

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra buněčné biologie, oddělení vývojové biologie

Bakalářská práce

Pavla Dostálová

Téma: Vliv estrogenů na kapacitaci a akrosomální reakci savčích spermií

(The influence of estrogens on mammalian sperm capacitation and acrosome reaction)

Školitelka: Doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc.

Praha 2008

Poděkování

Děkuji své školitelce Doc. RNDr. Janě Pěkníkové, CSc. za vedení při zpracování bakalářské práce.

Abstrakt

Kapacitace a akrosomální reakce jsou důležitou součástí procesů, kterými spermie musí projít, aby byly schopny oplodnit vajíčko. Během migrace ženským reprodukčním traktem spermie podstupují řadu regulovaných biochemických a membránových změn označovaných jako kapacitace. Tyto změny jsou nezbytné pro získání vlastností dovolujících spermii dosáhnout místa oplození, vazbu na *zona pellucida*, podstoupení akrosomální reakce, proniknutí vaječnými obaly a fúzi s vajíčkem. Akrosomální reakce je exocytosa akrosomálního obsahu, která nastává po fyziologických a farmakologických stimulacích.

Nejhojnějším estrogenem u lidí je 17 β -estradiol. Tento steroidní hormon má vliv jak na kapacitaci, tak na akrosomální reakci lidských ejakulovaných spermií. Vazba 17 β -estradiolu na membránový nongenomový receptor vyvolává rychlé odpovědi jako je zvýšení intracelulární koncentrace vápníku a inhibice progesteronových vlivů.

Za posledních 50 let v lidské populaci došlo k nárůstu neplodnosti. Pokles množství spermií a vzrůst poškození mužského reprodukčního traktu je spojován mimo jiné s vystavením přírodním estrogenům.

Protože lidé a zvířata jsou vystaveni značnému množství xenobiotik, další studium těchto látek je nezbytné pro stanovení rizik, detekce a legislativním opatřením.

Cílem této práce je shrnout známé vlivy estrogenů na kapacitaci a akrosomální reakci savčích spermií.

Klíčová slova: kapacitace, akrosomální reakce, 17- β estradiol, endokrinní disruptory

Abstract

Both capacitation and acrosome reaction are essential for successful egg fertilization. During sperm migration through the female genital tract, spermatozoa undergo a series of controlled biochemical and membranous changes, globally termed capacitation that enables them to reach and bind to *zona pellucida*, undergo the acrosome reaction, penetrate the egg vestments and, finally, fuse with the oocyte. In response to physiological or pharmacological stimuli, sperm undergo calcium-dependent exocytosis termed the acrosome reaction, which is an absolute prerequisite for fertilization.

The most potent and dominant estrogen in humans is 17β -estradiol. This steroid estrogen is able to influence both capacitation and acrosome reaction in human ejaculated spermatozoa. A nongenomic receptor for estradiol present on sperm plasma membrane mediates the rapid effects exerted by this hormone on sperm intracellular calcium concentration as well as on the biological response to progesterone. In particular, 17β -estradiol shows an inhibitory effect on progesterone mediated calcium influx and acrosome reaction.

In the last 50 years a significant decrease in human fertility has been observed. The decline in sperm count and increase in disorders of the male reproductive tract may be due to exposure to environmental estrogens (endocrine disruptors).

Since exposure to multiple xenobiotics is likely to occur in animals and humans, further investigation is needed to determine risk, detection and legislative steps.

The object of this study is to summarize the influence of estrogens on mammalian sperm capacitation and acrosome reaction.

Key words: capacitation, acrosom reaction, $17\text{-}\beta$ estradiol, endocrine disruptors

Obsah

Abstrakt; klíčová slova.....	3
Abstract; key words.....	4
1. Úvod.....	6
2. Kapacitace, akrosomální reakce.....	7
2.1 Kapacitace.....	7
2.2 Akrosomální reakce.....	9
3. Estrogeny.....	12
4. Hormonální disruptory.....	16
5. Závěr.....	20
6. Seznam zkratk.....	22
7. Seznam literatury.....	24

1. Úvod

Oplození je jedinečný proces, kdy dochází ke splynutí pohlavních buněk dvou jedinců téhož druhu za vzniku nového organismu. Ne všechny fáze tohoto procesu a faktory, které ho ovlivňují, jsou zcela známy.

Spermie vznikají ve varlatech samčího organismu procesem zvaným spermatogeneze, kdy z jedné diploidní spermatogonie vznikají meiotickým dělením 4 haploidní spermie. Nicméně takové spermie ještě nejsou schopné oplození. Musí projít řadou regulovaných dějů, jako je epididymální maturace a kapacitace, během nichž spermie získávají vlastnosti nezbytné pro úspěšné oplození vajíčka. Zralé spermie jsou skladovány v *cauda epididymis* a po ejakulaci putují z vaginy skrz děložní hrdlo a dělohu směrem k vajíčku, se kterým se setkávají v ampule vejcovodu. Po dosažení vajíčka dochází k primární vazbě spermie na vajíčko prostřednictvím interakcí mezi povrchovými proteiny spermie a *zona pellucida* vajíčka (Yanagimachi, 1994). Následuje akrosomální reakce, která umožňuje sekundární vazbu spermie na vajíčko pomocí intraakrosomálních proteinů, a oplození.

Nedávno provedené studie prokázaly, že více než 15% populace má problémy v oblasti reprodukce, přičemž muži jsou příčinou neplodnosti u více než 40% problémových párů (WHO, 1998). Za několik posledních desetiletí se výrazně snížila kvalita spermatu. Dříve byl za normospermika považován muž s 50 miliony spermií/ml a 50% morfologicky normálními spermii. Dnes je normospermik definován 20 miliony spermií/ml a 30% morfologicky normálními spermii (Pěkníková J., ústní sdělení). Předpokládá se, že tento pokles by mohl mít souvislost kromě jiného i s estrogenním vystavením v prostředí.

Soubor nepříznivých trendů mužské reprodukce byl pojmenován jako “testicular dysgenesis syndrom” (TDS) (Boisen et al., 2001). TDS může být způsoben jak genetickými, tak nepříznivými faktory životního prostředí, nebo kombinací obojího.

V současné době v mnoha světových laboratořích probíhá výzkum různých polutantů na organismy savců (model potkan, myš), nebo na vybrané buňky (linie buněk i spermie).

2. Kapacitace, akrosomální reakce

Kapacitace a akrosomální reakce jsou děje důležité pro úspěšné oplození vajíčka.

2.1 Kapacitace

Ejakulované spermie musí být určitou dobu v samičím reprodukčním traktu, kde prodělávají řadu biochemických a biofyzikálních změn označovaných jako kapacitační proces. První, kdo v roce 1951 doložil potřebu kapacitace pro úspěšné oplození vajíčka, byli nezávisle na sobě Chang a Austin (1984). Dodnes však nejsou zcela známy její molekulární mechanismy. Rychlost kapacitace je dána kvalitou spermatu, hormonálním stavem samice a je druhově závislá.

Proces kapacitace je spojován především se zvýšením tyrosinové fosforylace proteinů spermie, zvýšením intracelulární koncentrace vápníku, sodíku a bikarbonátu a naopak snížením intracelulární koncentrace chloridových a zinečnatých iontů (Baldi, 1996). *In vitro* studie na myších spermatických buňkách prokázaly stimulační vliv vápníku a bikarbonátu na adenyl cyklázu (AC) (Baldi et al., 1996). Aktivovaná AC generuje c-AMP, který aktivuje c-AMP dependentní kinázu (PKA). PKA fosforyluje tyrosin kinázu (TK) na serinových a threoninových zbytcích. Fosforylovaná TK je aktivní a fosforyluje další proteiny na tyrosinových zbytcích (Rajesh, 1996).

