY	41
3.1 MATERIÁL	41
3.1.1 Chemikálie	41
3.1.2 Roztoky	42
3.1.3 Přístroje	44
3.1.4 Další použitý materiál	45
3.1.5 Protilátky a fluorescenčně značené próby	45
3.1.6 Živočišný materiál pro odběr spermií	45
3.2 METODY	46
3.2.1 Příprava jednotlivých koncentrací estrogenů	46
3.2.2 Kapacitace spermií in vitro	46
3.2.3 Fluorescenční metody	48
3.2.4 Hodnocení tyrozinové fosforylace	48
3.2.5 Indukce akrozomální reakce in vitro	49
3.2.6 Hodnocení akrozomální reakce	50
3.2.7 SDS – PAGE a imunodetekce proteinů	50
4. VÝSLEDKY	53
4.1 HODNOCENÍ TYROZINOVÉ FOSFORYLACE V HLAVIČCE SPERMIE MYŠÍ PO KAPACITACI <i>IN VITRO</i> A STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ	53
4.2 HODNOCENÍ CAI INDUKOVANÉ AKROZOMÁLNÍ REAKCE A STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ	57
4.3 ELEKTROFORETICKÉ HODNOCENÍ TYROZINOVÉ FOSFORYLACE Z LYZÁTU CELÝCH SPERMIÍ	60
5. DISKUZE	62
6. ZÁVĚR	71
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	72

Abstrakt

V životním prostředí se vyskytuje stále více látek, které mohou působit na reprodukční parametry, jak v samčím, tak v samičím organismu. Současným světovým problémem je snížení kvality spermií, což vede k nárůstu početí dítěte nepřírozenou cestou za použití technik asistované reprodukce na specializovaných klinikách.

Mezi tyto látky patří i přírodní estrogény, které se po vyloučení z těla močí dostávají do odpadních vod. Do lidského těla se zpět dostávají v pitné vodě nebo z potravy a interferují s činností endogenních hormonů již při velmi nízkých koncentracích, proto je vysoce aktuální se v současné době zabývat vlivem těchto látek na savčí spermie.

Estrogény jsou brány jako typicky samičí pohlavní hormony, ale mají významnou roli i v regulaci samčí reprodukce. Endogenní estrogény jsou u savčích samců důležitou částí endokrinního systému. Účastní se vývoje zárodečných buněk, pochodů spermatogeneze a procesů vedoucích k úspěšnému oplození vajíčka jako je kapacitace a akrozomální reakce (AR). Tyrozinová fosforylace proteinů (p-Tyr) je jedním ze zásadních kroků pro úspěšný průběh kapacitace u spermií, na kterou navazuje fúze plazmatické a vnější akrozomální membrány s následným vyjitím akrozomálního váčku a splynutí spermie s vajíčkem.

Na laboratorních myších kmene BALB/c byl detailně studován vliv estrogenních hormonů 17- β -estradiolu, estronu, estriolu a syntetického 17- α -ethynylestradiolu na kapacitaci a AR *in vitro*. P-Tyr proteinů je výhradní ukazatel transdukce signálu v regulačních drahách spojených s kapacitací spermií, proto byl efekt daných látek hodnocen mírou p-tyr v hlavičce spermií při kapacitaci *in vitro*, a to jak pod fluorescenčním mikroskopem, tak pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy v přítomnosti dodecyl síranu sodného (SDS-PAGE). Paralelně byl rovněž hodnocen stav akrozómu po kalcium ionoforem (CaI) indukované AR.

Ze získaných výsledků nelze jednoznačně usuzovat, že exogenní přidání přirozených estrogenních hormonů do kapacitačního média indukuje oproti kontrole odlišnou míru fosforylace tyrozinových zbytků proteinů hlavičky myší spermie. Nicméně v případě syntetického 17- α -ethynylestradiolu, byl nárůst p-Tyr zaznamenán.

Z vyhodnocení CaI indukované AR je patrné, že procento myších spermií s dokončenou AR vzrůstalo s kapacitačním časem. U 17- β -estradiolu a estronu byl zaznamenán pokles AR v porovnání s kontrolou. Ostatní signifikantní rozdíly se objevovaly náhodně a bez závislosti na koncentraci, typu steroidu, čase kapacitace nebo době působení CaI. Lze shrnout, že rostoucí koncentrace estrogenů v životním prostředí může vést k ovlivnění schopnosti spermií kapacitovat a procházet akrozomální reakcí *in vitro*.

Klíčová slova: estrogény, spermie, kapacitace, tyrozinová fosforylace, akrozomální reakce

Abstract

There are an increasing amount of compounds in the environment that can have a negative effect on reproductive parameters in both male and female organism. There has been a worldwide decline of sperm quality during past decades and this fact lead to an increase of unnatural ways of conception through assisted reproduction techniques in the specialised centres.

Natural estrogens are one of these compounds and they get into waste water after being excluded from the body by the urine. They get back into the human body from drinking water or from the food, and they can interfere with function of endogenous hormones in very low concentrations. For these reasons it is up to date to deal with the influence of these compounds on mammalian sperm.

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. Endogenous estrogens in mammalian males are an important part of the endocrine system. Estrogens play an important role in the development of germ cells, spermatogenesis and processes leading to successful egg fertilization such as a capacitation or acrosomal reaction. Tyrosine phosphorylation is one of the essential steps for the properly ongoing process of capacitation in sperm followed by a fusion of plasma and outer acrosomal membrane of sperm and sequential exocytosis of the acrosomal vesicle followed by sperm-egg fusion.

We used laboratory strain of BALB/c mice for a detailed study of the effect of three natural estrogenic hormones 17- β -estradiol, estron, estriol and synthetic 17- α -ethynylestradiol on capacitation and acrosomal reaction *in vitro*. P-Tyr is exclusive indicator of a signal transduction pathway associated with sperm capacitation, therefore the effect of these estrogens was evaluated by the ratio of tyrosine phosphorylation in a sperm head during capacitation *in vitro* with the using of the fluorescent microscope and also SDS PAGE electrophoresis. Simultaneously, we evaluated the state of the acrosome after calcium ionophore induced acrosomal reaction.

The results obtained cannot unequivocally conclude that the exogenous addition of natural estrogenic hormones to the capacitation medium induces different levels of tyrosine-phosphorylated residues expressed in a mouse sperm head in comparison with the control. However, in the case of synthetic 17- α -ethynylestradiol, the increase in sperm head p-Tyr was detected. From the evaluation of CaI induced AR is evident that the increase in percentage of acrosome-reacted sperm was positively dependent on the time of the capacitation. The decrease in the level of AR was analyzed in 17- β -estradiol and estron influenced sperm samples in comparison with the control. Other significant differences occurred randomly and independently on the concentration, type of steroid, capacitation time or duration of CaI exposure. It can be concluded that increasing concentration of estrogens in the environment have an impact on the ability of sperm capacitation and AR *in vitro*.

Keywords: estrogens, sperm, capacitation, tyrosine phosphorylation, acrosomal reaction

Seznam zkratek

AC	adenylát cykláza
AKAP3	protein 3 zakotvující proteinkinázu A
AR	akrozomální reakce
ArKO	aromatázový knockout myši
ATP	adenosintrifosfát
ATPáza	adenosin trifosfatáza
BPA	bisfenol A
BSA	hovězí sérum albumin (bovine serum albumin)
CaI	kalciom ionofor (calcium ionofore)
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CRISP1	sekreční protein bohatý na cystein
cyt P450	cytochrom P450 enzymový komplex
DAG	diacylglycerol
DES	diethylstilbestrol
DF	dekapacitační faktor
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
ELFO	elektroforéza
ER	estrogenní receptor
ER α	estrogenní receptor α
ER β	estrogenní receptor β
ERE	estrogenní responzivní element (estrogen response element)
α ERKO	knockout estrogenního receptoru α
β ERKO	knockout estrogenního receptoru β
$\alpha\beta$ ERKO	dvojitý knockout myši pro estrogenní receptory α a β
FSH	folikuly stimulující hormon
GEN	genistein
GPI	glykofosfatidylinositol
GPR	receptor spojený s G-proteiny (G-protein coupled receptor)
HSP	heat shock protein – chaperon
HRT	hormonální substituční léčba (hormone replacement therapy)

IAM	vnitřní akrozomální membrána (inner acrosomal membrane)
IP ₃	inositol trifosfát
LH	luteinizační hormon
NADPH	redukováná forma - nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
nAChR	nikotinový acetylcholinový receptor
NO	oxid dusnatý
NP	p-nonylfenol
OAM	vnější akrozomální membrána (outer acrosomal membrane)
P450arom	P450 aromatáza
PBP	fosfatidylethanolamin vazebný protein
PBS	fyzilogický roztok, fosfátový pufr (phosphate buffer saline)
PCBs	polychlorované bifenyly
PIP ₂	fosfatidyl inositolbifosfát
PKA	protein kináza A
PKC	protein kináza C
PLA ₂	fosfolipáza A ₂
PLC	fosfolipáza C
PM	plazmatická membrána
PNA	lektin z burských oříšků z <i>Arachis hypogaea</i> (peanut), Alexa Fluor 488 [®] conjugate
p-Tyr	tyrozinová fosforylace proteinů
PTK	protein tyrozin kináza
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecyl síran sodný (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS
SHBG	globulin vázající pohlavní hormony (sex hormon binding globulin)
TBS	fyzilogický roztok neobsahující fosfáty (tris-buffered saline)
TEMED	N, N, N', N'- tetramethylendiamin
ZP	Zona pellucida
ZP2	Zona pellucida protein 2
ZP3	Zona pellucida protein 3

1. Úvod a cíle

V posledních letech dochází k celosvětovému snížení kvality spermií, což vede k nárůstu neplodnosti v ekonomicky vyspělých zemích a přibývá případů početí dítěte nepřírodnou cestou za použití technik asistované reprodukce na specializovaných klinikách. Nestatistická data ukazují, že až každý pátý pár má určité problémy s početím dítěte. V současné době víme, že muž se na neplodnosti páru podílí ve více než 50 % případů, mimo jiné dochází k poklesu počtu spermií a ke zvýšenému výskytu abnormálních spermií, které nejsou schopné oplodnit vajíčko. Odhaduje se, že počet spermií u mužů se v průměru každý rok snižuje o 2 až 3 %.

Na samčí reprodukční buňky působí nepříznivě mimo jiné vlivy životního prostředí. Tyto látky se vyskytují ve znečištěných půdách, vodních zdrojích i v ovzduší a po vniknutí do lidského těla mohou mít vliv na plodnost. Muž rovněž nezanedbatelně ovlivňuje kvalitu spermatických buněk a to nezdravým životním stylem a vědomým vystavováním se podnětům, které škodlivě působí na reprodukční parametry.

V odpadních vodách se vyskytují přírodní i syntetické estrogení hormony, které stávající technologie čištění neodstraní. Estrogeny se používají ve farmaceutickém, kosmetickém, potravinářském průmyslu a dostávají se do odpadních vod. Velké množství estrogenů se dostává do vodních toků i z moči pasoucích se hospodářských zvířat.

Hormony se sice výrazně naředí v říční vodě, ale bylo prokázáno, že estrogení hormony i v extrémně nízkých (10^{-9-12} mol·l⁻¹) koncentracích mají vliv na změny pohlaví rybích samců tzv. feminizace ryb. V důsledku probuzení samičích hormonů začínají samci tvořit jikry, následuje neschopnost oplození samice a dochází k vymírání rybí populace. Ryby nejsou zdaleka jedinými živočichy, kteří jsou k látkám s hormonálními účinky vnímaví, se stejným problémem se setkáváme i u žab a mlžů. Estrogení látky se dostávají do těla savců, včetně lidského, v pitné vodě nebo z potravy a interferují s činností endogenních hormonů již opět při velmi nízkých koncentracích, proto je vysoce aktuální se v současné době zabývat vlivem těchto látek na savčí spermie.

Estrogeny nejsou pouze samičí pohlavní hormony, ale jsou ve fyziologických koncentracích zcela esenciální pro správný průběh spermatogeneze samců. Estrogeny vznikají u somatických a zárodečných buněk varlat i v buňkách nadvarlat činností enzymu P450 aromatázy (P450arom), která přeměňuje androgeny na estrogeny. Tyto hormony následně regulují spermatogenezi přes vazbu na specifické estrogení receptory, které fungují

jako transkripční faktory a regulují genovou expresi v jádře. Nicméně je prokázáno, že jaderné estrogenní receptory jsou translokovány do plazmatické membrány a touto negenomickou cestou se účastní rychlého chemického přenosu. Estrogeny v endogenně řízené fyziologické koncentraci hrají roli při zahájení pochodu spermatogeneze, v maturaci spermií, při navození jejich motility a udržení životaschopnosti.

Spermie musí podstoupit řadu změn, aby byly schopné oplodnit vajíčko. Estrogeny svou rolí v kapacitaci a AR ovlivňují oplození savců. Tyrozinová fosforylace (p-Tyr) proteinů je jedním ze zásadních kroků pro úspěšný průběh kapacitace u spermií, na kterou navazuje fúze membrán (plazmatické a vnější akrozomální) s následným vylitím akrozomálního vezikulu při AR a po té splynutí spermie s vajíčkem. Estrogen po vazbě na estrogenní receptory zahajuje sled událostí zahrnující vzrůst vnitrobuněčné koncentrace vápenatých iontů, stejně jako hydrogenuhličitanových iontů, které následně aktivují adenylát cyklázu (AC) generující cyklický adenosin monofosfát (cAMP). Vzrůst cAMP dále aktivuje protein kinázu A (PKA) aktivující tyrozin kinázy, které fosforylují proteiny na tyrozinových zbytcích. Kromě tyrozinové fosforylace dochází současně k hyperpolarizaci membrány, která je způsobena zvýšením propustnosti K^+ iontů a souvisí s uvolněním inhibičních komponent z povrchu membrány spermie, kdy následně může dojít ke kapacitaci (Baldi *et al.* 2000). Bez řádné funkce signalizačních drah, kde estrogenní hormony hrají nezastupitelnou roli, není spermie schopná oplození.

Cíle diplomové práce

1.1 Studie vlivu vybraných estrogenů na kapacitaci myších spermií *in vitro* s detekcí míry tyrozinové fosforylace.

Prvním cílem této práce bylo zjistit, zda přírodní estrogeny – 17- β -estradiol, estron, estriol a syntetický 17- α -ethynylestradiol mají vliv na míru tyrozinové fosforylace v průběhu kapacity *in vitro*. Zajímalo nás, zda spermie ovlivněné v průběhu kapacity exogenním přidáním estrogenů ve fyziologických koncentracích do kapacitačního média mají časově i koncentračně odlišnou proteinovou fosforylaci tyrozinových zbytků oproti kontrole.

Míru tyrozinové fosforylace jsme zjišťovali dvěma způsoby:

1.1.1 Hodnocením pozitivní tyrozinové fosforylace v hlavičce spermie pod fluorescenčním mikroskopem.

1.1.2 Hodnocením tyrozinové fosforylace z lyzátu celých spermií za použití SDS-PAGE elektroforézy s následnou imunodetekcí proteinů.

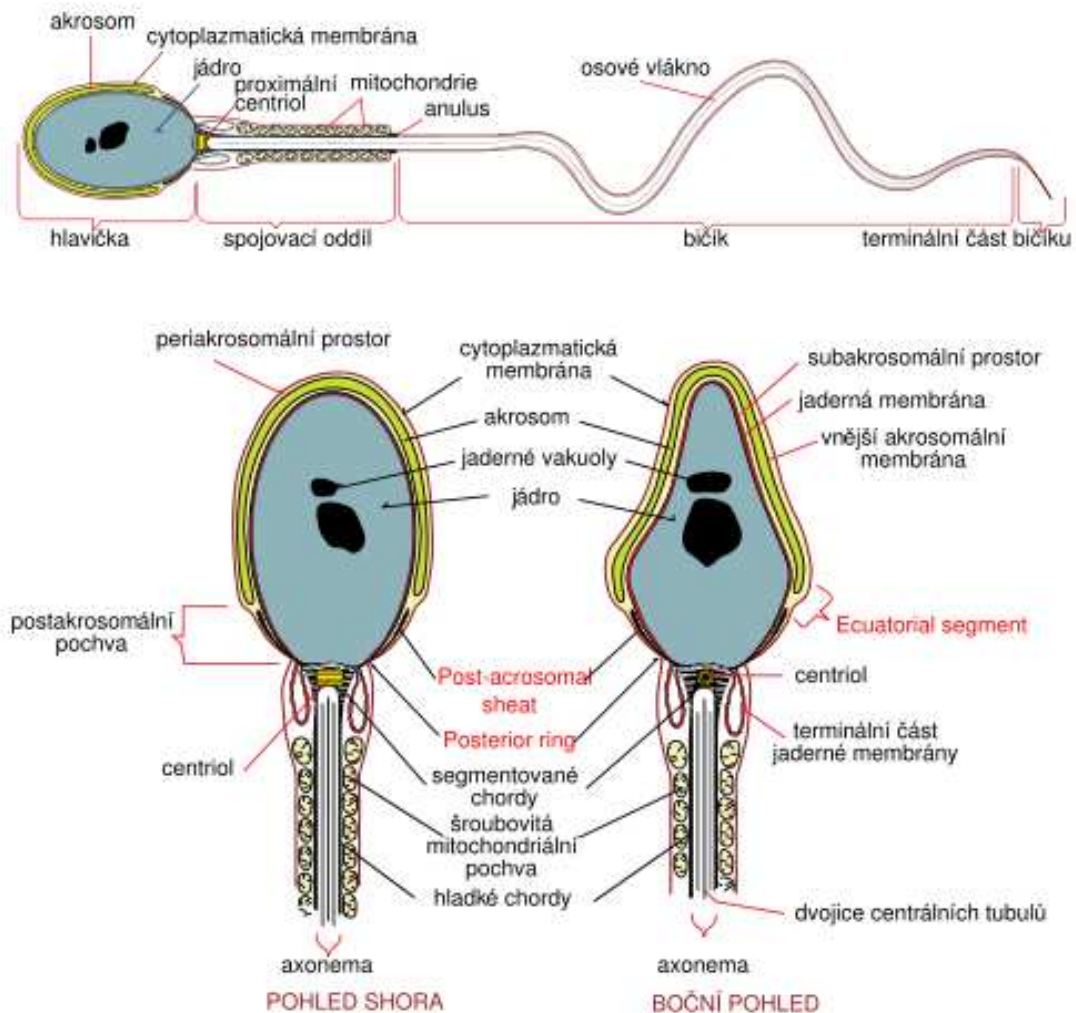
1.2 Hodnocení stavu akrozómu myších spermií po kalcium ionoforem indukované akrozomální reakci *in vitro*.

Druhým cílem bylo porovnat schopnost spermií projít akrozomální reakcí indukovanou kalcium ionoforem v podmínkách *in vitro* mezi skupinou kontrolní a skupinou ovlivněnou výše definovanými estrogenními hormony.

2. Literární přehled

2.1 Stavba a funkce savčí spermie

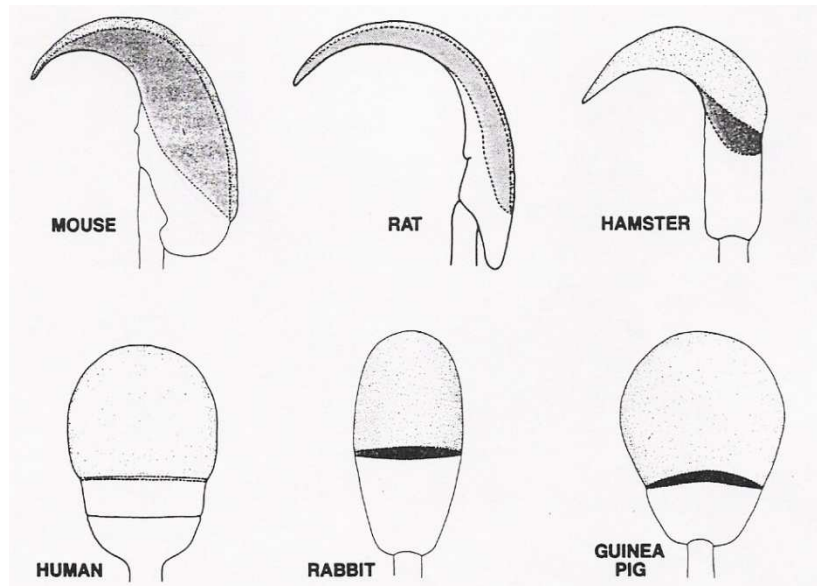
Spermie jsou samčí gamety s vysoce specializovanou funkcí a strukturou. Jsou to haploidní buňky, které jsou konečným stádiem procesu spermatogeneze probíhajícím ve varlatech, přesněji v semenotvorných kanálcích. Po vypuzení z těchto kanálků se hromadí v nadvarleti, kde dosahují schopnosti pohybu. Skládají se ze dvou hlavních částí, a to hlavičky s uloženou DNA spermie a bičíku (obr. 2.1), který jim zajišťuje pohyb (motilitu). Jejich posláním je spojit se s vajíčkem a vytvořit nový organismus.



Obr. 2.1 Lidská spermie (<http://cs.wikipedia.org/wiki/Spermie>).

2.1.1 Hlavička spermie

Hlavička savčí spermie má velikost přibližně 3–5 μm , obsahuje jádro a akrozóm, které jsou obklopeny cytoskeletem a cytoplazmou. Plazmatická membrána (PM) hlavičky má několik domén – akrozomální oblast a postakrozomální oblast. Akrozóm leží na předním konci hlavičky a pokrývá jádro až ze dvou třetin. Tvar hlavičky spermie se liší u jednotlivých druhů savců. Rozlišujeme čtyři základní morfologické typy hlaviček (viz obr. 2.2): kulaté (člověk), oválné (kanec), háčkovité nebo-li falciformní (myš) a hlavičky s velkým akrozómem (veverka). U lidí ale můžeme nalézt časté variability ve tvaru a velikosti hlavičky (Eddy & O'Brien 1994).



Obr. 2.2 Morfologické typy hlavičky spermie (Eddy & O'Brien 1994).

2.1.2 Jádro

V jádře spermie je chromatin více kondenzovaný a obsahuje poloviční sadu chromozómů. DNA spermie je v konečné fázi spermatogeneze spojena s bazickými proteiny protaminy, které nahrazují histony běžné u somatických buněk. Jádro je obaleno dvěma jadernými obaly, a to vnitřním a vnějším. Vnitřní povrch jaderného obalu lemuje proteinová síť, jaderná lamina, která tvoří jeho strukturální podporu a umožňuje ukotvení chromatinu.

2.1.3 Akrozóm spermie a jeho funkce

Akrozóm hraje důležitou roli v druhově specifické vazbě spermie na ZP vajíčka. Je to sekreční organela odvozená z Golgiho aparátu v pozdní fázi spermiogeneze a připomíná buněčný lysozóm v několika podobnostech: 1) akrozomální komponenty se formují a jsou uchovány po několik týdnů během vzniku a vývoje spermie ve varlatech; 2) obsah váčku prodělává změny během následného zrání spermie v nadvarlatech, je uložen ve spermii po dlouhou dobu a v koncentrované formě; 3) organela podstupuje sekreci v důsledku vnějšího stimulu (Abou-haila & Tulsiani 2009, Burgess & Kelly 1987).

Jeho hydrolytické enzymy jsou nezbytné pro penetraci spermie skrz obaly obklopující vajíčko (Millette 1999). Obsahuje i receptory důležité při vazbě spermie na *zona pellucida* (ZP) oocyty. Další akrozomální enzymy pomáhají fúzi membrán vajíčka a spermie a exocytóze kortikálních granul z vajíčka, které zabraňují polyspermii (Gilbert 2000).

Struktura akrozómu

Dobře vyvinutý akrozóm má podobu váčku s vnitřní (IAM) a vnější (OAM) akrozomální membránou. Vnitřní membrána kryje přední část vnější jaderné membrány, prostor mezi těmito membránami nazýváme perinukleární théka. OAM se nachází v těsné blízkosti vnitřní části PM hlavičky spermie (Eddy & O'Brien 1994).

Akrozóm se skládá ze dvou částí, akrozomální čepičky anteriorně a equatoriálního segmentu posteriorně (Yanagimachi 1994). Savci se druh od druhu liší velikostí a tvarem akrozómu, který je dán morfologií hlavičky spermie. Jsou dvě hlavní kategorie podoby akrozómu – srpovitý u hlodavců a čepičkovitý u větších savců.

Cytoskelet v hlavičce spermie je bohatý na aktin a vyskytuje se ve formě filamentární (F-aktin) nebo v monomerním stavu (G-aktin). F-aktin zajišťuje fyzickou bariéru, která brání fúzi OAM a PM spermie (Brener *et al.* 2003).

