

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI,
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Morfologie a funkční charakteristiky
lidských gamet –
možnosti klinického uplatnění**

**Morphology and Functional Characteristics
of Human Gametes –
the Potential Clinical Application**



Dizertační práce

Plzeň 2014

Disertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu Anatomie, histologie a embryologie na **Ústavu histologie a embryologie LF UK v Plzni**.

Uchazeč: **MUDr. Miroslava Čedíková**

Školitel: **doc. MUDr. Milena Králíčková, Ph.D.**

Konzultant: **doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D.**

Oponenti: **doc. MUDr. Marie Ludvíková, Ph.D.**

Ústav biologie, Lékařská fakulta v Plzni
Karlovarská 48, 301 66 Plzeň

MUDr. Lucie Hubičková-Heringová, Ph.D.

Ústav histologie a embryologie, 3. Lékařská fakulta v Praze
Ruská 87, 100 00 Praha 10

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba dizertační práce před komisí pro obhajobu dizertačních prací studijního programu Anatomie, histologie a embryologie se koná dne: **30. 9. 2014**

Místo obhajoby: prostory Ústavu histologie a embryologie, Karlovarská 48, Plzeň

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy v Praze, Husova 3, Plzeň.

doc. MUDr. Jitka Kočová, CSc.

předseda komise pro obhajobu disertačních prací studijního programu
Anatomie, histologie a embryologie
Ústav histologie a embryologie LF v Plzni

Abstrakt

Snížená plodnost je rostoucím problémem celé populace fertálního věku. V současné době postihuje 10 – 15% párů, asi 10% z nich nedokážeme zatím pomoci žádnou z metod asistované reprodukce. Na významu tak získává snaha o identifikaci nových prognostických markerů, které by napomohly ke zvýšení efektivity léčby neplodnosti.

První část práce je zaměřena na studium hladin vybraných hormonů a markerů oxidačního stresu ve folikulární tekutině u žen trpících neplodností v porovnání se zdravými a plodnými dárkyněmi oocytů. Stanovována byla hladina prolaktinu, volného T3 a T4 hormonu, homocysteinu, malonyldialdehydu, glutathionperoxidázy a celkové antioxidační kapacity. Navazující část práce je věnována rozdílu těchto parametrů u žen s normálním body mass indexem (BMI) s ženami trpícími nadváhou.

Druhá polovina práce je zaměřena na mužský faktor neplodnosti a věnuje se stanovení respirační aktivity mitochondrií spermií s normální a sníženou pohyblivostí a možnostmi jejího ovlivnění pomocí propolisu. Respirační aktivitu spermií jsme měřili na dvoukanálovém oxygrafu Oroboros.

Výsledky analýz prokázaly statisticky signifikantně vyšší hladiny prolaktinu a volného T4 hormonu ve folikulární tekutině u žen s poruchou plodnosti oproti skupině zdravých plodných dárek oocytů. U homocysteinu tomu bylo naopak, studie prokázala statisticky signifikantně vyšší hladiny ve folikulární tekutině u zdravých plodných žen. Nalezena byla signifikantně nižší hladina glutathionperoxidázy u skupiny žen s nadváhou. V úspěšnosti dosažení těhotenství se ženy s normálním BMI a ženy trpící nadváhou od sebe významně nelišily.

Ve studiích věnovaných lidským spermiím byla nalezena u asthenozoospermatických vzorcích signifikantně snížená aktivita komplexu I.

Ve vzorcích ošetřených propolisem došlo ke zmírnění poklesu progresivní motility v čase. U těchto vzorků byla pozorována i signifikantně vyšší spotřeba kyslíku v přítomnosti ADP a substrátů komplexů I a II.

Naše studie potvrzuje, že folikulární tekutina a látky v ní obsažené hrají klíčovou roli v regulaci reprodukčních procesů. Další studium dárek oocytů a jejich podrobnější srovnání s neplodnými pacientkami s různými gynekologickými příčinami poruch plodnosti bude přínosem pro objasnění patofyziologických mechanismů regulujících plodnost.

Výsledky další studie naznačují, že na snížené pohyblivosti spermií by se mohl podílet i zvýšený únik protonů z mitochondriální matrix, který vede ke snížené aktivitě fosforylačního procesu. Lepší charakterizace mužských zárodečných buněk, ať zcela zdravých či s postiženou motilitou, nám pomůže lépe pochopit proces fyziologického oplodnění a napomůže i ve výběru té nejvíce životaschopné spermie pro léčbu neplodnosti metodami asistované reprodukce.

Abstract

Reduced fertility is a growing problem through the population in fertile age. It currently affects 10-15% of couples; any method of assisted reproduction cannot help 10% of them. The effort to identify new prognostic markers that would help to improve the effectiveness of treatments of infertility assumes increasing significance.

The first part of this publication is focused on the study of levels of selected hormones and markers of oxidative stress in follicular fluid of women with diagnosis of infertility compared to healthy and fertile donors of oocytes. Levels of prolactin, free T3 and T4 hormone, homocysteine, malonydiladehyd, glutathione peroxidase and total antioxidant capacity and were analyzed.

Next part is devoted to the difference between these parameters in women with normal body mass index (BMI) compared to women suffering from overweight.

The second half of this work is focused on the male factor of infertility. The aim of our study was to determine comprehensively mitochondrial respiratory activity of sperm with normal and reduced motility and to evaluate the impact of propolis on human sperm motility. Respiratory activity of sperm was measured using oxygraph Oroboros.

The results showed significantly higher levels of prolactin and free T4 hormone in follicular fluid of infertile women in comparison to the group of healthy fertile oocyte donors. On the contrary, the study showed significantly higher homocysteine level in the follicular fluid of healthy fertile women. We observed significantly lower levels of glutathion peroxidase in the group of overweight women. The pregnancy success rate with women with normal BMI and overweight women did not differ significantly from each other.

In studies dealing with determination of oxygen consumption by human sperm, asthenozoospermatic samples displayed significantly reduced activity of complex I.

In samples treated with propolis, progressive motility was preserved in time. In these samples, oxygen consumption in the presence of adenosine diphosphate and substrates of the Complex I and Complex II were significantly increased.

Our study confirms that follicular fluid and its substances play a key role in the regulation of reproductive processes. Further study of oocyte donors and their detailed comparison with infertile patients with various gynecological causes of infertility will be beneficial further to clarify the pathophysiological mechanisms regulating fertility.

The results of the study formed on human spermatozoa suggest that increased leakage of protons from the mitochondrial matrix, which leads to reduced efficiency of phosphorylating process, could participate in the reduced sperm motility. Better characterization of male germ cells, either completely healthy or with affected motility, will help us to understand better the physiological process of fertilization and also to choose the most viable sperm for infertility treatment by methods of assisted reproduction.

1 Úvod

1.1 Lidské gamety a markery užívané ke sledování jejich kvality

Oocyt a folikulární tekutina

Oocyt je ženská pohlavní buňka, jejíž vývoj začíná již ve fetálním období. Pochází z primordiálních zárodečných buněk (primordial germ cells, PGC), které proliferují a migrují z endodermy stěny žloutkového vaku do vznikajících ovarií, zde začíná jejich diferenciace v oogonie [McLaughlin a McIver, 2009; Wylie et al., 1986].

Hledání nových spolehlivých a neinvazivních markerů ve folikulární tekutině vhodných ke sledování kvality oocytu je jedním z klíčových témat výzkumu věnujícího se lidské i zvířecí asistované reprodukci.

Folikulární tekutina zajišťuje charakteristické a nezastupitelné mikroprostředí, ve kterém dochází k vývoji oocytu. Na jejím vzniku se podílí jednak přestup složek krevní plazmy přes folikulární bariéru a zároveň sekreční aktivita buněk théky a granulózy [Fortune, 1994]. Biochemické složení folikulární tekutiny hraje zásadní roli pro kvalitu oocytu, zvláště pro jeho schopnost fertilizace a následný vývoj embrya.

Složky nacházející se ve folikulární tekutině můžeme rozdělit do několika kategorií: a) hormony, b) růstové faktory ze superrodiny transformujícího růstového faktoru β (TGF- β), c) ostatní růstové faktory a interleukiny, d) reaktivní kyslíkové radikály, e) anti-apoptické faktory, f) proteiny, peptidy a aminokyseliny, g) sacharidy, h) prostanoidy [Revelli et al., 2009].

Spermie

Spermie jsou mužskými pohlavními buňkami nesoucí genetickou informaci a sloužící k oplodnění oocytu. Jsou tvořeny hlavičkou a bičíkem a jejich velikost se pohybuje mezi 50 až 60 μm , z toho na bičík připadá 40 až 50 μm .

Bičík je nejdelší částí celé spermie a jeho ultrastruktura je důležitá pro správný pohyb této buňky. Rozděluje ho na čtyři části - spojovací oddíl, střední oddíl, hlavní a koncovou část [Turner, 2006]. Pro střední oddíl je charakteristická přítomnost mitochondriální pochvy.

Mitochondrie jsou zde uloženy v helikálně uspořádaných dvojicích, v celkovém počtu 72 až 80 mitochondrií v jedné spermii [Ankel-Simons a Cummins, 1996; St John et al., 2000a].

Ve spermii byla mitochondrie dlouho opomíjenou organelou, nyní je však doloženo, že má klíčovou roli v mnohých fyziologických a patologických procesech [Peña et al., 2009; Piomboni et al., 2012; Rajender et al., 2010]. Kromě produkce ATP (adenosintrifosfát) nutného pro zajištění pohyblivosti spermií hrají mitochondrie významnou úlohu v regulaci zrání a životnosti spermií a regulaci osmotické a vápníkové homeostázy [Peña et al., 2009].

Energii pro pohyb získávají lidské spermie dvojitým způsobem, prvním z nich je již výše zmiňovaná tvorba ATP pomocí oxidativní fosforylace, probíhající na vnitřní mitochondriální membráně. Druhou cestou je glykolýza, probíhající v cytoplasmě. Studie na myších prokázaly, že i při defektní oxidativní fosforylaci nedochází k plné inhibici motility [Escalier, 2006]. To potvrzují i nedávné výzkumy na kančích spermiích, které ukázaly, že se pouze malé množství laktátu dostává do Krebsova cyklu [Marin et al., 2003]. Teorii existence dvojího zdroje energie pro motilitu spermií podporuje i identifikace

glykolytických enzymů v bičíku (hexokináza, laktátdehydrogenáza, glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenáza) [Nagdas et al., 2005, 2006; Perl et al., 2006]. Na druhé straně, pohyb býčích spermií je zcela závislý na energii z Krebsova cyklu [Aitken et al., 2004a; Mukai a Okuno, 2004]. Stále tedy přetrvává názorová nejednotnost, co je tím hlavním zdrojem energie pro motilitu spermií.

2 Cíle práce

Tato práce si klade za cíl přispět k identifikaci nových markerů a funkčních testů v oblasti reprodukční medicíny, a tím přispět k lepší charakterizaci zárodečných buněk, což nám může pomoci k lepšímu pochopení procesu fyziologického oplodnění a ke zvýšení úspěšnosti léčby neplodnosti.

Cíle práce jsou:

1. Studium biochemického složení folikulární tekutiny u neplodných pacientek ve srovnání s plodnými dárkyněmi oocytů s cílem identifikace potenciálních biomarkerů kvality oocytu.
2. Porovnání výsledků léčby neplodnosti u skupiny neplodných žen podstupujících metody asistované reprodukce v závislosti na hodnotách jejich BMI a změny hladin vybraných hormonů a markerů oxidačního stresu ve folikulární tekutině.
3. Analýza mitochondriální respirace celých permeabilizovaných lidských spermií vysokoúčinnou oxygrafii u mužů s normozoospermií a asthenozoospermií.
4. Sledování efektu ethanolového extraktu propolisu na motilitu lidských spermií, jejich mitochondriální respirační aktivitu a membránový potenciál.

3 Materiál a metodika

3.1 Použité metody pro cíl 1 a 2

3.1.1 Studovaný soubor vztahující se k cíli 1

Studovaný soubor tvořilo 146 žen, z toho bylo 74 pacientek (průměrný věk 31 let, SD = 4,65) léčených pro neplodnost v Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie – IVF Centra Prof. Zecha v Plzni. Kontrolní skupinu tvořilo 72 zdravých plodných žen, dárkyň oocytů (průměrný věk byl 26 let, SD = 4,44). Studie byla schválena etickou komisí LF UK v Plzni a všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas.

V našem souboru bylo 13 neplodných žen a 26 plodných dárkyň oocytů, které kouřily 2 - 15 cigaret za den, ostatní byly nekuřáčky. Po detailním seznámení s problematikou a po podpisu informovaného souhlasu byla ženám odebírána folikulární tekutina v době odběru oocytů v průběhu jejich léčby neplodnosti. Vyšetřovány byly její tzv. pooly, tedy směs tekutin ze všech folikulů, u nichž nedošlo ke kontaminaci krví v průběhu odběru oocytů. Ve folikulární tekutině byly stanoveny hladiny prolaktinu, hormonů štítné žlázy (volný T3 a T4), homocysteinu (Hcy), glutathionperoxidázy (GPx), malonyldialdehydu (MDA) a celkové antioxidační kapacity (AOK).