Během kapacitace rovněž dochází ke změnám ve složení a distribuci lipidů a fosfolipidů v plazmatické membráně (Yanagimachi, 1994), zvyšuje se syntéza fosfatidylcholinu a lysofosfolipidů (Baldi et al., 1996). Tyto změny způsobují zvýšení fluidity membrány (díky snížení obsahu cholesterolu), která se tak stává přístupnější pro lipid vázající komponenty ovidukální tekutiny. Integrované proteiny pocházející z nadvarlat jsou měněny, adsorbované molekuly ze semenné plazmy během ejakulace jsou odstraňovány (Rajesh, 1996). Výsledkem takovýchto změn je odhalení receptorů na povrchu spermie nezbytných pro rozpoznání a vazbu spermie na *zona pellucida* (ZP) vajíčka.

V *in vivo* systému pro správné načasování kapacitace a akrosomální reakce (AR) jsou nezbytné složky semenné plazmy (adenosin, „fertilization promoting peptid“ (FPP), kalcitonin a angiotensin II) (Fraser et al., 2006a) tzv. první posli, kteří se mohou vázat na specifické receptory na povrchu membrány spermie a spouštět tak různé signální kaskády regulující průběh kapacitace a AR. Adenosin, FPP a kalcitonin zprvu stimulují produkci

c-AMP, která je spojována se zvýšením kapacity, a posléze v kapacitovaných spermatických buňkách produkci c-AMP snižují, čímž zabraňují předčasné AR.

Mechanismus přeměny stimulačního vlivu těchto složek v inhibiční je spojován se ztrátou dekapacitačního faktoru (DF), který se vyskytuje přímo na povrchu spermie nebo v semenné plazmě a je vázán na povrch spermie (Fraser et al., 2006a). Vazba DF na DF-receptor na povrchu spermie působí stimulačně na kalmodulin senzitivní Ca^{2+} -ATPázu, která udržuje nízkou hladinu intracelulárního vápníku, a protože zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ je spojováno se zvýšením kapacity, vazba DF na DF-receptor kapacitaci inhibuje.

Jiným možným vysvětlením stimulačního-inhibičního vlivu FPP a adenosinu je existence dvou populací G-proteinů (stimulační G_s -protein a inhibiční G_i -protein) spojených se specifickými receptory pro FPP/adenosin (Fraser et al., 2006a). G_s -protein aktivující m-AC, která generuje c-AMP, je funkční pouze v nekapacitovaných spermatických buňkách, zatímco G_i -protein je funkční pouze v kapacitovaných buňkách.

Pozitivní vliv kalcitoninu na kapacitaci a bránění předčasné AR nemůže být vysvětlen stejným způsobem jako je tomu v případě FPP a adenosinu, protože kalcitonin je spojen pouze s jednou populací G-proteinů (Fraser et al., 2006a).

Angiotensin II má rovněž stimulační vliv na kapacitaci spojenou se zvýšením hladiny c-AMP (Fraser et al., 2006a), ale narušil od FPP nebrání předčasné AR, protože v kapacitovaných spermatických buňkách nesnižuje stimulaci c-AMP produkce.

Proti vlivům vyvolaným složkami semenné plazmy působí fosfodiesteráza (Fraser et al., 2006a), enzym který metabolizuje c-AMP na 5'-AMP. Během kapacity dochází ke snížení hladiny tohoto enzymu.

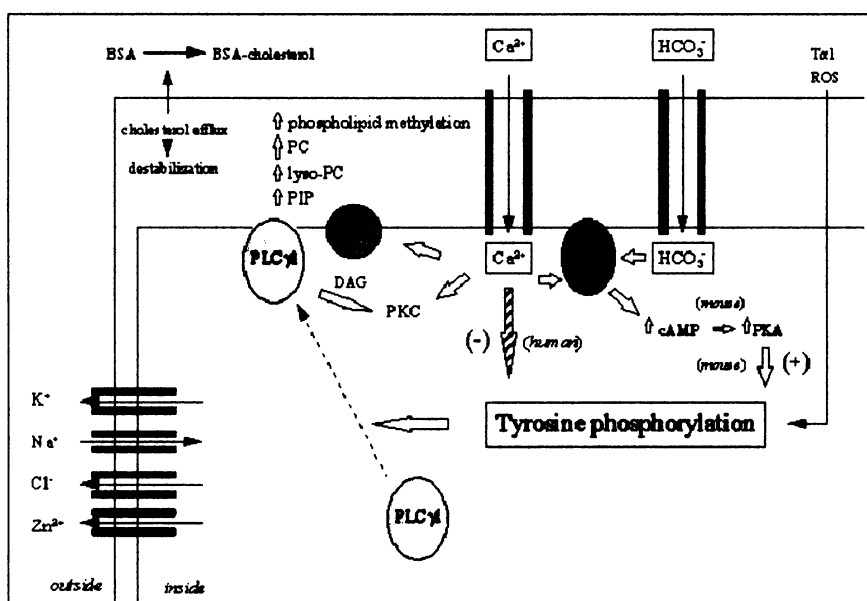
Na hladině c-AMP ve spermatických buňkách se podílí nejen mAC aktivovaná přes G-proteiny, ale také sAC, která je aktivovaná bikarbonátem (Baldi et al., 1996), Ca^{2+} a Mn^{2+} (Fraser et al., 2006a). Během kapacity se zvyšuje koncentrace bikarbonátu, proto je důležité, aby se na hladině c-AMP podílela i mAC, která je v kapacitovaných buňkách neaktivní, nezvyšuje tedy hladinu c-AMP a brání předčasné AR.

Protein tyrosinová fosforylace (PTP), je posttranslační modifikace proteinů specifická pro kapacitaci a AR spermii. Během kapacity jsou na tyrosinových zbytcích fosforylovány proteiny o molekulové váze 95 a 51 kDa (Rajesh, 1996) a 75 kDa (Baldi et al., 1996). 95-97 kDa protein je povrchový receptor spermie pro vazbu na ZP3 protein vajíčka (Baldi et al., 1996). Předpokládá se, že PTP hraje důležitou roli v regulaci draselných a vápenatých kanálů (Rajesh, 1996). V lidských spermiiích v podmínkách *in vitro* hraje intracelulární a extracelulární vápník odlišnou roli (Leclerc et al., 1998). Zatímco intracelulární vápník se

během kapacitace zvyšuje a indukuje vzrůst c-AMP, což vede až ke zvýšení PTP, zvyšující se koncentrace extracelulárního vápníku PTP snižuje.

Během kapacitace rovněž dochází ke změnám v metabolismu - zvyšuje se glykolýza a stoupá spotřeba kyslíku; a kvalitativním změnám pohybu-hyperaktivaci motility (Carrera at al., 1996).