Složky akrozómu

Akrozóm obsahuje velké množství rozmanitých enzymů, některé z nich jsou specifické jen pro spermatogenní buňky (akrozin, kyselá fosfatáza, β -galaktosidáza, fosfo-

lipáza, hyaluronidáza, neuraminidáza), jiné enzymy – kyselé hydrolázy se běžně vyskytují v lysozómech (Eddy & O'Brien 1994).

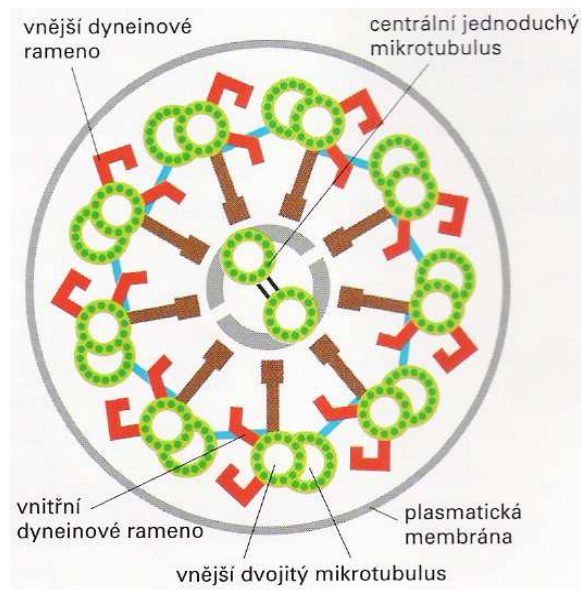
Nejlépe prozkoumaným enzymem je akrozin z rodiny serinových proteáz, který se v akrozómu vyskytuje ve formě neaktivního zymogenu proakrozinu a v průběhu AR je štěpen na enzymaticky aktivní akrozin (Yanagimachi 1994). α -Akro-zin je C-koncovou částí přichycen k vnitřní akrozomové membráně, po odštěpení vzniká β -akrozin – volná forma. Akrozin se uplatňuje při štěpení ZP a tím pomáhá spermii proniknout ZP. U myši se ale zjistilo, že tato proteáza není potřebná pro oplození (Baba *et al.* 1994a, Buffone *et al.* 2008). Při spuštění AR rozrušuje matrix akrozómu.

Hyaluronidáza je další enzym vyskytující se jak na povrchu spermie, kde je přichycena GPI-kotvou na PM spermie, tak rozpustná v akrozómu (Hardy *et al.* 1991). Při oplození nejdříve nastupuje hyaluronidáza štěpící kyselinu hyaluronovou v *cumulus oophorus*, což umožňuje spermii průchod skrz kumulární matrix. Po AR se uplatňuje vypuštěná hyaluronidáza hydrolyzující hyaluronan v ZP. Spermie může potom proniknout do vajíčka a oplodnit ho.

Ostatní enzymy akrozómu napomáhají průniku skrz kumulární matrix.

2.1.4 Bičík

Hlavní funkcí bičíku je poskytnout pohyb spermii, aby se dostala k vajíčku, mohla jím proniknout a oplodnit ho. Bičík je asi 50 μm dlouhý a můžeme ho rozdělit na čtyři části: krček, střední část s mitochondriemi, hlavní část a koncovou část. Bičíkem prochází osové vlákno – axonema, kterou obklopuje spirálovitá mitochondriální pochva. Axonemu tvoří kruh devíti dvojic mikrotubulů s dvěma centrálními mikrotubuly (uspořádání 9+2). Jednotlivé dvojice z kruhu jsou navzájem spojeny dyneinem, který funguje jako molekulární motor a umožňuje zakřivení bičíku při pohybu (obr. 2.3). Spermie se aktivně pohybuje proti proudu a je chemicky přitahována k vajíčku (pozitivní chemotaxe). Pohon pro spermii je zajišťován hydrolýzou molekul adenosin trifosfátu (ATP), které vznikají činností mitochondrií ve střední části bičíku. Během oplodnění jsou mitochondrie degradovány vaječnou buňkou, z toho vyplývá, že potomek má mitochondrie a mitochondriální DNA převážně od matky.



Obr. 2.3 Průřez bičíkem spermie (Alberts *et al.* 1998).

2.2 Spermatogeneze

Muž produkuje několik tisíc miliónů spermií za den kontinuálně od puberty po celé reprodukční období, se stářím ale jejich produkce klesá. Spermie jsou produkovány v semenotvorných kanálcích varlete v procesu nazývaném spermatogeneze (obr. 2.4), který probíhá v několika navazujících stádiích (fáze rozmnožovací, růstová a zrání) a zahrnuje proliferaci, mitózu, meiózu a diferenciaci pohlavních buněk.

Dalším kompartmentem varlat je intersticiální prostor mezi kanálky, ve varlatech se nacházejí tři hlavní typy buněk – germinální neboli zárodečné buňky, které jsou obklopeny a vyživovány plazmou procházející skrze semenotvorné kanálky ze Sertoliho buněk a Leydigovy buňky (Gilbert 2006).

Spermatogenezi zajišťují a umožňují Sertoliho buňky tvořící bariéru mezi krví a buňkami spermatogenní (zárodečné) linie a zprostředkující látkovou výměnu pohlavních buněk. Leydigovy buňky se vyskytují ve skupinách mezi semenotvornými kanálky varlete a produkují testosteron.

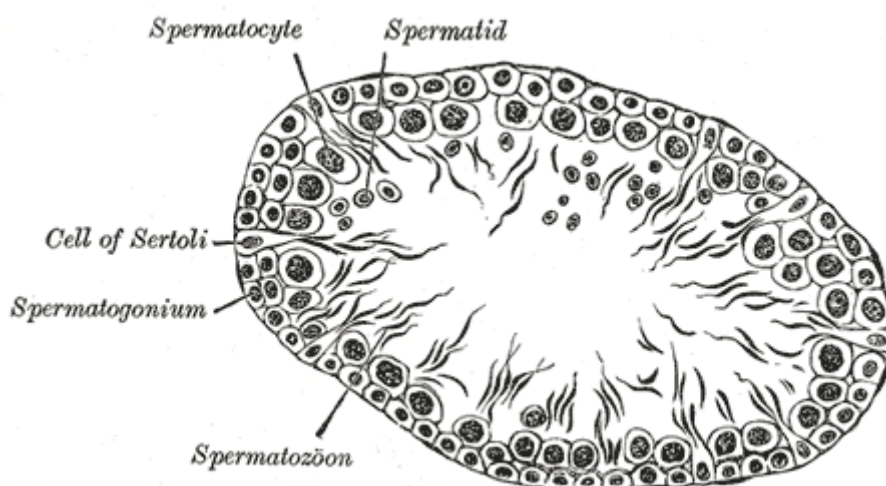
Při spermatogenezi nejdříve dochází k mitotickému dělení spermatogonií, prapohlavních kulovitých samčích buněk, za tvorby primárních spermatocytů neboli I. řádu (2n). Spermatocyty I. řádu se dělí prvním meiotickým dělením, při kterém vznikají

spermatocyty sekundární neboli II. řádu (n). U spermatocytů II. řádu probíhá druhé meiotické dělení za vzniku spermatid, které se už dále nedělí.

Ze spermatid se tvoří spermie procesem nazývaným spermiogeneze. Dochází ke kondenzaci jádra, vytvoření bičíku, ztrátě cytoplazmy a některých organel.

Nezralé spermie putují přes semenotvorné kanálky do nadvarlete, kde se uchovávají po dobu přibližně dvou týdnů a zde také dochází k jejich definitivnímu zrání. Spermie jsou vyživovány sekretem pohlavních přídatných žláz a to nadvarlat, prostaty, bulbouretrálních žláz a semenných váčků. Suspenze spermií je v sekretu žláz tzn. semenné plazmě a nazývá se ejakulát. Semenná plazma má zásadité pH, protože spermie jsou lépe pohyblivé v zásaditém prostředí.

Vznik nové spermie trvá přibližně 2 měsíce a odhaduje se, že každou hodinu opouští varle asi 1 milion spermií.



Obr. 2.4 Průřez epitelem semenotvorného kanálku s jednotlivými stádii spermatogeneze (<http://en.wikipedia.org>).

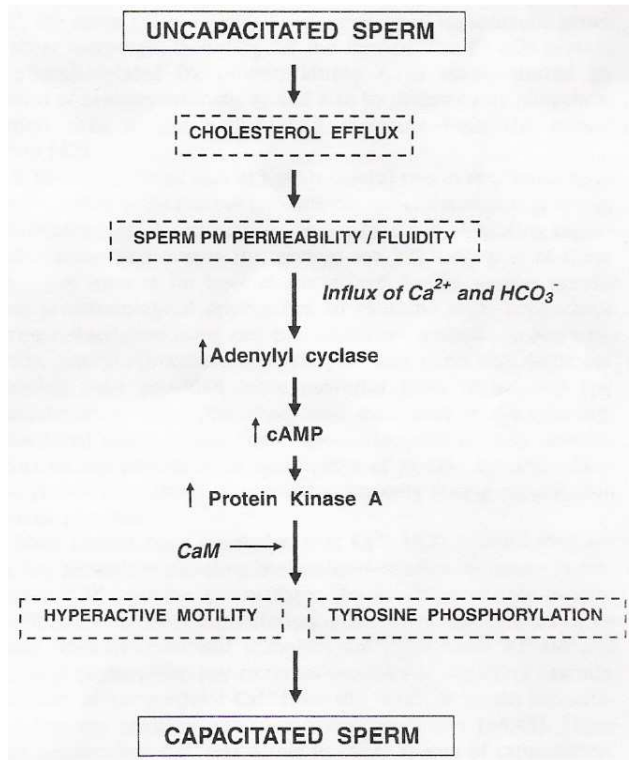
2.3. Kapacitace

Savčí spermatické buňky prodělávají neustálé změny během spermatogeneze ve varletech, zrání v nadvarlatech a v samičím reprodukčním traktu v průběhu kapacitace (Tulsiani *et al.* 1998). Proces kapacitace je konečný krok zrání savčích spermií a je potřeba pro dosažení schopnosti spermie oplodnit vajíčko (Baldi *et al.* 2000). Historicky byla kapacitace definována jako časový interval inkubace spermie (*in vivo* nebo *in vitro*), který je nutný k dosažení zralosti spermie (Chang 1984). Tento krok je biochemický proces, *in vivo* nastává po ejakulaci v ženském reprodukčním traktu, *in vitro* kapacitace může pro-

běhnout v ejakulátu nebo ve vzorku odebraném z nadvarlete (Visconti *et al.* 1995). Kapacitací reakce zahrnuje (obr. 2.5), mimo jiné, pohyb iontů přes PM, vyvazování cholesterolu tzn. změnu fluidity membrány, nárůst cAMP, p-Tyr mnoha proteinů a v neposlední řadě polymerizaci aktinu, která je závislá na vazbě ATP, následně prudkou depolymerizaci aktinu, čímž je navozena AR.

V důsledku těchto přizpůsobení samčí gameta rozeznává a váže se na vaječný obal ZP. ZP je vnější buněčný sacharidový obal (glykokalyx), který obklopuje vajíčko a účastní se přenosu signálu závislejícím na vápenatých iontech (Tulsiani *et al.*, 2007). Kapacitace souvisí i se změnami v koncentraci vnitrobuněčných iontů, ve změně fluidity PM, metabolismu a motility (Yanagimachi 1994). Přesné místo, kde se kapacitace *in vivo* odehrává, se u různých druhů živočichů liší (Yanagimachi 1994). Konečným krokem kapacitace *in vivo/ in vitro* je vazba povrchových receptorů hyperaktivovaných spermií na komplementární ligandy neporušené ZP vajíčka. Nyní může dojít k AR, která vede k vylití akrozómu, penetraci ZP a oplození vajíčka (Yanagimachi 1994, Tulsiani *et al.* 1997).

Biochemické změny během kapacitace indukované estrogény nastávají rychle díky negenomické akci estrogenních receptorů (Aquila *et al.* 2004).



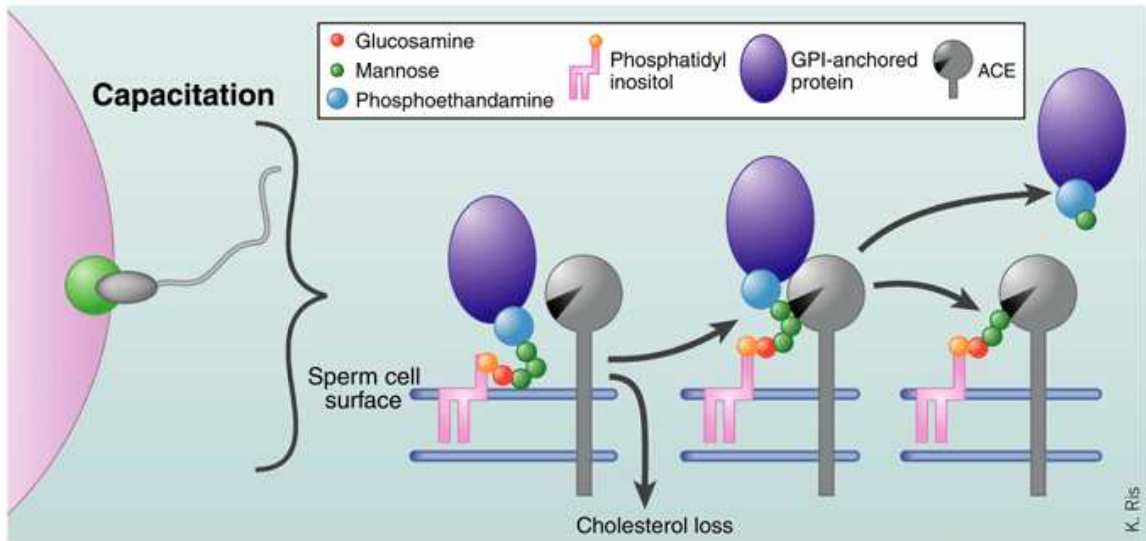
Obr. 2.5 Model možného sledu událostí v mezibuněčné signalizaci vedoucí ke kapacitaci (Abou-haila & Tulsiani 2009).

2.3.1 Biologie *in vivo* kapacitace

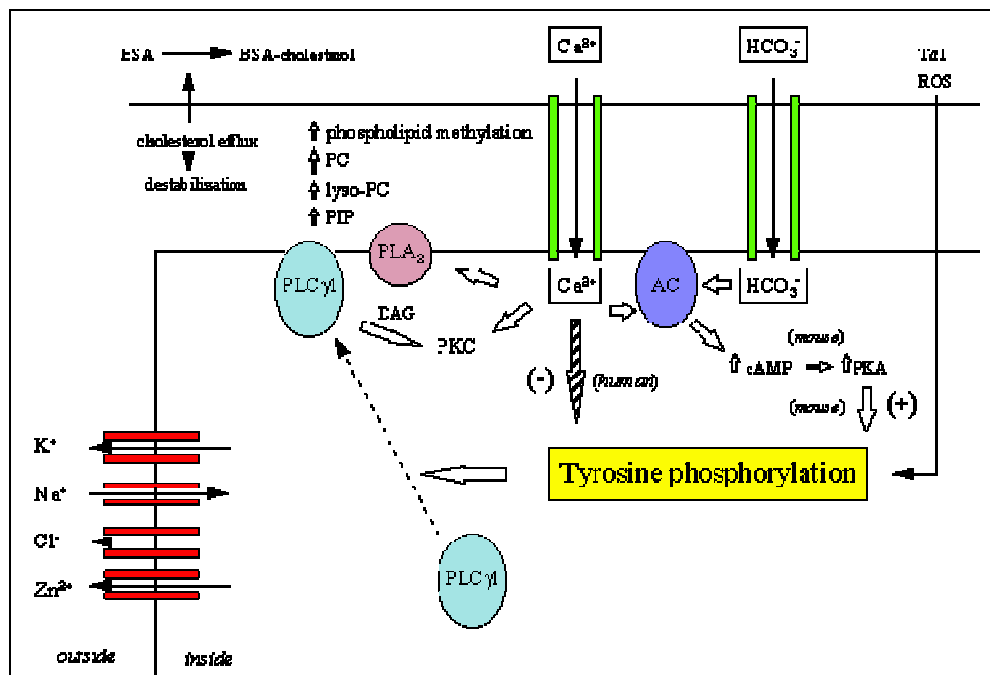
Většina spermií, které se dostanou do samčího rozmnožovacího traktu, je eliminována. Jen malé procento vstoupí do děložního hrdla zaplněného hlenem, který slouží k prevenci vstupu semenné plazmy do dělohy, zadržení morfologicky odlišných spermií i infekčních mikrobů a skladuje spermie pro pozdější přepravu (Yanagimachi 1994). Spermie rychle prochází hlenem bohatým na glykoproteiny a pohybují se směrem k děloze a vejcovodu (Abou-haila & Tulsiani 2009). Místo oplození tzv. nálevka se nachází v distální oblasti vejcovodu, zde je připraveno ovulované vajíčko obklopené kumulárním komplexem (Tulsiani *et al.* 1998). Tento komplex je rozptýlen pomocí hyaluronidázy, což je enzym přítomen v akrozómu i na povrchu spermie (Meyers & Rosenberger 1999), dovolující bezpečný průchod kapacitované spermii se stále intaktním akrozómem.

Změny probíhající na povrchu ejakulované spermie při *in vivo* kapacitaci zahrnují: odstranění adsorbovaných proteinů a glykoproteinů ze semenné plazmy, pozměnění (např. metylace fosfolipidů) a přebudování molekul PM, výsledkem je odhalení receptorů na spermii důležitých pro rozpoznání a vazbu na vajíčko (Jones 1998, Yanagimachi 1994). Efflux cholesterolu (obr. 2.6) mění propustnost a tekutost PM, což umožňuje vtok iontů Ca^{2+} a HCO_3^- , které aktivují intracelulární druhé posly (Abou-haila & Tulsiani 2009, Tulsiani *et al.* 2003). Spustí se signální kaskáda (obr. 2.7) zahrnující a) aktivaci AC a produkci cAMP; b) stimulaci PKA a dalších proteinových kináz; c) tyrozinovou fosforylaci skupiny molekul spermie; d) hyperaktivaci spermií (Zeng *et al.* 1995, Visconti *et al.* 1999).

Vtok HCO_3^- je umožněn $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ iontovou pumpou a je jí přisuzován vzrůst vnitrobuněčného pH (Demarco *et al.* 2003). Hladina HCO_3^- je nízká v nadvarleti, ale vysoká v semenné plazmě a ve vejcovodu. Tyto změny v koncentraci HCO_3^- v samčím a samičím reprodukčním traktu hrají důležitou roli v potlačení kapacitace v nadvarleti a naopak podporu tohoto děje *in vivo* v samičím rozmnožovacím ústrojí (Naz & Rajesh 2004). Kapacitace indukovaná některými biologickými a farmakologickými sloučeninami je regulována různými signálními dráhami, které zahrnují PKA, protein kinázu C (PKC) a protein tyrozin kinázu (PTK) (Thundathil *et al.* 2002). cAMP/PKA aktivita je spojená s p-Tyr (Aitken *et al.* 1998). Hodně efektů cAMP je zprostředkovaných přes aktivaci PKA, která nepřímo podporuje tyrozinovou fosforylaci proteinů fibrózní pochvy fosforylací Ser/Thr zbytků a aktivaci tyrozin kináz (Leclerc *et al.* 1996).



Obr. 2.6 Cholesterolový efflux po interakci vajíčka a spermie (Ris 2005).



Obr. 2.7 Schéma průběhu kapacitace spermií (Baldi *et al.* 1996).

2.3.2 Tyrozinová fosforylace

Fosforylace tyrozinů je důležitá regulační dráha v modulaci událostí spojených s kapacitací (Naz & Rajesh 2004). Na savčích spermích se vyskytují fosfoproteiny, jejichž fosforylovaný nebo defosforylovaný stav je kontrolován aktivitou proteinových kináz a fosfatáz, které mají roli při zisku motility, kapacitaci a AR (Tash & Means, 1983). U pro-

teinů spermie může fosforylace probíhat na tyrozinových, serinových a threoninových zbytcích, ale p-Tyr je nejdůležitější a je primárním ukazatelem procházejících signálních drah v buňce (Naz & Rajesh 2004).

Zdá se, že existují tři hlavní cesty přenosu signálu vedoucího ke kapacitaci.

1) cAMP/PKA dependentní, kde cAMP je druhý posel aktivující PKA, která patří mezi serin/threoninové kinázy a reguluje p-Tyr (Thundathil *et al.* 2002). 2) Dráha receptorové tyrozin kinázy (př. Epidermální růstový faktor - EGF) a 3) Nereceptorová protein tyrozin kinázová dráha (Naz & Rajesh 2004).

K fosforylaci dochází jak u bičíku, tak na hlavičce spermie, kde dochází k fúzi gamet (Urner *et al.* 2001). P-Tyr proteinů bičíku souvisí se získáním hyperaktivované motility, která je potřebná pro penetraci kumulu a ZP vajíčka (Naz & Rajesh 2004).

2.3.3 Hyperaktivace spermie

Spermie získá hyperaktivní motilitu díky p-Tyr proteinů bičíku (Holt & Harrison 2002). Spermie uvolněné ze semenné plazmy plavou v přímé trajektorii a rychleji než hyperaktivované. Bičík hyperaktivovaných spermií se mrská v hlubokých ohybech, pohyb je méně symetrický. Tento pohyb se liší v tekutinách s různou viskozitou a elasticitou a je nezbytný pro průchod ovidukálním hlenem a kumulární matrix, vazbu na vajíčko a průběh AR (Yanagimachi 1994, Suarez & Ho 2003). Pro iniciaci a udržení hyperaktivované motility jsou nutné extracelulární Ca^{2+} ionty působící společně s axonemou bičíku na spuštění hyperaktivace (Suarez & Ho 2003). Po proběhlé kapacitaci se na povrchu bičíku spermie odhalí receptory, které po aktivaci stimulují G protein, který pro změnu aktivuje Ca^{2+} kanály dovolující krátkodobý vstup Ca^{2+} iontů. Tyto Ca^{2+} ionty stimulují AC, a tím se zahájí syntéza cAMP a kinázová kaskáda (Abou-haila & Tulsiani 2009). Zmíněný G-protein ještě aktivuje Na^+/H^+ kanály (antiport), čímž dochází ke vzrůstu vnitrobuněčného pH (Yanagimachi 1994). Hyperaktivace může být kritická pro úspěch oplození, protože zvyšuje zdatnost spermie oddělit se od stěny vejcovodu, pohybovat se vzhůru spletitou dutinou vejcovodu, prostupovat hlenovým obsahem a proniknout ZP vajíčka (Suarez & Ho 2003).

2.3.4 Kapacitace *in vitro*

Savčí spermie mohou být kapacitovány i *in vitro* v chemicky definovaném médiu. Používají se spermie z ocasu nadvarlete (*cauda epididymis*) nebo ejakulované, které se vloží do média doplněného o energeticky bohaté látky, elektrolyty a akceptor cholesterolu (Dow & Bavister 1989).

V kapacitačním médiu musí být obsažena příslušná koncentrace elektrolytů, zdrojů energie, proteiny bovinního sérum albuminu (BSA), Ca^{2+} ionty a NaHCO_3 . Klíčové sekundární signalizační molekuly regulující kapacitaci spermií jsou Ca^{2+} a HCO_3^- ionty a cAMP (Abou-haila & Tulsiani 2009). Na myším modelu bylo předvedeno, že podmínky napomáhající kapacitaci spermiím z *cauda epididymis* podněcují tyrozinovou fosforylaci skupiny proteinů o velikosti 40 – 120 kDa.

Sérum albumin, obvykle hovězí BSA, je používán k vyvazování cholesterolu z PM spermie. Vychytávání cholesterolu je nezbytné v regulaci intracelulární signalizace během kapacitace.

Výsledkem přidání HCO_3^- iontů do média je stimulace pohyblivosti spermie a její hyperaktivace zprostředkované aktivací AC a p-Tyr proteinu 3 zakotvující proteinkinázu A (AKAP3), což doplňuje PKA (Luconi *et al.* 2004).

2.4 Akrozomální reakce

Při AR dochází k fúzi PM a OAM (obr. 2.8), což vede k uvolnění akrozomálních enzymů rozrušujících obaly vajíčka a k vystavení nových membránových domén (Breitbart & Spungin 1997). Po AR spermie může snadno proniknout do vajíčka a oplodnit ho. Klinické studie identifikovaly skupinu mužů, jejichž neplodnost byla spojena s nesprávnou AR (Benoff 1997, Abou-hai-la & Tulsiani 2009).