3.1.2 Studovaný soubor vztahující se k cíli 2

Studovaný soubor tvořilo 44 žen (průměrný věk 31,9 let, SD = 4,35) léčených pro neplodnost v Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie – IVF Centrum Prof. Zecha v Plzni. Neplodné ženy byly rozděleny do 2 skupin podle hodnoty BMI (37 žen mělo normální BMI, u 7 žen byla přítomna nadváha). Po detailním seznámení s problematikou studie, vyplnění dotazníku a po podpisu informovaného souhlasu byla ženám odebírána folikulární tekutina v době odběru oocytů v rámci jejich léčby neplodnosti metodami asistované reprodukce. Vyšetřovány byly její tzv. pooly. Ve folikulární tekutině byly stanoveny hladiny prolaktinu, volného T3, volného T4, homocysteinu, malonyldialdehydu, glutathionperoxidázy a celkové antioxidační kapacity. Tyto parametry byly korelovány s hodnotou BMI žen. Sledována byla úspěšnost fertilizace u neplodných žen v závislosti na BMI.

3.1.3 Stanovení studovaných biochemických markerů ve folikulární tekutině

Prolaktin a hormony štítné žlázy

Metoda stanovení hormonů prolaktinu a volného T3 a T4 byla založena na sendvičovém principu elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy (ECLIA) s využitím kitů Prolactine II, kitem FT3 a FT4 (ROCHE Diagnostics, ČR) na přístroji Cobas e411.

Homocystein

Hladina HCy byla stanovena enzymaticky kitem Liquid Stable (LS) 2-Part Homocysteine Reagent (Axis-Shield Diagnostics Ltd., UK) na přístroji Olympus AU400.

Malonyldialdehyd

Malonyldialdehyd a jiné degradační produkty peroxidace lipidů reagují s dvěma molekulami kyseliny thiobarbiturové v kyselém prostředí na barevný produkt, který se po extrakci n-butanolem měří při 532 nm použitím Elisa-readeru.

Glutathionperoxidáza

Aktivita glutathionperoxidázy byla stanovena kitem RANSEL (Randox Laboratories Ltd., UK) na analyzátoru OLYMPUS AU 400 optickým testem při 340nm.

Celková antioxidační kapacita

AOK byla stanovena kitem TAS (Randox Laboratories Ltd., UK). Měření bylo prováděno na analyzátoru Olympus AU 400.

Statistické vyhodnocení

Výsledky byly statisticky hodnoceny pomocí Wilcoxonova neparametrického testu (nepárová varianta) a dále analýzou rozptylu (ANOVA, post hoc analýza pomocí Tukeyovy metody mnohonásobného porovnávání). Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky signifikantní.

3.2 Použité metody pro cíl 3 a 4

3.2.1 Studovaný soubor soubor vztahující se k cíli 3

Ejakuláty byly získány od 14 mužů z IVF Centra Prof. Zecha v Plzni. Dle klasifikace World Health Organization byli rozděleni do skupiny normozoospermatiků ($n = 7$, průměrný věk 33,1 let) a asthenozoospermatiků ($n = 7$, průměrný věk 36,7 let).

3.2.2 Studovaný soubor soubor vztahující se k cíli 4

Ejakuláty byly získány od deseti dobrovolníků (průměrný věk 24,2 let, SEM $\pm 2,8$) po třídní abstinenci v IVF Centru Prof. Zecha v Plzni. Po zkapalnění byly vyhodnoceny dle kritérií Světové zdravotnické organizace (WHO) 2010 [World Health Organization, 2010].

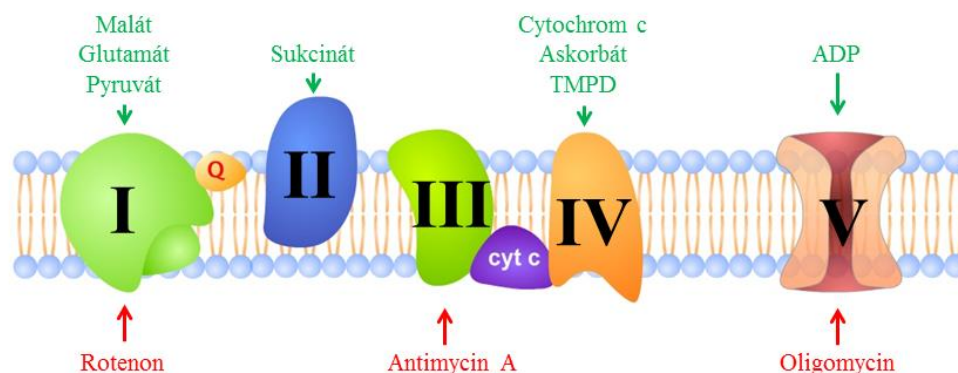
3.2.3 Vysokoúčinná respirometrie

Mitochondriální respirace je klíčovým elementem v buněčné fyziologii. Vysokoúčinná respirometrie je unikátní velmi citlivá oxygrafická metoda, která umožňuje posoudit funkční stav mitochondrií dynamickým měřením metabolismu celých mitochondrií, ať už izolovaných nebo nacházejících se v intaktních nebo permeabilizovaných buňkách.

Díky vysoké citlivosti přístroje lze pro analýzu použít relativně malé množství biologického materiálu a měřit spotřebu kyslíku po dlouhou dobu za různých metabolických (respiračních) stavů, do kterých je vzorek uváděn postupnou titrací substrátů, aktivátorů a inhibitorů jednotlivých komplexů.

V našich experimentech jsme měřili respirační aktivitu spermií na dvoukanálovém oxygrafu Oroboros O2k (Oroboros, Innsbruck, Rakousko), který zaznamenává koncentrace kyslíku v inkubačním médiu v čase a zároveň vyhodnocuje spotřebu kyslíku biologickým vzorkem, a to kontinuálně v průběhu celého experimentu.

Měření probíhalo v uzavřených komůrkách o objemu 2 ml a při teplotě 36°C. Přehledné zobrazení substrátů, inhibitorů a rozpřahovače je znázorněno na obrázku 1.



Obázek 1 – Schématické znázornění protokolu oxygrafie (zelená barva = substráty; červená barva = inhibitory komplexů)

Při studiu efektu propolisu na mitochondriální funkce spermií byl do jedné z komůrek, snímaných paralelně, přidán EEP (ethanolový extrakt propolisu) o koncentraci 0,01 mg/ml, druhá komůrka byla snímána bez intervence.

3.2.4 Příprava ethanolového extraktu propolisu

Propolis byl získán v průběhu měsíce září 2012 v západních Čechách (město Horní Slavkov - 50°8'17.268"N, 12°48'48.992"E). Propolis byl zmražen na -20 °C a rozdrcen. K takto vzniklému prášku byl přidán 70% ethanol (100 ml) a po 24 hodinách stálého míchání byl výsledný produkt přefiltrován. Filtrát byl doplněn do 100 ml 70% ethanolom [Bonvehí a Gutiérrez, 2012]. Finální koncentrace propolisu užívaná v experimentech byla 0,01 mg/ml v příslušném médiu.

3.2.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Kvalitativní a kvantitativní analýza fenolových látek obsažených v propolisu byla provedena chromatografickým přístrojem vybaveným binární pumpou (Waters 1525), Waters 717 s autosamplerem a duálním UV/VIS detektorem 2487.

Jako standardy byly použity: apigenin, chrysin, genistein, kaempferol, luteolin, naringenin, pinocembrin, galangin, kyselina kávová, felurová, skořicová, gallová, kumarová a benzoová (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA). Vanilin byl zakoupen od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

3.2.6 Permeabilizace buněčné membrány spermie

Pro kontrolu úspěšné permeabilizace buněčné membrány spermie pro substráty a inhibitory po použití digitoninu byly spermie obarveny fluorescenční látkou jodidem propidia, který intaktní buněčnou membránou neprochází. Konečná koncentrace jodidu propidia byla 1 µg/ml.

3.2.7 Průtoková cytometrie

Mitochondriální membránový potenciál byl sledován pomocí MitoProbe™ JC-1 Assay Kit (Life Technologies). Analýza byla provedena softwarem BD FACS Diva při excitaci 488 nm s využitím filtrů užívaných pro Alexa Fluor 488 a R-phycoerythrin.

3.2.8 Aktivita citrátsyntázy

Ke zjištění množství mitochondrií v testovaném biologickém materiálu a standardizaci oxygrafických měření se v experimentální praxi nejčastěji využívá stanovení aktivity citrátsyntázy nebo měření koncentrace mitochondriální DNA [Kuznetsov et al., 2002]. Aktivitu citrátsyntázy jsme stanovili v obsahu komůrek oxygrafu spektrofotometrickou metodou [Kuznetsov et al., 2002; Larsen et al., 2012].

3.2.9 Analýza dat a statistika

Ke statistickému porovnání jednotlivých hodnot spotřeby kyslíku v obou skupinách jsme použili Mann-Whitneyova pořadového testu pomocí programu STATISTICA Cz, (StatSoft CR, Praha, Česká republika). Po otestování normality distribuce a homogenity rozptylů bylo provedeno srovnání Studentovým t-testem, Wilcoxonovým testem a analýzou rozptylu (ANOVA) s post hoc testy korigovanými pro mnohočetná porovnání Bonferroniho metodou. Za signifikantně významné byly považovány výsledky $p < 0,05$.

4 Souhrn výsledků a jejich diskuze

4.1 Výsledky vztahující se k cíli 1

Studium vybraných složek folikulární tekutiny jako markerů pro sledování kvality lidských oocytů

Porovnávány byly hladiny prolaktinu, volného T3 a T4, HCy, MDA, GPx a AOK ve skupinách žen léčených pro neplodnost a kontrolních plodných dárkyň oocytů. Z tabulky 1 je zřejmé, že u neplodných žen byly naměřeny signifikantně vyšší hladiny prolaktinu ($p = 0,0006$) i volného T4 hormonu ($p = 0,0246$), avšak koncentrace volného T3 se mezi skupinami významně nelišily. Ze stejné tabulky je také zřejmé, že u kontrolní skupiny žen byla naměřena signifikantně vyšší hladina homocysteinu ($p < 0,0001$).

Vzhledem k tomu, že plodnost žen je silně ovlivněna věkem a naše skupiny plodných a neplodných se liší věkovým složením, porovnali jsme hladiny hormonů mezi plodnými a neplodnými ve stejných věkových obdobích. Mezi skupinami plodných a neplodných žen ve věkovém rozmezí 20 až 29 let je statisticky signifikantní rozdíl v hladinách prolaktinu ($p = 0,026$), Hcy ($p = 0,0002$) a MDA ($p = 0,0374$), další signifikantně významný rozdíl byl nalezen ve skupině ve věkovém rozmezí 30 až 39 let také v hladinách prolaktinu ($p = 0,0256$), volného T4 ($p = 0,0175$), Hcy ($p < 0,0001$) i AOK ($p = 0,0458$). Úplný přehled mediánů naměřených hodnot společně se statistickou významností a interkvartilovým rozpětím shrnuje tabulka 2.

Dále jsme porovnali hladiny hormonů uvnitř obou skupin v závislosti na věku. Prokázali jsme zde statisticky významný rozdíl v hodnotách AOK u kontrolní skupiny zdravých dárkyň. Nejvyšší hladina AOK je u žen mezi 20 až 29 rokem, u žen mladších a starších se tato hladina významně snižuje ($p = 0,0450$).

Tabulka 1 - Hladiny prolaktinu, fT3, fT4, HCy, MDA, GPx a AOK ve folikulární tekutině neplodných žen a kontrolní skupiny zdravých dárkyň oocytů (hodnoty jsou uvedeny jako medián a interkvartilové rozpětí)

*Sledované parametry	Neplodné (n = 74)	Kontroly (n = 72)	p value
Prolaktin (mIU/l)	958 [711 – 1408]	768 [590 – 1009]	0,0006
fT3 (pmol/l)	5,07 [4,56 – 5,43]	5,00 [4,75 – 5,34]	0,3833
fT4 (pmol/l)	14,75 [13,80 – 15,80]	14,05 [13,33 – 15,78]	0,0246
HCy (μmol/l)	6,00 [4,97 – 7,00]	8,65 [6,82 – 10,88]	<0,0001
MDA (μmol/l)	1,600 [1,360 – 2,033]	1,710 [1,480 – 2,133]	0,1421
GPx (U/l)	621,0 [528,0 – 699,8]	598,5 [524,3 – 668,3]	0,4864
AOK (mmol/l)	1,390 [1,350 – 1,483]	1,385 [1,310 – 1,470]	0,3491

Role prolaktinu ve folikulární tekutině nebyla dosud plně vysvětlena a odborná literatura neuvádí dostatek údajů ani o vztahu mezi koncentracemi prolaktinu v séru a ve folikulární tekutině [Kamel et al., 1994; Lebedeva IYu et al., 1998]. Skutečnost, že zdravé plodné dávkyně mají signifikantně nižší hladiny prolaktinu ve folikulární tekutině nehlédě na věkovou skupinu, v níž hladiny sledujeme, naznačuje, že prolaktin bude pravděpodobně významným regulačním faktorem pro vývojový potenciál oocyty. Poznání patofyziologického mechanismu, kterým prolaktin k regulaci přispívá, může vést k vyšší individualizaci léčebného plánu snížené plodnosti.