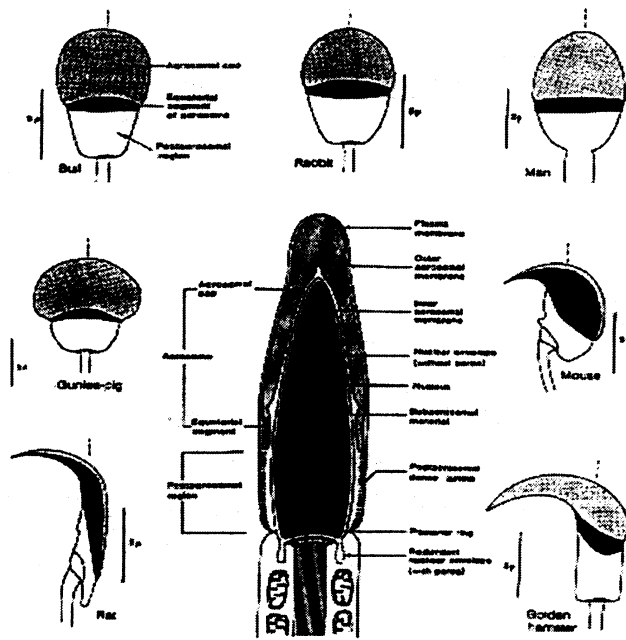
Pro kapacitaci *in vitro* jsou potřeba kapacitační media, která obsahují: energetický substrát (pyruvát, laktát, glukosa), cholesterolový akceptor (BSA), Na^+ , HCO_3^- , Ca^{2+} , nízkou koncentraci K^+ a fyziologickou koncentraci Na^+ (Visconti et al., 2002).



Obr.1 Schematické znázornění hlavních událostí nastávajících za podmínek vedoucích ke kapacitaci myších spermií *in vitro*. Během kapacitace dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace vápníku a bikarbonátu, to vede k aktivaci AC, která generuje c-AMP a následně dochází k aktivaci PKA, která aktivuje TK. Aktivovaná PLA a PLC generují fosfatidylcholin (PC), lysofosfatidylcholin (lyso-PC) a fosfatidylinositol (PIP). Zvyšuje se fluidita membrány především díky odstraňování cholesterolu, to může být urychleno přidáním BSA (Baldi et al., 1996)

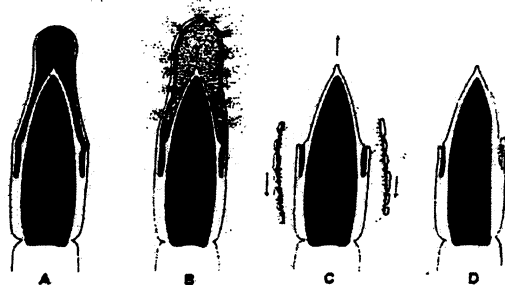
2.2 Akrosomální reakce

Akrosom je organela spermie vznikající během procesu spermatogeneze z Golgiho aparátu, která je složena ze dvou hlavních částí: *anterior cap* (akrosomální čepičky) v přední části jádra a *posterior region* nazývaný ekvatoriální segment. Akrosom obsahuje proteiny (enzymy) nezbytné pro vazbu a penetraci spermie do vajíčka.



Obr.2 Znárodnění relativní velikosti a topografického vztahu mezi akrosomální čepičkou a ekvatoriálním segmentem spermie u různých druhů savců (Yanagimachi, 1994)

Akrosomální reakce (AR) bývá někdy označována za poslední krok kapacitace. AR u myši nastává po interakci povrchových molekul spermie s ZP3 proteiny na povrchu vajíčka (Yanagimachi, 1994). V lidských spermích AR stimuluji ZP3 proteiny vajíčka, progesteron, sérum albumin a epidermální růstový faktor (Yanagimachi 1994). Citlivost spermí k ZP3 a progesteronu se během kapacitace zvyšuje, nejcitlivější jsou spermie k těmto stimulům v místě oplození vajíčka (Baldí et al., 1996). Po kontaktu spermie-ZP dochází ke vzniku mnoha fenestrací mezi vnější akrosomální membránou a plazmatickou membránou spermie, vylití akrosomálního obsahu a vystavení proteinů vnitřní akrosomální membrány, které se váží na ZP2 proteiny vajíčka.



Obr.3 Znárodnění postupu akrosomální reakce. A-před AR; B-během AR nastává fúze vnější akrosomální membrány a plazmatické membrány spermie, vzniká mnoho fenestrací a dochází k vylití akrosomálního obsahu. C, D- po dokončení AR (Yanagimachi, 1994)

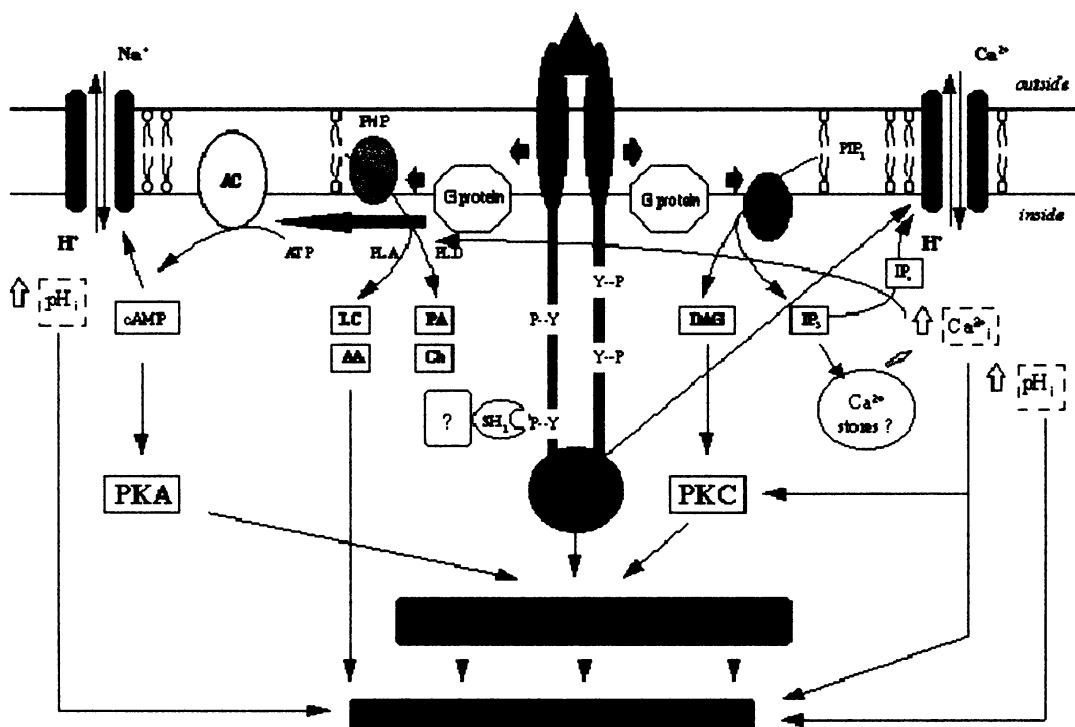
Po stimulaci spermií ZP3 proteinem a progesteronem dochází k agregaci receptorů a spuštění signální kaskády vedoucí k indukci AR (Baldi et al., 1996). V *in vitro* studiích bylo prokázáno, že přidání ZP3 proteinů ke kapacitovaným spermím ve vápenatém médiu působí rychlý vzrůst intracelulární koncentrace vápníku $[Ca^{2+}]_i$, po které následuje fáze plató (Baldi et al., 1996). Vzrůst $[Ca^{2+}]_i$ je způsoben aktivací pertusin toxin-citlivého G-proteinu, který je spojen s receptorem pro ZP3 peptid. Pohyb Ca^{2+} je také spojován s pohybem H^+ ven z buňky a zvýšením intracelulárního pH. AR nastává ve fázi vzrůstu $[Ca^{2+}]_i$ (Baldi et al., 1996).

Podobné stimulační vlastnosti má i progesteron, ale narozdíl od ZP3-stimulované AR k AR po stimulaci progesteronem dochází ve fázi plató (Baldi et al., 1996).

Pro aktivaci AR je vyžadována fosforylace proteinů. Tu zajišťují protein kinázy; PKA a PKC na serin-threoninových zbytcích a TK na tyrosinových zbytcích. Zvýšená $[Ca^{2+}]_i$ vede k aktivaci PKC, PKA, TK a PLC, PLA2, PLD (Baldi et al., 1996).