2.4.1 Indukce akrozomální reakce

Uvažuje se, že signálem zahajujícím AR u myši a několika jiných druhů je rozpoznání a vazba receptorů kapacitované spermie s ligandy na ZP (Tulsiani *et al.* 1997). Vazba spermie na vajíčko se odehrává ve dvou etapách. Nejdříve jsou kapacitované spermie

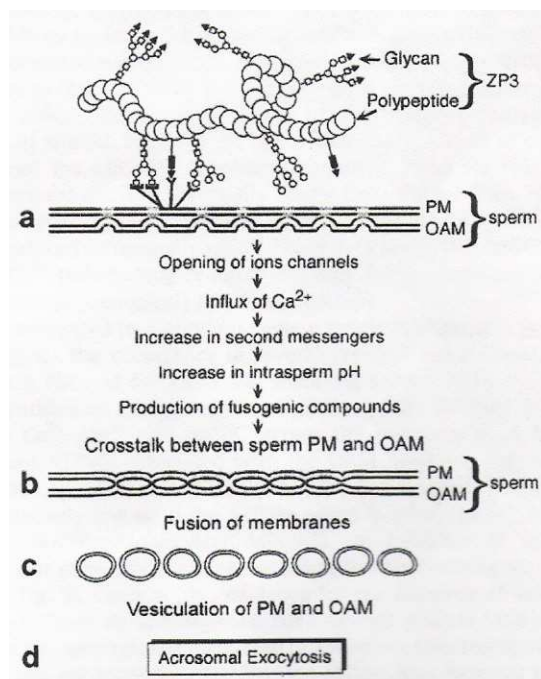
volně a vratně přimknuty na ZP pomocí PM překrývající jejich akrozóm, potom dojde k pevné nevratné vazbě. První interakce mezi spermií a vajíčkem u myši se účastní specifické cukerné zbytky na ZP proteinu 3 (ZP3), které jsou rozpoznávány komplementárními cukr vazebnými enzymy (glykosidázami, glykosyltransferázami) nebo lektinu podobnými proteiny na povrchu spermie a indukují AR pouze při kovalentní vazbě na proteinovou kostru (Loeser & Tulsiani 1999). Proteinová kostra ZP3 glykoproteinu napomáhá seskupení povrchových receptorů spermie (Breitbart & Spungin 1997).

Sekundární vazebná místa zajišťuje ZP2 glykoprotein na ZP vajíčka. Tato interakce zprostředkovaná cukernými zbytky spouští signální dráhu vedoucí k fúzi PM a OAM a následné AR. Tyto události jsou nejlépe prozkoumané u myši, ale u ostatních druhů živočichů se odehrávají podobně (Loeser & Tulsiani 1999).

Hladina Ca^{2+} iontů ve spermií je před navázáním na ZP velmi nízká, ale v extracelulární tekutině je mnohem vyšší. Kontakt gamet opačného pohlaví otevírá Ca^{2+} kanály, což vede k trvalému přibývání Ca^{2+} iontů a dalších druhých poslů cAMP, inositol tri-fosfátu (IP_3) a diacylglycerolu (DAG). Vzrůst hladiny druhých poslů aktivuje cAMP-dependentní (PKA), Ca^{2+} a fosfolipid-dependentní (PLC) kinázy a zahajují signální kaskádu, při které se zvyšuje vnitřní pH spermie.

Odpovědí na přibývání Ca^{2+} iontů a zvyšování pH je depolymerizace F-aktinu na G-aktin, který se rozptyluje a tím se dostává PM blíže k OAM (Spungin et al. 1995). V odpovědi na tyto změny začne depolymerizace F-aktinu, který tvoří fyzickou bariéru mezi PM spermie a OAM, na monomerní G-aktin. Vzrůst Ca^{2+} iontů také aktivuje fosfolipázu A_2 (PLA_2), která hydrolyzuje esterové vazby membránových fosfolipidů, čímž podporuje fúzi membrán a jejich vezikulaci. Formace váčků z PM a OAM dovoluje uvolnění složek akrozómu do místa vazby spermie k vajíčku (Abou-haila & Tulsiani 2009). Silný účinek hydrolytických akrozomálních enzymů uskutečněné v místě vazby spermie k vajíčku spolu s mrskavým pohybem hyperaktivované spermie umožní hyperaktivované spermií vniknout do vajíčka a oplodnit ho (Abou-haila & Tulsiani 2000, Abou-haila & Tulsiani 2009).

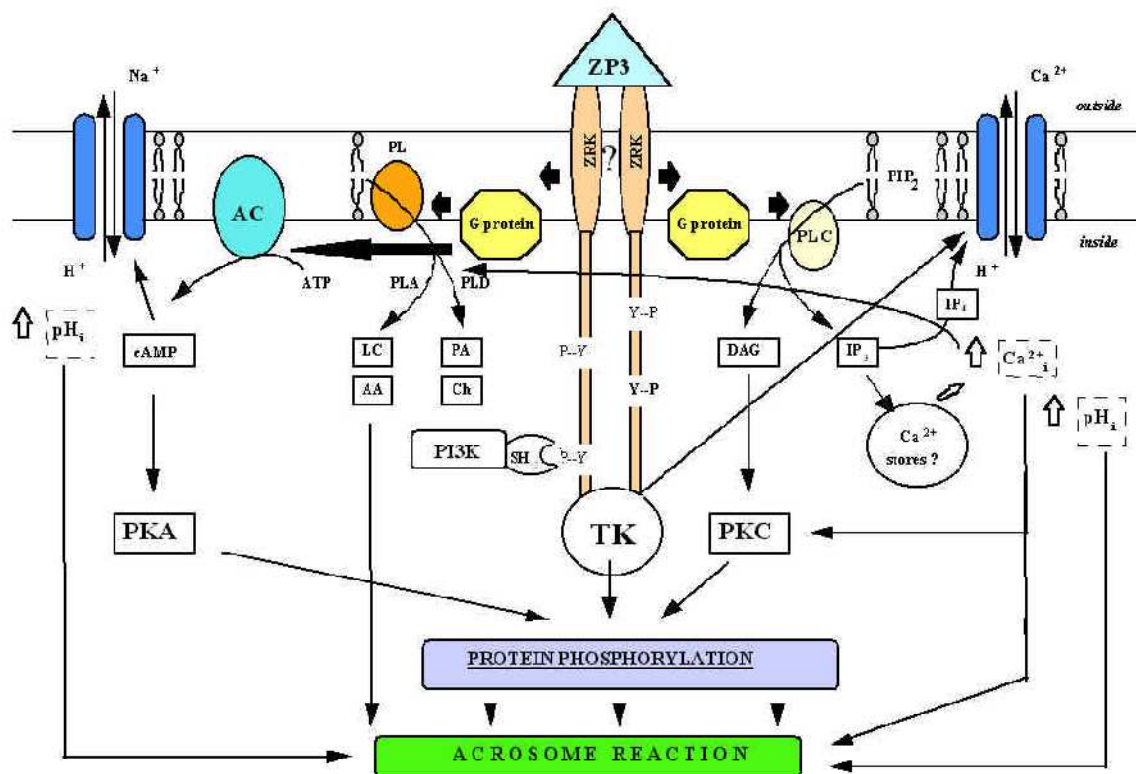
Aktivace PKA pomocí cAMP, aktivita PLC a depolymerizace F-aktinu jsou esenciální pro spuštění AR.



Obr. 2.8 Model sledu událostí vedoucích k akrozomální exocytóze (Abou-haila & Tulsiani 2009).

2.4.2 Molekulární mechanismy akrozomální reakce

ZP3 glykoprotein se váže k nejméně dvěma receptorům na PM spermie (obr. 2.9). Po vazbě dochází k autofosforylaci receptoru a indukci TK aktivace, která vede k p-Tyr. Signální dráha je spojená s G-proteiny aktivující membránově vázané enzymy PLC a AC. Aktivace těchto dvou enzymů vede ke generaci druhých posílů cAMP činností enzymu AC a DAG spolu s IP₃, hydrolýzou fosfatidyl-inositol bisfosfátu (PIP₂) činností PLC. Následkem zvýšení hladiny druhých posílů dochází k aktivaci PKA (cAMP dependentní) a později PKC (Ca²⁺ a fosfolipid dependentní). PKA otevírá napěťově ovládaný Ca²⁺ kanál v OAM, který vypouští Ca²⁺ zevnitř akrozómu do cytosolu. Toto je první zvýšení hladiny Ca²⁺ iontů (Baldi *et al.* 2000). PKC otevírá napěťově ovládaný Ca²⁺ kanál v PM, otevírá se i IP₃ aktivovaný vápníkový kanál, což vede k druhé vlně Ca²⁺ iontů v cytosolu (Breitbart & Naor 1999). Vzrůst Ca²⁺ iontů aktivuje PLA₂ generující jiné druhé posly kyselinu arachidonovou nebo lyso-fosfatidylcholin z membránových fosfolipidů, což pomáhá fúzi membrán a exocytóze akrozómu (Breitbart & Spungin 1997). Gi i TK receptory mohou také zapínat Na⁺/H⁺ pumpu způsobující zásaditost cytosolu.



Obr. 2.9 Diagram ilustrující hlavní signální dráhy aktivované během AR (Baldi *et al.* 2000).

2.4.3 Akrozomální reakce *in vitro*

Pro indukci AR *in vitro* u epididymálních nebo ejakulovaných spermií se používají fyziologické a nefyziologické sloučeniny.

Mezi fyziologické substance patří ty, se kterými se spermie setkává během *in vivo* oplození, jako jsou progesteron (hormon produkovaný během ovulace); prostaglandiny, glykózaminoglykany a sterol sulfát (přítomny ve folikulární tekutině a kumulárních buňkách). (Yanagimachi 1994). Pro indukci AR lze použít i solubilní ZP, izolovanou z vajíček a rozpuštěnou teplem (Son & Meizel 2003):

K nefyziologickým induktorům patří kalcium ionofor (CaI), neoglykoproteiny, lektiny a další (Tarín & Trounson 1993). CaI indukuje AR otevřením Ca^{2+} kanálů, což umožní vtok Ca^{2+} iontů. Některé syntetické glykoproteiny – neoglykoproteiny obsahující manózu jsou kovalentně vázány s BSA, napodobují ZP a indukují AR (Loeser & Tulsiani 1999).

Pohyb Ca^{2+} iontů z extracelulárního média do nitra spermie je kritický krok, který reguluje vylití akrozómu (De Blas 2002). U několika druhů hlodavců jsou spermie,

inkubované v médiu bez vápníku, neschopné projít AR, pokud se do média vápník nedodá. Kapacitované lidské spermie byly neschopné odpovědi nefyziologickému CaI do doby, než bylo toto činidlo přidáno do média s již obsaženým vápníkem. Přítomnost cAMP může vyvolat CaI -dependentní AR, dokonce když je vápník prakticky nepřítomný v médiu, ale tento cyklický nukleotid není náhradou za Ca²⁺ ionty při AR indu-kované ZP. cAMP může vynechat požadavek transportu Ca²⁺ iontů jen v případě chemicky indukované AR (Abou-haila & Tulsiani 2009). Ca²⁺ dependentní ATPáza spojená s OAM má funkci pumpy udržující v akrozómu hladinu Ca²⁺ iontů poměrně nízkou, dokud je inhibována (Tulsiani *et al.* 1998). Do vstupu Ca²⁺ iontů a sestavení složek signální transdukční dráhy jsou zapojené další Ca²⁺ transportní kanály jako napětím ovládané kanály nebo IP₃ kanály (O'Toole *et al.* 2000). V průběhu AR dochází k přerozdělení Ca²⁺ mezi OAM a PM z anteriorní oblasti do equatoriálního segmentu, kde membrány fúzí, což vede k exocytóze akrozómu (Abou-haila & Tulsiani 2009).

2.5 Estrogeny

Jejich název je odvozen z estrálního cyklu, v němž hrají důležitou roli. Estrogeny jsou skupinou steroidních hormonů, které dělíme na kortikosteroidy produkované kůrou nadledvin (glukokortikoidy a mineralokortikoidy), androgeny vznikající ve varlatech, estrogeny a gestageny syntetizované převážně ve vaječnících. Estrogeny, stejně jako ostatní steroidní hormony, jsou produkovány žlázami s vnitřní sekrecí. V pohlavních žlázách podporují oogenezi a spermatogenezi. Sekrecí do krevního řečiště se dostávají i do dalších míst svého působení, kde koordinují fyziologické funkce důležité pro samičí reprodukci (Brown 1999). Jsou to primární pohlavní hormony u žen, ale v menší míře se vyskytují i v těle mužů, kde regulují vývoj spermií (Hess *et al.* 1997). Jako všechny steroidy, i estrogeny bez problémů pronikají buněčnou membránou a vážou se na estrogenní receptory (ER) uvnitř buněk. ER fungují jako klasické ligandem-aktivované transkripční faktory, které regulují expresi mnoha genů (Smith 1999). Kromě dlouhodobého genomového efektu působí estrogeny přes rychlou mezibuněčnou signalizaci prostřednictvím receptorů spojených s G-proteiny na povrchu membrány buněk (Prossnitz 2008).

Fyziologie samčích gonád je zčásti pod kontrolou rovnováhy estrogenů a androgenů, s proteinem P450arom sloužící jako modulátor (Carreau & Hess 2010).

2.5.1 Funkce estrogenů

Estrogeny jsou sice přítomné u žen i mužů, ale jejich množství je nejvyšší u žen v reprodukčním věku. Jsou důležité pro vývoj sekundárních pohlavních znaků ženského těla, jako jsou prsa, a také ovlivňují periodický vývoj děložní sliznice v průběhu menstruačního cyklu a jeho další regulace. 17- β -estradiol zpětně ovlivňuje sekreci hypofyzárních hormonů – folikuly stimulujícího hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH). U mužů estrogen reguluje například vývoj spermií a má také úlohu ve vývoji libida (Smith 1999). Tento ženský hormon je spojený s regulací plodnosti u samců, protože při zablokování funkce estrogenního receptoru, zůstane samec neplodný. Podobné je to i u lidí (<http://www.scienceblog.com/community/older/1997/B/199701564.html>).

Množství a hladina hormonů se denně mění. Estrogeny jsou sekretovány v krátkých pulsech, které se liší hodinu od hodiny, až minutu od minuty. Uvolňování hormonu se mění i mezi dnem a nocí. U žen v průběhu menstruačního cyklu hladina 17- β -estradiolu kolísá od 50 – 400 pg/ml krevní plazmy, u mužů se pohybuje mezi 5 – 100 pg/ml (Raven *et al.* 2006). U myších samců se hladina estrogenu v séru pohybuje mezi 5 – 20 pg/ml (Yang 2006).

Estrogeny hrají zásadní roli v neuroendokrinní regulaci reprodukce. Hormon 17- β -estradiol je nepostradatelný pro normální činnost neurosekrečního systému a působí buď prostřednictvím dvou podtypů jaderných estrogenních receptorů, ER α a ER β , nebo přímo na membránové proteiny (Luconi *et al.* 2002). Během estru u myší se hladina 17- β -estradiolu obsaženého v plazmě pohybuje mezi 10^{-11} M až 10^{-10} M (Bergman *et al.* 1992). 17- β -estradiol při fyziologické koncentraci (10^{-11} M – 10^{-10} M) zvyšuje Ca²⁺ aktivované K⁺ proudy přes ER β (Nishimura *et al.* 2008).

17- β -estradiol indukuje rychlý vzrůst koncentrace Ca²⁺ uvnitř buněk. Tento efekt je zprostředkován membránovým receptorem a je závislý na přítomnosti Ca²⁺ mimo buňky, proto není pozorovatelný v médiu bez Ca²⁺ iontů. 17- β -estradiol stimuluje tyrozinovou fosforylaci několika proteinů spermií zahrnující funkční estrogen receptorový protein (29 kDa) (Luconi *et al.* 1999).

2.5.2 Výskyt estrogenů

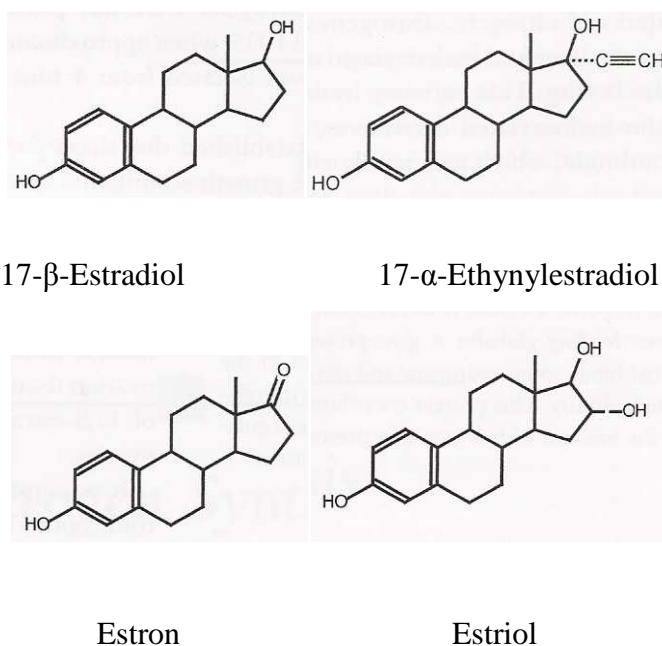
Tři hlavní druhy estrogenů jsou 17- β -estradiol, estriol a estron (obr. 2.10). Syntéza estrogenů se liší podle pohlaví a věku. Estrogeny jsou primárně syntetizovány v rostoucích folikulech ve vaječnících, ve žlutém tělísku a v placentě. LH stimuluje produkci estrogenu ve vaječnících. Některé estrogeny jsou také produkovány v menších množstvích jinými tkáněmi, jako jsou játra, nadledviny a prsní žlázy. Tyto sekundární zdroje estrogenů jsou důležité hlavně u žen po menopauze (Smith 1999).

Od první menstruace do menopauzy je primárním estrogenem 17- β -estradiol, který je produkován hlavně v zárodečných buňkách vaječníků. Jeho hladina kolísá v průběhu menstruačního cyklu a vzrůstá před ovulací.

V průběhu menopauzy převažuje syntéza estronu převážně v tukových buňkách. Estriol je hlavním estrogenem v těhotenství a vzniká v placentě aromatizací androgenů plodu (Smith 1999).

U mužů jsou estrogeny syntetizovány ve varlatech, v nadvarlatech, ve spermatu stejně jako v mozku (Hess *et al.* 2001), více viz Kapitola 2.6.

Nadledviny a tukové buňky jsou také schopny syntetizovat estrogeny, což může být důvod, proč podváha nebo naopak nadváha jsou rizikové faktory pro neplodnost.



Obr. 2.10 Chemické vzorce estrogenů (Smith 1999).

2.5.3 Struktura estrogenů

Steroidní hormony, kam estrogeny náleží, se skládají z cyklopentanoperhydrofenantrenové struktury. Od ostatních skupin steroidů, jako jsou progestiny a androgeny, se estrogeny odlišují 18-uhlíkatými atomy uspořádanými do čtyř kruhů. Tuto strukturu nazýváme estranové jádro. Pro jejich správnou hormonální aktivitu je důležité umístění hydroxylové skupiny na uhlíku číslo 3 (C3) a přítomnost hydroxylové nebo ketonové skupiny na pozici C17.

17- β -estradiol obsahuje 3-hydroxylovou a 17- β -hydroxylovou skupinu. Estrony mají ketonovou skupinu na C17 pozici namísto hydroxylové u 17- β -estradiolu. Estrioly se od 17- β -estradiolu liší přidáním 16- α -hydroxylové skupiny.

Jejich biologická aktivita se odvíjí od jejich schopnosti vazby k ER a jeho aktivaci. Největší afinitu má ER k 17- β -estradiolu, nižší pak k estronu a estriolu (Smith 1999).

2.5.4 Biosyntéza estrogenů

Estrogeny, stejně jako ostatní steroidy, jsou odvozené z cholesterolu. Biosyntéza (obr. 2.11) vyžaduje přítomnost tří bílkovin obsahujících ve své molekule hemovou skupinu, a to enzymový komplex cytochrom P450 (cytP450) a dvě rozdílné dehydrogenázy. U žen syntéza začíná v buňkách théky ve vaječnicích.

Prvním krokem je odstranění postranního řetězce cholesterolu pomocí enzymu z cytP450, čímž vzniká pregnenolon (C21). Následně se uplatňuje 17- α -hydroxyláza cytP450, která převádí steroidy C21 na strukturu C19. 3- β -hydroxysteroid dehydrogenáza poté oxiduje hydroxylovou skupinu na ketonovou skupinu na C3 pozici, čímž vzniká C19 estrogenní prekursor androstenedion, který prochází bazální membránou do okolních buněk granulózy. V buňkách granulózy se uplatňuje další enzym – cytochrom P450 aromatáza (P450arom), která katalyzuje aromatizaci A kruhu a dává vznik estronu. Estron i androstenedion jsou substráty pro enzym – 17- β -hydroxysteroid dehydrogenázu, která zvrtně mění estron na 17- β -estradiol a androstenedion na testosteron. 17- β -estradiol může vznikat i z testosteronu za účasti aromatázy.

Estriol se tvoří ve větším množství v průběhu těhotenství v buňkách placenty z 16- α -hydroxydehydroisoandrosteron sulfátu, který je produkován aktivitou jater a nadledvinek plodu (Smith 1999).

vázáno na albumin (60 %) nebo na globulin vázající pohlavní hormony (SHBG) (38 %) a v takovémto stavu je inaktivní (Smith 1999). Estrogen se také majoritně váže na albumin. Při estrogenním transportu má vazba estrogenů na albuminy nižší afinitu než vysokofinitní vazba na SHBG. Podle afinity k vazebným proteinům plazmy a jejich koncentraci se mění jejich metabolický obrat. Syntéza SHBG probíhá v játrech a je ovlivňována pohlavními steroidy. Estrogeny syntézu SHBG zvyšují, naopak androgeny a gestageny ji snižují, proto nacházíme vyšší koncentraci SHBG u žen než u mužů. Ženy s nízkou koncentrací SHBG (např. ženy obézní) mají sníženou vazebnou kapacitu pro estrogeny a až několikanásobně zvýšenou koncentraci volně cirkulujících estrogenů.

2.5.6 Terapeutické estrogeny a syntetické estrogeny

Uměle vytvořené estrogeny a přírodní estrogeny získané z jiných savců (např. březích klisen) se používají hlavně ve farmaceutickém průmyslu. Jsou součástí většiny antikoncepčních pilulek (zhruba 40 % českých žen pravidelně užívá hormonální antikoncepci) a vyskytují se v přípravcích hormonální substituční léčby (HRT) pro ženy po menopauze. Estrogeny zajišťují prevenci ztrát kostní hmoty následkem menopauzy nebo odnětí vaječníku. Přirozeně se vyskytující estrogeny podporují růst karcinomu prsu u žen, ve vysokých dávkách však paradoxně růst tohoto nádoru blokují. Dříve se proto vysoké dávky estrogenů užívaly v léčbě karcinomu prsu, dnes je tato léčba nahrazena novějšími způsoby hormonální léčby. U mužů estrogeny snižují tvorbu mužských pohlavních hormonů ve varlatech. Také se podávají transsexuálům, kteří se chtějí stát ženou.

Přírodní 17- β -estradiol má velmi slabou aktivitu při orálním podání, proto se chemicky upravuje pro zvýšení své aktivity. Dva nejčastější syntetické estrogeny jsou estradiol 17-benzoát a 17- α -ethynylestradiol (Smith 1999).

Aktivní forma estradiol valerátu, syntetického 17- β -estradiolu je chemicky a biologicky identická s endogenním lidským 17- β -estradiolem. Nahrazuje ztrátu produkce estrogenu u žen v menopauze a zmírňuje menopauzální symptomy. Estradiol valerát uplatňuje své účinky prostřednictvím interakce se specifickými cytoplazmatickými receptory v estrogen senzitivních tkání.

2.5.7 Estrogenní receptory

Estrogeny jsou lipofilní sloučeniny, tudíž mohou procházet difúzí přes PM a vázat se k vysokoafinitním receptorovým proteinům. Estrogenní receptory (ERs) patří do rodiny jaderných receptorů, která zahrnuje receptory pro ostatní steroidy, vitamíny a thyroïdní hormony (Smith 1999). ERs jsou ligandem ovládané transkripční faktory, které vážou estrogeny s vysokou afinitou a pozitivně regulují expresi cílových genů v jádře. Většina receptorů je lokalizována do jaderného kompartmentu, ale některé mohou zůstat v cytoplazmě a mohou být translokovány do PM. Jaderné estrogenní, progesteronové a androgenní receptory byly nalezeny v PM u různých typů buněk (Levin 2008, Pedram *et al.* 2007).