Tabulka 2 - Hladiny prolaktinu, fT3, fT4, HCy, MDA, GPx a AOK ve folikulární tekutině neplodných žen a kontrolní skupiny zdravých dávkyně oocytů v závislosti na věku (hodnoty jsou uvedeny jako medián a interkvartilové rozpětí)

*Sledované parametry	Neplodné 20 – 29 let (n = 27)	Kontroly 20 – 29 let (n = 46)	P value	Neplodné 30 – 39 let (n = 43)	Kontroly 30 – 39 let (n = 23)	P value
Prolaktin (mIU/l)	937 [759 - 1207]	771 [568 – 964]	0,0260	954 [694 – 1494]	680 [588 – 1124]	0,0256
fT3 (pmol/l)	5,10 [4,41 – 5,47]	5,06 [4,77 – 5,41]	0,3074	4,98 [4,66 – 5,35]	4,88 [4,60 – 5,19]	0,5929
fT4 (pmol/l)	14,50 [13,80 – 15,80]	14,35 [13,38 – 16,20]	0,6185	15,20 [13,90 – 16,00]	13,70 [12,70 – 14,60]	0,0175
HCy (μmol/l)	6,00 [4,80 – 7,20]	8,55 [7,02 – 11,05]	0,0002	5,70 [5,00 – 6,80]	9,00 [6,60 – 11,10]	<0,0001
MDA (μmol/l)	1,400 [1,280 – 2,040]	1,730 [1,480 – 2,240]	0,0374	1,710 [1,480 – 2,030]	1,630 [1,390 – 2,080]	0,9594
GPx (U/l)	570,0 [501,0 – 723,0]	594,0 [521,3 – 654,8]	0,9688	645,0 [531,0 – 699,0]	639,0 [552,0 – 693,0]	0,8728
AOK (mmol/l)	1,380 [1,310 – 1,460]	1,415 [1,338 – 1,493]	0,6674	1,430 [1,350 – 1,500]	1,360 [1,300 – 1,420]	0,0458

*fT3 - volný T3 hormon, fT4 - volný T4 hormon, HCy – homocystein, MDA – malondialdehyd, GPx – glutathionperoxidáza, AOK – celková antioxidační kapacita

V našich podmínkách je screening tyreoidálních dysfunkcí doporučován široké škále pacientek léčených pro neplodnost – všem s anamnézou hyper- či hypothyreoidální poruchy, ženám s diabetem typu 1 či s jakoukoliv jinou autoimunitní poruchou, ženám po léčbě maligního onemocnění, po prodělané radioterapii v oblasti hlavy či krku atd. Onemocnění štítné žlázy před otěhotněním i v průběhu těhotenství vyžaduje speciální management s ohledem na změny tyreoidálních funkcí v těhotenství [Poppe et al., 2007]. Ačkoliv se v současné době endokrinology doporučený postup pravděpodobně velmi blíží optimálnímu nastavení substituční terapie, další poznání toho, jak se hladiny volného T4 hormonu promítají ze séra do folikulární tekutiny a jak pak tyto hladiny ovlivňují vývojový potenciál oocyty, jistě může přispět k ještě citlivějšímu a více personalizovanému způsobu léčby.

U zdravých žen je lidský folikul během svého zrání dostatečně chráněn proti toxickému poškození v důsledku oxidačního stresu [Angelucci et al., 2006]. Stoupající aktivita kyslíkových radikálů může být jedním z důvodů neplodnosti i poklesu úspěšnosti IVF u žen se vzrůstajícím věkem, kdy dochází k progresivnímu poklesu kvality a kvantity oocytů [Broekmans et al., 2006; Wiener-Megnazi et al., 2004]. Toto vše může být ještě umocněno životosprávou ženy a jejím aktivním nikotinismem [Paszkowski et al., 2002]. Na hladinu HCy má velký vliv plazmatická koncentrace folátu (kyselina listová – vitamin B₉), který po své modifikaci na tetrahydrofolát působí jako kofaktor enzymu methylenetetrahydrofolát reduktázy (MTHFR) v remethylační cestě přeměny HCy na aminokyselinu methionin. Nikotin, dehtové metabolity a sekundární kouř mají vliv na hladinu folátu, jehož nízká koncentrace je spojena právě s hyperhomocysteinemií. Kuřáci mají také tendenci k menší konzumaci ovoce a zeleniny bohatých na kyselinu listovou. Je však třeba poznamenat, že tento vztah mezi kouřením a hladinou folátu není jednoznačný a některé studie prokazují jejich nezávislost [Okumura a Tsukamoto, 2011]. Tento fakt je jistě závislý také na intenzitě kouření. V naší studii jsme prokázali, že neexistuje signifikantní spojitost mezi neplodnými ženami kuřačkami a nekuřačkami ani zdravými dárkyněmi oocytů kuřačkami a nekuřačkami v žádném sledovaném parametru.

Foláty snižují hladinu HCy jak v krvi, tak ve folikulární tekutině [Forges et al., 2007], což významně koreluje jak s kvalitou oocytu, tak s vývojovým potenciálem embrya [Boxmeer et al., 2009; Ocal et al., 2012]. I když stále probíhá diskuze [Appasamy et al., 2008; Oyawoye et al., 2009] o spojitosti mezi AOK folikulární tekutiny a etiologií infertility, je jisté, že vliv volných radikálů je zapojen do patofyziologických mechanismů mnoha chorob souvisejících s neplodností, kde je zapotřebí léčby IVF. Pacientky s endometriózou mají ve srovnání s pacientkami s jinými diagnózami signifikantně zvýšené hladiny HCy [Ebisch et al., 2006].

Naše výsledky jsou ve zdánlivém rozporu z důvodu vyšší hladiny Hcy u kontrolní skupiny. Hladina Hcy však může být ovlivněna nejen suplementací folátů, ale i ovariální hyperstimulací [Benkhalifa et al., 2010; Boxmeer et al., 2008], a protože schopnost metylace souvisí s riziky metod asistované reprodukce [Menezo et al., 2010], je další výzkum v této oblasti se zapojením zkoumání zdravých plodných dárkyň přínosem.

Vztahy sérových hormonálních hladin a hladin hormonů ve folikulární tekutině jsou komplexní a jejich regulace i role nejsou dosud zcela jasné [Baka a Malamitsi-Puchner, 2006; Gürbüz et al., 2005; Park a Yang, 2011]. Další podrobnější srovnání folikulárních tekutin dárkyň oocytů s neplodnými pacientkami s různými gynekologickými příčinami poruch plodnosti bude přínosem pro objasnění patofyziologických mechanismů regulujících plodnost a také ovlivňujících úspěšnost při léčbě neplodnosti.

4.2 Výsledky vztahující se k cíli 2

Vliv nadváhy na úspěšnost technik asistované reprodukce

Porovnávány byly hladiny prolaktinu, volného T3 a volného T4, homocysteinu, malonyldialdehydu, glutathionperoxidázy a celkové antioxidační kapacity v závislosti na hodnotě BMI. Jak je zřejmé z tabulky 3, hladiny sledovaných parametrů se mezi sebou výrazně nelišily. Pozorována byla jen signifikantně nižší hladina GPx u skupiny žen s nadváhou ($p = 0,0044$). V úspěšnosti dosažení těhotenství se ženy s normálním BMI a ženy trpící nadváhou od sebe významně nelišily ($p = 0,4430$).

Hladiny sledovaných markerů a úspěšnost otěhotnění však mohla být ovlivněna skupinou žen, u kterých byl příčinou neplodnosti andrologický faktor. V naší skupině bylo

těchto žen 27,27% (n = 12). Po vyřazení těchto žen a opětovné analýze výsledků bylo zjištěno, že u žen trpících nadváhou můžeme pozorovat signifikantně vyšší hodnotu volného T3 (p = 0,0134) a nižší hladinu GPx (p = 0,0466) ve folikulární tekutině. Tyto výsledky dokumentuje tabulka 4. V úspěšnosti dosažení těhotenství se však ani tyto dvě skupiny významně nelišily (p = 0,6290).

Obezita a nadváha se šíří světem jako epidemie. Obezita, tedy BMI ≥ 30 kg/m² ovlivňuje fyziologické funkce mnoha tkání a orgánů. V důsledku toho mají obézní ženy problémy s přirozeným otěhotněním a obrací se na centra specializující se na léčbu neplodnosti. Tento jev je zvýšeně sledován v průběhu posledních dvaceti let, a to zvláště ve vyspělých zemích.

O mechanismu, jakým přítomnost obezity negativně ovlivňuje reprodukční schopnosti ženy, není zatím příliš známo. Předpokládá se souvislost s poruchou metabolismu steroidů, sekrecí a působením inzulínu či adipokinů. Tyto změny mohou ovlivňovat růst folikulů, vývoj embrya i jeho implantaci, a to jak za přirozených podmínek tak po ART (assisted reproduction techniques, techniky asistované reprodukce) [Bellver et al., 2010; Budak et al., 2006; Mitchell et al., 2005]. Důležitým faktorem je také výskyt obezity již v adolescentním věku ženy. Právě změny ve váze a tělesné konstituci v tomto kritickém životním období mohou ovlivnit endokrinní regulaci puberty a tím i správný vývoj reprodukčního systému [Farooqi et al., 1999; Pelusi a Pasquali, 2003].

Tabulka 3 - Hladiny prolaktinu, volného T3, volného T4, HCy, MDA, GPx a AOK ve folikulární tekutině neplodných žen s normálním BMI a nadváhou (BMI ≥ 25 kg/m²) (hodnoty jsou uvedeny jako průměr a směrodatná odchylka)

*Sledované parametry	Normální BMI (n = 37)	Nadváha (n = 7)	p value
Prolaktin (mIU/l)	939,6 ± 468,22	881,8 ± 635,96	0,9749
fT3 (pmol/l)	4,9 ± 0,54	5,3 ± 0,58	0,6374
fT4 (pmol/l)	14,5 ± 2,11	13,8 ± 1,87	0,4307
HCy (μmol/l)	5,6 ± 1,98	6,8 ± 1,69	0,0893
MDA (μmol/l)	1,5 ± 0,45	1,4 ± 0,40	0,4688
GPx (U/l)	669,0 ± 100,92	558,0 ± 54,40	0,0044
AOK (mmol/l)	1,3 ± 0,12	1,46 ± 0,19	0,5291

*fT3 - volný T3 hormon, fT4 - volný T4 hormon, HCy – homocystein, MDA – malondialdehyd, GPx – glutathionperoxidáza, AOK – celková antioxidantní kapacita

Většina prací zabývajících se obezitou a neplodností zdůrazňuje negativní efekt vyššího BMI na implantaci a kvalitu embrya, na úspěšnost fertilizace a dosažení těhotenství, incidenci potratů a průběh těhotenství [Bellver et al., 2010; Ferlitsch et al., 2004; Kuchenbecker et al., 2006; Moragianni et al., 2012; Rittenberg et al., 2011; Shah et al., 2011; van der Steeg et al., 2008].

Tabulka 4 - Hladiny prolaktinu, volného T3, volného T4, HCy, MDA, GPx a AOK ve folikulární tekutině neplodných žen s normálním BMI a nadváhou (BMI ≥ 25 kg/m²) po vyřazení žen s andrologickou příčinou neplodnosti (hodnoty jsou uvedeny jako průměr a směrodatná odchylka)

*Sledované parametry	Normální BMI (n = 28)	Nadváha (n = 4)	p value
Prolaktin (mIU/l)	980,7 ± 488,82	1370,5 ± 545,41	0,2537
fT3 (pmol/l)	4,9 ± 0,57	5,3 ± 0,20	0,0134
fT4 (pmol/l)	14,5 ± 2,31	14,0 ± 1,73	0,6016
HCy (μmol/l)	5,6 ± 2,13	6,1 ± 0,90	0,7626
MDA (μmol/l)	1,5 ± 0,45	1,4 ± 0,43	0,4236
GPx (U/l)	666,0 ± 101,82	546,0 ± 37,43	0,0466
AOK (mmol/l)	1,3 ± 0,12	1,5 ± 0,26	0,2786

*fT3 - volný T3 hormon, fT4 - volný T4 hormon, HCy – homocystein, MDA – malondialdehyd, GPx – glutathionperoxidáza, AOK – celková antioxidační kapacita

Výsledky naší studie podporují hypotézu, že negativní efekt vyššího BMI začíná až u BMI nad 30 kg/m² [Bellver et al., 2010; Dechaud et al., 2006; Lashen et al., 1999; Matalliotakis et al., 2008; Moragianni et al., 2012; Pasquali et al., 2007; Styne-Gross et al., 2005; Winter et al., 2002].

V naší skupině jsme zaznamenali nižší hladiny GPx u žen s vyšším BMI. Nižší hladiny cytoprotektivních enzymů jsou pozorovány nejen u žen s vyššími hodnotami BMI [Agarwal et al., 2005; Alpay et al., 2006; Lee et al., 2008] a u pacientek s diabetem mellitem [Goyal et al., 2011], ale například i v seminální plazmě některých neplodných mužů, kde nižší hladina tohoto protektivního enzymu způsobuje vyšší peroxidaci lipidů a tím ztrátu motility spermií [Alvarez a Storey, 1989; Giannattasio et al., 2002]. K úpravě snížené hladiny GPx u žen s nadváhou dochází po dosažení normálních hodnot BMI [Bougoulia et al., 2006].

Zvýšenou hladinu volného T3 hormonu nacházíme častěji u žen trpících nadváhou a obezitou [Reinehr, 2010]. Stejně výsledky ukazuje i naše práce, kde hladina volného T3 hormonu byla signifikantně vyšší u žen s BMI nad 25 kg/m². Oproti ostatním pracím, kde byl volný T3 stanoven ze séra, jsme tuto rozdílnou hladinu prokázali ve folikulární tekutině. Mechanismus vzrůstu hladiny hormonu není prozatím znám, ví se však, že jeho hladina se normalizuje při snížení váhy a nejspíše souvisí s metabolismem leptinu [Reinehr, 2010; Reinehr a Andler, 2002; Reinehr et al., 2008].