Aktivovaná PLC štěpí PIP_2 na DAG a IP_3 . DAG spolu s Ca^{2+} aktivuje PKC. Spekuluje se o možných intracelulárních zásobách vápníku. V takovém případě by byl Ca^{2+} zřejmě uvolňován po IP_3 -stimulaci příslušného receptoru. Aktivace PKA zahrnuje aktivaci m-AC, která generuje c-AMP. ZP-stimulace TK nevyžaduje extracelulární Ca^{2+} . Aktivovaná TK zvyšuje tyrosinovou fosforylaci proteinů a způsobuje autofosforylaci receptoru pro ZP3 peptid. Další signální dráhou závislou na zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ ve spermatických buňkách je aktivace PLA2. PLA2 vytváří lipidové metabolity jako je lysofosfatidylcholin, který dále přispívá ke zvýšení AR a motility spermie. Lipidové metabolity se mohou účastnit procesu fúze vnější akrosomální membrány a plazmatické membrány spermie.

K aktivaci PLD dochází až v pokročilém stádiu AR a její funkce na AR zatím není známa.



Obr.4 Schematické znázornění hlavních signálních drah zahrnutých v procesu AR po stimulaci ZP3 peptidy. Popis dějů viz text (Baldi et al., 1996)

Spermie, u kterých došlo k předčasné AR ztrátě proteinů na vnější akrosomální membráně a proto jsou neschopné vazby na ZP vajíčka (Yanagimachi, 1994), což vede k neplodnosti.

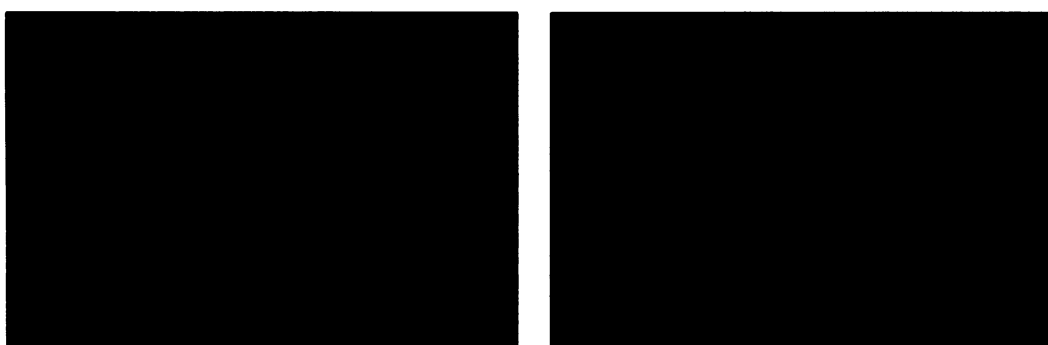
3. Estrogeny

Estrogeny jsou pohlavní hormony převažující u žen, proto bývají označovány jako tzv. ženské pohlavní hormony. Estrogeny však najdeme i v samčím organismu.

Estrogeny patří mezi steroidy a jsou derivovány z cholesterolu. Důležitým meziproductem při syntéze estrogenů je androstenedion, který je v reprodukčním období žen produkován thekálními buňkami, následně aromatizován vaječnickovými granulózními buňkami na estron a konvertován na estradiol. Menší množství estradiolu je produkováno u mužů ve varlatech Sertoliho buňkami a Leydigovými buňkami (Hess, 2000). Zde je androstenedion konvertován na testosteron, který je aromatizován na estradiol. Aromatázová aktivita byla rovněž objevena v germinálních buňkách a ejakulovaných lidských spermích (Rochira et al., 2005). Spermie tedy přichází do kontaktu s estrogenem jak během svého pobytu v ženském reprodukčním

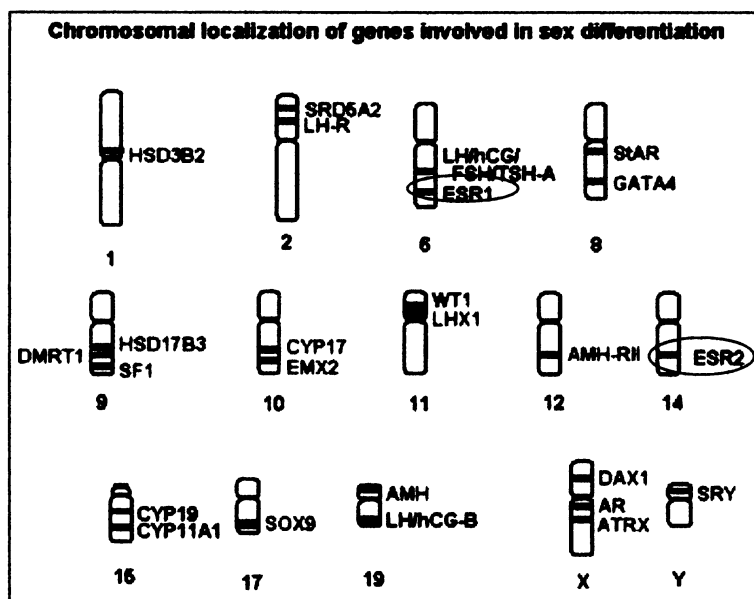
traktu, tak také během svého vývoje a je pravděpodobné, že estrogen má vliv na funkci spermií, což také potvrdily různé studie.

Estrogeny díky své steroidní povaze mohou volně procházet přes fosfolipidovou membránu a vázat se na estrogení receptory (ERs) v cytosolu. ERs byly poprvé objeveny Jensenem v roce 1950 (Mueller, 2004) a patří do rodiny jaderných receptorů. Jsou známy 2 formy klasických (genomových) ERs, obvykle označovaných jako ER α a ER β . Tyto dvě formy se liší v C-koncové ligand vázající doméně a N-koncové transaktivační doméně (Aquila et al., 2004). Oba ERs byly imunodetekovány v lidských spermatických buňkách; ER α v *middle piece* bičíku a ER β po celé délce bičíku (Aquila et al., 2004).



Obr.5 Imunolokalizace ER α (vlevo) a ER β (vpravo) v lidských ejakulovaných spermiích (Aquila et al., 2004)