ER váže 17- β -estradiol fenolickou částí, vazebné místo receptoru je však dvakrát větší než hydrofobní část 17- β -estradiolu (Brzozowski *et al.* 1997) a tato velká hydrofóbní prohlubeň umožňuje alkylfenolům a bisfenolu A (BPA) vazbu na receptor a vyvolání nesprávných hormonálních signálů (Křesinová *et al.* 2009).

Estrogeny se mohou účastnit i negenomického rychlého chemického přenosu v cytoplazmě, když se navážou na membránový receptorový protein na povrchu buněk. Oba typy ERs vyvolávají genomické a negenomické efekty (Aquila *et al.* 2004).

Kromě klasických ERs existuje i membránový receptor, který se nazývá GPR30 a patří do rodiny receptorů spojených s G-proteiny (GPR) (Revankar *et al.* 2005, Prossnitz *et al.* 2008). Po vazbě estrogenu na receptor se, v závislosti na umístění receptoru, spouští odlišné signální dráhy. Tyto dráhy mohou uvést do pohybu produkci oxidu dusnatého (NO), zaplavit buňku vápníkem nebo iniciovat uvolnění hormonu. Molekulární odpověď trvá vteřiny až minuty, což se dramaticky liší od odpovědi genovou expresí trvající hodiny až dny.

Estrogenní receptory α a β (ER α a ER β)

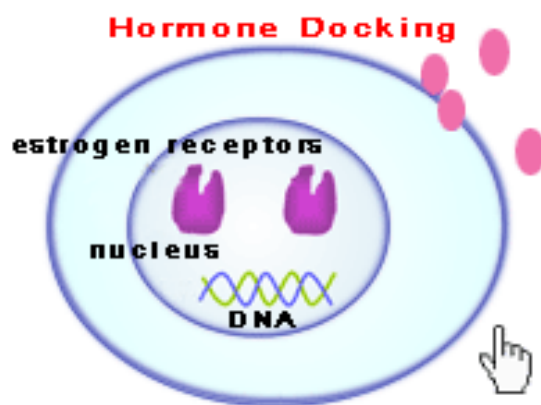
Existují dva typy ERs a to ER α a ER β (Gustafsson 1999), které mají shodnou selektivitu k ligandům, ale reakce na tyto estrogenní sloučeniny mohou být různorodé (Kuiper *et al.* 1997). Oba se skládají z 6 strukturních a funkčních domén. Obsahují několik trans-aktivačních domén, jejich DNA vazebné domény jsou identické z 96 %, ligand vazebné domény jsou homologní z 55 % (Smith 1999), ale rozdílné ve zkrácení N-koncové

části u ER β proteinu, který má molekulovou hmotnost jen 45 kDa na rozdíl od ER α (66 kDa) (Brown 1999). DNA vazebná doména je bohatá na cystein a je formovaná do motivu dvou „zinkových prstů“, jejichž struktura je stabilizována dvěma ionty zinku. Po homodimerizaci ER se touto doménou ER navazuje na estrogení responzivní elementy (ERE), což je sekvence DNA, která kontroluje transkripci estrogen responzivních genů (Korach 2000).

Odlišují se svou distribucí v tkáních, transkripčními aktivitami a fenotypem v knock-out modelech (Korach 2000). ER α je exprimován v děloze, ve vaječnicích, ve varlatech, v nadvarlatech (principal cells a jiné typy buněk), v hypofýze, v ledvinách a v nadledvinách. Lokalizace ER α v nadvarlatech se u různých druhů liší, ale v epitelu semenotvorných kanálků je jeho přítomnost konstantní. Druhá izoforma - ER β je exprimován v prostatě, ve varlatech – téměř ve všech buněčných typech intersticia a semenotvorných kanálků varlete, kromě prodlužujících se spermatid, v nadvarlatech (hlavně v těle a ocasu), *vas deferens*, ve vývodných kanálcích, v děloze, v močovém měchýři, v plicích a v mozku (Kuiper 1997, Brown 1999, Hess 2003). Rozdílné ligandy mají různou afinitu k α a β izoformám ER. Estron se přednostně váže k ER α , zatímco estriol k ER β . 17- β -estradiol se váže stejně dobře k oběma izoformám receptorů.

2.5.8 Mechanismus účinku estrogenů

Estrogeny se z krevního řečiště stejně jako ostatní lipofilní molekuly dostávají do cílových buněk difúzí přes buněčné membrány nebo se vážou na membránové receptory na povrchu buněk. Hormon se váže na receptor (obr. 2.12) a vytvoří hormon-receptor komplex, který v jádře dimerizuje a váže se na specifické sekvence DNA ERE (Smith 1999). Zde ovlivňuje genovou expresi v závislosti na interakci koaktivátorů či korepresorů s RNA polymerázou II transkripčního iniciačního faktoru. Koaktivátory a korepresory mají histonacetylázovou či deacetylázovou aktivitu, tudíž podporují či potlačují remodelaci chromatinu ovlivňující transkripci (Brown 1999). Ve výsledku estrogeny aktivují či potlačují syntézu nových proteinů vedoucí ke změně růstu, funkce nebo diferenciaci cílové buňky.

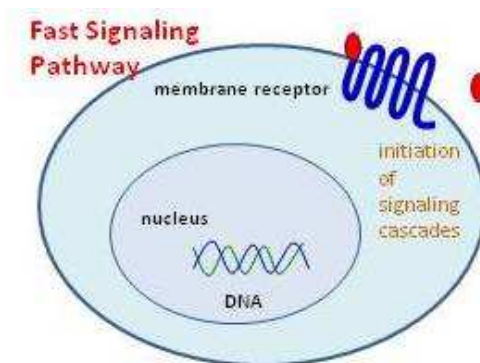


Obr. 2.12 Model působení estrogenů přes ER uvnitř buňky – odpověď genovou expresí (<http://e.hormone.tulane.edu/learning/docking-receptor-binding.html>).

2.5.9 Role receptorů GPR30 v rychlé signalizační dráze

Další možné působení estrogenů se kromě klasických estrogenních receptorů ER α a ER β , odehrává přes receptory růstových faktorů a GPR. GPR30 jsou receptory spojené s heterotrimerickými G-proteiny se 7 transmembránovými doménami (obr. 2.13), jejich N-konec směřuje ven z buňky a C-konec je lokalizován do cytoplazmy (Prossnitz *et al.* 2007). GPR30 po vazbě estrogenu zahajuje signální kaskádu zahrnující generaci druhých posílů Ca²⁺, cAMP, and NO, stejně jako aktivaci receptorových tyrozin kináz (Paul Micevych *et al.* 2009). GPR30 působí nezávisle na estrogenních receptorech (ER α a ER β) a přenáší signály přes EGF receptory (Filardo & Thomas 2005). Mohou zprostředkovávat i klasickou transkripční (genomickou) signalizaci. Na rozdíl od dlouhodobé genomové odpovědi, je signalizační dráha pomocí GPR30 velmi rychlá (Revankar *et al.* 2005). Biochemické změny během kapacitace indukované estrogeny nastávají rychle díky nengenomické akci ERs, protože spermie jsou považovány za transkripčně inaktivní (Aquila *et al.* 2004). GPR30 signalizace je doprovázená mobilizací vápníku, proto se signalizace přes tento typ receptoru zdá být dobrým kandidátem estrogenní dráhy na spermii.

Na GPR30 se také mohou vázat environmentální estrogeny a mohou aktivovat alternativní estrogenní signalizační dráhu v buňkách, kterým byly odstraněny ER (Thomas & Dong 2006).



Obr. 2.13 Model působení estrogenů přes GPR30 – rychlá signalizační dráha (<http://e.hormone.tulane.edu/learning/docking-receptor-binding.html>).

2.6 Role estrogenů v samčí reprodukci

Estrogen je považován za samičí pohlavní hormon, zatímco testosteron za samčí hormon, avšak oba hormony jsou přítomny u obou pohlaví (Hess 2003). Rozdíl mezi pohlavími není kvalitativní, ale vzniká v důsledku kvantitativní odlišnosti v koncentraci hormonů a různé expresi receptorů steroidních hormonů. U mužů je estrogen přítomen v nižších koncentracích v krvi, ale jeho koncentrace může být mimořádně vysoká v semeni a může dosahovat 250 pg/ml v tekutinách *rete testis*. Estrogeny hrají významnou roli při růstu a udržování kostní hmoty, stejně jako při vývoji zárodečných buněk a při pochodech spermatogeneze, jsou důležité i pro správnou motilitu a životaschopnost spermií a jejich penetraci do oocyty. Estrogeny také regulují vstřebávání luminální tekutiny v *caput* nadvarlete (Hess *et al.* 1997). 17- β -estradiol je schopen ovlivnit kapacitaci a AR u lidských ejakulovaných spermií. (Aquila *et al.* 2004).

Sertoliho, Leydigovy, zárodečné buňky a spermie jsou čtyři rozdílné typy buněk v mužském reprodukčním systému, které obsahují aromatázu a tudíž a jsou schopny syntetizovat estrogeny (Hess 2000). Estrogen je produkován v poměrně velkém množství ve varlatech stejně jako v mozku, ale ve spermatu u některých druhů ho můžeme nalézt v extrémně vysokých koncentracích, přestože primárním mužským steroidem je testosteron. Tato vysoká koncentrace estrogenů v tekutině *rete testis* u hlodavců je pravděpodobně způsobena přeměnou testosteronu na 17- β -estradiol pomocí aromatázy v zárodečných buňkách varlat a při průchodu spermií reprodukčním traktem (Hess *et al.* 2001).

Estrogeny mají esenciální roli v samčí reprodukci, protože negativní účinky má jak přebytek estrogenů, tak nedostatek estrogenů, který způsobuje abnormální spermatogenezi a samčí neplodnost. U samců je obsah estrogenů v periferní krvi typicky nízký a pohybuje se od 2 – 180 pg/ml v závislosti na savčím druhu (Hess 2003). Koncentrace estrogenů je vyšší v cévách varlat, stejně tak i v reprodukčním traktu. Hojně se vyskytují v tekutině *rete testis* nebo v semeni, kde je jejich koncentrace v rozmezí od 14 do 900 pg/ml. Souza *et al.* (2009) podávali 10 dní 17- β -estradiol myším samcům v dávce 100 μ g/kg tělesné váhy, což vedlo k poruše spermateliózy. Tento jev byl doprovázen potlačáním hormonů FSH a testosteronu a naopak doprovodným jevem byl nárůst 17- β -estradiolu ve varlatech. 17- β -estradiol inhibuje formaci tubulobulbárního komplexu, který je významný při vývoji spermií ze spermatid v procesu spermateliózy. Inhibice tvorby tubulobulbárního komplexu může být jedním z mechanismů, kterým environmentální estrogeny ovlivňují samčí neplodnost.

2.6.1 Estrogenní receptory u mužů

V samčích reprodukčních tkáních, jako jsou varlata, vývodné kanálky a nadvarlata, jsou u většiny živočišných druhů přítomny estrogenní receptory (Hess *et al.* 1997). ER α jsou zapojeny ve steroidogenních procesech, ER β se uplatňují v gametogenezi (Delbes *et al.* 2006).

ER α se u mužů nevyskytuje ve varlatech, ale je primárně lokalizován v epitelu vývodných kanálků, kde je jeho exprese nejvyšší (Hess 2003). Regulují zde expresi proteinů zapojených ve vstřebávání tekutin. Vývodné kanálky jsou zodpovědné za vstřebávání až 90 % lumenální tekutiny *rete testis* (Hess 2000). Při zablokování funkce estrogenního receptoru zůstane samec neplodný (Hess *et al.* 2001).

ER β jsou přítomny v Leydigových buňkách varlete, v prodlužujících se spermatidách a v epitelu vývodných kanálků a přední části nadvarlat. Samotný ER β není schopen kompenzovat nepřítomnost ER α v samčím reprodukčním traktu (Rosenfeld *et al.* 1998).

Rozdílné umístění izoform ER v lidských spermiích odhaluje odlišné úlohy těchto ER ve fyziologii spermií a v procesu oplození (Solakidi *et al.* 2005).

V lidských ejakulovaných spermiích se ER α často nachází ve střední části s mitochondriemi a ER β je lokalizován zejména v bičíku. V proximální oblasti bičíku se výskyt ER α a ER β překrývá (Aquila *et al.* 2004).

2.6.2 Estrogeny u myší

Myší zárodečné buňky ve varlatech obsahují enzym P450arom, která přeměňuje androgeny na estrogeny. Tento náález naznačuje, že tyto buňky jsou schopné produkovat estrogen. Další studie ukázaly, že P450arom je přítomná v zárodečných buňkách varlat i u jiných druhů živočichů (Janulis *et al.* 1996).

P450arom byla nalezena ve vývodných kanálcích a v nadvarlatech nejvíce v přední části *caput* (hlavě) a její přítomnost klesala průchodem spermií do *corpus* (těla), nejméně znatelné množství bylo v *cauda* (ocas) *epididymis*. Syntéza estrogenů v těchto oblastech je důležitá pro maturaci spermií.

ER α je přítomen v Leydigových a peritubulárních buňkách, ve vývodných kanálcích a ve specifických buněčných typech v *caput* a *cauda epididymis*. ER β v epiteliálních a stromálních buňkách varlete, v zárodečných buňkách (ve všech stádiích spermatogeneze, kromě spermatocytů v meiotickém dělení) i spermiích a v epitelu chámovodu (Zhou *et al.* 2002, Selva *et al.* 2004). Selva *et al.* (2004) předvedli zvýšenou expresi proteinu pro ER β v primárních spermatocytech v průběhu spermatogeneze, ale jeho úloha není přesně známa. Výsledky ukazují, že ER β může hrát roli v regulaci průběhu prvního meiotického dělení.

17- β -estradiol stimuluje kapacitaci a AR po přidání k nekapacitovaným spermiím v porovnání s neovlivněnými spermiemi (Adeoya-Osiguwa *et al.* 2003). Nedávná studie *in vivo* (Spearow *et al.* 1999) ukázala významný genetický rozdíl v citlivosti k estrogenům mezi různými druhy myší. U vysoce senzitivního kmene myší k estrogenům se varlata samců zmenšila a množství spermií v semenotvorných kanálcích dramaticky pokleslo. Na rozdíl od více rezistentního kmene, kde téměř nedošlo ke změně ve spermatogenezi ani ve velikosti varlat. Tento poměrně značný rozsah v citlivosti má velký význam při určení bezpečnostních hranic pro muže.

Estrogeny regulují vstřebávání lumenální tekutiny v *caput* nadvarlete. Narušení této nezbytné funkce způsobí, že sperma přichází do nadvarlete spíše naředěné než koncentrované, což má za následek neplodnost. Vinu na této skutečnosti může mít přímý efekt environmentálních estrogenních disruptorů (Hess *et al.* 1997).

2.6.3 Knockout modely myši

Vyřazením genu pro ER tzv. knockoutem (ERKO) u myších samců se dozvídáme o funkci a důležitosti těchto receptorů v reprodukci. ERKO samci jsou normální na anatomické úrovni, ale jsou neplodní, což ukazuje esenciální roli ER v regulaci samčí reprodukce. Dochází narušení spermatogeneze rozrušením epitelu semenotvorných kanálků a ve výsledku ke snížení počtu spermií a defektům v jejich funkci (Eddy *et al.* 1996).

Narušení ER α , pomocí knockoutu (α ERKO) nebo podáním čistého antiestrogenu, vede k naředění spermatu z *cauda epididymis*, poškození morfologie spermií, potlačení transportu sodíku a následnému vstřebávání vody, zvýšení sekrece Cl⁻, což v konečném důsledku vede ke snížení plodnosti. Kromě této primární regulace lumenální tekutiny a iontového transportu, jsou estrogény odpovědné za udržení rozdílné epitelové morfologie, proto můžeme říci, že ER α je nezbytně nutný pro plodnost u samců (Hess 2003).

Další možné modely knockout myši jsou pro ER β (β ERKO) a pro oba ER ($\alpha\beta$ ERKO) dvojitý knockout myši, které poskytují cenné informace o způsobu uplatnění obou izoform ER.

Jiné poznatky se dozvídáme z aromatázového knockoutu myši (ArKO), kdy vznikají jedinci neschopní syntézy endogenních estrogenů. U těchto jedinců nacházíme vysoké hladiny testosteronu, LH a FSH. U spermií je snížena životaschopnost, množství a zhoršená motilita spermií.

U uvedených modelů nalézáme stěžejní poruchy, které zahrnují narušení morfologie varlat, zastavení spermatogeneze ve stádiu časně spermiogeneze, pokles koncentrace spermií, snížení jejich motility a schopnosti oplodnit vajíčko, závažné roztažení vývodných kanálků a významné přetvoření normálního hormonálního profilu, jež ve výsledku ovlivňují samčí neplodnost (Jones & Simpson 2000).

2.7 Vylučované estrogény

Jakost povrchových a podzemních vod je ohrožována mnoha chemikáliemi, které člověk vyrábí. Řada studií přítomnosti farmak a lidských hormonů v životním prostředí byla prováděna během 70. – 80. let (Křesinová *et al.* 2009, Aherne & Briggs 1989), avšak tehdy detegovaná stopová množství vzbuzovala malou pozornost, až do doby zjištění spoji-

tosti mezi syntetickou antikoncepcí 17- α -ethynylestradiolem a vlivem na ryby (Křesinová *et al.* 2009, Snyder & Mulder 2001). Nebezpečí takových látek spočívá v tom, že se ve vodách vyskytují v nesmírně malém množství, řádově v jednotkách až desítkách nanogramů v litru vody. Přes tato malá množství mohou mít při dlouhodobém výskytu negativní vliv na životní prostředí, na organismy a v konečném důsledku na člověka. Estrogenní látky se dostávají do těla v pitné vodě nebo z potravy a interferují s činností endogenních hormonů, což může mít negativní efekt na vývoj a reprodukci (Křesinová *et al.* 2009, Quinn *et al.* 2004, Van den Belt *et al.* 2003). Konkrétní údaje a poznatky o takovém působení na člověka však dosud chybí (Křesinová *et al.* 2009).

Během posledních let je věnována značná pozornost přírodním (estron, 17- β -estradiol a estriol) a syntetickým steroidům (17- α -ethynylestradiol), tyto hormony stávající technologie čištění odpadních vod neodstraní. Estrogeny se používají jako přísady do kosmetických výrobků, ve farmaceutickém průmyslu (léky, antikoncepční a menopauzní pilulky, atd.), kdy se po vyloučení z těla dostávají do odpadních vod. Velké množství estrogenů se dostává do vodních toků i z moči pasoucích se hospodářských zvířat. Dalším možným zdrojem estrogenů mohou být pohlavní steroidní hormony, kterými je krmena drůbež a dobytek, aby rychleji přibývali na váze. V některých zemích, kde není užívání potravinových aditiv pečlivě regulováno zákony, mohou v potravinách zůstat velmi významná množství estrogenů (Andersson & Skakkebaek 1999).

Bylo prokázáno, že tyto přírodní i syntetické estrogenní hormony mají vliv na změny pohlaví ryb. Hormony se sice neuvěřitelně naředí v říční vodě, ale na rybí samce mají nežádoucí účinky i při extrémně nízkých koncentracích. V důsledku probuzení samičích hormonů začínají samci tvořit jikry, následuje neschopnost oplození samice a dochází k vymírání rybí populace. Ryby nejsou zdaleka jedinými živočichy, kteří jsou k látkám s hormonálními účinky vnímaví, se stejným problémem se setkáváme i u žab a mlžů.

2.7.1 Hormony ve vodě

Přírodní estrogenní hormony estron, 17- β -estradiol, estriol i syntetický 17- α -ethynylestradiol jsou vylučovány lidmi do životního prostředí a jsou průkaznými endokrinními disruptory už v přítomnosti ng/l (Khanal *et al.* 2006). Odhaduje se, že produkce estrogenů ženskou populací v Praze je 2,1 g/den (Pačes 2002). Kromě lidských

hormonů se do vod dostávají i hormony zvířat a látky, které mají podobné chemické vlastnosti jako hormony.

Hormony ať už přirozené, nebo umělé se dostávají z lidského těla do kanalizačních sítí a z nich se netěsnostmi dostávají do podzemních a později i do povrchových vod. Většina hormonů a jim podobných látek odtéká do čističek, kde se velká část zachytává v čistiřenských kalech. Část hormonů přesto opět uniká do vodních toků. Čistiřenské kaly se často různým způsobem využívají, například v zemědělství. Ví se, že se estrogény váží na jílovité částice a na svrchní, organickou vrstvu půd.

Syntetické estrogény, užívané jako orální antikoncepce, jsou v těle metabolizovány na jejich konjugáty s kyselinou glukuronovou a vyloučeny močí. Tyto konjugáty jsou následně, při zpracování splaškové vody aktivovaným kalem, hydrolyzovány glukuronidázou, produkovanou mikroorganismy (např. *Escherichia coli*), zpět na formy syntetických estrogenů a kyselinu glukuronovou (Křesinová *et al.* 2009, Tyler *et al.* 1998), jiné typy metabolizovaných estrogenů jsou více odolné k modifikacím a zůstávají beze změny nebo jsou upraveny jiným způsobem (Gomes *et al.* 2009).

17- α -ethynylestradiol je aktivní složka antikoncepčních pilulek, estrogen, který se vyskytuje ve vodních tocích v řádech ng/l i po přečištění odpadních toků. v čističkách odpadních vod. V řekách tento estrogen způsobuje feminizaci vodních organismů (Pauwels *et al.* 2008)

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Amonium persulfate (A3678, Sigma)

BSA – albumine bovine serum ($\geq 96\%$, A-2153, Sigma)

Calcium ionofore A23187 (C7522, Sigma)

Dulbecco's phosphate buffered saline modified, without CaCl_2 and MgCl_2 (D5652, Sigma)

Estriol (E1253, Sigma)

Estron (E9750, Sigma)

Etanol (02862, Penta)

17- α -ethynylestradiol (E4876, Sigma)

17- β -estradiol (E7879, Sigma)

Formaldehyd (47629, Penta)

Glycin (G8898, Sigma)

Hoechst – bis-benzimidazol (H33258, Sigma)

M2 medium (with HEPES, without Penicillin & Streptomycin) (M7167, Sigma)

Metanol (65543, Penta)

Paraffinöl (8904.1, Roth)

PBS – fyziologický roztok, fosfátový pufr (phosphate-buffered saline)

Precision Plus Protein All Blue Standard – (BioRad)

SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (34075, Thermo Scientific)

TBS – fyziologický roztok neobsahující fosfáty (tris-buffered saline)

TEMED – N, N, N', N'- tetramethylethyldiamin (T7024-25ML, Sigma)

Triton X-100 (T-9284, Sigma)

Vectashield mounting medium for fluorescence (H-1000, Vector)

3.1.2 Roztoky

PBS (10× koncentrovaný)

1 l destilované H₂O

80 g NaCl

2 g KCl

28,65 g Na₂HPO₄ (pro 12 H₂O)

2 g KH₂PO₄

Sterilní PBS

100 ml tkáňové kultury

0,96 g Dulbecco's phosphate buffered saline modified (obsahující NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ (pro 7 H₂O) 1,15 g/l, KH₂PO₄ 0,2 g/l)

3,7 % formaldehyd

36 – 38% formaldehyd ředěn v PBS, pH upraveno na hodnotu 7,36

15 mmol NH₄Cl

0,4 g NH₄Cl rozpuštěno v 500 ml PBS

0,1 % Triton

500 µl ředěno v 500 ml PBS

TBS (10× koncentrovaný)

100 ml destilované H₂O

8 g NaCl

1,2 g TRIS

1% BSA

0,1 g rozpuštěno v 10 ml PBS

ELFO elektrodový pufr

3 g Tris

14,4 g glycinu

1 g SDS

1 l destilované H₂O

ELFO roztoky

Roztok A – 30 g akrylamidu

0,8 g BIS

do 100 ml destilované H₂O

Roztok B – 10 g SDS

do 100 ml destilované H₂O

Roztok C – 22,75 g Tris

do 250 ml destilované H₂O

pH upraveno pomocí HCl na hodnotu 8,8

Roztok D – 3 g Tris

do 100 ml destilované H₂O

pH upraveno pomocí HCl na hodnotu 6,8

Roztok G – 10% persíran amonný (0,1 g/1 ml)

PBS – Tween 0,05%

1 l PBS

500 µl Tween

Přenosový pufr - pufr pro přenos proteinů po SDS-PAGE na membránu

3 g Tris

14,4 g glycinu

200 ml metanolu

do 1 l destilované H₂O

Redukující vzorkový pufr

2,4 ml roztoku D

2 ml roztoku B (tj. 3,3% SDS)

1 ml glycerolu
0,5 ml destilované H₂O
72 mg DTT – dithiotreitol
1 mg bromfenolové modři

10% separační gel

5 ml roztoku A
7,5 ml roztoku C
2,5 ml destilované H₂O
150 µl roztoku B
7 µl TEMED
persíran amonný 150 µl roztoku G
5% zaostřovací gel
1 ml roztoku A
3 ml roztoku D
2 ml destilované H₂O
100 µl roztoku B
5 µl TEMED
persíran amonný 90 µl roztoku G

3.1.3 Přístroje

Analytické váhy WPS 360/C/2 (Radwag)
Autokláv OT 12 (Nüve)
Binolupa Stemi 2000 (Zeiss)
Centrifuga MiniSpin® Plus (Eppendorf)
Centrifuga Micro 200 (Hettich Zentrifugen)
ELFO sestava – Mini vertical gel electrophoresis unit SE 260 (Hoeffer Scientific)
ELFO sestava na nalévání gelů – Dual gel caster SE 245 (Hoeffer Scientific)
Fluorescenční mikroskop BX 40 (Olympus)
Flow box EN 12469 (Biohazard CleanAir)

Inkubátor EN 025 (Nüve)
Konfokální mikroskop DM IRE2 (Leica)
Magnetická míchačka RCT Basic (IKA Werke)
pH metr – Microprocessor pH Meter PHB-212 (Omega)
Semi-dry blotter TE77XP (Hoeffer Scientific)
Světelný mikroskop ZP 9491 (Zeiss)
Třepačka Bio Shaker 3D (Biosan)
Třepačka Titertrek Flow laboratories 11212/7
Optimax X-Ray Film Processor (Fomei)
Zdroj – Power Pac Basic 014BR (BioRad)
Zdroj studeného světla Highlight 2100 Europe (Olympus)

3.1.4 Další použitý materiál

Cell culture dish 35 mm × 10 mm (430165, Corning)
Filtrační papír
Nitrocelulózová membrána – Trans-blot-transfer medium (0,2 μm) (BR 162-0150, BioRad)
Rentgenový film – Medix medici X-ray film XBU (Foma)
Zkumavky (Eppendorf)

3.1.5 Protilátky a fluorescenčně značené próby

A0168 anti mouse skonjugovanou peroxidázou – ředění 1:80 000
Goat anti mouse IgG Alexa Fluor 488 (A11001, Molecular Probes) – ředění 1:1000
Lectin PNA conjugates Alexa Fluor 568 (L-32458, Molecular Probes)
Monoclonal anti-phosphotyrosine P-Tyr-01 mouse IgG1 (11-263-C025, Exbio) – ředění 1:500

3.1.6 Živočišný materiál pro odběr spermií

Laboratorní myš inbrední BALB/c, SPF kmen (Anlab, Velaz, chovy PříFUK)

3.2 Metody

3.2.1 Příprava jednotlivých koncentrací estrogenů

Estrogeny byly ředěny etanolem do pěti různých koncentrací, a to 0,02; 0,2; 2; 20 a 200 $\mu\text{g/l}$. Nejnižší dvě koncentrace estrogenů 0,02 $\mu\text{g/l}$ a 0,2 $\mu\text{g/l}$ jsou fyziologické koncentrace v plazmě myši, následující dvě koncentrace 2 $\mu\text{g/l}$ a 20 $\mu\text{g/l}$ jsou fyziologické v místě ovulace u myši a poslední nejvyšší 200 $\mu\text{g/l}$ je tudíž pouze 10-ti násobek fyziologické. Molární koncentrace jsou po výpočtu a zaokrouhlení následující 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM a 1 μM .