4.3 Výsledky vztahující se k cíli 3

Vysokoúčinná respirometrie

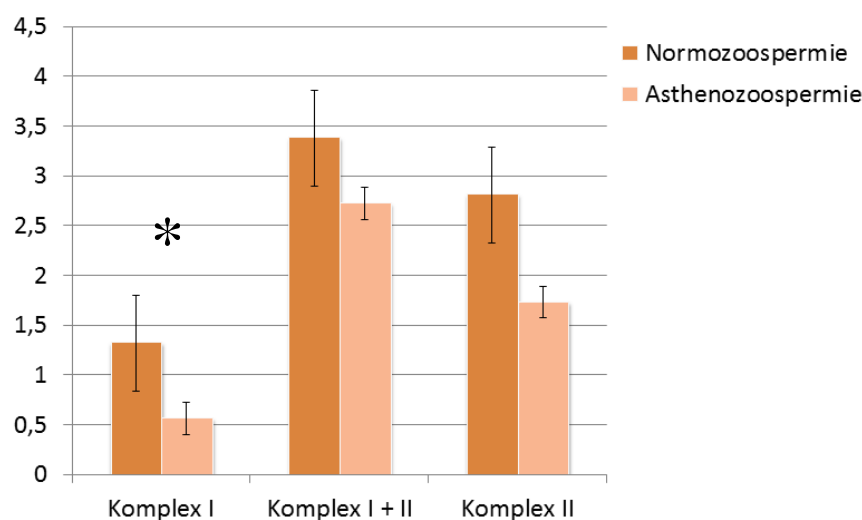
Minimální počet spermií nutný pro detekci spotřeby kyslíku byl 5×10^6 buněk v 1 ml média. Po aplikaci glutamátu, malátu a pyruvátu, substrátů pro komplex I, byla spotřeba kyslíku srovnatelná se stavem bez substrátů, což ukazuje na dobrou permeabilizaci buněčné membrány, která vedla k úniku ADP z buňky. Po přidání ADP došlo ke stimulaci respirace a indukci stavu S3, tj. maximální spotřebě kyslíku při fosforylaci ADP na ATP (OXPHOS_I). U asthenozoospermie byla aktivita komplexu I signifikantně nižší než u kontrol (tabulka 5, graf 1).

Aplikací sukcinátu dodávajícího do systému elektrony prostřednictvím komplexu II došlo k dalšímu zvýšení spotřeby kyslíku (OXPHOS_{I+II}), která se mezi oběma skupinami významně nelišila. Následná inhibice komplexu I rotenonem ukázala, že příspěvek komplexu I k celkové kapacitě oxidační fosforylace byl i u zdravých spermií relativně nižší než je tomu typicky v somatických buňkách, např. jaterních nebo svalových [El-Mir et al., 2000; Scheibye-Knudsen a Quistorff, 2009]. Inhibice ATP-syntázy oligomycinem snížila spotřebu kyslíku na úroveň nutnou především pro pumpování protonů do intermembránového prostoru. Tato hodnota byla signifikantně vyšší u asthenozoospermatických vzorků. Rozpřažení fosforylace a oxidace pomocí FCCP ukázalo, že ve zdravých i asthenozoospermatických vzorcích je kapacita elektrontransportního systému přenášet elektrony vyšší než maximální spotřeba kyslíku při zachovalé fosforylaci. Reziduální spotřeba kyslíku, na kterou byly ostatní respirační parametry korigovány, byla u zdravých spermií $0,14 \pm 0,05$ pmol O₂/(s.10⁶buněk) a u spermií s poruchou pohyblivosti $0,15 \pm 0,05$ pmol O₂/(s.10⁶ buněk).

Tabulka 5 - Spotřeba kyslíku permeabilizovanými spermii

*Stav	Titrační protokol	Normozoospermie pmol/(s.10 ⁶ bb) (n = 7)	Asthenozoospermie pmol/(s.10 ⁶ bb) (n = 7)	p value
S2	GMP _L	0,23 ± 0,02	0,21 ± 0,10	n.s.
S3 _I	GMP _P	1,32 ± 0,16	0,56 ± 0,16*	0,007
S3 _{I+II}	GMPS _P	3,38 ± 0,52	2,72 ± 0,79	n.s.
S3 _{I+IIc}	GMPS _{cP}	3,37 ± 0,56	2,77 ± 0,89	n.s.
S3 _{II}	S(Rot) _P	2,81 ± 0,48	1,73 ± 0,57	0,07
S4	S(Rot) _L	0,67 ± 0,16	1,72 ± 0,59	0,046
S3 _{uII}	S(Rot) _E	3,18 ± 0,67	4,10 ± 1,39	n.s.

* G = glutamát, M = malát, P = pyruvát, D = ADP, S = sukcinát, c = cytochrom c, Rot = rotenon, Omy = oligomycin, F = FCCP; L = LEAK, P = OXPHOS, E = ETS; I a II = komplexy I a II



Graf 1 – Rozdíl v aktivitě komplexu I a komplexu II u normozoospermie a asthenozoospermie (* p = 0,007)

Literární údaje o respirační aktivitě mitochondrií ve spermiích jsou relativně chudé, nicméně již první studie ukazují, že poruchy mitochondrií mají vliv na motilitu spermií [Ferramosca et al., 2012b]. Důvodem je zejména malé množství mitochondrií obsažených v jednotlivých zárodečných buňkách a jejich obtížná izolace [Piomboni et al., 2012]. Proto je nutné stanovit mitochondriální respiraci na celých buňkách, ideálně tak, aby buněčná membrána byla permeabilizována a umožnila přestup substrátů Krebsova cyklu a adenosindifosfátu k mitochondriím. Dosud používaná metoda byla založena na inkubaci spermií v hypotonickém roztoku, která vedla k narušení buněčné membrány bez poškození membrány mitochondrií [Piasecka a Kawiak, 2003]. V somatických buňkách však inkubace v hypotonických médiích způsobuje stimulaci mnoha membránových iontových kanálů a receptorů, což vede ke změnám ve složení intracelulární tekutiny a aktivaci intracelulárních procesů včetně uvolňování řady biologicky účinných látek a apoptózy [Blum et al., 2010; Okada a Maeno, 2001]. Proto jsme v naší studii využili permeabilizace membrány spermií digitoninem, detergentem často využívaným ve výzkumu mitochondriální funkce na celých buňkách [Pesta a Gnaiger, 2012]. V naší práci jsme měřili respirační aktivitu mitochondrií lidských spermií permeabilizovaných digitoninem vysokoúčinnou oxygrafii, která umožňuje stanovení spotřeby kyslíku z nejmenšího možného množství zárodečných buněk.

Oxidativní fosforylaci jakožto zdroji energie pro pohyb spermií byla dávana nezastupitelná role, proto se také předpokládalo, že poruchy mitochondriální morfologie a funkce jsou hlavním faktorem odpovídajícím za sníženou motilitu spermií [Turner, 2006]. Studie na myších ale ukázaly, že při poškozené oxidativní fosforylaci nedochází k zániku motility spermií [Escalier, 2006] a zdrojem ATP je zejména přeměna glukózy na pyruvát [Marin et al., 2003]; také spermie králíků pravděpodobně využívají jako hlavní zdroj energie glykolýzu [Storey a Kayne, 1980]. Spermie některých živočišných druhů dokonce dokáží vytvářet glykogen [Ford, 2006]. Samčí zárodečné buňky dalších živočišných druhů (beran, býk, kanec, primáti) včetně člověka však pro pohyb využívají ve významné míře ATP získaný v mitochondriích oxidativní fosforylací [Aitken et al., 2004b; Mukai a Okuno, 2004; Piomboni et al., 2012]. Otázka primárního zdroje energie pro pohyb

spermií ještě není zcela zodpovězená ani u člověka; všeobecně uznávaným pohledem je jejich všestrannost v možnosti získávání ATP, která je ovlivněná přítomností a dostupností substrátů v ženském reprodukčním traktu [Ruiz-Pesini et al., 2007; Storey, 2008].

Některé mitochondriální parametry, např. mitochondriální membránový potenciál měřený pomocí průtokové cytometrie přímo koreluje s počtem oplodněných oocytů a ovlivňuje tak výsledky léčby neplodnosti pomocí metod asistované reprodukce [Marchetti et al., 2012]. Další výzkum a detailnější studium této problematiky tak slibují přínos pro další pokrok v diagnostice i terapii neplodnosti.

Naše studie potvrzuje nález snížené aktivity komplexu I v mitochondriálním respiračním systému asthenozoospermatických vzorků. Aktivita komplexu II však nebyla asthenozoospermií narušena a celková kapacita transportu elektronů při stimulaci komplexů I a II a zachovalé fosforylaci (stav S_{3I+II}) se mezi oběma skupinami nelišila. Zajímavým nálezem je také pravděpodobná zpětná kontrola přenosu elektronů fosforylací ADP u asthenozoospermie, jak ukazuje poměr E/P, který byl u méně pohyblivých spermií signifikantně vyšší. Důvodem pro snížení aktivity komplexu I tedy patrně není jeho snížená exprese. U asthenozoospermatických vzorků byl také prokázán signifikantně zvýšený stav LEAK (S4), který vyjadřuje stupeň mitochondriální oxidace nutné zejména pro kompenzaci úniku protonů z mitochondriální matrix, ale podílí se na něm i obrat kationtů přes vnitřní mitochondriální membránu [Pesta a Gnaiger, 2012]. Známým příkladem rozpřažení respirace a fosforylace ADP je rozpřahovací protein hnědé tukové tkáně (UCP1), který je zodpovědný za tvorbu tepla v mitochondriích [Rousset et al., 2004]. V lidských spermiích byla prokázána mRNA pro další rozpřahovací protein - UCP2, jehož role by mohla spočívat v ochraně před kyslíkovými radikály [Zhang et al., 2007], ale jehož vztah k mitochondriální respiraci spermií nebyl dosud zkoumán.

4.4 Výsledky vztahující se k cíli 4

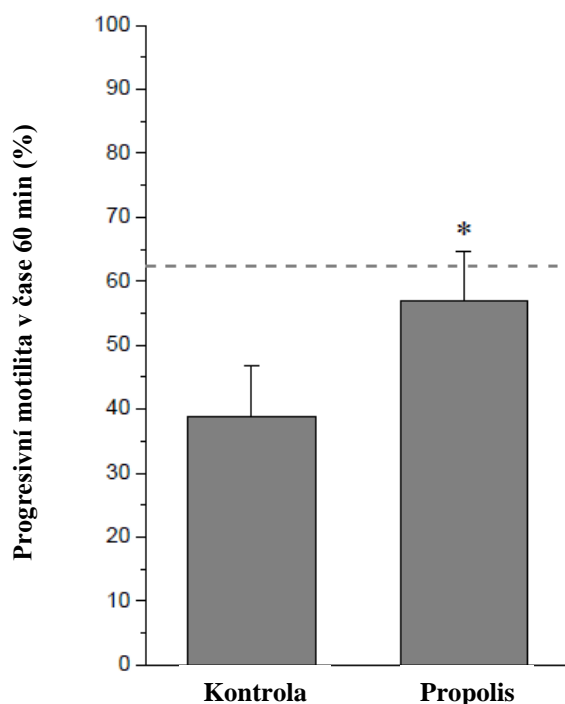
Efekt českého propolisu na mitochondriální funkce lidských spermií

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Chromatografickou analýzou propolisu byly identifikovány následující složky: kyselina ferulová, kumarová, kávová, skořicová, vanillin, kaempferol, apigenin a chrysin. Naopak látky jako kyselina gallová, benzoová, quercetin, naringenin, luteolin, genistein, pinocembrin, galangin a fenylethylester kyseliny kávové nebyly ve vzorku propolisu nalezeny.

Efekt propolisu na motilitu spermií v čerstvém ejakulátu

Do této studie bylo zařazeno deset zdravých mužů průměrného věku 24,2 let. K čerstvému ejakulátu (0,1 ml) byl přidán extrakt propolisu nebo 70% ethanol (1 μ l) (konečná koncentrace propolisu byla 0,01 mg/ml). Po 60 minutách byla opět odečítána motilita spermií. Efekt propolisu na motilitu lidských spermií po 60 minut trvající inkubaci ukazuje graf 2. Propolis zpomalil pokles progresivní motility spermií v nativním ejakulátu. Procento progresivně pohyblivých spermií inkubovaných s propolisem bylo po 60 minutách téměř stejné jako v čerstvém vzorku, spermie neošetřené propolisem s časem progresivní motilitu ztrácely ($p = 0,028$). Samotný ethanol neměl žádný negativní efekt na motilitu spermií.