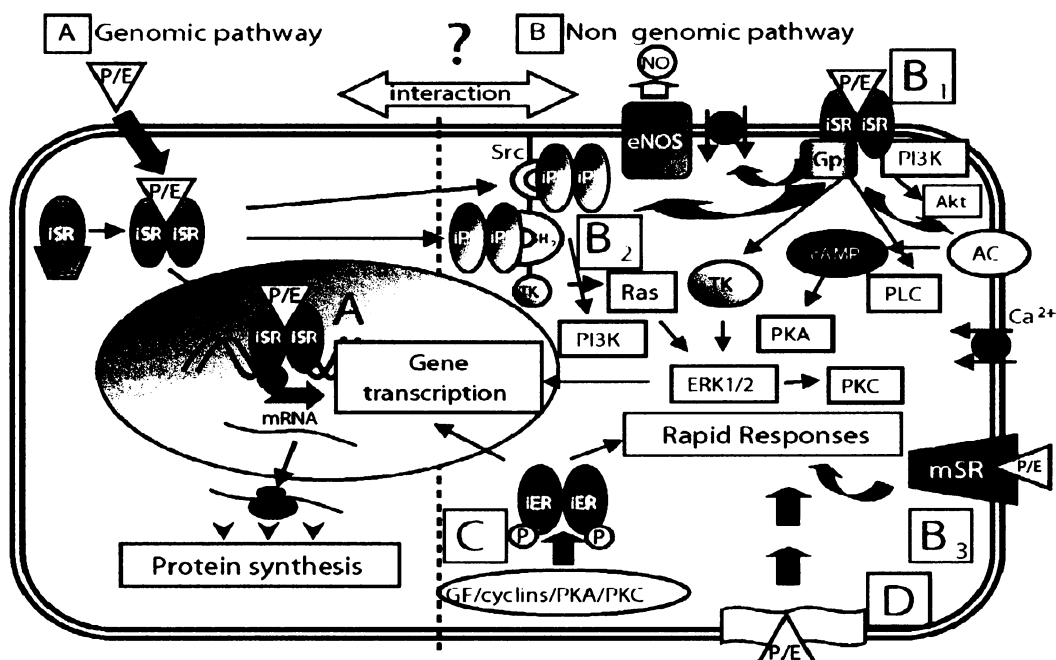
Genomové ERs jsou kódovány na různých genech (Aquila et al., 2004). ER α je kódován na 6. chromosomu, ER β na 14. chromosomu. Vedle klasických ERs byl ve spermiích objeven také membránový ER (mER) o molekulové váze 29 kDa (Luconi et al., 1999). Genomové ERs a mERs mají stejnou ligand-vázající doménu, ale mERs chybí DNA-vázající doména (Luconi et al., 1999).



Obr.6 Lokalizace ERs na chromosomech. ER α (zde ESR1) na 6.chromosomu, ER β (zde ESR2) na 14.chromosomu. (www.endotext.org/.../figures/figure24.jpg)

Vazba estrogenu na genomový ERs vyvolá změnu konformace receptoru, dojde k disociaci inhibičních Hsp (heat shock protein) a dimerizaci receptorů (Luconi et al., 2004; Mueller, 2004). Dimery prochází do jádra, kde se váží do specifické sekvence DNA v promotorové oblasti označované jako ERE („estrogen response element“). V jádře tyto komplexy regulují genovou transkripci. Vzniká tak mRNA, která je v cytoplazmě přepsána do proteinů. Nově syntetizované proteiny pak způsobují změny buněčné funkce.

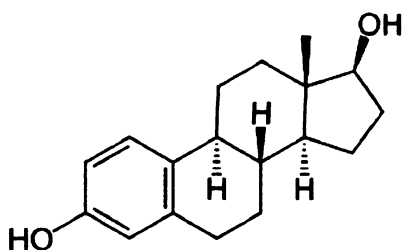
Protože DNA spermií je vysoce kondenzovaná a tedy nepřístupná pro transkripční faktory je nepravděpodobné, že by odpovědi vyvolané 17 β -estradiolem (E2) ve spermatických buňkách byly způsobeny změnou genové exprese. Mimo to, spermie postrádají ribosomy a translační aparát (Luconi et al., 2004), tudíž by nově vzniklá mRNA nemohla být přepsána do proteinů. Je tedy pravděpodobnější, že změny ve spermatických buňkách vyvolané po E2-stimulaci během kapacity a AR jsou negenomového původu. Tuto myšlenku potvrzuje i skutečnost, že inkubace spermií s protilátkou proti DNA-vazebné doméně neinhibuje E2-vyvolané odpovědi (Luconi et al., 2004).



Obr.7 Genomové a nengenomové působení E2 a progesteronu. A: Genomová dráha skrz klasické cytosolické jaderné receptory působící jako jaderné transkripční faktory; B: nengenomová dráha vyvolávající rychlé odpovědi skrz klasické cytosolické/jaderné receptory (B₁), nebo skrz multiproteinový komplex (B₂), nebo skrz membránové steroidní receptory (B₃). C: Alternativní dráha aktivace (fosforylaci) klasických ERs bez přítomnosti steroidního ligandu. D: dráha aktivace rychlých odpovědí buňky bez zahrnutí receptorů. E:estrogen; P: progesteron; iER a iPR: klasické cytosolické/jaderné ER; Gp: G protein (Luconi et al., 2004)

E2 je nejhojnější samičí endogenní steroidní hormon. V různých tkáních bylo prokázáno, že E2 ovlivňuje intracelulární koncentraci Ca²⁺, hladinu c-AMP, mitogenem aktivovanou protein kinázovou aktivitu, fosfolipázu C (PLC) a A2 (PLA2) a protein kinázu C (PKC) (Luconi et al., 1999).

17-beta-estradiol - přirozený steroidní hormon



E2, stejně jako progesteron, je složkou folikulární tekutiny, ve které se vyskytuje v mikromolární koncentraci (Luconi et al., 2004).

V *in vitro* studiích spermatických buněk bylo prokázáno, že E2 indukuje rychlý a trvalý vzrůst intracelulární koncentrace vápníku v závislosti na dávce E2 (Luconi et al., 1999); nutnou podmínkou je přítomnost extracelulárního Ca^{2+} v mediu. Závislost na extracelulárním Ca^{2+} nasvědčuje tomu, že spermie nemají intracelulární zásoby vápníku. Vzrůst Ca^{2+} v závislosti na E2 je bifázový proces s první složkou v nmol koncentraci a druhou v mikromolární koncentraci. Progesteron rovněž stimuluje rychlý vstup Ca^{2+} s bifázovým působením, zprvu progesteron stimuluje rychlý vstup Ca^{2+} , následuje fáze plató. Progesteronem stimulovaný vstup Ca^{2+} a AR je snížena, jsou-li spermie nejprve vystaveny E2 (Luconi et al., 2001). Vzrůst Ca^{2+} a PTP po stimulaci E2, není následováno indukci AR, spíše, v závislosti na dávce, E2 inhibuje působení progesteronu. Protože plató fáze vzrůstu Ca^{2+} indukovaného progesteronem je spojována s indukci AR (Baldi et al., 1996) a E2 tuto plató fázi snižuje, předpokládá se, že inhibice progesteronem stimulované AR je způsobena E2-inhibicí plató fáze (Luconi et al., 2001). Je možné, že částečný stimulační vliv E2 je spojen se stejnou signální dráhou jako progesteronová stimulace a tato interference vede k inhibici AR. Jiným možným vysvětlením je přímá kompetice E2 a progesteronu o stejný receptor.

Vzrůst intracelulární koncentrace Ca^{2+} po E2-stimulaci potvrdila i pozdější studie (He et al., 2005). E2, stejně jako konjugovaný E2-BSA (který není schopný procházet přes membránu a je tedy důkazem zahrnutí mERs v této stimulaci) zvyšovaly intracelulární koncentraci Ca^{2+} . Oproti dřívějším studiím však bylo pozorováno i zvýšení rychlosti AR v kapacitovaných spermích. Ke shodným závěrům došla i studie na křeččích epididymálních spermích v izolované myši děloze (Bathla et al., 1999). I zde docházelo k urychlení kapacitace a AR v závislosti na E2. Autoři předpokládají, že E2 může mít vliv na syntézu proteinů v děloze, které jsou důležité pro kapacitaci a AR.

Podle studie, kterou provedl Luconi et al. (1999) se vliv E2 zdá být specifický, protože 17α -estradiol nevyvolává vzrůst intracelulární koncentrace vápníku ani neinterferuje s progesteronovými vlivy. Pozdější studie však prokázala, že E2 a 17α -estradiol ve stejné míře urychlují kapacitaci a AR (Fraser et al., 2006) a zdá se tedy, že působí přes stejnou signální dráhu.