3.2.2 Kapacitace spermií *in vitro*

Ve sterilním flow boxu se do příslušného počtu připravených Petriho misek (35×10 mm) napipetovalo fertilizační M2 médium (s obsahem 0,4% BSA). Do dvou misek tvořících zásobu se dávalo 200 μl čistého M2 média a do misek s kontrolními vzorky 100 μl čistého M2 média. V miskách ovlivněných estrogenem bylo 100 μl M2 média smícháno s určitým estrogenem (o výsledné koncentraci estrogenů 200; 20; 2; 0,2 nebo 0,02 $\mu\text{g/l}$). Takto napipetované kapky byly převrstveny parafínovým olejem (cca 700 μl), (obr. 3.1). Všechny misky byly inkubovány minimálně 30 minut v termostatu o stálé teplotě 37 °C a 5% CO_2 .



Obr. 3.1 Petriho miska s kapkou kapacitačního média převrstveného parafínovým olejem.

Do zásobních misek byl po vytemperování vložen terminální 4-5 region levé a pravé *cauda epididymis* z dospělého samce myši usmrčeného cervikální dislokací. Spermie se nechaly 10 minut uvolňovat z tkáně do média při 37 °C a 5% CO₂. Poté bylo ze zásobních misek rozpipetováno 5 µl suspenze spermií do všech ostatních misek (výsledná koncentrace spermií byla cca 5×10⁶ /ml), (obr. 3.2).



Obr. 3.2 Příprava preparátů pro hodnocení p-Tyr po kapacitaci spermií *in vitro*.

Od této chvíle se začala měřit doba kapacitace a v časových intervalech 5 (ihned po rozpipetování ze zásobních misek), 30, 60, 90, a 120 minut byly prováděny odběry vzorků (obr. 3.3).



Obr. 3.3 Odběr vzorků spermií v daném čase kapacitace.

Tyto vzorky byly použity buď na přípravu preparátů pro fluorescenční hodnocení pozitivní p-Tyr v hlavičce spermie (viz 3.2.3) nebo na přípravu lyzátu celých spermií pro elektroforetické hodnocení p-Tyr (viz 3.2.7).

3.2.3 Fluorescenční metody

Fixace formaldehyd-triton

Zaschnuté preparáty byly vloženy na 10 minut do 3,7% formaldehydu v PBS. Následovalo promytí (2-3×) v PBS (pH = 7,36) a inkubace po dobu 5 minut s 15 mM NH₄Cl a opětovné promývání v PBS (2-3×). Poté se preparáty nechaly inkubovat maximálně 3 minuty v 0,1% tritonu v PBS a byly promyty 3×5 minut v PBS. Na závěr byly zality PBS a uloženy do chladu před dalším zpracováním.

Nepřímá imunofluorescence

Fixované preparáty byly 45-60 minut blokovány pomocí 1% BSA a 5 minut promývány v PBS. Poté byly inkubovány 2 hodiny s primární protilátkou (Monoclonal anti-phosphotyrosine P-Tyr-01 mouse IgG1 - 11-263-C025, Exbio) ředěnou v poměru 1:500 se sterilním PBS při pokojové teplotě ve vlhké komůrce chráněné před světlem. Po uplynulé době byla protilátka odmyta 5×5 minut v PBS a nanesena próba s navázaným fluoroforem (Goat anti mouse IgG Alexa Fluor 488 - A11001, Molecular Probes) ředěna v poměru 1:1000 se sterilním PBS. Po hodinovém působení byla protilátka odmyta 3×5 minut v PBS a preparát byl zamontován do speciálního média (Vectashield mounting medium) a poté analyzován pod fluorescenčním mikroskopem.

3.2.4 Hodnocení tyrozinové fosforylace

Vzorky spermií odebrané v příslušných časech kapacity *in vitro* (viz 3.2.2) byly stáčeny a promývány v TBS (pH = 7,34), poté se ze vzorků připravily preparáty roztěrem na podložní sklíčka a fixovaly se ve formaldehyd tritonu (viz 3.2.3). Po blokaci 1% BSA byly značeny primární protilátkou proti fosforylovaným tyrozinovým zbytkům (Monoclonal anti-phosphotyrosine P-Tyr-01 mouse IgG1 - 11-263-C025, Exbio, ředění 1:500) a sekun-

dární protilátkou s navázaným fluoroforem (Goat anti mouse IgG Alexa Fluor 488 - A11001, Molecular Probes, ředění 1:1000). Připravené preparáty se hodnotily pod fluorescenčním mikroskopem, kdy se určoval počet buněk označených protilátkou čili pozitivních (obr. 4.1) a negativních (obr. 4.2) z celkového počtu 100 buněk a jejich zastoupení bylo vyjádřeno v procentech. Toto hodnocení bylo prováděno minimálně šestkrát u každé koncentrace daného typu estrogenu.

Experimentální data byla analyzována programem STATISTICA 6.0. Pro statistickou analýzu rozdílů mezi porovnávanými skupinami (počet buněk s pozitivní p-Tyr u experimentálních vzorků vs. kontrolní vzorek ve stejném čase) byla použita jednosměrná analýza kovariance (ANCOVA). Vzhledem k nerovnému počtu (N) vzorků ve skupinách byl jako post-hoc metoda zvolen Turkey test pro nerovné N (N=6-10) s cílem zhodnotit statisticky významný rozdíl mezi zkoumanými skupinami. Jako kovariát byl použit průměr daného parametru, v našem případě počet fosfotyrozín-pozitivních buněk v čase nula. P hladina <0,05*; <0,01**; a 0,001**** byla považována za signifikantní.

U všech statistických vyhodnocení průběhu p-Tyr (Tabulky 4.1 – 4.4) byl použit stejný postup při přípravě i vyhodnocení vzorků, jediný rozdíl byl v použitém estrogenu.

3.2.5 Indukce akrozomální reakce *in vitro*

V průběhu kapacitace spermií *in vitro* se paralelně prováděla i indukce AR pomocí 0,5 mM CaI (1 µl/100 µl média), který byl přidáván ve 30, 60, 90 a 120 minutách kapacitace spermií *in vitro*. Spermie byly kapacitovány při 37 °C a 5% CO₂ a byly vystaveny působení CaI po dobu 60 min (kromě **kap30 + CaI5***, kde CaI byl přidán, avšak spermie byly ihned odebrány, CaI tedy mohl působit jen krátkou dobu, než byly spermie odebrány a standardně zpracovány). Vzorky byly odebírány v časech s označením **kap30 + CaI5***, **kap30 + CaI60**, **kap60 + CaI60**, **kap90 + CaI60** a **kap120 + CaI60**. Jako negativní kontrola k těmto experimentálním skupinám sloužila **kap5 bez CaI**, tzn. čas kapacitace 5 min, kdy nebyl ke spermiím přidán CaI a vzorky byly ihned odebrány po rozpipetování ze zásobních misek. Všechny odebrané vzorky byly poté hodnoceny pod fluorescenčním mikroskopem.

3.2.6 Hodnocení akrozomální reakce

Z odebraných vzorků, u kterých byla prováděna CaI indukovaná AR (viz 3.2.5) bylo na podložní sklíčko umístěno 10 μ l suspenze spermií s M2 médiem a přidán 2,5 μ M PNA lektin s navázaným fluoroforem (Lectin PNA conjugates Alexa Fluor 568 - L-32458, Molecular Probes – značící intaktní akrozóm) a 1 μ M hoechst (značící jádro spermie). Pod fluorescenčním mikroskopem byl hodnocen stav akrozómů a počítáno procentuální zastoupení živých spermií, které prodělaly CaI indukovanou AR (z celkového množství 100 buněk) a spermií s intaktním akrozómem (obr. 4.3). U každé koncentrace (0,02 μ g/l; 0,2 μ g/l; 2 μ g/l; 20 μ g/l a 200 μ g/l) daného typu estrogenu (17- β -estradiolu, estronu, estriolu a 17- α -ethynylestradiolu) v kapacitačním médiu bylo hodnocení prováděno minimálně šestkrát.

Pro statistické hodnocení rozdílů mezi jednotlivými skupinami (počet buněk po AR u experimentálních vzorků vs. kontrolní vzorek ve stejném čase) byla použita analýza kovariance (ANCOVA) a jako post hoc metoda byl aplikován Turkey test pro nerovné N (N=6-10) pro zjištění statistických rozdílů mezi zkoumanými skupinami. Jako kovariát byl použit průměr daného parametru, v našem případě procento buněk, u kterých proběhla AR v čase kap5 bez CaI. Důvod pro to je ten, že je nutné do statistického zpracování zahrnout rozdíly v tomto parametru, které by jinak mohly silně zkreslovat výsledky rozdílů mezi kontrolní a experimentálními skupinami v dalších časech.

U všech statistických vyhodnocení výsledků indukované AR (Tabulky 4.5 – 4.8) se postup při přípravě i vyhodnocení vzorků shodoval, rozdílný byl pouze použitý estrogen.

3.2.7 SDS – PAGE a imunodetekce proteinů

Příprava vzorku a počítání koncentrace spermií

Spermie z *cauda epididymis* se inkubovaly v kapacitačním médiu při 37 °C a 5% CO₂ (viz 3.2.2). Spermie byly ovlivňovány koncentrací 0,02; 0,2; 2; 20 nebo 200 μ g/l jednoho ze čtyř estrogenů (17- β -estradiol, estron, estriol, 17- α -ethynylestradiol). První odběr se prováděl v čase 5 minut, kdy se spermie po vložení do média ihned odebraly, následovaly odběry v čase 30, 60, 90 a 120 minut kapacitace.

Odebrané vzorky byly promývány v PBS a stáčeny 10 minut při 12 000 rpm. Po odebrání veškerého supernatantu bylo k peletce přidáno 100 μ l PBS a důkladně resuspendováno. Pro zjištění koncentrace spermií byla použita Bürkerova komůrka, na kterou bylo nanášeno 10 μ l připravené suspenze. Byly počítány buňky v šestnácti čtvercích obsažených v jedné jednotce.

Výsledná koncentrace buněk/ml byla vypočítána podle tohoto vzorce:

$$E = (\sum \text{buněk ve čtvercích} / 16) \times 100 (\text{faktor ředění}) \times 250 \times 10^3$$

K vzorkům bylo přidáno 10 μ l vzorkového pufru a vzorky se 5 minut povařily ve vodní lázni. Poté byly zmrazeny a uchovány pro další použití.

Příprava SDS gelu a elektroforetické rozdělení proteinů

Po nalití všech složek 10% separačního gelu a jeho převrstvení destilovanou vodou došlo k jeho polymeraci. Přebytková voda se odsála filtračním papírem. Na zpolymerovaný gel se navrstvil 5% zaostřovací gel a pomocí hřebenu, který se vložil do ještě neztuhlého gelu, se vytvořily jamky pro nanášení vzorků. Hřeben byl vyjmut po úplné polymeraci gelu. Gely, uzavřené mezi skleněnou a plastovou deskou, byly upevněny do elektroforetického přístroje a celá sestava byla zalita elektrodovým pufrům. Do každé jamky se Hamiltonovou pipetou nanášelo 15 μ l vzorku nebo 10 μ l standardu. Přístroj byl nastaven na 110 V a po přechodu vzorků do zaostřovacího gelu se napětí navýšilo na 140 V. V gelu byl sledován transport bromfenolové modři. Po ukončení elektroforézy se z rozložené aparatury vyjmul gely a byl odříznut zaostřovací gel. Dále se pracovalo jen se separačním gelem. Proteiny obsažené ve vzorcích se po elektroforetickém rozdělení přenesly pomocí Western blotu na nitrocelulózovou membránu.

Western blot

Do aparatury na přenos proteinů byly vloženy nejprve 4 listy chromatografických papírů, poté nitrocelulózová membrána, na kterou se položil gel a nakonec další 4 chromatografické papíry. Jednotlivé složky byly vlhčeny přenosovým pufrům. Pro přenos proteinů je potřeba proud 0,8 mA na 1 cm² nitrocelulózové membrány po dobu 1,5 hodiny.

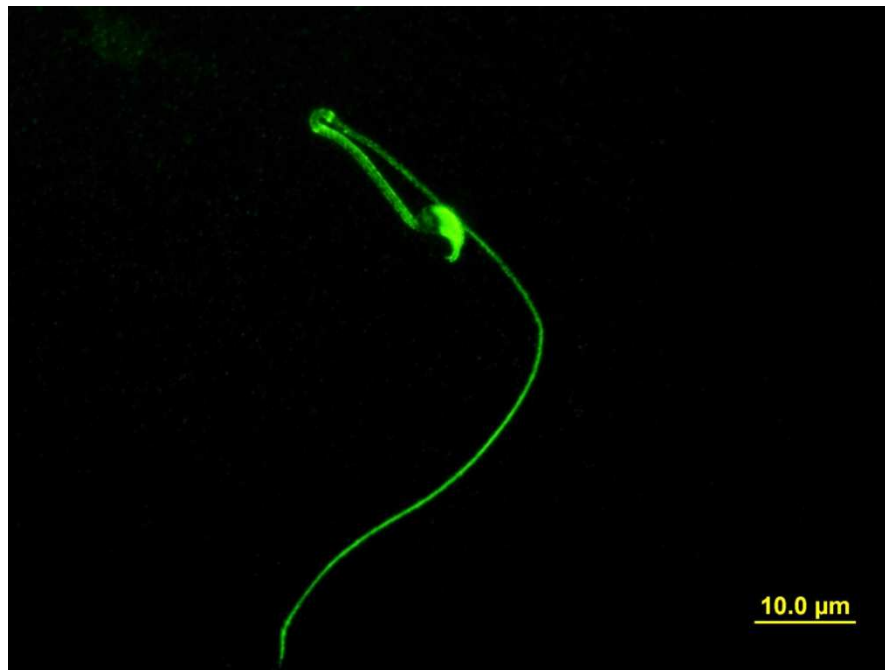
Detekce proteinů

Nejprve se membrána zavodnila v roztoku PBS-Tween 0,05% na 15 minut. Poté byla 1 hodinu blokována v roztoku 5% mléka s PBS-Tween 0,05% (10 g mléka na 200 ml PBS-Tween 0,05%). Po zablokování nespecifických vazebných míst byla 1,5 hodiny inkubována v roztoku primární protilátky (Monoclonal anti-phosphotyrosine P-Tyr-01 mouse IgG1 - 11-263-C025, Exbio) ředěné v poměru 1:500 s 1% mlékem v PBS-Tween 0,05%. Po uplynulé době byla primární protilátka odmyta roztokem PBS-Tween 0,05% 6×5 minut. Poté byla ponořena do roztoku sekundární protilátky (A0168 anti mouse s konjugovanou peroxidázou), která byla ředěna v poměru 1:80 000 s 1% mlékem v PBS-Tween 0,05% a 1 hodinu inkubována. Na závěr byla sekundární protilátka odmyvána 5×5 minut v PBS-Tween 0,05%. Pomocí chemiluminiscenční sady se proteiny s navázanou peroxidázou detekovaly na RTG filmu a pomocí automatu, který obsahuje lázeň s vývojkou a ustalovačem, se osvětlené RTG filmy vyvolaly (Obr. 4.4 – 4.7). Tento postup se opakoval nejméně třikrát pro jednotlivé koncentrace (0,02 µg/l; 0,2 µg/l; 2 µg/l; 20 µg/l a 200 µg/l) estrogenu (17-β-estradiolu, estronu, estriolu a 17-α-ethynylestradiolu) v kapacitačním médiu.

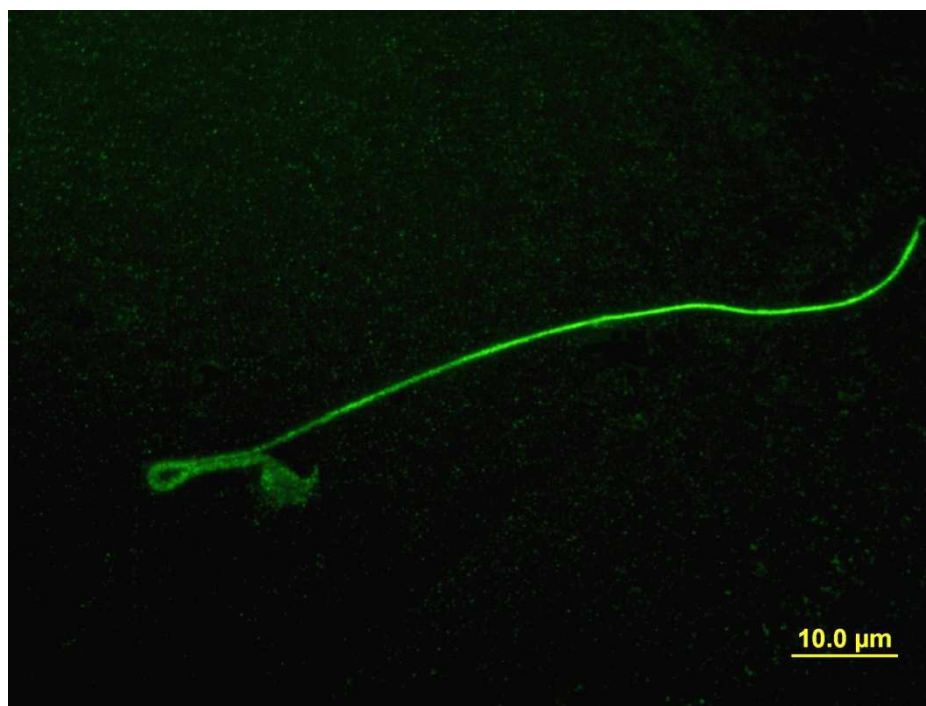
4. Výsledky

4.1 Hodnocení tyrozinové fosforylace v hlavičce spermie myši po kapacitaci *in vitro* a statistické zhodnocení získaných výsledků

Při hodnocení p-Tyr pod fluorescenčním mikroskopem byl zaznamenán počet spermií s pozitivně značenou hlavičkou spermie (obr. 4.1) a negativně značenou hlavičkou spermie (obr. 4.2) u vzorků myších spermií ovlivněných jedním z použitých estrogenů v koncentraci (0,02 - 200 $\mu\text{g/l}$) odebraných v pěti časech kapacity (5 - 120 minut).



Obr. 4.1 p-Tyr proteinů v hlavičce a bičku spermie myši – pozitivně značený akrozomální region hlavičky spermie a biček ve střední a hlavní části.



Obr. 4.2 p-Tyr proteinů v hlavičce a bičíku spermie myši – negativní signál v hlavičce spermie a pozitivní signál v bičíku.

Při hodnocení působení **17- β -estradiolu** můžeme nalézt signifikantní výkyvy v procentech p-Tyr proteinů hlavičky spermíí, které ale neukazují jednoznačnou závislost na koncentraci estrogenu nebo na čase kapacitace a jsou velmi náhodné (Tabulka 4.1).

Naproti tomu u syntetického **17- α -ethynylestradiolu** se výsledky pokusů zdají mít nejvíce konzistentní trend v nejvyšších koncentracích tohoto estrogenu, z čehož by se dal usuzovat jistý vliv tohoto syntetického estrogenu na průběh kapacitace myších spermíí *in vitro*. V koncentracích 2 $\mu\text{g/l}$ - 200 $\mu\text{g/l}$ byl signifikantně vyšší nárůst p-Tyr proteinů hlavičky spermie. U koncentrace 20 $\mu\text{g/l}$ byl signifikantní nárůst konzistentní v průběhu 30 - 120 minut kapacitace, u nejvyšší koncentrace 200 $\mu\text{g/l}$ byl tento nárůst pozorován ve 30, 90 a 120 minutách kapacitace, u koncentrace 2 $\mu\text{g/l}$ se projevil pouze v 60 minutách (Tabulka 4.4).

U výsledků hodnocení vzorků spermíí ovlivněných **estronem** nemají signifikantní odchylky prokazatelný tendenční vývoj v závislosti na čase nebo koncentraci estronu (Tabulka 4.2). Kromě koncentrace 200 $\mu\text{g/l}$, kdy se projevil podobný trend jako u 17- α -ethynylestradiolu. U estronu byla p-Tyr ve vývoji maximální v 60 minutách kapacitace, u koncentrace 20 $\mu\text{g/l}$ dosahovala maxima v 90 minutách (shodně s kontrolou).

V průběhu p-Tyr proteinů u spermií ovlivněných **estriolem** bylo u vzorků s koncentrací 0,02 µg/l - 2 µg/l statisticky významně vyšší procento značených buněk ve 30 minutách kapacitace, u koncentrací 0,02 µg/l a 0,2 µg/l i v 60 minutách kapacitace. Z výsledků v těchto dvou kapacitačních časech můžeme usuzovat na určitý trend, stejně jako u 17- α -ethynylestradiolu, kde se ale projevil konzistentněji po celou dobu kapacitace a u vyšších koncentrací tohoto hormonu. U ostatních signifikantních hodnot se neukázala žádná koncentrační nebo časová závislost (Tabulka 4.3).

Pro hodnotnější výsledky by bylo třeba udělat násobnější opakování pokusů.