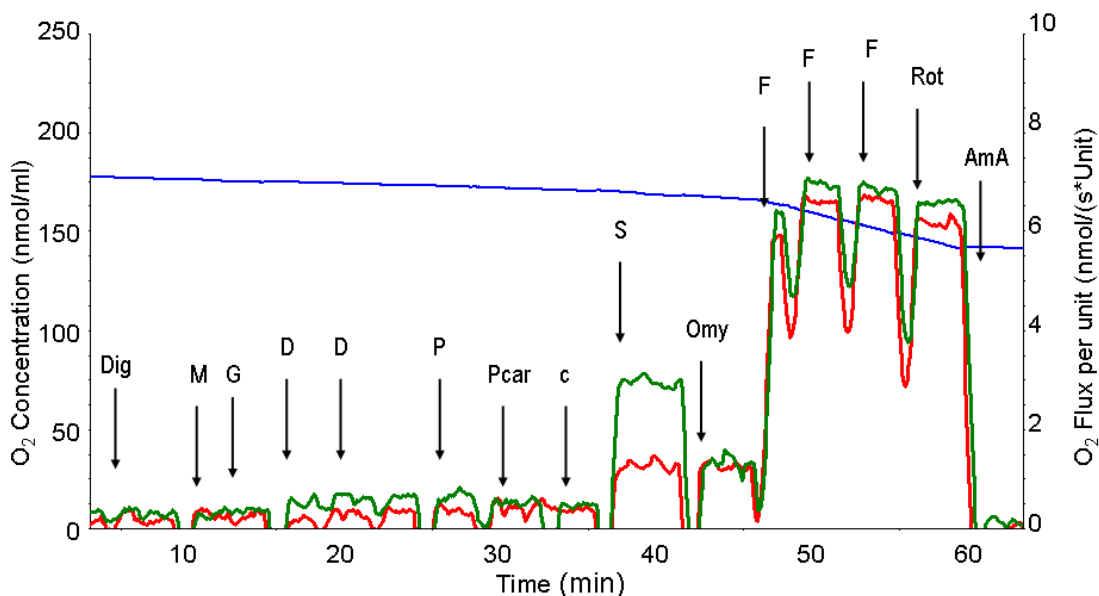
Graf 2 - Efekt českého propolisu na motilitu spermií. Sloupce reprezentují hodnoty progresivní motility lidských spermií v nativním ejakulátu po 60 minutové inkubaci s ethanolovým propolisovým extraktem (průměr ± SEM). Přerušovaná čára = progresivní motilita v čase 0. * $p < 0,05$, porovnáváno s hodnotami kontrol

Vysokoúčinná respirometrie

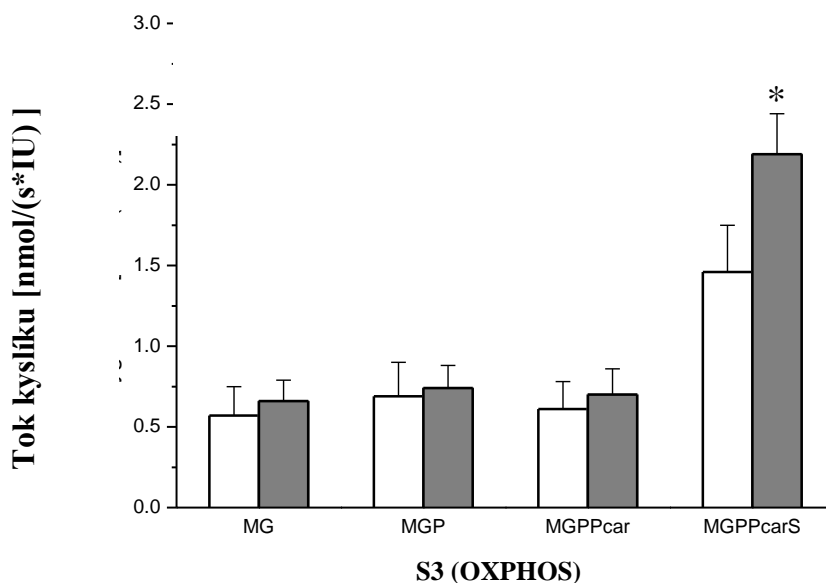
Typickou křivku spotřeby kyslíku v permeabilizovaných spermiích po aplikaci propolisu (0,01 mg/ml) a bez něj ukazuje obrázek 2. Spotřeba kyslíku neovlivněných spermií ($0,13 \pm 0,01$ nmol/(s.IU)) byla propolisem statisticky významně zvýšena ($0,27 \pm 0,03$ nmol/(s.IU)); $p = 0,006$). Po permeabilizaci digitoninem byl v kontrolních vzorcích stav S2, tj. respirace po přidání substrátů komplexu I malátu a glutamátu, signifikantně nižší ($0,19 \pm 0,04$ nmol/(s.IU)) než ve vzorcích ovlivněných propolisem ($0,29 \pm 0,05$ nmol/(s.IU); $p = 0,014$).

Stav S3, tedy spotřeba kyslíku při oxidativní fosforylaci, určený přidáním ADP a substrátů komplexu I, ETF a komplexu II, je znázorněn v grafu 3. Propolis významně zvýšil (o ~50%) $S3_{I+II}$ ($p = 0,003$), což naznačuje zvýšenou aktivitu komplexu II. Nedošlo k ovlivnění stavu S4 indukovaného oligomycinem, ten dosáhl $0,81 \pm 0,07$ a $0,94 \pm 0,09$ nmol/(s.IU) u kontrolního vzorku respektive vzorku ovlivněného propolisem.

Stav S3u udávající kapacitu elektrontransportního systému při rozpřažení oxidace a fosforylace a kolapsu mitochondriálního membránového potenciálu byl po přidání propolisu signifikantně vyšší v přítomnosti všech substrátů (tj. malátu, glutamátu, pyruvátu, palmitoylkarnitinu a sukcinátu i po inhibici komplexu I rotenonem (graf 4). Při měření spotřeby kyslíku po aplikaci TMPD + askorbátu byla respirační aktivita komplexu IV v kontrolních vzorcích $12,16 \pm 2,58$ nmol O_2 /(s.IU), s propolisem byla signifikantně zvýšena na $15,4 \pm 3,19$ nmol O_2 /(s.IU). Samotný ethanol (médiu pro propolis, oligomycin, antimycin A, FCCP a rotenon) v objemu do 10 μ l neovlivňoval respirometrické parametry měřené se substráty komplexu I a II a ETF v přítomnosti ADP.

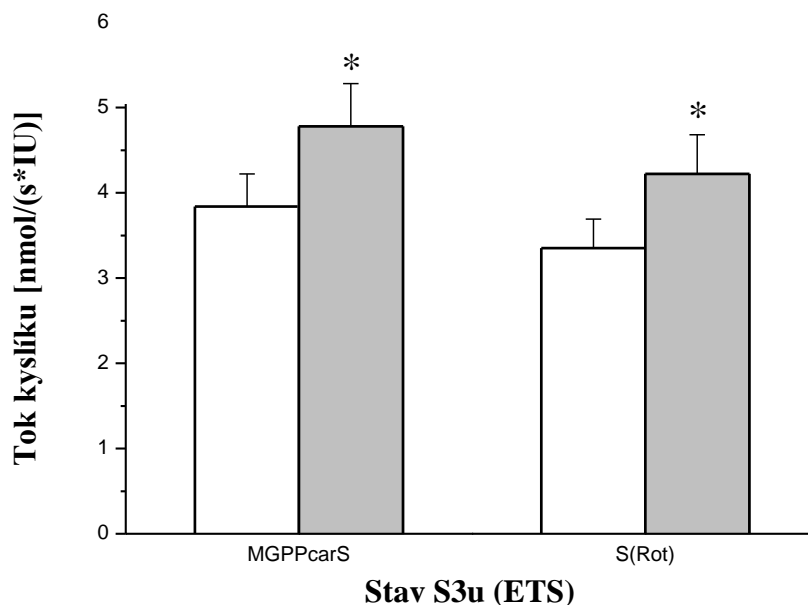


Obrázek 2 - Typická křivka spotřeby kyslíku v permeabilizovaných spermích po aplikaci propolisu (zelená čára) a bez něj (červená čára). Znázornění protokolu s jednotlivými substráty komplexu I, komplexu II a elektron-transportního flavoproteinů užívaného pro lidské spermie. Červená linka = tok kyslíku korigovaný na IU aktivity citrátsyntázy v kontrolních vzorcích, zelená linka = tok kyslíku korigovaný na IU aktivity citrátsyntázy ve vzorcích ovlivněných propolisem 0,01 mg/ml, modrá linka = koncentrace kyslíku v komůrce oxygrafu. Dig = digitonin, M = malát, G = glutamát, D = ADP, P = pyruvát, Pcar = palmitoylcarnitin, c = cytochrom c, S = sukcinát, Omy = oligomycin, F = FCCP, Rot = rotenon, AmA = antimycin A



Graf 3 - Spotřeba kyslíku při stavu S3 (OXPHOS) u kontrol a při ošetření propolisem. Tok kyslíku byl korigován na reziduální spotřebu kyslíku a vyjádřen na IU aktivity

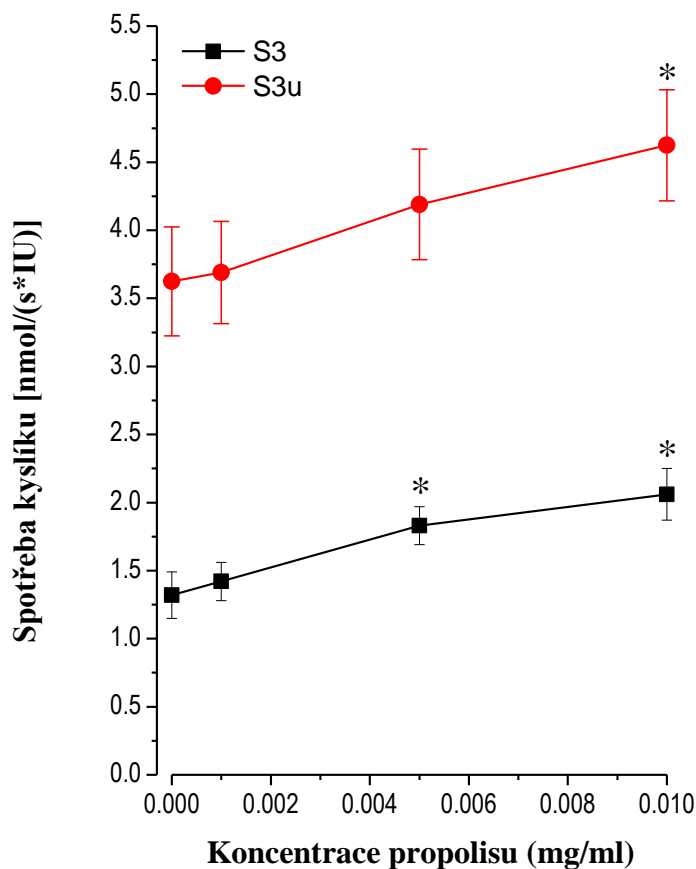
citrátsyntázy * $p < 0.05$, v porovnání s hodnotami kontrol. Bílé sloupce = kontrola, šedé sloupce = propolis, M = malát, G = glutamát, P = pyruvát, Pcar = palmitoylcarnitin, S = sukcinát



Graf 4 - Spotřeba kyslíku při stavu S3u (ETS) u permeabilizovaných spermií bez propolisu a po jeho aplikaci. Tok kyslíku byl korigován na reziduální spotřebu kyslíku a vyjádřen na IU aktivity citrátsyntázy. * $p < 0.05$, v porovnání s hodnotami kontrol. Bílé sloupce = kontrola, šedé sloupce = propolis, M = malát, G = glutamát, P = pyruvát, Pcar = palmitoylcarnitin, S = sukcinát a inhibitor komplexu I rotenon (Rot)

Respirační kontrolní koeficienty byly vypočítány pro odhad relativní efektivity individuálních intervencí a stavu spřažení oxidace a fosforylace v mitochondriích spermií. Poměr $OXPHOS_{I+II}/OXPHOS_I$ byl signifikantně vyšší ve vzorku ovlivněném propolisem ($3,53 \pm 0,42$) ve srovnání s kontrolou ($2,8 \pm 0,28$), což naznačuje zvýšenou efektivitu spřažené respirace při stimulaci komplexu II sukcinátem. Kontrolní poměr LEAK (poměr respirace LEAK a kapacity elektron-transportního system) dosahoval $0,25 \pm 0,02$ v kontrolních vzorcích a byl významně snížen po aplikaci propolisu na hodnoty $0,21 \pm 0,02$ ($p = 0,024$).

Vztah mezi koncentrací propolisu a jeho účinkem na spotřebu kyslíku je znázorněn v grafu 5. Propolis v závislosti na dávce zvyšoval spotřebu kyslíku. Propolis byl účinnější, ve stavu S3 než S3u.



Graf 5 – Vztah mezi konečnou koncentrací propolisu a spotřebou kyslíku. Stav S3 (OXPHOS) = spotřeba kyslíku permeabilizovanými spermii v přítomnosti malátu, glutamátu, pyruvátu, sukcinátu a ADP. Stav S3u = spotřeba kyslíku permeabilizovanými spermii, měřeno po přidání malátu, glutamátu, ADP, pyruvátu, sukcinátu a FCCP. Tok kyslíku byl korigován na reziduální spotřebu kyslíku a vyjádřen na IU aktivity citrát syntázy. * $p < 0.05$, v porovnání s hodnotami bez propolisu.