E2 rovněž stimuluje protein tyrosinovou fosforylací (PTP) několika proteinů včetně 29 kDa proteinu, což je mER (Luconi et al., 1999). Modulace fosforylovaného stavu estrogenových

receptorů samotnými steroidními hormony nebo jinými složkami je spojováno s transaktivací klasických genomových estrogenních receptorů. TP nastává v ligand vázající doméne genomových ERs (Luconi et al., 1999).

Protože hladiny estradiolu ve folikulární tekutině jsou podobné dávkám E2 indukujícím nengenomové vlivy, „cross talk“ mezi membránovými receptory spermie pro E2 a progesteron může být důležitý pro přesné načasování kapacity a AR v ženském reprodukčním traktu.

4. Hormonální disruptory

Živé organismy jsou vystaveny působení různých polutantů, což jsou látky přítomné jako kontaminanty životního prostředí. Některé z těchto látek, s kterými člověk i zvířata přichází denně do styku, jsou označovány jako endokrinní disruptory (EDs).

Podle definice publikované ve WHO studii v roce 2002, EDs jsou exogenní látky, nebo směsi, které ovlivňují funkci endokrinního systému, čímž působí nepříznivé vlivy v zasaženém organismu, jeho potomcích nebo populaci (WHO; 2002).

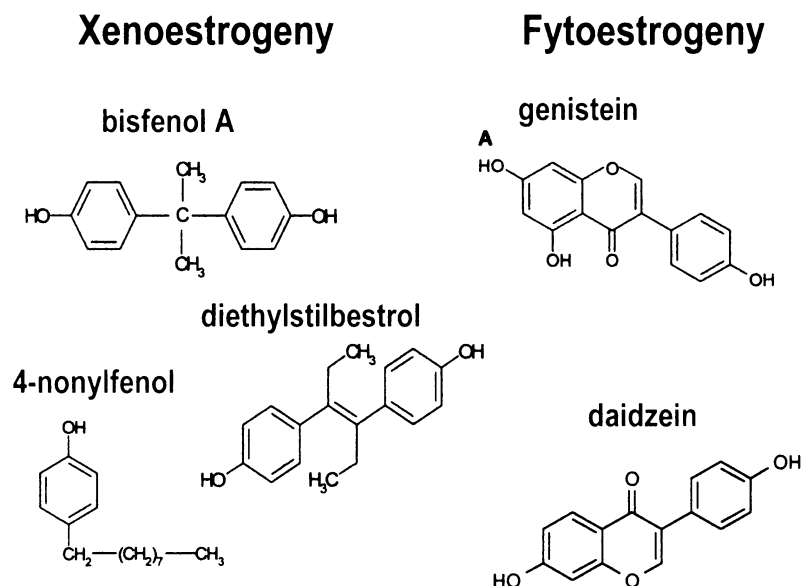
U množství EDs byla objevena estrogenní aktivita (schopnost vázat se na ERs). Syntetické látky s estrogenní aktivitou jsou známy jako xenoestrogeny, rostlinné složky s estrogenní aktivitou se nazývají fytoestrogeny a takovéto látky u hub bývají označovány za mykoestrogeny. Narozdíl od endogenních estrogenů, tyto látky nemusí být steroidní povahy.

Protože jsou ERs částečně promiskuitní (www.wiley.com/.../endocrine_disrupting.htm), mohou se na ně vázat xenoestrogeny i fytoestrogeny a působit jako částeční agonisté přirozeného endogenního hormonu E2. Přírodní estrogeny také mohou kompetovat s E2 o vazbu na ERs a působit jako antagonisté. Vzhledem k tomu, že estrogen má vliv na funkci spermií, je logické předpokládat, že chemické látky, které jsou schopny vázat se na ERs, mohou ovlivňovat mužskou plodnost. Tyto látky mají ale nižší estrogenní aktivitu než E2.

Velký zájem o možný negativní vliv přírodních estrogenů na plodnost nastal po objevení negativních vlivů syntetického nesteroidního estrogenu diethylstilbestrolu (DES). V letech 1938-1971 byl podáván těhotným ženám jako prevence proti potratům a komplikacím během těhotenství. U jejich synů pak byl prokázán zvýšený výskyt kryptorchismu, hypospadie, nádorů varlat a snížení počtu spermií (Schrager and Potter, 2004). Dnes je podávání tohoto léku zakázáno a používá se v laboratořích studujících vliv různých EDs, jako pozitivní kontrola.

Fytoestrogeny a xenoestrogeny

Pro studii vlivů estrogenních disruptorů na mužské pohlavní buňky byly používány především fytoestrogeny genistein (GEN) a daidzein a xenoestrogeny bisfenol A (BPA) a nonylfenol (NP).



BPA je organická složka se dvěma funkčními fenolovými skupinami. Je syntetizován z acetonu a dvou fenolů. Monomer je používán ve všudypřítomných plastech, polykarbonátech (Krishnan et al., 1993) a epoxidových pryskyřicích (Olea et al., 1996).

NP je organická sloučenina patřící do rodiny alkylfenolů. NP je průmyslová složka nacházející se v barvách, pesticidech a herbicidech (White et al., 1994). NP má slabou estrogenní aktivitu.

Hlavním zdrojem GEN a daidzeinu jsou sojové boby a tedy i veškeré sojové produkty; a luštěniny (Messina, 1999). GEN a daidzein jsou isoflavony strukturně podobné endogenním estrogenům. Výchozím substrátem pro syntézu GEN a daidzeinu je fenylalanin. Oba fytoestrogeny mají estrogenní i slabě antiestrogenní aktivitu (Faqi et al., 2004). Tyto aktivity mohou být příčinou poškození plodnosti a poruch reprodukčního traktu. Podle mnoha studií však GEN ani daidzein nemá vliv na váhu a morfologii varlat ani na množství a morfologii spermií (Faqi et al., 2004; Fielden et al., 2003).

In vitro provedená studie prokázala 17% zvýšení schopnosti oplození spermií u myši, kterým byly podávány vyšší dávky GEN (10 mg/kg/den) (Fielden et al., 2003). Výsledky této studie jsou v rozporu s tvrzením, že vyšší dávky GEN inhibují funkci TK (Tomes et al., 2004), která

je součástí signální kaskády aktivující AR. A protože AR je důležitou prerekvizitou úspěšného oplození vajíčka, měl by inhibiční vliv GEN spíše plodnost snižovat. Inhibiční vliv vyšších dávek GEN na AR v závislosti na délce vystavení potvrdili ve své studii Kumi-Diaka a Townsend (Kumi-Diaka and Townsend, 2003).

Při podávání nižších dávek měl GEN pozitivní vliv na reprodukci díky stimulaci AR (Kumi-Diaka and Townsend, 2003). Stimulaci kapacity a AR při nižších (nmol/l) dávkách potvrdila i pozdější studie na myších a lidských spermích (Fraser et al., 2006b). Navíc objevila, že vystavení spermím různě velkým dávkám GEN v nanomolárním spektru vyvolává stejně velké stimulační odpovědi. Stejným způsobem působí i další fytoestrogen daidzein (Fraser et al., 2006b). Možné vysvětlení stimulace AR v odpověď na GEN je zvýšení hladiny c-AMP, kterou Fraser a jeho skupina potvrdila. Zvýšení hladiny c-AMP je zřejmě v důsledku pozorovaného zvýšení $[Ca^{2+}]_i$, která stimuluje mAC. Zvýšená hladina c-AMP aktivuje PKA, dochází k neregulované fosforylaci proteinů a nežádoucí AR. Dále prokázali, že GEN stimuluje kapacitu a AR v koncentraci 10 nmol/l a vyšší, zatímco NP stimuluje až při koncentraci 1 μ mol/l a je tedy slabším agens.