Statistické vyhodnocení průběhu p-Tyr při kapacitaci *in vitro* u myších spermií ovlivněných jedním z estrogenů

Tabulka 4.1

Koncentrace 17- β -estradiolu	čas kapacity (min)				
	5	30	60	90	120
Kontrola	8,54 \pm 1,00	9,74 \pm 1,02	10,86 \pm 1,23	11,46 \pm 1,23	9,70 \pm 1,20
0,02 μ g/l	8,55 \pm 0,64	10,12 \pm 0,97	10,28 \pm 0,78	12,28 \pm 1,27	10,53 \pm 0,71
0,2 μ g/l	8,75 \pm 1,03	11,16 \pm 0,49**	6,03 \pm 0,21**	9,50 \pm 1,05*	8,36 \pm 0,75
2 μ g/l	10,57 \pm 1,17	9,61 \pm 0,68	9,98 \pm 0,93	10,38 \pm 0,68	10,20 \pm 0,80
20 μ g/l	10,43 \pm 1,26	14,02 \pm 1,69**	11,71 \pm 1,31	11,11 \pm 1,02	9,52 \pm 1,12
200 μ g/l	10,11 \pm 1,17	10,50 \pm 1,20	11,21 \pm 1,02	14,59 \pm 1,08**	10,78 \pm 0,92

Tabulka 4.2:

Koncentrace estronu	čas kapacity (min)				
	5	30	60	90	120
Kontrola	9,43 \pm 0,47	9,53 \pm 0,80	10,59 \pm 0,73	11,93 \pm 0,75	10,82 \pm 0,96
0,02 μ g/l	9,20 \pm 0,56	10,16 \pm 0,80	11,59 \pm 1,10	10,78 \pm 0,75	11,24 \pm 1,18
0,2 μ g/l	10,72 \pm 0,97*	10,20 \pm 1,29	12,58 \pm 0,83*	12,14 \pm 0,83	10,47 \pm 0,86
2 μ g/l	10,93 \pm 1,56	11,25 \pm 1,38*	11,31 \pm 1,10	10,50 \pm 1,18	9,65 \pm 0,90
20 μ g/l	10,76 \pm 1,42	12,42 \pm 1,86*	12,93 \pm 2,00	13,44 \pm 1,10*	13,23 \pm 2,28
200 μ g/l	10,97 \pm 1,51	12,59 \pm 1,56*	14,45 \pm 1,39*	12,51 \pm 1,20	11,14 \pm 1,36

Tabulka 4.3:

Koncentrace estriolu	čas kapacity (min)				
	5	30	60	90	120
Kontrola	9,78 \pm 0,80	8,86 \pm 0,59	9,56 \pm 0,86	10,74 \pm 0,43	10,45 \pm 0,76
0,02 μ g/l	9,77 \pm 1,46	12,13 \pm 0,56**	12,43 \pm 0,90*	11,22 \pm 2,34	10,42 \pm 0,99
0,2 μ g/l	11,51 \pm 1,63	11,04 \pm 1,65*	12,66 \pm 1,70*	10,22 \pm 1,21	13,33 \pm 1,80**
2 μ g/l	10,87 \pm 1,34	11,39 \pm 1,02*	10,68 \pm 1,97	10,66 \pm 1,21	10,87 \pm 1,51
20 μ g/l	5,76 \pm 1,60**	9,03 \pm 0,62	9,09 \pm 0,44	9,90 \pm 0,72	11,55 \pm 2,14
200 μ g/l	6,88 \pm 1,02*	9,33 \pm 0,97	10,13 \pm 0,59	10,21 \pm 0,90	11,35 \pm 0,70*

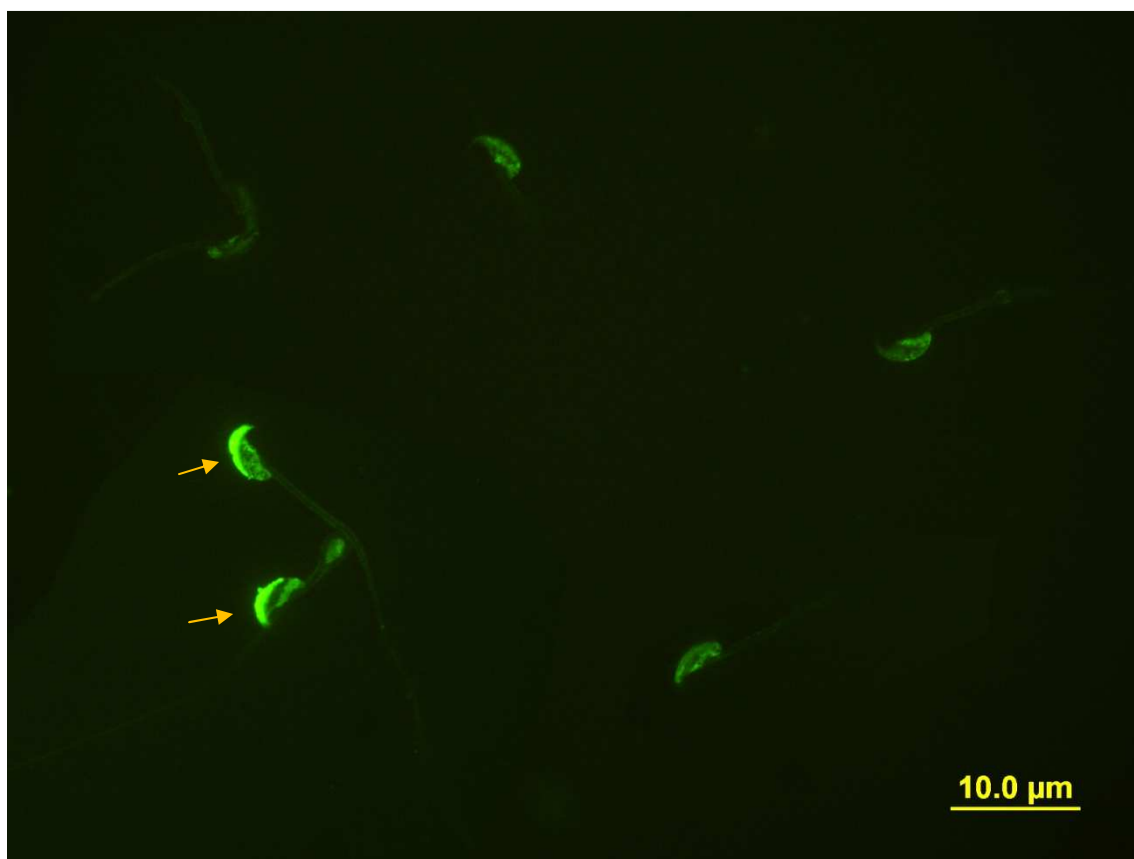
Tabulka 4.4:

Koncentrace 17- α -ethynylestradiolu	čas kapacity (min)				
	5	30	60	90	120
Kontrola	12,68 \pm 0,98	12,89 \pm 1,21	13,86 \pm 0,53	13,49 \pm 1,13	12,90 \pm 0,91
0,02 μ g/l	10,94 \pm 1,32*	13,94 \pm 1,71	12,14 \pm 1,24	14,43 \pm 0,70	12,84 \pm 1,27
0,2 μ g/l	12,53 \pm 1,30	12,57 \pm 0,54	13,16 \pm 0,91	13,19 \pm 0,64	12,48 \pm 1,07
2 μ g/l	13,18 \pm 1,89	12,93 \pm 0,93	15,43 \pm 1,02**	14,31 \pm 1,35	13,18 \pm 1,55
20 μ g/l	11,44 \pm 0,98	14,50 \pm 1,20*	16,48 \pm 0,44***	18,77 \pm 1,67***	14,62 \pm 1,18*
200 μ g/l	11,10 \pm 1,30	14,82 \pm 1,61*	13,96 \pm 1,04	16,54 \pm 0,89*	16,01 \pm 1,76**

Hodnoty v tabulkách 4.1 – 4.4 udávají průměrné procento spermií s pozitivní p-Tyr \pm střední chyba průměru, po kapacitaci myších spermií *in vitro* v přítomnosti 5 různých koncentrací (0,02 μ g/l - 200 μ g/l) příslušného estrogenu s odběry v časech kapacity (5 - 120 min). Červeně - výsledky se signifikantně vyšším procentem pozitivní tyrozinové fosforylace v hlavičce spermií. Modře - výsledky se signifikantně nižším procentem viz nahoře. Rozdíly byly analyzovány pomocí analýzy kovariance (ANCOVA), Turkey test se využil jako post hoc metoda. Jako kovariát byl použit průměr daného parametru (počet fosfotyrozin-pozitivních buněk v čase nula). P hladina <0,05*; <0,01**; a 0,001*** byla považována za signifikantní.

4.2 Hodnocení CaI indukované akrozomální reakce a statistické zhodnocení získaných výsledků

Počet myších spermií, které prošly CaI indukovanou akrozomální reakcí (obr. 4.3) byl jednoznačně závislý na čase kapacitace a postupně vzrůstal. Hodnocení bylo prováděno u každé koncentrace (0,02 - 200 $\mu\text{g/l}$) příslušného typu estrogenu v kapacitačním médiu a v daném čase (viz tabulky 4.5 - 4.8).



Obr. 4.3 Spermie s intaktním akrozómem (viz šipky) a spermie po dokončené AR.

U všech koncentrací **17- β -estradiolu** bylo v čase kap30 + CaI5* v porovnání s kontrolou shodně signifikantně nižší procento spermií, u kterých proběhla AR. Může to naznačovat pomalejší nástup AR u ovlivněných spermií (Tabulka 4.5).

Podobného trendu v procentuálním zastoupení spermií po AR stejně jako u 17- β -estradiolu, si můžeme povšimnout u třech nejvyšších koncentrací **estronu** (2 - 200 $\mu\text{g/l}$) v čase kap30 + CaI5*, kdy bylo statisticky významně nižší procento myších spermií s dokončenou AR (Tabulka 4.6).

Z výsledků hodnocení **estriolu** nelze usuzovat žádný trend ve vývoji AR. Není zde patrná žádná závislost na koncentraci estrogenu nebo na časech, v kterých byly vzorky odebírány a statisticky signifikantní hodnoty jsou velmi náhodné.

U syntetického **17- α -ethynylestradiolu** by se po porovnání s předchozím estrogenem 17- β -estradiolem a estronem dal usuzovat časový posun statisticky významně nižšího procenta spermií po AR, který se vyskytuje v kapacitačním čase kap30 + CaI60 u většiny koncentrací. Pokud bych se pokusila interpretovat výsledky v čase kap120 + CaI60, kdy naopak došlo k signifikantnímu zvýšení počtu spermií, které podstoupily AR, u vzorků s koncentrací estrogenu 0,02 $\mu\text{g/l}$, 0,2 $\mu\text{g/l}$ a 200 $\mu\text{g/l}$, tak se mohlo jednat o kompenzaci pomalejšího nástupu AR.

Jak jsem již zmínila výše, procento myších spermií s dokončenou AR vzrůstalo s kapacitačním časem u všech koncentracích daného estrogenu. Pro větší průkaznost výsledků by bylo nutné násobnější opakování pokusů.

Srovnání výsledků průběhu p-Tyr proteinů a CaI indukované AR

Po srovnání výsledků průběhu p-Tyr proteinů a CaI indukované AR u myších spermií ovlivněných estronem by se dala usuzovat korelace v čase kap30 + CaI5* u třech nejvyšších koncentrací (2 - 200 $\mu\text{g/l}$). U hodnot p-Tyr v tomto čase je signifikantně vyšší procento pozitivně značených spermií a naopak u výsledků AR je ve shodném čase a shodných koncentracích estronu signifikantně nižší procento spermií s dokončenou AR, což může mít souvislost s předčasným zapnutím signálních drah a nesprávnému načasování AR.

Statistické vyhodnocení výsledků Cal indukované AR *in vitro* u spermií ovlivněných jedním z estrogenů

Tabulka 4.5:

Koncentrace 17- β -estradiolu	čas kapacity (min) + doba působení Cal (min)					
	kap5 bez Cal	kap30 + Cal5*	kap30 + Cal60	kap60 + Cal60	kap90 + Cal60	kap120 + Cal60
kontrola	3,49 \pm 0,40	15,05 \pm 1,26	47,71 \pm 2,61	61,71 \pm 2,14	69,33 \pm 1,86	76,97 \pm 0,86
0,02 μ g/l	3,33 \pm 0,46	11,14 \pm 0,76***	46,99 \pm 3,15	61,05 \pm 3,29	69,96 \pm 1,35	78,50 \pm 1,70
0,2 μ g/l	3,85 \pm 0,27	11,22 \pm 2,48**	47,98 \pm 5,38	57,99 \pm 2,55	70,49 \pm 2,05	79,92 \pm 2,16
2 μ g/l	4,07 \pm 0,67	10,75 \pm 1,43***	49,95 \pm 5,10	61,98 \pm 4,51	70,85 \pm 3,20	77,15 \pm 1,39
20 μ g/l	2,90 \pm 0,26	11,84 \pm 1,68**	49,10 \pm 2,82	58,97 \pm 3,79	70,59 \pm 0,83	77,56 \pm 2,13
200 μ g/l	2,35 \pm 0,48*	9,51 \pm 1,52***	47,31 \pm 4,29	59,77 \pm 4,23	70,96 \pm 1,51	78,66 \pm 1,99*

Tabulka 4.6:

Koncentrace estronu	čas kapacity (min) + doba působení Cal (min)					
	kap5 bez Cal	kap30 + Cal5*	kap30 + Cal60	kap60 + Cal60	kap90 + Cal60	kap120 + Cal60
kontrola	2,71 \pm 0,35	9,82 \pm 1,39	37,70 \pm 4,44	57,13 \pm 4,07	71,96 \pm 1,64	82,07 \pm 1,02
0,02 μ g/l	2,90 \pm 0,77	7,52 \pm 1,49	40,85 \pm 5,60	56,41 \pm 5,88	72,66 \pm 2,88	81,15 \pm 2,58
0,2 μ g/l	2,37 \pm 0,26	8,98 \pm 1,84	47,73 \pm 8,67	51,89 \pm 5,39	72,75 \pm 3,83	81,65 \pm 1,51
2 μ g/l	2,41 \pm 0,37	7,75 \pm 0,60*	38,23 \pm 5,59	56,46 \pm 4,18	67,57 \pm 3,32	82,23 \pm 1,96
20 μ g/l	2,13 \pm 0,31	7,20 \pm 0,63*	34,27 \pm 3,51	48,86 \pm 6,97	67,90 \pm 3,13	80,62 \pm 3,45
200 μ g/l	1,49 \pm 0,27*	6,34 \pm 0,62*	40,78 \pm 5,34	51,08 \pm 5,61	66,38 \pm 4,87	77,80 \pm 1,11

Tabulka 4.7:

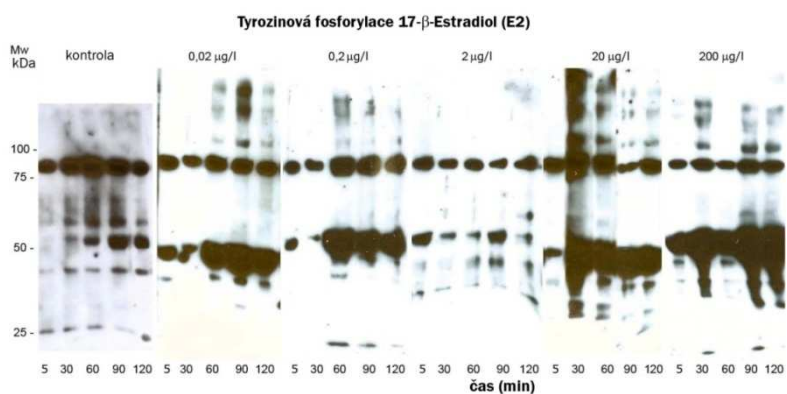
Koncentrace estriolu	čas kapacity (min) + doba působení Cal (min)					
	kap5 bez Cal	kap30 + Cal5*	kap30 + Cal60	kap60 + Cal60	kap90 + Cal60	kap120 + Cal60
kontrola	2,42 \pm 0,22	8,85 \pm 1,37	28,85 \pm 2,68	40,34 \pm 2,44	63,10 \pm 2,43	76,94 \pm 2,38
0,02 μ g/l	2,37 \pm 0,54	6,63 \pm 2,59	27,82 \pm 4,65	36,56 \pm 4,51	54,40 \pm 2,22***	71,78 \pm 2,35**
0,2 μ g/l	1,95 \pm 0,10*	6,84 \pm 2,49	23,38 \pm 2,33*	41,16 \pm 3,08	57,84 \pm 2,73*	73,60 \pm 3,80
2 μ g/l	2,41 \pm 0,56	6,86 \pm 0,97*	36,31 \pm 4,79**	47,38 \pm 4,50*	60,79 \pm 2,13	78,02 \pm 2,93
20 μ g/l	2,67 \pm 0,26	9,78 \pm 2,05	35,03 \pm 4,74*	51,44 \pm 4,21**	58,41 \pm 3,21*	74,74 \pm 3,50
200 μ g/l	2,10 \pm 0,43	7,60 \pm 1,64	27,31 \pm 6,03	44,59 \pm 6,77	62,00 \pm 4,56	74,86 \pm 3,65

Tabulka 4.8:

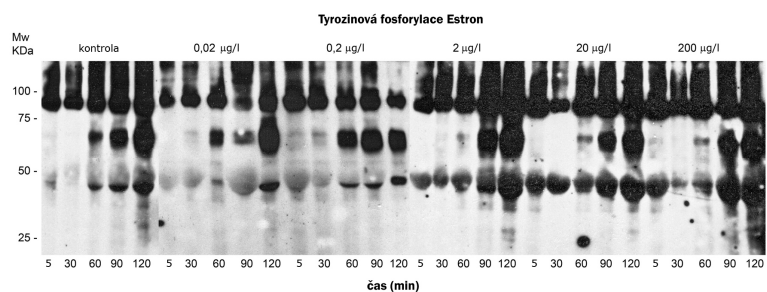
Konc. 17- α -ethynyl estradiolu	čas kapacity (min) + doba působení Cal (min)					
	kap5 bez Cal	kap30 + Cal5*	kap30 + Cal60	kap60 + Cal60	kap90 + Cal60	kap120 + Cal60
kontrola	5,67 \pm 0,94	12,53 \pm 1,75	32,05 \pm 2,93	42,56 \pm 3,75	62,44 \pm 2,81	67,41 \pm 2,98
0,02 μ g/l	6,23 \pm 2,19	11,63 \pm 2,51	25,77 \pm 4,06*	43,13 \pm 3,18	60,15 \pm 3,83	71,26 \pm 2,91*
0,2 μ g/l	5,21 \pm 2,24	11,46 \pm 2,65	25,15 \pm 3,73*	39,68 \pm 5,27	50,94 \pm 5,11*	73,17 \pm 3,88**
2 μ g/l	5,27 \pm 1,35	10,65 \pm 0,33	31,92 \pm 4,63	40,71 \pm 5,61	62,84 \pm 3,04	65,08 \pm 3,69
20 μ g/l	4,93 \pm 1,23	10,04 \pm 1,56	26,24 \pm 3,54*	41,00 \pm 5,67	56,91 \pm 5,62	62,82 \pm 3,56
200 μ g/l	4,38 \pm 1,15	9,52 \pm 0,82*	29,15 \pm 4,49	35,59 \pm 3,30*	64,93 \pm 2,52	71,51 \pm 5,42**

Tabulky 4.5 – 4.8: Hodnoty udávají průměrné procento spermií s dokončenou AR \pm střední chyba průměru, po indukci AR pomocí Cal, v přítomnosti 5 různých koncentrací (0,02 μ g/l - 200 μ g/l) příslušného estrogenu. Červeně - výsledky se signifikantně vyšším procentem spermií po AR. Modře - výsledky se signifikantně nižším procentem spermií po AR. Rozdíly byly analyzovány pomocí ANCOVA, Turkey test se využil jako post hoc metoda. Jako kovariát byl použit průměr daného parametru (procento buněk, u kterých proběhla AR v čase kap5 bez Cal). P hladina <0,05*; <0,01**; a 0,001*** byla považována za signifikantní.

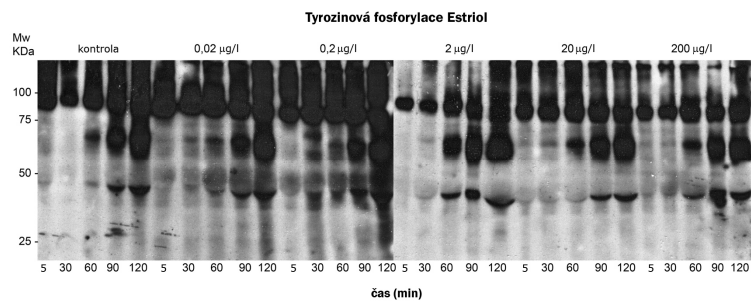
4.3 Elektroforetické hodnocení tyrozinové fosforylace z lyzátu celých spermíí



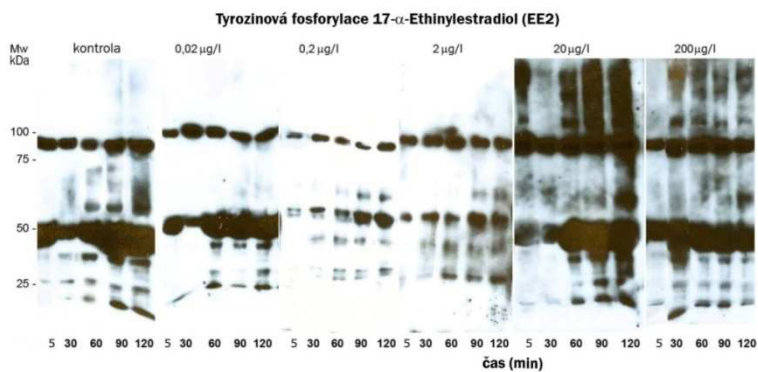
Obr. 4.4



Obr. 4.5



Obr. 4.6



Obr. 4.7

Obr. 4.4 – 4.7: výsledek imunodetekce p-Tyr proteinů lyzátu spermíí ovlivněných jedním z estrogenů v dané koncentraci v průběhu kapacitace in vitro v porovnání s kontrolou.

U výsledků z SDS-PAGE se neshoduje proteinové zastoupení u kontrolních vzorků použitých pro jednotlivé estrogény.

Byly zhotoveny pouze 3 bloty pro daný typ estrogenu, což nebylo dostatečné, pro průkazné ovlivnění probíhající kapacity jednotlivými estrogény. Docházelo ke špatné manipulaci se vzorky spermií, nepřesnosti v nánosu vzorků.

U spermií k nárůstu p-Tyr proteinů docházelo, protože jsme detekovali určité proteiny o molekulové hmotnosti Mw v rozmezí 40-120 kDa u všech pozorovaných vzorků spermií.

5. Diskuze

Nedávno bylo objasněno, že 17- β -estradiol a různé xenoestrogeny mají stimulační efekt na kapacitaci, AR a schopnost oplození u myších spermií *in vitro* (Adeoya-Osiguwa *et al.* 2003). Proto jedním z cílů této práce bylo zjistit, zda přírodní estrogeny 17- β -estradiol, estron, estriol a syntetický 17- α -ethynylestradiol mají nějaký dopad na fertilizační schopnost spermií, specificky na míru p-Tyr v průběhu kapacitace *in vitro*. P-Tyr proteinů má klíčovou roli v regulaci procesů kapacitace, hyperaktivace motility a akrozomální reakce (Grasa *et al.* 2009). P-Tyr koreluje s probíhající kapacitací, a je proto používána jako hlavní nebo dokonce výhradní ukazatel transdukce signálu v regulačních drahách spojených s kapacitací spermií (Visconti *et al.* 1995, Naz & Rajesh 2004), proto jsme si hodnocení míry p-Tyr pro naše pokusy zvolili. Zajímalo nás, zda exogenní přidání estrogenů, ve fyziologických a v jedné nefyziologické koncentraci do kapacitačního média, indukuje oproti kontrole odlišnou míru fosforylace tyrozinových zbytků proteinů hlavičky myší spermie.

Nejnižší dvě použité koncentrace estrogenu 0,02 $\mu\text{g/l}$ a 0,2 $\mu\text{g/l}$ jsou fyziologické koncentrace v plazmě myší, další dvě zvolené koncentrace 2 $\mu\text{g/l}$ a 20 $\mu\text{g/l}$ jsou fyziologické v místě ovulace u myši a nejvyšší vybraná koncentrace 200 $\mu\text{g/l}$ je tudíž pouze 10-ti násobkem nejvyšší fyziologické, avšak přítomnost této koncentrace estrogenů 200 $\mu\text{g/l}$ je dokumentována v životním prostředí.