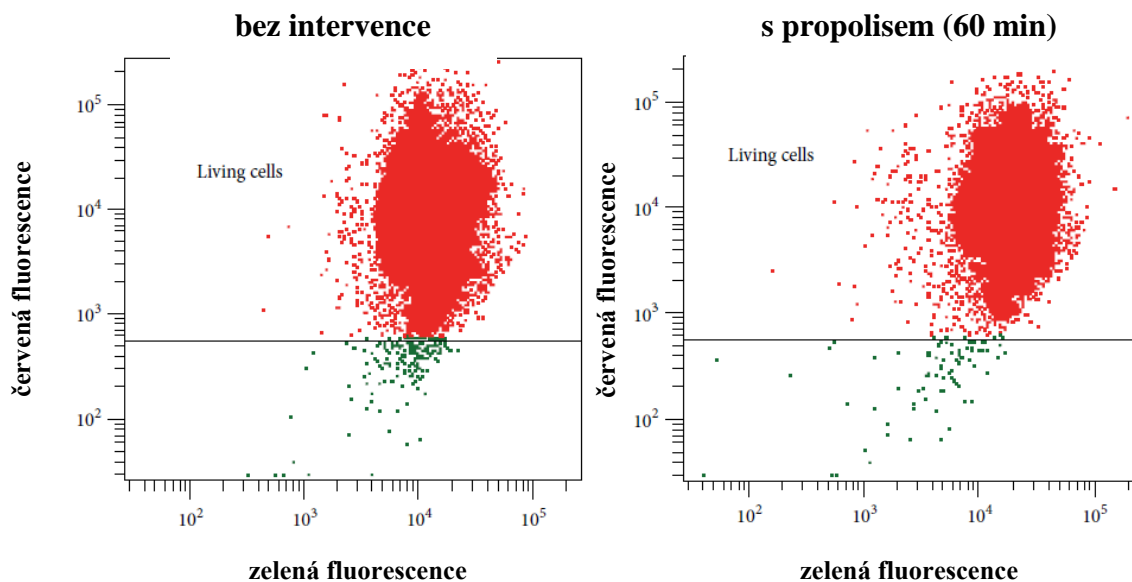
Permeabilizace buněčné membrány spermie

Přidání 5 $\mu\text{g/ml}$ digitoninu umožnilo dostatečnou prostupnost buněčné membrány pro jodid propidia, a tudíž i pro substráty a inhibitory potřebné pro oxygrafickou analýzu.

Průtoková cytometrie

Depolarizace mitochondriální membrány je citlivým indikátorem mitochondriálního poškození. JC-1 je fluorescenční sonda prostupující membránou mitochondrie, která agreguje v mitochondriální matrix a emituje červené světlo, pokud je $\Delta\Psi_m$ vysoké. V případě, že je mitochondriální membrána depolarizovaná, není monomerní forma JC-1 schopná se v mitochondriální matrix akumulovat a zůstává v cytoplazmě, kde produkuje zelenou fluorescenci. Ztráta $\Delta\Psi_m$ u spermii může sloužit jako časný marker buněčné apoptózy a tím i případné dysfunkce [Barroso et al., 2006].

Inkubace vzorků spermií s propolisem (60 min) neměla v našich experimentech na $\Delta\Psi_m$ signifikantní vliv (obrázek 3). V kontrolních vzorcích bylo procento buněk s vysokým $\Delta\Psi_m$ $98,43 \pm 1,07\%$, u spermií ovlivněných propolisem dokonce mírně vzrostlo $99,33 \pm 0,25\%$.



Obrázek 3 - Typický graf z průtokového cytometru po použití barviva JC-1. Mitochondriální membránový potenciál byl detekován za použití MitoProbe™ JC-1 Assay Kit (Life Technologies). R-phycoerythrin = červená fluorescence, zdravé buňky; Alexa Fluor 488 dye = zelená fluorescence, redukováný mitochondriální membránový potenciál

Aktivita citrátsyntázy

V kontrolních vzorcích byla aktivita citrátsyntázy $6,58 \pm 0,84$ mIU/ 10^7 buněk a nebyla výrazně ovlivněna propolisem ($6,08 \pm 0,84$ mIU/ 10^7 buněk) ani dalšími substancemi (substráty, inhibitory, médii) přidávanými při respirometrických měřeních, jak bylo testováno v oddělených kontrolách.

Jedná se o první studii, která ukazuje chemické složení českého propolisu a jeho vliv na lidské spermie. Propolis má velmi komplexní chemické složení, které může být ovlivněno různorodostí rostlin, ze kterých včely sbírají materiál pro propolis a geografickou oblastí, kde k tomu dochází. Oblast sběru testovaného vzorku leží v severním mírném pásmu, kde je typickým produktem včelí propolis topolového typu [Bankova et al., 2002]. V lokalitě, kde byl použitý propolis sbírán, se nachází následující zastoupení stromů: 90% jehličnaté stromy, bříza (6%), olše (2%), buk (1%) a dub (1%) [Lesy ČR, 2014]. V testovaném vzorku byl detekován chrysin, který je typický v tomto typu propolisu přítomný, dále pak fenolové kyseliny a flavonoidy, které se často nacházejí v propolisu z podobných oblastí, a které jsou pravděpodobně zodpovědné za některé z pozitivních vlastností propolisu [Wojtyczka et al., 2013]. Mimo výše zmíněné látky byly v českém propolisu nalezeny také vysoké koncentrace kyseliny ferulové, kumarové a kaempferolu. Naopak látky v topolovém typu propolisu často popisované (fenylethyl

ester kyseliny kávové, naringenin a quercetin) [Bankova, 2005; Bankova et al., 2002] a známé pro své protizánětlivé, antioxidační a protirakovinné účinky [Ozturk et al., 2012] nebyly v českém propolisu nalezeny.

Mezi faktory, které mohly přispět k výše zmíněným rozdílům ve složení propolisu, patří nejen rozmanitost rostlin vyskytujících se v okolí úlu, ale také roční období, ve kterém docházelo ke sběru, osvětlení, nadmořská výška, typ sběru a dostupnost potravy [Toreti et al., 2013]. Je nutné si uvědomit, že hledání konkrétních látek zodpovědných za pozitivní efekt propolisu doposud nebylo úspěšné. Vědecké studie dokazují, že biologické účinky propolisu jsou téměř totožné (antimikrobiální, antitumorózní, antioxidační, protizánětlivé, atd.) ve vzorcích z různých klimatických zón, navzdory tomu, že mají rozdílné chemické složení [Bankova, 2005]. S největší pravděpodobností je pro biologickou aktivitu propolisu nejdůležitější specifická kombinace jeho složek [Kujumgiev et al., 1999].

Studie popisuje vliv propolisu na motilitu spermií, mitochondriální membránový potenciál a mitochondriální respirační aktivitu stanovenou vysokoúčinnou respirometrií. Ta dovoluje stanovení jednotlivých respiračních stavů při postupném ovlivňování vzorku, což umožňuje komplexní posouzení mitochondriálních funkcí. Vysoká citlivost metody navíc umožňuje stanovit respirační aktivitu jednotlivých komplexů při použití relativně malého množství vzorku [Pesta a Gnaiger, 2012]. V našem experimentu byly použity pročištěné spermie, které byly podrobeny permeabilizaci membrány digitoninem (mírný neionizovaný detergent), jehož dávka byla pečlivě vytitrována tak, aby došlo k permeabilizaci buněčné membrány bez poškození mitochondriální membrány. Dosud byla ve většině případů spotřeba kyslíku lidských mitochondrií ve spermiích stanovována tradiční oxygrafií po úpravě vzorku v hypotonickém prostředí [Ferramosca et al., 2008b; Piasecka a Kawiak, 2003; Piasecka et al., 2003; Stendardi et al., 2011]. Ve spermiích mnoha savců může však podobné hypotonické prostředí podstatně ovlivnit aktivitu různých proteinkináz (PK), včetně proteinkinázy A (PKA), proteinkinázy C (PKC) a tyrosinkinázy, a to přes osmosenzitivní K^+ a Cl^- kanály [Petrunkina et al., 2007].

Cenným poznatkem pramenícím z této studie je, že propolis *in vitro* zvyšuje aktivitu mitochondriálních respiračních komplexů II a IV bez ovlivnění sprzęžení elektronového transportu a syntézy ATP a mitochondriálního membránového potenciálu v permeabilizovaných lidských spermiích. Propolis zvyšoval spolu se substráty komplexu I a komplexu II spotřebu kyslíku o ~50%. Toto zvýšení bylo připsáno komplexu II, protože komplex I sám o sobě propolisem ovlivněn nebyl. Poměr P_{I+II}/P_I byl signifikantně vyšší ve vzorcích ošetřených propolisem. Podobně také v rozpřaženém stavu (S3u, E) byla spotřeba kyslíku významně vyšší po přidání propolisu (o ~25%). V obou případech za přítomnosti substrátů komplexu I a II a po inhibici rotenonem. Aktivita komplexu IV byla také zvýšena (~27%).

Dostupná data o vlivu propolisu a jeho hlavních součástí na respiraci mitochondrií nebo na aktivitu jednotlivých mitochondriálních enzymů zapojených do elektrontransportního konvergentního systému jsou vzácná. Nejčastějším poznatkem je, že je jeho efekt v normálních somatických buňkách (kardiomyocyty, neurony, hepatocyty) zanedbatelný, ale podstatným se stává až v případě, kdy jsou buňky vystaveny působení toxinů a je ohrožena oxidativní fosforylace [Barros Silva et al., 2013; Kumaran a Prince, 2010; Lagoa et al., 2011]. Naproti tomu, u nádorových buněk propolisový extrakt nebo jeho součásti inhibují oxidativní fosforylaci, dochází k uvolnění cytochromu c a aktivaci apoptózy [Chen et al., 2012; Yeh et al., 2011]. S přihlédnutím k těmto skutečnostem je vliv propolisu na buněčnou respiraci těžce předvídatelný a závislý na buněčném typu.

Některé studie naznačují, že propolis nebo jeho součásti mohou ovlivňovat membránový potenciál mitochondrií cestou zvýšené permeability vnitřní mitochondriální membrány [Das et al., 2012]. Z toho důvodu byl proveden experiment s MitoProbe™ JC-1 Assay Kitem, který ukázal, že mitochondriální membránový potenciál v lidských spermích není propolisem ovlivněn. Nedošlo k ovlivnění ani oligomycinem navozeného respiračního stavu (LEAK), který reflektuje kompenzaci protonového úniku, protonového skluzu, elektronového skluzu a kationtového obratu [Pesta a Gnaiger, 2012]. Snížení kontrolního poměru LEAK po přidání propolisu bylo pravděpodobně dáno zvýšenou efektivitou elektronového transportu přes komplex II při stavu S3u. Možný výklad molekulárního mechanismu vedoucího k aktivaci komplexu II byl podán ve studii Cimen a spol., kde byla prokázána zvýšená deacetylace a aktivace sukcinát dehydrogenázy v přítomnosti jedné ze složek propolisu – kaempferolu [Cimen et al., 2010].

Vliv propolisu a jeho součástí na spermie byl doposud zkoumán jen velmi vzácně. Celý propolisový extrakt byl použit ve studiích Yousefa a spolupracovníků, kde byl propolis podáván po 10 až 12 týdnů králíkům a potkanům [Yousef a Salama, 2009; Yousef et al., 2010]. Podání propolisu způsobilo zvýšení počtu spermií i jejich motility, dále došlo ke zvýšení hladiny testosteronu v plazmě a snížení počtu mrtvých a deformovaných spermií. Další studie dokumentovala pozitivní efekt chrysinu na motilitu spermií, jejich koncentraci a hladinu testosteronu v séru [Ciftci et al., 2012]. Ke zvýšení viability a motility spermií došlo i při použití kyseliny ferulové [Zheng a Zhang, 1997]. Všechny tyto nálezy byly vysvětleny antioxidační aktivitou propolisu a žádná ze studií se nezabývala vlivem propolisu nebo jeho součástí na produkci energie mitochondriemi.

Výsledky našich experimentů naznačují, že v lidských spermích hraje oxidativní fosforylace významnou roli v získávání energie pro pohyb spermií. Ukazuje se také, že asthenozoospermie může být spojená s narušenou funkcí mitochondrií [Ferramosca et al., 2012a]. Vysokoučinná respirometrie může vnést do hledání nových látek pozitivně ovlivňujících motilitu spermií a jejich fertilizační schopnost nové možnosti. Detailní analýza respirační efektivity jednotlivých mitochondriálních enzymatických komplexů může přinést také nové poznatky umožňující lepší pochopení funkčních poruch spermií.

5 Závěry

5.1 Závěry vztahující se k cíli 1 a 2

Studium vybraných složek folikulární tekutiny jako markerů pro sledování kvality lidských oocytů a vliv nadváhy na úspěšnost technik asistované reprodukce

Folikulární tekutina zajišťuje charakteristické a nezastupitelné mikroprostředí, které ovlivňuje vývoj oocyty. Biochemické složení folikulární tekutiny má zásadní vliv na vývojový potenciál vajíčka. Cílem našich experimentů bylo porovnání hladin vybraných hormonů a markerů oxidačního stresu ve folikulární tekutině žen s poruchou plodnosti a zdravých plodných dárcyň oocytů. Dále jsme porovnávali výsledky léčby neplodnosti u skupiny neplodných žen podstupujících ART v závislosti na hodnotách jejich BMI a změny hladin vybraných hormonů a markerů oxidačního stresu ve folikulární tekutině.

Výsledky této části práce potvrzují přítomnost prolaktinu, hormonů štítné žlázy, HCy a dalších parametrů oxidačního stresu ve folikulární tekutině a naznačují jejich klíčovou roli v regulaci reprodukčních procesů. Dále byla prokázána vyšší hladinu volného T3 hormonu a nižší hladina cytoprotektivního enzymu GPx ve folikulární tekutině u žen s vyšším BMI oproti ženám s nižším BMI. Nepotvrdil se však negativní efekt nadváhy na úspěšnost otěhotnění u neplodných žen. Závěry z naší studie jsou limitovány relativně malým počtem pacientek ve skupině s nadváhou.