Pravděpodobným vysvětlením stimulačních účinků při nižších dávkách GEN a inhibičních při dávkách vyšších je zahrnutí dvou různých signálních drah, kdy jedna vede ke stimulaci produkce c-AMP a druhá k inhibici TK. Při vyšších dávkách je GEN, který má nižší afinitu k ERs než E2 (Rosselli et al., 2000) zřejmě schopný kompetovat o volná vazebná místa na membráně spermie a působit jako antagonist endogenního hormonu, tedy nevyvolává PTP spojenou se zvýšením kapacity.

Přestože existuje obecná teorie průběhu kapacity a AR u savců, u různých druhů se mohou vyskytovat odlišnosti. Studie provedená na lidských a myších spermích prokázala, že lidské i myší spermie reagují podobným způsobem na GEN, nicméně lidské spermie jsou ke GEN citlivější (1nmol/l GEN u lidských spermím oproti 10 nmol/l GEN u myších spermím) (Fraser et al., 2006b). Tato studie rovněž prokázala, že GEN je účinnější ve stimulaci kapacity než FPP, složka semenné plazmy.

Vliv GEN byl také studován na zmrazených býčích spermích (Menzel et al., 2007). Zmrazení-roztavení má vliv na motilitu a kapacitu spermie (Menzel et al., 2007). Počáteční stav PTP ve zmrazených spermích může odrážet kapacitační změny podobné časné membránové modifikaci během fyziologické kapacity. Zřejmě díky této počáteční PTP GEN nemá vliv na kapacitu zmrazených spermím, nicméně stále brání indukci AR vyvolané stimulací ZP3 proteinem a progesteronem.

Mnoho xenoestrogenů je slabých a samostatně nepůsobí měřitelné vlivy. V prostředí jsme však vystaveni většímu množství hormonálních disruptorů, proto Rajapakse et al. (2002a) jeho skupina provedla studii vlivu kombinace 11 xenoestrogenů (všechny se vážaly na ER α) na AR. Přestože všechny složky byly pod svou hodnotou NOEC („no observed effect concentration“), jejich kombinace vedla k tlumení vlivů E2 (). Tento jev je vysvětlován podobným mechanismem působení jednotlivých složek, tudíž ve výsledku se mohou chovat jako složka jedna.

Kombinaci xenobiotik studovala i další vědecká skupina (Fraser et al., 2006b), která potvrdila vyšší stimulační vliv kombinace xenobiotik na kapacitaci (GEN+nonylphenol; GEN+8-PN); všechny složky byly v nanomolární koncentraci.

Molekulární studie prokázaly, že GEN kompetuje s E2 o vazebné místo na ERs (Kuiper et al., 1998), má však nižší afinitu k ERs než E2 (Rosseli et al., 2000). Zatímco E2 se váže na oba genomové ERs se stejnou afinitou, GEN má vyšší afinitu k ER β a mění tak poměr aktivovaných ERs.

Multigenerační studie vlivu GEN a DES na spermie myši prokázala přibližně stejný negativní vliv na stav akrosomu v P i F1 generaci (Kyselová et al., 2004), přesto ale zůstalo poměrně vysoké procento nepoškozených akrosomů (okolo 70-80%). F1 generace vystavená GEN však nevykazovala sníženou reprodukční schopnost, naproti tomu DES snížil počet mláďat ve vrhu a všichni potomci byli neplodní. Tato skupina (Kyselová et al., 2003) provedla podobnou studii i na NP a prokázala, že stejně jako v případě GEN a DES poškozuje akrosom v P i F1 generaci, závislost na dávce neprokázali.

BPA má podobně jako GEN negativní vliv na stav akrosomu (Pěkníková et al., 2002). BPA v nižších dávkách (2ng) poškozuje integritu akrosomu v P, F1 i F2 generaci. Při vyšší dávce (20 ng) se negativní vliv projevil až v F2 generaci. Účinek BPA je zřejmě způsoben indukci AR nebo změnami genové exprese. Nižší vliv vyšších dávek má dvojí možné vysvětlení: BPA reaguje s ER α jiným způsobem než estradiol, nebo mohou nízké koncentrace hormonů stimulovat, zatímco vysoké koncentrace mají inhibiční vliv.

5. Závěr

17 β -estradiol, přirozený endogenní hormon, se během kapacitace a AR váže na mER o molekulové váze 29 kDa. Vazba E2-mER vyvolává zvýšení intracelulární koncentrace vápníku a působí proti stimulačním vlivům progesteronu. Interakce mezi E2 a progesteronovým působením je zřejmě důležitý děj pro přesné načasování kapacitace a AR v samičím genitálním traktu. Ovlivnění interakce může vést k disregulaci dějů probíhajících během kapacitace a AR. Protože kapacitace a AR jsou nezbytnou prerekvizitou pro úspěšné oplození vajíčka, poruchy v regulaci kapacitace a AR vedou k neplodnosti.

Regulace úspěšné kapacitace může být narušena látkami v životním prostředí. Látky s estrogení aktivitou, které se v prostředí vyskytují přirozeně (fytoestrogeny), nebo jsou do prostředí uvolňovány lidmi (xenoestrogeny), mohou napodobovat endogenní estrogeny, vázat se na ERs na povrchu membrány a působit jako jejich agonisté, nebo mohou interferovat s receptory jiných signálních drah a blokovat tak působení endogenních hormonů.

Přestože většina studií neprokázala negativní vliv fytoestrogenů na mužský reprodukční trakt, ani na množství a motilitu spermií a naznačují tedy, že přírodní estrogeny nemají vliv na plodnost samců, studie vlivů přírodních estrogenů na kapacitaci a AR získaly výsledky, které jsou v rozporu s tímto tvrzením. Xenoestrogeny a fytoestrogeny mohou urychlovat kapacitační proces a zkracovat tak životnost spermií. Rovněž urychlují v *in vitro* podmínkách AR. To může mít negativní dopad na plodnost, protože předčasná AR vede ke ztrátě schopnosti spermie vázat se na ZP vajíčka. Inhibiční vliv GEN na kapacitaci je překonám kryopreservací.

Studie provedená na BPA (Pěknicová et al., 2002) ukázala, že někdy mohou mít nižší dávky xenobiotik horší dopad na živé organismy než dávky vyšší.

Problémy hodnocení vlivů xenoestrogenů a fytoestrogenů spočívají ve vystavení živých organismů velkému množství polutantů a časové prodlevě mezi vystavením a reakcí. Mezi pozorovatelnými vlivy a dobou vystavení může být značná časová prodleva a tedy v krátkodobých studiích nemusí být tyto vlivy patrné, proto většina studií vlivů polutantů na savce (včetně lidí) se nyní testuje v multigeneračních studiích.

Polutanty v životním prostředí (včetně estrogenů) mohou mít negativní vliv na savčí organismus a reprodukci, proto jejich studium je důležité pro stanovení rizik, detekci v prostředí a legislativním opatřením.