Biologická aktivita jednotlivých estrogenů se odvíjí od jejich schopnosti vazby k estrogenímu receptoru a jeho aktivaci. Rozdílné ligandy mají různou afinitu k α a β izoformám ER. Estron se přednostně váže k ER α , zatímco estriol k ER β , 17- β -estradiol se váže stejně dobře k oběma izoformám receptorů (Smith 1999). Kromě cytosolického umístění klasických ER, které se po vazbě ligandu translokují do jádra, byly objeveny ER vyskytující se na PM spermie myší (Zhou *et al.* 2002, Selva *et al.* 2004, Baldi *et al.* 2009). Na PM se mohou i vyskytovat nově objevené ER, které mají jinou stavbu než klasické ER (Baldi *et al.* 2009). Biochemické změny během kapacitace indukované estrogeny nastávají rychle díky negenomické akci ERs, protože spermie jsou považovány za transkripčně inaktivní (Aquila *et al.* 2004). Po vazbě estrogenů na tyto receptory se zahajuje signální kaskáda zahrnující vzrůst intracelulárního Ca²⁺, který může dále stimulovat AC produkující cAMP a vedoucí ke zvýšení p-Tyr (Visconti *et al.* 1995).

Výsledky jednotlivých pokusů spermií nebyly specifikovány na jedince, z tohoto důvodu byla použita uniformní populace BALB/c myši. Výsledky byly shromažďovány do konečného souboru dat pro vybraný estrogen o dané koncentraci a času kapacitace v době odběru vzorku. Vzhledem k tomu, že se v průběhu kapacitace mění procento spermií, kde dochází k p-Tyr na hlavičce spermie, jsme úroveň p-Tyr pozorovali u vzorků v 5, 30, 60, 90 a 120 minutách kapacitace.

Pohyb Ca^{2+} iontů z extracelulárního média do nitra spermie je kritický krok, který reguluje vylití akrozómu (De Blas 2002). U několika druhů hlodavců jsou spermie, inkubované v médiu bez vápníku, neschopné projít AR, pokud se do média vápník nedodá. 17- β -estradiol indukuje rychlý vzrůst koncentrace Ca^{2+} iontů uvnitř buněk. Tento efekt je zprostředkován membránovým receptorem a je závislý na přítomnosti Ca^{2+} mimo buňky, proto není pozorovatelný v médiu bez Ca^{2+} iontů (Luconi *et al.* 1999). Ca^{2+} ionty jsou dále spolu se sérum albuminem potřeba i pro navození kapacitace *in vitro*. Ca^{2+} ionty především k indukci aktivace adenylát cyklázy pro generaci cAMP, důležitého druhého posla pro zahájení signálních kaskád zahrnujících PKA a sérum albumin k vyvázání cholesterolu z PM pro zvýšení její fluidity (Baldí *et al.* 2009, Naz & Rajesh 2004). Z těchto důvodů jsme pro naše pokusy použili médium s přítomností Ca^{2+} iontů a sérum albuminu.

Z konečných statistických výsledků jsou patrné odchylky od kontrolních hodnot, což může naznačovat, že spermie z *cauda epididymis* reagují na přítomnost estrogenů v médiu. Spermie mají na plazmatické membráně ERs, které váží ligandy – estrogeny obsažené v okolním prostředí a také obsahují enzym aromatázu, která může konvertovat testosteron na 17- β -estradiol a androstenedion na estron během průchodu z varlat do nadvarlat (Baldí *et al.* 2009). Po vazbě estrogenů na tyto receptory se zahajuje signální kaskáda zahrnující vzrůst intracelulárního Ca^{2+} , který může dále stimulovat AC produkující cAMP a vedoucí ke zvýšení p-Tyr (Visconti *et al.* 1995).

Během kapacitace spermií u kontrolního vzorku je počet spermií s pozitivní p-Tyr v hlavičce maximálně 9 % (Nixon *et al.* 2006, Asquith *et al.* 2004). Je třeba říci, že p-Tyr stejně jako kapacitace nejsou synchronní (Stewart-Savage 1993), nicméně pouze méně než 15 % uvolněných spermií, u kterých došlo k p-Tyr, může rozpoznat *zona pellucida* vajíčka. Potvrdila jsem, že u neovlivněných (kontrolních) spermií bylo v 90 minutách kapacitace nejvyšší procento fluorescenčně zbarvených buněk (10 – 13 %) z celkové populace spermií. Podobné závěry přináší i Dvořáková-Hortová *et al.* (2008), Nixon *et al.*

(2005) a Visconti *et al.* (1995), kteří uvádějí, že tento časově závislý vzrůst p-Tyr proteinů koreluje s kapacitačním stavem s maximy po 90 minutách inkubace. Dvořáková-Hortová *et al.* (2008) dále zmiňují zpomalení p-Tyr po 180 minutách kapacitace, která probíhá už jen u 7 – 9 % při stejných kapacitačních podmínkách. Oproti tomu publikované výsledky pokusů Stewart-Savage (1993), které byly prováděny na spermiích křečků, udávají nesynchronní p-Tyr, kdy je kapacitace maximální až po 120 minutách inkubace spermií.

U mých výsledků se v nejvyšší použité koncentraci 200 µg/l 17-β-estradiolu ukázalo signifikantně zvýšené procento p-Tyr spermií v 90 minutách kapacitace, což nekoreluje s výsledky Adeoya-Osiguwa *et al.* (2003), kteří došli k závěru, že u nekapacitovaných myších spermií 17-β-estradiol v koncentraci 1 µM (což odpovídá právě koncentraci 20 µg/l) signifikantně stimuluje kapacitaci a AR, ale u kapacitovaných spermií nemá tento estrogen vliv žádný. Adeoya-Osiguwa *et al.* (2003) si to vysvětlují tím, že během kapacitace se mění kompozice a strukturní uspořádání komponentů PM spermie včetně ERs. V koncentraci 0,2 µg/l a 20 µg/l 17-β-estradiolu se objevil statisticky významný nárůst p-Tyr proteinů spermií ve 30 minutách kapacitace, což mohlo být projevem urychlené kapacitace, ale jedná se spíše o neopodstatněné výkyvy vzniklé možnou variabilitou při barvení nebo nedostatečným počtem opakování pokusů, protože v dalším průběhu kapacitace dochází ke kolísání v naměřených hodnotách. Pro lepší čitelnost závislosti koncentrace použitého estrogenu na průběh kapacitace by bylo potřeba udělat větší počet vzorků pro získání relevantních výsledků.

Při vyhodnocení statistických výsledků u dalšího přirozeného estrogenu – estronu, jsem se setkala s několika signifikantními odchylkami, které stejně jako u výsledků 17-β-estradiolu neměly, snad kromě koncentrace 200 µg/l, prokazatelný tendenční vývoj v závislosti na čase nebo koncentraci estronu. U zmiňované nejvyšší koncentrace 200 µg/l se může jednat o předčasnou stimulaci kapacitace touto koncentrací estrogenu, která je 10-ti násobkem fyziologické koncentrace v místě ovulace samice myši, kdy je signifikantní nárůst p-Tyr proteinů ve 30 minutách kapacitace a i se statisticky významným maximem v 60 minutách kapacitace. Estron má nižší afinitu k ERβ a váže se přednostně k ERα (Smith 1999). Vyšší koncentrace estrogenů v buňkách, kde jsou estrogení receptory téměř saturované, může stále zvyšovat počet kapacitovaných buněk v závislosti na koncentraci, tudíž estrogení efekt ve vysoké koncentraci, může být zprostředkován jiným mechanis-

mem než přes estrogenní receptory, např. průnikem estrogenů narušenou membránou tzv. perturbací, kdy estrogen volně proniká do buňky (Baldi *et al.* 2009).

Naproti tomu u spermií ovlivněných estriolem se ukázal signifikantní nárůst p-Tyr ve 30 minutách kapacitace u nižších koncentrací (0,02 µg/l - 2 µg/l) tohoto estrogenu a u koncentrací 0,02 µg/l a 0,2 µg/l i v 60 minutách kapacitace. Z výsledků v těchto dvou kapacitačních časech můžeme usuzovat na určitý trend. Děd *et al.* (2010) v publikovaných výsledcích uvádějí, že specifické mechanismy (jako např. signalizace přes receptory) jsou odpovědné za citlivost k nízkým koncentracím estrogenů a k estrogenům ve vysoké koncentraci citlivé nejsou. Tato skutečnost může být podpořena i dalším statisticky významným výsledkem, kdy se u dvou nejvyšších koncentrací estriolu setkáváme v čase 5 minut s pomalejším nástupem p-Tyr v porovnání s kontrolou. Nicméně u ostatních signifikantních hodnot se neukázala žádná koncentrační nebo časová závislost.

Po vyhodnocení výsledků kapacitace spermií ovlivňovaných syntetickým estrogenem 17- α -ethynylestradiolem používajícím se jako aktivní složka hormonální antikoncepce, a u kterého byl prokázán vliv na ryby, kdy docházelo k feminizaci samčího pohlaví, k poklesu plodnosti a k redukci estrogenů v plazmě u rybích samců i samic (Křesinová *et al.* 2009, Flores-Valverde *et al.* 2010), jsem zaznamenala celkově vyšší procenta značených buněk i u kontrolní skupiny v porovnání s pokusy u ostatních estrogenů. V porovnání s kontrolou jsem vyhodnotila statisticky významný konzistentní nárůst p-Tyr proteinů hlavicky spermie ve dvou nejvyšších koncentracích 17- α -ethynylestradiolu (20 µg/l a 200 µg/l) ve 30, 90 a 120 minutách kapacitace a u konc. 20 µg/l i v 60 minutách. U tohoto syntetického estrogenu by se dal usuzovat jistý vliv na průběh kapacitace myších spermií *in vitro*, protože u přirozených hormonů se tento trend neprojevil.

Je známo, že syntetické estrogény, mezi něž používaný 17- α -ethynylestradiol patří, interferují s činností endogenních hormonů, což může mít negativní efekt na vývoj a reprodukci (Křesinová *et al.* 2009, Quinn *et al.* 2004, Van den Belt *et al.* 2003, Flores-Valverde *et al.* 2010). Tento estrogen se může vázat s větší afinitou na estrogenní receptory a urychlovat signální dráhy vedoucí ke kapacitaci. Za těchto okolností je však nutné si uvědomit, že k řádnému oplození dochází právě při správném a fyziologickém načasování procesů, jakož je kapacitace a AR, které tomuto předcházejí. Urychlení těchto procesů nemusí tudíž vést k úspěšné fertilizaci vajíčka spermií.

Gwatkin & Williams (1970) při pozorování efektu estrogenů a progesteronu na kapacitaci spermií králíka *in vitro* zjistili inhibiční efekt folikulární tekutiny s přídatkem těchto hormonů. Briggs (1973) získal podobné výsledky se spermiemi křečků. K opačnému závěru dospěl Bathla *et al.* (1999) se signifikantně vyšším počtem kapacitovaných spermií inkubovaných v izolované děloze s přídatkem estrogenů. Stejně tak Děd *et al.* (2010) prováděli výzkum vlivu estrogenů na kapacitaci kančích spermií *in vitro* a došli k závěru, že estrogény stimulují kapacitaci kančích spermií, ale rozpoznali velké rozdíly v reakci na estrogény u jednotlivých zdrojových zvířat. Takové výkyvy jsou předpokladatelné v heterogenní populaci jedinců. Tomuto jsme se snažili předejít zvolením inbredního laboratorního kmene myši BALB/c, avšak i tak jsem pozorovala určité individuální výkyvy mezi jednotlivými jedinci. Tyto výkyvy mohly být způsobeny i nepřesností měření, nedostatečnou kontrolou funkčního kapacitativního systému, malým vzorkem spermií nebo variabilitou při barvení.

Relevantní v souvislosti s individuální odpovědí jedince na vlivy estrogenů je publikace Spearow *et al.* (1999), kteří zjistili velké rozdíly mezi kmeny myši v citlivosti k narušení reprodukčního vývoje dospívajícího samce při působení 17- β -estradiolu. Rozdíly v účincích 17- β -estradiolu na jednotlivé kmeny myši, jakož i dávka 17- β -estradiolu na relativní váhu varlat a spermatogenezi byly signifikantní ($P < 0.0001$).

Nejednotnost v hodnocení procesu kapacitace je patrná z jednotlivých publikací, kde autoři analyzovali kapacitaci myších spermií buď pouze po 30 minutách (Adeoya-Osiguwa *et al.* 2003), nebo naopak až po 180 – 300 minutách (Bathla *et al.* 1999) a nebo dokonce až pouze po 360 minutách (Gwatkin & Williams 1970). Tato skutečnost může být důležitý zdroj některých protichůdných výsledků. Z publikovaných prací vyplývá, že efekt estrogenů na kapacitaci savčích spermií by měl být analyzován v pečlivě vybraných časech kapacitace, jenž odráží probíhající kapacitaci u jednotlivých druhů, proto byla u našich pokusů kapacitace monitorována ve zvolených časech pokrývajících její celkový průběh.

Ačkoliv několik předešlých studií uvádí vliv estrogenů na zralé spermie u různých druhů živočichů, je zde několik rozporných výsledků v této oblasti. Francavilla *et al.* (2003) uvádějí, že preinkubace lidských spermií s estrogenem 17- β -estradiolem nepozměňuje schopnost spermie fúzovat s oocytem. Naproti tomu Adeoya-Osiguwa *et al.* (2003)

zaznamenali stimulační efekt 17- β -estradiolu a rozdílných xenoestrogenů na kapacitaci, AR a fertilizační schopnost myších spermií.

Nelze říci, že z mých výsledků by vyplývalo, že estrogény měly jednoznačný vliv na kapacitaci. Kromě konzistentního signifikantního zvýšení procent p-Tyr spermií v koncentraci 20 $\mu\text{g/l}$ a 200 $\mu\text{g/l}$ syntetického 17- α -ethynylestradiolu, kdy byl patrný výraznější trend u nejvyšších koncentrací v průběhu celé kapacitace. Z naměřených hodnot estronu lze uvést tendenční vývoj u nejvyšší koncentrace 200 $\mu\text{g/l}$ v průběhu času kapacitace a u estriolu lze spekulovat o určitém trendu naopak u 2 nejnižších koncentrací 0,02 $\mu\text{g/l}$ a 0,2 $\mu\text{g/l}$. U 17- β -estradiolu nelze interpretovat žádná závislost na koncentraci estrogenu a čase kapacitace. Pro hodnotnější výsledky by bylo třeba udělat násobnější opakování pokusů.

Dalším cílem bylo porovnat schopnost spermií projít CaI indukovanou AR v podmínkách *in vitro* po ovlivnění spermií estrogenními hormony 17- β -estradiolem, estronem, estriolem a syntetickým 17- α -ethynylestradiolem. Úspěšný průběh AR je po kapacitaci další důležitý krok nutný k snadnému průniku spermie skrz vaječné ochranné obaly a oplození vajíčka. Pohyb Ca^{2+} iontů z extracelulárního média do intracelulární oblasti spermie je kritický krok, který reguluje vylití akrozómu, protože zvýšená koncentrace Ca^{2+} iontů vede k fúzi membrán a exocytóze akrozómu (De Blas 2002, Gupta & Bhandari 2011). CaI slouží jako nefyziologický induktor AR, který otevřením Ca^{2+} kanálů umožňuje vtok Ca^{2+} iontů do buňky, což vede k aktivaci uvolnění lytických proteinů z akrozómu a zcela odráží tento jev probíhající *in vivo* (Yamagata *et al.* 1998).

Průběh AR se u kontrolních spermií myšího kmene BALB/c v prvním testovaném čase (kap5 bez CaI) a druhém testovaném čase (kap30 + CaI5*, kdy CaI působil 5 minut) shodoval s výsledkem Johnson *et al.* (2007), kteří sledovali vývoj AR v průběhu kapacitace *in vitro* u různých druhů myší, jakožto i u kmene BALB/c. V průběhu času se procenta spermií, u kterých proběhla AR, zvyšovala, ale u našich výsledků byl po shodném počátečním rozvoji, nárůst AR intenzivnější. Jedním z důvodů by mohlo být použití CaI jako induktoru AR, na rozdíl od Johnson *et al.* (2007), kteří ho nepoužili.

U přirozeně nejhojnějšího estrogenu 17- β -estradiolu jsme u všech zkoumaných koncentrací shodně zaznamenali po 30 minutách kapacitace a pěti minutovém působení

CaI (kap30 + CaI5*) statisticky významně nižší procento spermií, u kterých proběhla AR. Podobný trend v procentuálním zastoupení spermií po AR se objevil u dalšího přirozeného estrogeneru estronu, kdy se u jeho vyšších koncentrací (2 - 200 µg/l) v čase kap30 + CaI5* ukázaly statisticky významně nižší procenta spermií, u kterých došlo k AR. P-Tyr a polymerizace aktinu následují jedna po druhé v přesně stanoveném pořadí. P-Tyr, jako jedna z mnoha dalších, vyvolává polymerizaci aktinu, která brání předčasné fúzi PM a OAM, která vede k AR (Brener *et al.* 2003, Breitbart *et al.* 2005). Pokud je p-Tyr zvýšená, může to mít za následek neschopnost depolymerizace filamentárního aktinu, a proto může dojít k bloku AR, dokud není p-Tyr zredukována. To může naznačovat, že v našem případě došlo k opoždění AR oproti kontrole, protože mohla být předčasně sepnutá dráha p-Tyr, která nemohla být dokončena polymerizací aktinu a jeho následnou depolymerizací. Načasování všech procesů spojených s molekulárními změnami vedoucími ke kapacitaci a AR je velmi důležité a nesprávné nastavení sledu událostí může vést ke snížení schopnosti oplození spermie.

Data ale přesně nekorelují s výsledky p-Tyr u 17-β-estradiolu, kdy se projevil signifikantní nárůst p-Tyr jen u dvou koncentrací estrogeneru, ale ke zpomalení AR docházelo ve všech koncentracích. To může značit, že byly výsledky AR nebo p-Tyr špatně vyhodnoceny. Po porovnání výsledků se statistickým vyhodnocením průběhu p-Tyr u estronu můžeme ve stejném čase kapacitace (30 minut) u spermií, ovlivněných třemi nejvyššími koncentracemi estronu (2- 200 µg/l), vidět jistou korelaci s průběhem AR, kdy dochází k p-Tyr u signifikantně vyššího procenta spermií, tedy k časnějšímu zahájení p-Tyr než u kontroly.

Z výsledků hodnocení estriolu nelze usuzovat na žádný trend ve vývoji AR. Není zde patrná žádná závislost na koncentraci estronu nebo na časech, v kterých byly vzorky odebírány a statisticky signifikantní hodnoty jsou velmi náhodné.

U syntetického 17-α-ethynylestradiolu by se po porovnání s předchozím estrogenem 17-β-estradiolem a estronem dal usuzovat časový posun statisticky významně nižšího procenta spermií po AR, který se vyskytuje v kapacitačním čase kap30 + CaI60 u většiny koncentrací. Pokud bych se pokusila interpretovat výsledky v čase kap120 + CaI60, kdy naopak došlo k signifikantnímu zvýšení počtu spermií, které podstoupily AR, u vzorků s koncentrací estrogeneru 0,02 µg/l, 0,2 µg/l a 200 µg/l, tak se mohlo jednat o kompenzaci pomalejšího nástupu AR.

Je diskutabilní, zda můžeme považovat za průkazné výsledky průběhu AR u 17- α -ethynylestradiolu, protože se zde statisticky signifikantní odchylky od kontrolních hodnot objevují náhodně a bez zjevné závislosti na koncentraci, čase kapacitace nebo době působení CaI.

Po statistickém vyhodnocení výsledků indukované AR jsou u spermií ovlivněných estrogenu patrné odchylky od hodnot kontrolních vzorků. Většina těchto statisticky významných rozdílů neprokazuje závislost na koncentraci, typu steroidu, době působení CaI nebo na čase, v kterém byly vzorky odebírány. Nicméně lze říci, že procento myších spermií s dokončenou AR vzrůstalo s kapacitačním časem u všech koncentracích daného estrogenu. Pro větší průkaznost výsledků by ale bylo nutné provést pokusy s násobnějším opakováním.

Naproti tomu Děd *et al.* (2010) dokázali signifikantní účinek estrogenu (17- β -estradiolu, estronu, estriolu a 17- α -ethynylestradiolu) na AR indukovanou pomocí solubilizované ZP a CaI, kdy byl počet spermií po AR signifikantně vyšší ve všech experimentálních skupinách. Jejich výsledky ze ZP a CaI indukované AR svědčí o tom, že estrogenu mají skutečné fyziologické účinky na kapacitaci spermií. Správné fyziologické načasování procesů kapacitace a AR je důležité pro úspěšnou fertilizaci (Nixon *et al.* 2006), ke které při urychlení těchto procesů nemusí docházet. Spermie, které prodělají AR předčasně, ztrácí svůj fertilizační potenciál, nejsou schopny pronikat skrz *cumulus oophorus* a vázat se na ZP.

Moje výsledky SDS-PAGE elektroforézy nám nepřinesly přesvědčivé důkazy o ovlivnění probíhající kapacitace jednotlivými estrogenu, protože se neshoduje proteinové zastoupení u kontrolních vzorků použitých pro jednotlivé estrogenu. Vzorky spermií pro jednu SDS-PAGE elektroforézu, byly odebrány z jednoho myšího samce z inbredního laboratorního kmene BALB/c u daného typu estrogenu jsem pokus prováděla pouze třikrát. Pokusy nebyly provedeny v dostatečném množství a kvalitě, proto z výsledků nemůžeme vyvozovat závěry.

Tuto metodu používal i Visconti *et al.* (1995), který pro získání relevantnějších výsledků pokusy zopakoval minimálně pětkrát s podobnými výsledky.

U jednotlivých zdrojových zvířat byly po imunodetekci proteinů patrné velké výkyvy p-Tyr proteinů v průběhu kapacitace *in vitro* u kontrolních i experimentálních skupin spermií. Toto možné zkreslení výsledků může být způsobeno špatnou manipulací se vzor-

ky spermií, které se pro hodnocení použily (např. nepřesností v nánosu vzorků, chybné označení vzorků při odběru, chybou v pipetování) nebo nedodržením správného postupu při použití metody SDS – PAGE.

Nicméně můžeme říci, že u spermií v průběhu kapacitace k nárůstu p-Tyr docházelo, protože jsme detekovali pozitivní p-Tyr u specifických proteinů o molekulové hmotnosti Mw v rozmezí 40-120 kDa u všech pozorovaných vzorků spermií. Výsledky Visconti *et al.* (1995) prokazují vzrůst p-Tyr u proteinů Mw v rozmezí 40-120 kDa v průběhu kapacitace a určují p95/116 hexokinázu (95 kDa) jako hlavní protein s fosforylovanými tyroziny na membráně myších spermií, který je neměnný během inkubační periody. U myší byly popsány další proteiny, u kterých dochází k p-Tyr v průběhu kapacitace. Jsou to 2 chaperony - endoplasmin (erp99 – 52 kDa) a heat shock protein 60 (hsp60 – 75 kDa), které se vyskytují na PM hlavičky spermie. Aktivací těchto dvou proteinů, pomocí p-Tyr během kapacitace, dochází ke spuštění konformačních změn usnadňujících sestavení ZP receptorového komplexu na povrchu spermie. Po rozpoznání a vazbě receptorů kapacitované spermie s ligandy na ZP (Tulsiani *et al.* 1997) se spouští signální dráha vedoucí k depolymerizaci F-aktinu na G-aktin a tím se dostává PM blíže k OAM (Spungin *et al.* 1995), které po fúzi a formaci váčků umožní uvolnění složek akrozómu (Abou-haila & Tulsiani 2009, Asquith *et al.* 2004, Breitbart *et al.* 2005, Naz & Rajesh 2004). U lidských spermií jsou to například proteiny ERK-1 a ERK-2 (kinázy regulující extracelulární signály), u kterých také probíhá p-Tyr.

Je diskutabilní, zda můžeme považovat signifikantní odchylky v mých výsledcích za průkazné, protože se u většiny koncentrací daného estrogenu objevují náhodně a bez zjevné závislosti na koncentraci, čase kapacitace nebo na typu estrogenu, proto nelze jednoznačně říci, že estrogeny měly vliv na průběh kapacitace nebo AR.

Nicméně lze říci, že k určitému vývoji p-Tyr proteinů v průběhu času docházelo, a že kromě času 5 minut, kdy u experimentálních skupin došlo ke snížení AR, procento myších spermií s dokončenou AR vzrůstalo s kapacitačním časem u všech koncentracích daného estrogenu. Pro hodnotnější výsledky by bylo třeba pokusy s myšími spermii ovlivněnými danými koncentracemi estrogenů zopakovat vícekrát než bylo provedeno .