Hormonální i antioxidační složka folikulární tekutiny hraje významnou úlohu ve vývoji oocyty, a proto bude kompletní znalost jejího biochemického složení spolu s poznáním role jednotlivých složek hrát v budoucnu roli v identifikaci zatím nejasných patofyziologických mechanismů neplodnosti i faktorů, jež ovlivňují úspěšnost její léčby.

5.2 Závěry vztahující se k cíli 3

Funkce mitochondrií ve spermii u mužů s normozoospermii a asthenozoospermii

Jednou z příčin mužské neplodnosti je snížená motilita spermií. Ukazuje se, že ve vývoji této poruchy může hrát roli snížená efektivita respirační aktivity mitochondrií.

V této části práce jsme měřili respirační aktivitu mitochondrií lidských spermií s normální a sníženou pohyblivostí. Použili jsme spermie permeabilizované digitoninem a spotřebu kyslíku jsme měřili vysokoúčinnou oxygrafií, která umožňuje stanovení mitochondriální respirační aktivity v nejmenším možném počtu zárodečných buněk. Výsledky studie potvrzují sníženou aktivitu komplexu I u asthenozoospermatiků a naznačují, že na snížené pohyblivosti spermií by se mohl podílet i zvýšený únik protonů z mitochondriální matrix, který vede ke snížené efektivitě fosforylačního procesu.

Dokonalejší charakterizace mužských zárodečných buněk, ať zcela zdravých či s postiženou motilitou přispějí k lepšímu pochopení procesu fyziologického oplodnění. Nové poznatky z této oblasti mohou přispět i k rozšíření a upřesnění parametrů výběru té nejživotoschopnější spermie pro léčbu neplodnosti metodami asistované reprodukce.

5.3 Závěry vztahující se k cíli 4

Efekt českého propolisu na mitochondriální funkce lidských spermií

Jedná se o první studii studující vliv propolisu na mitochondriální funkce spermií. Doposud byl jeho efekt sledován pouze u somatických buněk.

Vzorky ejakulátu od 10 dobrovolníků byly zpracovány a vyhodnoceny dle kritérií Světové zdravotnické organizace z roku 2010. Účinek propolisu byl sledován jak na nativním vzorku, tak po jeho laboratorním zpracování.

Ve vzorcích ošetřených propolisem došlo ke zmírnění poklesu progresivní motility v čase. U těchto vzorků byla pozorována i signifikantně vyšší spotřeba kyslíku v přítomnosti ADP a substrátů komplexů I a II (stav OXPHOS I+II). Po přidání propolisu došlo také k signifikantnímu zvýšení aktivity komplexu IV a po přidání rotenonu i stavu ETS II. Naopak stav LEAK navozený přítomností oligomycinu ovlivněn nebyl, stejně jako mitochondriální membránový potenciál.

Tato studie jako první ukazuje, že ethanolový extrakt propolisu zvyšuje aktivitu mitochondriálních respiračních komplexů II a IV bez ovlivnění mitochondriálního membránového potenciálu. Získaná data naznačují, že propolis zlepšuje celkovou respirační efektivitu lidských spermií in vitro, a tedy má potenciál pro zlepšení motility spermií.

5.4 Závěry pro praxi a výhled do budoucna

Hledání nových biomarkerů a funkčních testů je rychle se rozšiřující oblast reprodukční medicíny. Jejich nalezení může napomoci k zpřesnění diagnostiky příčin lidské neplodnosti, zkvalitnit prognostický potenciál léčby pomocí metod asistované reprodukce, pomoci s výběrem té nejvhodnější metody a mít tak pozitivní vliv nejen na psychiku neplodného páru, ale i na celkové ekonomické zatížení spojené s léčbou.

Dokonalejší charakterizace ženských i mužských gamet, jejich vývoje a možností jejich ovlivnění, mohou napomoci k lepšímu pochopení procesu fyziologického oplodnění a vývoje nového jedince.

Podařilo se nám identifikovat rozdílné hladiny hormonů a markerů oxidačního stresu u žen trpících neplodností v porovnání se zdravými dárkyněmi oocytů. V navazující práci bychom se chtěli zaměřit na zpřesnění těchto rozdílů, a to již ne v poolované folikulární tekutině, ale ve folikulární tekutině odebrané z jednotlivých folikulů individuálně.

Prokázali jsme možnost využití metody vysokoúčinné respirometrie na spermatické vzorky. Tato metoda může napomoci k identifikaci porušeného mitochondriálního dýchání u spermií a má tedy potenciál zkvalitnit diagnostiku příčin asthenozoospermie. Dále ji je možné využít k identifikaci látek podporujících nebo naopak negativně ovlivňujících mitochondrie ve spermiích a tedy produkci energie pro jejich správnou motilitu.

6 Literatura

- Agarwal, A., Gupta, S., and Sharma, R. (2005). Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician’s perspective. *Reprod. Biomed. Online* 11, 641–650.
- Aitken, R.J., Ryan, A.L., Baker, M.A., and McLaughlin, E.A. (2004a). Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 994–1010.
- Aitken, R.J., Ryan, A.L., Baker, M.A., and McLaughlin, E.A. (2004b). Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 994–1010.
- Alpay, Z., Saed, G.M., and Diamond, M.P. (2006). Female Infertility and Free Radicals: Potential Role in Adhesions and Endometriosis. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 13, 390–398.
- Alvarez, J.G., and Storey, B.T. (1989). Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* 23, 77–90.
- Angelucci, S., Ciavardelli, D., Di Giuseppe, F., Eleuterio, E., Sulpizio, M., Tiboni, G.M., Giampietro, F., Palumbo, P., and Di Ilio, C. (2006). Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 1775–1785.
- Ankel-Simons, F., and Cummins, J.M. (1996). Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13859–13863.
- Appasamy, M., Jauniaux, E., Serhal, P., Al-Qahtani, A., Groome, N.P., and Muttukrishna, S. (2008). Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. *Fertil. Steril.* 89, 912–921.
- Baka, S., and Malamitsi-Puchner, A. (2006). Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. *Reprod. Biomed. Online* 12, 500–506.
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.* 100, 114–117.
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., and Sabatini, A.-G. (2002). Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z. Für Naturforschung C J. Biosci.* 57, 530–533.
- Barros Silva, R., Santos, N.A.G., Martins, N.M., Ferreira, D.A.S., Barbosa, F., Jr, Oliveira Souza, V.C., Kinoshita, A., Baffa, O., Del-Bel, E., and Santos, A.C. (2013). Caffeic acid phenethyl ester protects against the dopaminergic neuronal loss induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Neuroscience* 233, 86–94.
- Bellver, J., Ayllón, Y., Ferrando, M., Melo, M., Goyri, E., Pellicer, A., Remohí, J., and Meseguer, M. (2010). Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertil. Steril.* 93, 447–454.
- Benkhalifa, M., Montjean, D., Cohen-Bacrie, P., and Ménézo, Y. (2010). Imprinting: RNA expression for homocysteine recycling in the human oocyte. *Fertil. Steril.* 93, 1585–1590.
- Blum, A.E., Walsh, B.C., and Dubyak, G.R. (2010). Extracellular osmolarity modulates G protein-coupled receptor-dependent ATP release from 1321N1 astrocytoma cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298, C386–396.
- Bonvehí, J.S., and Gutiérrez, A.L. (2012). The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1351–1358.

- Bougoulia, M., Triantos, A., and Koliakos, G. (2006). Plasma interleukin-6 levels, glutathione peroxidase and isoprostane in obese women before and after weight loss. Association with cardiovascular risk factors. *Horm. Athens Greece* 5, 192–199.
- Boxmeer, J.C., Steegers-Theunissen, R.P.M., Lindemans, J., Wildhagen, M.F., Martini, E., Steegers, E.A.P., and Macklon, N.S. (2008). Homocysteine metabolism in the pre-ovulatory follicle during ovarian stimulation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 23, 2570–2576.
- Boxmeer, J.C., Macklon, N.S., Lindemans, J., Beckers, N.G.M., Eijkemans, M.J.C., Laven, J.S.E., Steegers, E.A.P., and Steegers-Theunissen, R.P.M. (2009). IVF outcomes are associated with biomarkers of the homocysteine pathway in monofollicular fluid. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 24, 1059–1066.
- Broekmans, F.J., Kwee, J., Hendriks, D.J., Mol, B.W., and Lambalk, C.B. (2006). A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum. Reprod. Update* 12, 685–718.
- Budak, E., Fernández Sánchez, M., Bellver, J., Cerveró, A., Simón, C., and Pellicer, A. (2006). Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. *Fertil. Steril.* 85, 1563–1581.
- Chen, V., Staub, R.E., Baggett, S., Chimmani, R., Tagliaferri, M., Cohen, I., and Shtivelman, E. (2012). Identification and analysis of the active phytochemicals from the anti-cancer botanical extract Bezielle. *PLoS One* 7, e30107.
- Ciftci, O., Ozdemir, I., Aydin, M., and Beytur, A. (2012). Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. *Andrologia* 44, 181–186.
- Cimen, H., Han, M.-J., Yang, Y., Tong, Q., Koc, H., and Koc, E.C. (2010). Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry (Mosc.)* 49, 304–311.
- Das, S., Das, J., Samadder, A., Boujedaini, N., and Khuda-Bukhsh, A.R. (2012). Apigenin-induced apoptosis in A375 and A549 cells through selective action and dysfunction of mitochondria. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 237, 1433–1448.
- Dechaud, H., Anahory, T., Reyftmann, L., Loup, V., Hamamah, S., and Hedon, B. (2006). Obesity does not adversely affect results in patients who are undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 127, 88–93.
- Ebisch, I.M.W., Peters, W.H.M., Thomas, C.M.G., Wetzels, A.M.M., Peer, P.G.M., and Steegers-Theunissen, R.P.M. (2006). Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 21, 1725–1733.
- El-Mir, M.Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Avéret, N., Rigoulet, M., and Leverve, X. (2000). Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* 275, 223–228.
- Escalier, D. (2006). Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Hum. Reprod. Update* 12, 449–461.
- Farooqi, I.S., Jebb, S.A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C.H., Prentice, A.M., Hughes, I.A., McCamish, M.A., and O’Rahilly, S. (1999). Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N. Engl. J. Med.* 341, 879–884.
- Ferlitsch, K., Sator, M.O., Gruber, D.M., Rücklinger, E., Gruber, C.J., and Huber, J.C. (2004). Body mass index, follicle-stimulating hormone and their predictive value in in vitro fertilization. *J. Assist. Reprod. Genet.* 21, 431–436.

- Ferramosca, A., Focarelli, R., Piomboni, P., Coppola, L., and Zara, V. (2008b). Oxygen uptake by mitochondria in demembrated human spermatozoa: a reliable tool for the evaluation of sperm respiratory efficiency. *Int. J. Androl.* *31*, 337–345.
- Ferramosca, A., Provenzano, S.P., Coppola, L., and Zara, V. (2012a). Mitochondrial respiratory efficiency is positively correlated with human sperm motility. *Urology* *79*, 809–814.
- Ferramosca, A., Provenzano, S.P., Coppola, L., and Zara, V. (2012b). Mitochondrial respiratory efficiency is positively correlated with human sperm motility. *Urology* *79*, 809–814.
- Ford, W.C.L. (2006). Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum. Reprod. Update* *12*, 269–274.
- Forges, T., Monnier-Barbarino, P., Alberto, J.M., Guéant-Rodriguez, R.M., Daval, J.L., and Guéant, J.L. (2007). Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum. Reprod. Update* *13*, 225–238.
- Fortune, J.E. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* *50*, 225–232.
- Giannattasio, A., De Rosa, M., Smeraglia, R., Zarrilli, S., Cimmino, A., Di Rosario, B., Ruggiero, R., Colao, A., and Lombardi, G. (2002). Glutathione peroxidase (GPX) activity in seminal plasma of healthy and infertile males. *J. Endocrinol. Invest.* *25*, 983–986.
- Goyal, R., Singhai, M., and Faizy, A.F. (2011). Glutathione peroxidase activity in obese and nonobese diabetic patients and role of hyperglycemia in oxidative stress. *J. -Life Health* *2*, 72–76.
- Gürbüz, B., Yalti, S., Ficicioglu, C., and Taşdemir, S. (2005). The relation of serum and follicular fluid leptin and ovarian steroid levels in response to induction of ovulation in in vitro fertilization cycles. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* *118*, 214–218.
- Kamel, M.A., Zabel, G., Bernart, W., Neulen, J., and Breckwoldt, M. (1994). Comparison between prolactin, gonadotrophins and steroid hormones in serum and follicular fluid after stimulation with gonadotrophin-releasing hormone agonists and human menopausal gonadotrophin for an in-vitro fertilization programme. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *9*, 1803–1806.
- Kuchenbecker, W.K.H., Ruifrok, A.E., Bolster, J.H.T., Heineman, M.J., and Hoek, A. (2006). [Subfertility in overweight women]. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* *150*, 2479–2483.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., and Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* *64*, 235–240.
- Kumaran, K.S., and Prince, P.S.M. (2010). Caffeic acid protects rat heart mitochondria against isoproterenol-induced oxidative damage. *Cell Stress Chaperones* *15*, 791–806.
- Kuznetsov, A.V., Strobl, D., Ruttman, E., Königsrainer, A., Margreiter, R., and Gnaiger, E. (2002). Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Anal. Biochem.* *305*, 186–194.
- Lagoa, R., Graziani, I., Lopez-Sanchez, C., Garcia-Martinez, V., and Gutierrez-Merino, C. (2011). Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* *1807*, 1562–1572.
- Larsen, S., Nielsen, J., Hansen, C.N., Nielsen, L.B., Wibrand, F., Stride, N., Schroder, H.D., Boushel, R., Helge, J.W., Dela, F., et al. (2012). Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J. Physiol.* *590*, 3349–3360.
- Lashen, H., Ledger, W., Bernal, A.L., and Barlow, D. (1999). Extremes of body mass do not adversely affect the outcome of superovulation and in-vitro fertilization. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *14*, 712–715.