6. Seznam zkratek

[Ca ²⁺] _i	intracelulární koncentrace vápenatých iontů
5'-AMP	adenosin monofosfát s fosfátovou skupinou na 5. uhlíku
8-PN	8-prenylnaringenin
AC	adenylát cykláza
AR	akrosomální reakce
BPA	bisfenol A
BSA	hovězí sérový albumin
Ca ²⁺ -ATPáza	membránová pumpa transportující vápník za štěpení adenosintrifosfátu
c-AMP	cyklický adenosin monofosfát
DAG	Diacylglycerol
DES	Diethylstilbestrol
DF	dekapacitační faktor
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E2	17-beta estradiol
E2-BSA	17-beta estradiol spojený s hovězím sérovým albuminem
EDs	endokrinní disruptory
ERE	"estrogen response element" místo v DNA, na které se specificky váže ER
ERs	estrogenní receptory
ER α	estrogenní receptor alfa
ER β	estrogenní receptor beta
F1 generace	1. generace potomků
F2 generace	2. generace potomků
FPP	„fertilization promoting peptid“
GEN	Genistein
G _i -protein	inhibiční G-protein
G-protein	protein vázající GTP (guanosintrifosfát)
G _s -protein	stimulační G-protein
Hsp	"heat shock protein" protein tepelného šoku
IP ₃	inositol-3-fosfát
m-AC	membránová adenylát cykláza
mER	membránový estrogenový receptor

mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
	„no observed effect concentration“ koncentrace při níž není pozorován žádný
NOEC	vliv
NP	Nonylfenol
P generace	rodičovská generace
PIP ₂	Fosfatidylinositoldifosfát
PKA	protein kináza A
PKC	protein kináza C
PLA2	fosfolipáza A2
PLC	fosfolipáza C
PLD	fosfolipáza D
PTP	protein tyrosinová fosforylace
sAC	solubilní adenylát cykláza
TDS	„testicular dysgenesis syndrom“ soubor nepříznivých trendů v reprodukci
TK	tyrosin kináza
TP	tyrosinová fosforylace
WHO	„World Health Organization“ Světová zdravotnická organizace
ZP	zona pellucida
ZP2 proteiny	protein 2 na povrchu zona pellucida vajíčka
ZP3 proteiny	protein 3 na povrchu zona pellucida vajíčka

5. Seznam literatury

Aquila S., Sisci D., Gentile M., Middea E., Catalano S., Carpino A., Rago V., Ando S. (2004) *Estrogen receptor (ER)alpha and ER beta are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway.* J Clin Endocrinol Metab., 89:1443-1451.

Baldi E., Luconi M., Bonaccorsi L., Krausz C., and Forti G. (1996) *Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways.* Front Biosci., 1:d189-205.

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.* Indian J Physiol Pharmacol., 43:211-217.

Boisen K.A., Main K.M., Rajpert-Da Meyts E., Skakkebaek N.E. (2001) *Are male reproductive disorders a common entity? The testicular dysgenesis syndrome.* Ann N Y Acad Sci., 948:90-9.

Carrera A., Moos J., Ning X.P., Gerton G.L., Tesarik J., Kopf G.S., Moss S.B. (1996) *Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation.* Dev Biol., 180:284-296.

Chang M.C. (1984) *The meaning of sperm capacitation. A historical perspective.* J Androl., 5:45-50.

Faqi AS, Johnson WD, Morrissey RL, McCormick DL. (2004) *Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats.* Reprod Toxicol., 18:605-611

Fielden MR, Samy SM, Chou KC, Zacharewski TR. (2003) *Effect of human dietary exposure levels of genistein during gestation and lactation on long-term reproductive development and sperm quality in mice.* Food Chem Toxicol., 41:447-454

Fraser L.R., Adeoya-Osiguwa S.A., Baxendale R.W., Gibbons R. (2006a) *Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules.* Front Biosci., 11:1636-1645.

Fraser L.N., Beyret E., Milligan S.R., Adeoya-Osiguwa S.A. (2006b) *Effects of estrogenic xenobiotics on human and mouse spermatozoa* Hum Reprod., 21:1184-1193

He Y.F., Yue L.M., He Y.P., Zhang J.H., Zheng J., Gao X.P. (2005) *Effects of estrogen on acrosome reaction and intracellular calcium in human spermatozoa and the possible mechanism concerned*. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 36:500-502.

Hess R.A. (2000) *Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract*. Rev Reprod., 5:84-92

Krishnan A.V., Stathis P., Permuth S.F., Tokes L., Feldman D. (1993) *Bisphenol-A: Estrogenic substance is released from polycarbonate flask during autoclaving*. Endocrinol., 132:2279-2286

Kuiper G.G., Lemmen J.G., Carlsson B., Corton J.C., Safe S.H., van der Saag P.T., et al. (1998) *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogenic receptor B*. Endocrinol. 139:4252-4263

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., 6:201-208.

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

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

Leclerc P., Lamirande E., Gagnon C. (1998) *Interaction between Ca²⁺, cyclic 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation*. J Androl., 19:434-43

Luconi M., Bonaccorsi L., Forti G., Baldi E. (2001) *Effects of estrogenic compounds on human spermatozoa: evidence for interaction with a nongenomic receptor for estrogen on human sperm membrane*. Mol Cell Endocrinol., 178:39-45.

- 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*. Steroid., 69:553-559.
- Luconi M., Muratori M., Forti G., Baldi E. (1999) *Identification and characterization of novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects*. J Clin Endocrinol Metab., 84:1670-1678.
- Menzel V.A., Hinsch E., Hägele W., Hinsch K.D. (2007) *Effect of genistein on acrosome reaction and zona pellucida binding independent of protein tyrosine kinase inhibition in bull*. Asian J Androl., 9:650-658
- Messina M.J. (1999) *Legumes and soy beans: overview of their nutritional profiles and health effects*. Am J Clin Nutr 70:439S-450S
- Mueller S.O. (2004) *Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods*. Anal Bioanal Chem., 378:582-587.
- Naz R.K. (1996) *Involvement of protein tyrosine phosphorylation of human sperm in capacitation/acrosome reaction and zona pellucida binding*. Front Biosci., 1:d206-213
- Olea N., Pulgar R., Pérez P., Olea-Serrano F., et al. (1996) *Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry*. Environ Health Perspect., 104:298-305
- Peknicová J., Kyselová V., Buckiová D., Boubelík M. (2002) *Effect of an endocrine disruptor on mammalian fertility. Application of monoclonal antibodies against sperm proteins as markers for testing sperm damage*. Am J Reprod Immunol., 47:311-318.
- Rajapakse N., Silva E., Kortenkamp A. (2002) *Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action*. Environ Health Perspect., 110:917-921
- Rochira V., Granata A.R., Madeo B., Zirilli L., Rossi G., Carani C. (2005) *Estrogens in males: what have we learned in the last 10 years?* Asian J Androl., 7:3-20
- Rosseli M., Reinhart K., Imthurn B., Keller P.J., Dubey R.K. (2000) *Cellular and biochemical mechanism by which environmental oestrogens influence reproductive function*. Hum Reprod Update. 6:332-350

Schrager S., Potter B.E. (2004) *Diethylstilbestrol exposure*. Am Fam Physician., 69:2395-2400

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

Tomes C.N., Roggero C.M., De Blas G., Saling P.M., Mayorga L.S. (2004) *Requirement of protein tyrosine kinase and phosphatase activities for human sperm exocytosis*. Dev Biol., 265,399–415.

Visconti P.E., Westbrook V.A., Chertihin O., Demarco I., Sleight S., Diekman A.B. (2002) *Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity*. J Reprod Immunol., 53:133-50.

White R., Jobling S., Hoare S.A., Sumpter J.P., Parker M.G. (1994) *Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic*. Endocrinol. 135:175-182

WHO (1998) *Laboratory manual for examination of human semen and semen cervical mucus interaction*. Cambridge University Press, third edition.

WHO (2002) *Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors*. Edited by: Terri Damstra, Sue Barlow, Aake Bergman, Robert Kavlock, Glen Van Der Kraak

Yanagimachi R. (1994) *Mammalian Fertilization*. New York: The Physiology of Reproduction, second edition.

www.endotext.org/.../figures/figure24.jpg

www.wiley.com/.../endocrine_disrupting.htm.