6. Závěr

Z konečných statistických výsledků studie vlivu vybraných přírodních estrogenů 17- β -estradiolu, estronu, estriolu a syntetického 17- α -ethynylestradiolu na kapacitaci myších spermií *in vitro* jsem z hodnocení míry fosforylace proteinů na tyrozinových zbytcích v hlavičce spermií neprokázala jednoznačný koncentrační nebo časový vliv těchto hormonů. Zaznamenala jsme sice signifikantní odchylky od kontrolních hodnot, což by mohlo naznačovat, že spermie z *cauda epididymis* na estrogeny reagují. Kromě konzistentního signifikantního zvýšení procent p-Tyr spermií ve dvou nejvyšších koncentracích syntetického 17- α -ethynylestradiolu, kdy byl patrný výraznější trend u nejvyšších koncentrací v průběhu celé kapacitace a u 2 nejnižších koncentrací estriolu v 30 a 60 minutách kapacitace se jedná spíše o nepřesnosti hodnocení nebo variabilitu při barvení, protože ke kolísání v naměřených hodnotách dochází bez zjevné závislosti na typu estrogenu, jeho koncentraci nebo na době, po kterou byly spermie kapacitovány.

Ze statistických výsledku hodnocení stavu akrozómu myších spermií po CaI indukované AR *in vitro* jsem zaznamenala u spermií ovlivněných 17- β -estradiolem a estronem jistý trend, kdy docházelo ve 30 minutách kapacitace a po pěti minutovém působení CaI k dokončení AR u statisticky významně nižšího procenta spermií v porovnání s kontrolou, kdy se pravděpodobně jednalo o pomalejší nástup AR. Další statisticky signifikantní odchylky od kontrolních hodnot, které jsem zaznamenala, se objevovaly náhodně a bez závislosti na koncentraci, typu steroidu, čase kapacitace nebo době působení CaI. Nicméně lze konstatovat, že procento myších spermií s dokončenou AR vzrůstalo s kapacitačním časem u všech koncentrací daného estrogenu.

Výsledky elektroforetického hodnocení tyrozinové fosforylace z lyzátu celých spermií nedokazují ovlivnění probíhající kapacitace jednotlivými estrogeny, protože pokusy nebyly provedeny v dostatečném množství a kvalitě. Docházelo ke špatné manipulaci se vzorky spermií, k nepřesnosti v nánosu vzorků nebo chybnému označení vzorků při odběru.

Při získávání výsledků k této diplomové práci jsem si osvojila používání laboratorních metod spojených s technikami přípravy spermií pro *in vitro* oplození, a to kapacitaci myších spermií *in vitro* nebo indukci AR za použití CaI u myších spermií *in vitro*, dále fluorescenční barvení a metodu SDS-PAGE s následnou imunodetekcí proteinů.

7. Seznam použité literatury

- Abou-Haila A., Tulsiani D. R. P. (2000): Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys.* 379(2): 173-82.
- Abou-Haila A., Tulsiani D. R. P. (2009): Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 485(1): 72-81.
- Adeoya-Osiguwa S. A., Markoulaki S., Pocock V., Milligan S. R., Fraser L. R. (2003): 17beta-Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. *Hum Reprod.* 18(1): 100-107.
- Agrawal R. C., Kumar S. (1999): Hepato-toxic effect of diuron in albino rats. *Indian J Exp Biol.* 37(5): 503-4.
- Aherne G. W., Briggs R. (1989): The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. *J Pharm Pharmacol.* 41(10) :735-6.
- Aitken R. J., Harkiss D., Knox W., Paterson M., Irvine D. S. (1998): A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci.* 5: 645-56.
- Andersson A. M., Skakkebaek N. E. (1999): Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *European Journal of Endocrinology.* 6: 477-485.
- Aquila S., Sisci D., Gentile M., Middea E., Catalano S., Carpino A., Rago V., Andò 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. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(3): 1443-51.
- Asquith K. L., Baleato R. M., McLaughlin E. A., Nixon B., Aitken R. J. (2004): Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *J Cell Sci.* 117: 3645-3657.
- Baba T., Azuma S., Kashiwabara S. I., Toyoda Y. (1994a): Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem.* 269: 31845-31849.
- Baldi E., Luconi M., Bonaccorsi L., Krausz C., Forti G. (1996): Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci.* 1: 189-205.
- Baldi E., Luconi M., Bonaccorsi L., Muratori M., Forti G. (2000): Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci.* 5: E110-23.
- Baldi E., Luconi M., Muratori M., Marchiani S., Tamburrino L., Forti G. (2009): Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Mol Cell Endocrinol.* 308(1-2): 39-46.
- Bathla H., Guraya S. S., Sangha G. K. (1999): Role of estradiol in the capacitation and acrosome reaction of hamster epididymal spermatozoa in the isolated uterus of mice incubated *in vitro*. *Indian J Physiol Pharmacol.* 43(2): 211-217.

- Beato M., Herlich P., Schutz G. (1995): Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*. 83: 851-857.
- Benoff S. (1997): Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol Hum Reprod*. 3(7): 599-637.
- Bergman M. D., Schachter B. S., Karelus K., Combastriaris E. P., Garcia T., Nelson J. F. (1992): Up-regulation of the uterine estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid during the mouse estron cycle: the role of estradiol. *Endocrinology* 130: 1923-1930.
- De Blas G., Michaut M., Treviño C L., Tomes C. N., Yunes R., Darszon A., Mayorga L. S. (2002): The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J Biol Chem*. 277(51): 49326-31.
- Breitbart H., Spungin B. (1997): The biochemistry of the acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction*. 3: 195–202.
- Breitbart H., Naor Z. (1999): Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Rev Reprod*. 4(3): 151-9.
- Brener E., Rubinstein S., Cohen G., Shternall K., Rivlin J., Breitbart H. (2003): Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*. 68(3): 837-45.
- Briggs M. H. (1973): Steroid hormones and the fertilizing capacity of spermatozoa. *Steroids*. 22(4): 547-553.
- Brown T. R. (1999): Steroid Hormones, Overview. In: Knobil E., Neill J. D. (eds.): *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press. 634-644.
- 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. (1997): Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 389(6652): 753-8.
- Buffone M. G., Foster J. A., Gerton G. L. (2008): The role of the acrosomal matrix in fertilization. *Int J Dev Biol*. 52(5-6): 511-22.
- Bureau M., Bailey J. L., Sirard M. A. (2002): Binding regulation of porcine spermatozoa to oviductal vesicles *in vitro*. *J Androl*. 23(2): 188-93.
- Carlsen E., Giwercman A., Keiding N., Skakkebaek N. E. (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J*. 305: 609–613.
- Carreau S., Hess R. A. (2010): Oestrogens and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 365(1546): 1517-35.
- Clift L. E., Andriikova P., Frolikova M., Stopka P., Bryja J., Flanagan B. F., Johnson P. M., Dvorakova-Hortova K. (2009): Absence of spermatozoal CD46 protein expression and associated rapid acrosome reaction rate in striped field mice (*Apodemus agrarius*). *Reprod Biol Endocrinol*. 7: 29.
- Ded L., Dostalova P., Dorosh A., Dvorakova-Hortova K., Peknicova J. (2010): Effect of estrogens on boar sperm capacitation *in vitro*. *Reprod Biol Endocrinol*. 8(1): 87.

- Delbès G., Levacher C., Habert R. (2006): Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction*. 132(4):527-38.
- Delclos K. B., Bucci T. J., Lomax L. G., Latendresse J. R., Warbritton A., Weis C. C., Newbold R. R. (2001): Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod Toxicol*. 15: 647-63.
- 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. (2003): Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem*. 278: 7001-7009.
- Dow M. P., Bavister B. D. (1989): Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation *in vitro*. *Gamete Res*. 23(2): 171-80.
- Dvořáková-Hortová K., Šandera M., Jursová M., Vašinová J., Pěkníková J. (2008): The influence of fluorides on mouse sperm capacitation. *Anim Reprod Sci*. 108(1-2): 157-70.
- Eddy E. M., O'Brien D. O. (1994): The Spermatozoon. In: Knobil E., Neill J. D. (eds.): *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 29-77.
- Eddy E. M., Washburn T. F., Bunch D. O., Goulding E. H., Gladen B. C., Lubahn D. B., Korach K. S. (1996): Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology*. 137: 4796-4805.
- Filardo E. J., Thomas P. (2005): GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF repase. *Trends Endocrinol Metab*. 16(8): 362-7.
- Flores-Valverde A. M., Horwood J., Hill E. M. (2010): Disruption of the steroid metabolome in fish caused by exposure to the environmental estrogen 17alpha-ethinylestradiol. *Environ Sci Technol*. 44(9): 3552-8.
- Francavilla F., Romano R., Pandolfi C., Macerola B., Santucci R., Necozone S., Francavilla S. (2003): Evaluation of the effect of 17alphaOH-progesterone and 17beta-oestradiol on human sperm ability to fuse with oocytes: comparison and possible interference with the effect of progesterone. *Int J Androl*. 26(6): 342-7.
- Fraser L. R. (1982): Ca²⁺ is required for mouse sperm capacitation and fertilization *in vitro*. *J Androl*. 3: 412-419.
- Gehm B. D., McAndrews J. M., Chien P. Y., Jameson J. L. (1997): Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94: 14138-14143.
- Gilbert S. F. (2006): *Developmental Biology*. 8th ed. Sunderland (MA), Sinauer Associates, Inc.
- Gomes R. L., Scrimshaw M. D., Lester J. N. (2009): Fate of conjugated natural and synthetic steroid estrogens in crude sewage and activated sewage sludge batch studies. *Environ Sci Technol*. 43(10): 3612-3618.
- Grasa P., Colas C., Gallego M., Monteagudo L., Muinõ-Blanco T., Cebrián-Pérez J. A. (2009): Changes in content and localization of proteins phosphorylated at tyrosine, serine and threonine residues during ram sperm capacitation and acrosome reaction. *Reproduction*. 137(4): 655-67.

- Gupta S. K., Bhandari B. (2011): Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian J Androl.* 13(1): 97-105. Review.
- Gustafsson J. A. (1999): Estrogen receptor beta – a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol.* 163: 379-383.
- Gwatkin R. B., Williams D. T. (1970): Inhibition of Sperm Capacitation *in vitro* by Contraceptive Steroids. *Nature.* 227(5254): 182-183.
- Hardy D. M., Oda M. N., Friend D. S., Huang T. T. (1991): A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction. *Biochem J.* 275 (3): 759-66.
- Hess R. A. (2000): Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Rev Reprod.* 5(2): 84-92.
- Hess R. A. (2003): Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 1: 52.
- Hess R. A., Bunick D., Lee K. H., Bahr J., Taylor J. A., Korach K. S., Lubahn D. B. (1997): A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature.* 390: 509-512.
- Hess R. A., Bunick D., Bahr J. (2001): Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract - a review. *Mol Cell Endocrinol.* 178(1-2): 29-38.
- Hewitt S. C., Deroo B. J., Korach K. S. (2005): Signal transduction. A new mediator for an old hormone? *Science.* 307(5715): 1572-3.
- Holt W. V., Harrison R. A. (2002): Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway: between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation. *J Androl.* 23(4): 557-65.
- Hornung M. W., Zabel E. W., Peterson R. E. (1996): Toxic equivalency factors of polybrominated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and polyhalogenated diphenyl ether congeners based on rainbow trout early life stage mortality. *Toxicol Appl Pharmacol.* 140(2): 227-34.
- <http://e.hormone.tulane.edu/learning/docking-receptor-binding.html>
- <http://www.scienceblog.com/community/older/1997/B/199701564.html>
- <http://cs.wikipedia.org/wiki/Spermie>
- <http://en.wikipedia.org>
- Chang M. C. (1984): The meaning of sperm capacitation. *J Androl.* 5: 45-50.
- Janulis L., Hess R. A., Bunick D., Nitta H., Janssen S., Asawa Y. Bahr J. M. (1996): Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase which decreases as sperm traverse the epididymis. *J Androl.* 17(2): 111-116.
- Johnson R. D. a 10 dalších. (1998): Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to early life stage brook trout (*Salvelinus fontinalis*) following parental dietary exposure. *Environ.Toxicol. Chem.* 17: 2408-2421.

- Johnson P. M., Clift L. E., Andrlíkova P., Jursova M., Flanagan B. F., Cummerson J. A., Stopka P., Dvorakova-Hortova K. (2007): Rapid sperm acrosome reaction in the absence of acrosomal CD46 expression in promiscuous field mice (*Apodemus*). *Reproduction*. 134(6): 739-47.
- Jones R. (1998): Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl*. 53: 73-84.
- Jones M. E., Simpson E. R. (2000): Oestrogens in male reproduction. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 14(3): 505-16.
- Khanal S. K., Xie B., Thompson M. L., Sung S., Ong S. K., Van Leeuwen J. (2006): Fate, transport, and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems. *Environ Sci Technol*. 40(21):6537-46.
- Kolch W. (2000): Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*. (351)2: 289-305. Review.
- Korach K. S. (2000): Estrogen receptor knock-out mice: molecular and endocrine phenotypes. *J Soc Gynecol Invest*. 7: 16-17.
- Křesinová Z., Svobodová K., Cajthaml T. (2009): Mikrobiální degradace endokrinně disruptivních látek. *Chemické listy*. 103: 200-207.
- Kuiper G. G., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Häggblad J., Nilsson S., Gustafsson J. A. (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 138(3): 863-70.
- Kumi-Diaka J., Townsend J. (2003): Toxic potential of dietary genistein isoflavone and beta-lapachone on capacitation and acrosome reaction of epididymal spermatozoa. *J Med Food*. 6(3): 201-8.
- Landcake P., Price R. J. (1976): The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol*. 9: 77-86.
- Leclerc P., de Lamirande E., Gagnon C. (1996): Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod*. 55(3): 684-92.
- Levin E. R. (2008): Rapid signaling by steroid receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 295(5): 1425-30.
- Loeser C. R., Tulsiani D. R. (1999): The role of carbohydrates in the induction of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Biol Reprod*. 60(1): 94-101.
- Luconi M., Porazzi I., Ferruzzi P., Marchiani S., Forti G., Baldi E. (2005): Tyrosine Phosphorylation of the A Kinase Anchoring Protein 3 (AKAP3) and Soluble Adenylate Cyclase Are Involved in the Increase of Human Sperm Motility by Bicarbonate. *Biol Reprod*. 72(1): 22-32.
- Luconi M., Francavilla F., Porazzi I., Macerola B., Forti G., Baldi E. (2004): Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids*. 69(8-9): 553-559.

- Luconi M., Forti G., Baldi E. (2002): Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 80: 369-381.
- Luconi M., Muratori M., Forti G., Baldi E. (1999): Identification and Characterization of a Novel Functional Estrogen Receptor on Human Sperm Membrane That Interferes with Progesterone Effects *J Clin Endocrinol Metab.* 84(5): 1670-1678.
- Mayor S. (2005): ACEing GPI release. *Nat Struct Mol Biol.* 12(2): 107-8.
- Mayorga L. S., Tomes C. N., Belmonte S. A. (2007): Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life* 59(4-5):286-92.
- Melzoch K., Filip V., Buckiova D., Hanzlikova I., Smidrkal J. (2000): Resveratrol – occurrence in wine originating from Czech vineyard regions and effect on human health. *Czech J Food Sci.* 18: 35-40.
- Meyers S. A., Rosenberger A. E. (1999): A plasma membrane-associated hyaluronidase is localized to the posterior acrosomal region of stallion sperm and is associated with spermatozoal function. *Biol Reprod.* 61(2): 444-51.
- Nagao T., Yoshimura S., Saito Y., Nakagomi M., Usmi K., Ono H. (2001): Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reprod Toxicol.* 15: 399-411.
- Nawata H., Chong M. T., Bronzert D., Lippman M. E. (1981): Estradiol-independent growth of a subline of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Biol Chem.* 256(13): 6895-902.
- Naz R. K., Ahmad K., Kaplan P. (1992): Expression and function of ras proto-oncogene proteins in human sperm cells. *J Cell Sci.* 3: 487-94.
- Naz R. K., Rajesh P. B. (2004): Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2: 75.
- Nelson L. R., Bulun S. E. (2001): Estrogen production and action. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45: 116–24.
- Nishimura I., Ui-Tei K., Saigo K., Ishii H., Sakuma Y., Kato M. (2008): 17- β -Estradiol at physiological concentrations augments Ca^{2+} -activated K^+ currents via estrogen receptor β in the gonadotropin-releasing hormone neutral cell line GT1-7. *Endocrinology.* 149: 774-782.
- Nixon B., MacIntyre D. A., Mitchell L. A., Gibbs G. M., O'Bryan M., Aitken R. J. (2006): The identification of mouse sperm-surface-associated proteins and characterization of their ability to act as decapacitation factors. *Biol Reprod.* 74(2): 275-87.
- O'Toole C. M., Arnoult C., Darszon A., Steinhardt R. A., Florman H. M. (2000): Ca^{2+} entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell.* 11(5): 1571-84.
- Ouellette Y., Price C. A., Carrière P. D. (2005): Follicular fluid concentration of transforming growth factor-beta1 is negatively correlated with estradiol and follicle size at the early stage of development of the firstwave cohort of bovine ovarian follicles. *Domest Anim Endocrinol.* 29(4): 623-633.

- Pauwels B., Wille K., Noppe H., De Brabander H., Van de Wiele T., Verstraete W., Boon N. (2008): 17- α -estradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17- β -estradiol and estriol. *Biodegradation*. 19(5): 683-93.
- Pačes T. (2002): Estrogeny – ženské hormony ve vltavské a pitné vodě v Praze. Česká geologická služba, Praha.
- Pedram A., Razandi M., Sainson R. C. A., Kim J. K., Hughes C. C., Levin E. R. (2007): A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 282: 22278–22288.
- Peknicova J., Kyselova V., Buckiova D., Boubelik M. (2002): Effect of an endocrine disruptor on mammalian fertility. Application of monoclonal antibodies against sperm proteins as markers for testing sperm damage. *Amer J Reprod Immunol*. 47: 311-318.
- Prossnitz E. R., Arterburn J. B., Sklar L. A. (2007): GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol*. 265-266:138-42.
- Quinn B., Gagné F., Costello M., McKenzie C., Wilson J., Mothersill C. (2004): The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquat Toxicol*. 66(3): 279-92.
- Raven G., de Jong F. H., Kaufman J. M., de Ronde W. (2006): In Men, Peripheral Estradiol Levels Directly Reflect the Action of Estrogens at the Hypothalamo-Pituitary Level to Inhibit Gonadotropin Secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 91(9): 3324-8.
- Revankar C. M., Cimino D. F., Sklar L. A., Arterburn J. B., Prossnitz E. R. (2005): A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science*. 307(5715): 1625-1630.
- Rosenfeld C. S., Ganjam V. K., Taylor J. A., Yuan X., Stiehr J. R., Hardy M. P., Lubahn D. B. (1998): Transcription and Translation of Estrogen Receptor- β in the Male Reproductive Tract of Estrogen Receptor- α Knock-Out and Wild-Type Mice. *Endocrinology*. 139(6): 2982-2987.
- Saberwal G. S., Sharma M. K., Balasinar N., Choudhary J., Juneja H. S. (2002): Estrogen receptor, calcium mobilization and rat sperm motility. *Mol Cell Biochem*. 237(1-2): 11-20.
- Savouret J. F., Quesne M. (2002): Resveratrol and cancer: a review *Biomed Pharmacother*. 56: 84-87.
- Siemann G. J., Creasy L. L. (1992): Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Ecology and Viticulture*. 43: 49-52.
- Smith C. L. (1999): Estrogens, Overview. In: Knobil E., Neill J. D. (eds.): *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press. 119-126.
- Snyder M. J., Mulder E. P. (2001): Environmental endocrine disruption in decapod crustacean larvae: hormone titers, cytochrome P450, and stress protein responses to heptachlor exposure. *Aquat Toxicol*. 55(3-4): 177-90.
- Solakidi S., Psarra A-M. G., Nikolaropoulos S., Sekeris C. E. (2005): Estrogen receptors α and β (ER α and ER β) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ER β and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum Reprod*. 20(12): 3481-7.

- Son J. H., Meizel S. (2003): Evidence Suggesting That the Mouse Sperm Acrosome Reaction Initiated by the Zona Pellucida Involves an $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor1. *Biology of reproduction*. 68: 1348–1353.
- D'Souza R., Pathak S., Upadhyay R., Gaonkar R., D'Souza S., Sonawane S., Gill-Sharma M., Balasinor N. H. (2009): Disruption of tubulobulbar complex by high intratesticular estrogens leading to failed spermiation. *Endocrinology*. 150(4): 1861-9.
- Spearow J. L., Doemeny P., Sera R., Leffler R., Barkley M. (1999): Genetic variation in susceptibility to endocrine disruption by estrogen in mice. *Science*. 285(5431): 1259-61.
- Spungin B., Margalit I., Breitbart H. (1995): Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J Cell Sci*. 108 (6): 2525-35.
- Stefankiewicz J., Kurzawa R., Drozdziak M. (2006): Environmental factors disturbing fertility of men. *Ginekol Pol*. 77(2): 163-9.
- Stewart-Savage J. (1993): Effect of Bovine Serum Albumin Concentration and Source on Sperm Capacitation in the Golden Hamster. *Biol Reprod*. 49(1): 74-81.
- Suarez S. S., Ho H. C. (2003): Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 49(3): 351-6.
- Swan S. H., Elkin E. P., Fenster L. (1997): Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect*. 105(11): 1228-32.
- Tarín J. J., Trounson A. O. (1993): Zona-free sperm penetration assay and inducers of the acrosome reaction: a model for sperm microinjection under the zona pellucida. *Mol Reprod Dev*. 35(1): 95-104.
- Tarlatzis B. C., Pazaitou K., Bili H., Bontis J., Papadimas J., Lagos S., Spanos E., Mantalenakis S. (1993): Growth hormone, oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid after ovarian stimulation with various regimes for assisted reproduction. *Hum Reprod*. 8(10): 1612-1616.
- Tash J. S., Means A. R. (1983): Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod*. 28(1): 75-104.
- Thomas P., Dong J. (2006): Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 102(1-5): 175-9.
- Thundathil J., de Lamirande E., Gagnon C. (2002): Different signal transduction pathways are involved during human sperm capacitation induced by biological and pharmacological agents. *Mol Hum Reprod*. 8(9): 811-6.
- Tulsiani D. R., Yoshida-Komiya H., Araki Y. (1997): Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod*. 57(3): 487-94.
- Tulsiani D. R., Abou-Haila A., Loeser C. R., Pereira B. M. (1998): The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res*. 240(2): 151-64.

- Tulsiani D. R., Zeng H. T., Abou-Haila A. (2007): Biology of sperm capacitation: evidence for multiple signalling pathways. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 63: 257-72.
- Tyler C. R., Jobling S., Sumpter J. P. (1998): Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit Rev Toxicol.* 28(4): 319-61.
- Urner F., Leppens-Luisier G., Sakkas D. (2001): Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose. *Biol Reprod.* 64(5): 1350-7.
- Van den Belt K., Verheyen R., Witters H. (2003): Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicol Environ Saf.* 56(2): 271-81.
- Visconti P. E., Bailey J. L., Moore G. D., Pan D., Olds-Clarke P., Kopf G. S. (1995): Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development.* 121(4): 1129-37.
- Visconti P. E., Moore G. D., Bailey J. L., Leclerc P., Connors S. A., Pan D., Olds-Clarke P., Kopf G. S. (1995): Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development.* 121(4): 1139-50.
- Visconti P. E., Galantino-Homer H., Ning X., Moore G. D., Valenzuela J. P., Jorgez C. J., Alvarez J. G., Kopf G. S. (1999): Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem.* 274(5): 3235-42.
- Visconti P. E., Ning X., Fornés M. W., Alvarez J. G., Stein P., Connors S. A., Kopf G. S. (1999): Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol.* 214(2): 429-43.
- Yamagata K., Murayama K., Okabe M., Toshimori K., Nakanishi T., Kashiwabara S., Baba T. (1998): Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *J Biol Chem.* 273(17): 10470-4.
- Yanagimachi R. (1994): Mammalian fertilization. In: Knobil E., Neill J. D. (eds.): *The Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press, 189-317.
- Yang H. J. (2006): Feminization and reduction of testicular weight in mouse sparganosis. *Korean J Parasitol.* 44(2): 167-9.
- Zabel E. W., Peterson R. E. (1996): TCDD-like activity of 2,3,6,7-tetrachloroxanthene in rainbow trout early life stages and in a rainbow trout gonadal cell line (RTG-2) *Environ Toxicol Chem.* 15: 2305-2309.
- Zeng Y., Clark E. N., Florman H. M. (1995): Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol.* 171(2): 554-63.
- Zhou Q., Nie R., Prins G. S., Saunders P. T., Katzenellenbogen B. S., Hess R. A. (2002): Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl.* 23(6): 870-81