Lebedeva IYu, Denisenko YYu, Lebedev, V.A., and Kuzmina, T.I. (1998). Prolactin in follicular fluid and intracellular store calcium in follicular cells are related to morphological signs of ovarian follicle atresia in cows: work in progress. *Theriogenology* 49, 509–519.

Lee, Y.S., Kim, A.Y., Choi, J.W., Kim, M., Yasue, S., Son, H.J., Masuzaki, H., Park, K.S., and Kim, J.B. (2008). Dysregulation of adipose glutathione peroxidase 3 in obesity contributes to local and systemic oxidative stress. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 22, 2176–2189.

Charakteristika lesní správy [online] Lesy ČR, s. p. [vid. 30.06.14]. Dostupné z: <http://www.lesy.cz/ls229/charakteristika-lesni-spravy/Stranky/default.aspx>

Marchetti, P., Ballot, C., Jouy, N., Thomas, P., and Marchetti, C. (2012). Influence of mitochondrial membrane potential of spermatozoa on in vitro fertilisation outcome. *Andrologia* 44, 136–141.

Marin, S., Chiang, K., Bassilian, S., Lee, W.-N.P., Boros, L.G., Fernández-Novell, J.M., Centelles, J.J., Medrano, A., Rodriguez-Gil, J.E., and Cascante, M. (2003). Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett.* 554, 342–346.

Matalliotakis, I., Cakmak, H., Sakkas, D., Mahutte, N., Koumantakis, G., and Arici, A. (2008). Impact of body mass index on IVF and ICSI outcome: a retrospective study. *Reprod. Biomed. Online* 16, 778–783.

Wylie Mendoza, C., Ruiz-Requena, E., Ortega, E., Cremades, N., Martinez, F., Bernabeu, R., Greco, E., and Tesarik, J. (2002). Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 17, 1017–1022.

Menezo, Y., Elder, K., Benkhalifa, M., and Dale, B. (2010). DNA methylation and gene expression in IVF. *Reprod. Biomed. Online* 20, 709–710.

Mitchell, M., Armstrong, D.T., Robker, R.L., and Norman, R.J. (2005). Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reprod. Camb. Engl.* 130, 583–597.

Moragianni, V.A., Jones, S.-M.L., and Ryley, D.A. (2012). The effect of body mass index on the outcomes of first assisted reproductive technology cycles. *Fertil. Steril.* 98, 102–108.

Mukai, C., and Okuno, M. (2004). Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol. Reprod.* 71, 540–547.

Nagdas, S.K., Winfrey, V.P., and Olson, G.E. (2005). Tyrosine phosphorylation generates multiple isoforms of the mitochondrial capsule protein, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx), during hamster sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 72, 164–171.

Nagdas, S.K., Winfrey, V.P., and Olson, G.E. (2006). Identification of a hamster sperm 26-kilodalton dehydrogenase/reductase that is exclusively localized to the mitochondria of the flagellum. *Biol. Reprod.* 75, 197–202.

Ocal, P., Ersoylu, B., Cepni, I., Guralp, O., Atakul, N., Irez, T., and Idil, M. (2012). The association between homocysteine in the follicular fluid with embryo quality and pregnancy rate in assisted reproductive techniques. *J. Assist. Reprod. Genet.* 29, 299–304.

Okada, Y., and Maeno, E. (2001). Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 130, 377–383.

Okumura, K., and Tsukamoto, H. (2011). Folate in smokers. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 412, 521–526.

Oyawoye, O.A., Abdel-Gadir, A., Garner, A., Leonard, A.J., Perrett, C., and Hardiman, P. (2009). The interaction between follicular fluid total antioxidant capacity, infertility and early reproductive outcomes during in vitro fertilization. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* 14, 205–213.

- Ozkaya, M.O., and Nazıroğlu, M. (2010). Multivitamin and mineral supplementation modulates oxidative stress and antioxidant vitamin levels in serum and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* *94*, 2465–2466.
- Ozturk, G., Ginis, Z., Akyol, S., Erden, G., Gurel, A., and Akyol, O. (2012). The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of melanomas, lung and prostate cancers. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* *16*, 2064–2068.
- Park, D.-W., and Yang, K.-M. (2011). Hormonal regulation of uterine chemokines and immune cells. *Clin. Exp. Reprod. Med.* *38*, 179–185.
- Pasquali, R., Patton, L., and Gambineri, A. (2007). Obesity and infertility. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* *14*, 482–487.
- Paszowski, T., Clarke, R.N., and Hornstein, M.D. (2002). Smoking induces oxidative stress inside the Graafian follicle. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *17*, 921–925.
- Pelusi, C., and Pasquali, R. (2003). Polycystic ovary syndrome in adolescents: pathophysiology and treatment implications. *Treat. Endocrinol.* *2*, 215–230.
- Peña, F.J., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J.A., Ortega Ferrusola, C., González Fernández, L., and Macías García, B. (2009). Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* *44*, 345–349.
- Perl, A., Qian, Y., Chohan, K.R., Shirley, C.R., Amidon, W., Banerjee, S., Middleton, F.A., Conkrite, K.L., Barcza, M., Gonchoroff, N., et al. (2006). Transaldolase is essential for maintenance of the mitochondrial transmembrane potential and fertility of spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 14813–14818.
- Pesta, D., and Gnaiger, E. (2012). High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *810*, 25–58.
- Petrunkina, A.M., Harrison, R.A.P., Tsoleva, M., Jebe, E., and Töpfer-Petersen, E. (2007). Signalling pathways involved in the control of sperm cell volume. *Reprod. Camb. Engl.* *133*, 61–73.
- Piasecka, M., and Kawiak, J. (2003). Sperm mitochondria of patients with normal sperm motility and with asthenozoospermia: morphological and functional study. *Folia Histochem. Cytobiol. Pol. Acad. Sci. Pol. Histochem. Cytochem. Soc.* *41*, 125–139.
- Piasecka, M., Laszczyńska, M., and Gaczarzewicz, D. (2003). Morphological and functional evaluation of spermatozoa from patients with asthenoteratozoospermia. *Folia Morphol.* *62*, 479–481.
- Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., Ferramosca, A., and Zara, V. (2012). The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int. J. Androl.* *35*, 109–124.
- Poppe, K., Velkeniers, B., and Glinde, D. (2007). Thyroid disease and female reproduction. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *66*, 309–321.
- Rajender, S., Rahul, P., and Mahdi, A.A. (2010). Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. *Mitochondrion* *10*, 419–428.
- Reinehr, T. (2010). Obesity and thyroid function. *Mol. Cell. Endocrinol.* *316*, 165–171.
- Reinehr, T., and Andler, W. (2002). Thyroid hormones before and after weight loss in obesity. *Arch. Dis. Child.* *87*, 320–323.
- Reinehr, T., Isa, A., de Sousa, G., Dieffenbach, R., and Andler, W. (2008). Thyroid hormones and their relation to weight status. *Horm. Res.* *70*, 51–57.

- Revelli, A., Delle Piane, L., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., and Rinaudo, P. (2009). Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 7, 40.
- Rittenberg, V., Sobaleva, S., Ahmad, A., Oteng-Ntim, E., Bolton, V., Khalaf, Y., Braude, P., and El-Toukhy, T. (2011). Influence of BMI on risk of miscarriage after single blastocyst transfer. *Hum. Reprod.* 26, 2642–2650.
- Rousset, S., Alves-Guerra, M.-C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A.-M., Bouillaud, F., and Ricquier, D. (2004). The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53 *Suppl 1*, S130–135.
- Ruiz-Pesini, E., Díez-Sánchez, C., López-Pérez, M.J., and Enríquez, J.A. (2007). The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Curr. Top. Dev. Biol.* 77, 3–19.
- Scheibye-Knudsen, M., and Quistorff, B. (2009). Regulation of mitochondrial respiration by inorganic phosphate; comparing permeabilized muscle fibers and isolated mitochondria prepared from type-1 and type-2 rat skeletal muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* 105, 279–287.
- Shah, D.K., Missmer, S.A., Berry, K.F., Racowsky, C., and Ginsburg, E.S. (2011). Effect of obesity on oocyte and embryo quality in women undergoing in vitro fertilization. *Obstet. Gynecol.* 118, 63–70.
- Stendardi, A., Focarelli, R., Piomboni, P., Palumberi, D., Serafini, F., Ferramosca, A., and Zara, V. (2011). Evaluation of mitochondrial respiratory efficiency during in vitro capacitation of human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 34, 247–255.
- St John, J.C., Sakkas, D., and Barratt, C.L. (2000a). A role for mitochondrial DNA and sperm survival. *J. Androl.* 21, 189–199.
- Van der Steeg, J.W., Steures, P., Eijkemans, M.J.C., Habbema, J.D.F., Hompes, P.G.A., Burggraaff, J.M., Oosterhuis, G.J.E., Bossuyt, P.M.M., van der Veen, F., and Mol, B.W.J. (2008). Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 23, 324–328.
- Storey, B.T. (2008). Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 427–437.
- Storey, B.T., and Kayne, F.J. (1980). Properties of pyruvate kinase and flagellar ATPase in rabbit spermatozoa: relation to metabolic strategy of the sperm cell. *J. Exp. Zool.* 211, 361–367.
- Styne-Gross, A., Elkind-Hirsch, K., and Scott, R.T., Jr (2005). Obesity does not impact implantation rates or pregnancy outcome in women attempting conception through oocyte donation. *Fertil. Steril.* 83, 1629–1634.
- Toreti, V.C., Sato, H.H., Pastore, G.M., and Park, Y.K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2013, 697390.
- Turner, R.M. (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod. Fertil. Dev.* 18, 25–38.
- Wiener-Megnazi, Z., Vardi, L., Lissak, A., Shnizer, S., Reznick, A.Z., Ishai, D., Lahav-Baratz, S., Shiloh, H., Koifman, M., and Dirnfeld, M. (2004). Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 82 *Suppl 3*, 1171–1176.
- Winter, E., Wang, J., Davies, M.J., and Norman, R. (2002). Early pregnancy loss following assisted reproductive technology treatment. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 17, 3220–3223.

Wojtyczka, R.D., Dziedzic, A., Idzik, D., Kępa, M., Kubina, R., Kabała-Dzik, A., Smoleń-Dzirba, J., Stojko, J., Sajewicz, M., and Wąsik, T.J. (2013). Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates to Propolis Extract Alone or in Combination with Antimicrobial Drugs. *Mol. Basel Switz.* 18, 9623–9640.

World Health Organization (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (Geneva: World Health Organization).

Wylie, C.C., Stott, D., and Donovan, P.J. (1986). Primordial germ cell migration. *Dev. Biol. N. Y. N* 1985 2, 433–448.

Yeh, R.-D., Chen, J.-C., Lai, T.-Y., Yang, J.-S., Yu, C.-S., Chiang, J.-H., Lu, C.-C., Yang, S.-T., Yu, C.-C., Chang, S.-J., et al. (2011). Gallic acid induces G₀/G₁ phase arrest and apoptosis in human leukemia HL-60 cells through inhibiting cyclin D and E, and activating mitochondria-dependent pathway. *Anticancer Res.* 31, 2821–2832.

Yousef, M.I., and Salama, A.F. (2009). Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 47, 1168–1175.

Yousef, M.I., Kamel, K.I., Hassan, M.S., and El-Morsy, A.M.A. (2010). Protective role of propolis against reproductive toxicity of triphenyltin in male rabbits. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 48, 1846–1852.

Zhang, K., Shang, Y., Liao, S., Zhang, W., Nian, H., Liu, Y., Chen, Q., and Han, C. (2007). Uncoupling protein 2 protects testicular germ cells from hyperthermia-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 327–332.

Zheng, R.L., and Zhang, H. (1997). Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility, viability, lipid peroxidation, and cyclic nucleotides. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 581–586.

7 Poděkování

Tato práce vznikla na Ústavu histologie a embryologie a Ústavu fyziologie Lékařské fakulty v Plzni Univerzity Karlovy v Praze a v Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie, IVF Zentren Prof. Zech-Pilsen.

Ráda bych poděkovala svým školitelkám doc. MUDr. Mileně Králíčkové, Ph.D. a doc. MUDr. Jitce Kuncové, Ph.D. za inspirující vedení, pomoc při výběru tématu a cenné rady při tvorbě práce.

Děkuji také všem svým spolupracovníkům, zejména MUDr. Michaele Miklíkové a Mgr. Pavlu Pitulovi za jejich pomoc a podporu, Ing. Václavu Babuškovi, MUDr. Martině Grundmanové, MUDr. Janu Cendelínovi, Ph.D., Mgr. Zbyňku Houdkovi, Ph.D., MUDr. Kristýně Krakorové, Mgr. Pavle Lhotské a celému týmu z Institutu reprodukční medicíny a endokrinologie za jejich spolupráci a ochotu při pokusech.

Tento projekt byl podpořen Programem rozvoje vědních oborů Karlovy Univerzity (projekt P36), projektem OP VaVpI PO 2 Biomedicínské centrum ED2.1.00/03.0076, projektem specifického vysokoškolského výzkumu SVV 264804/2012, 266802/2013, 260048/2014 a grantem GA UK 696212.