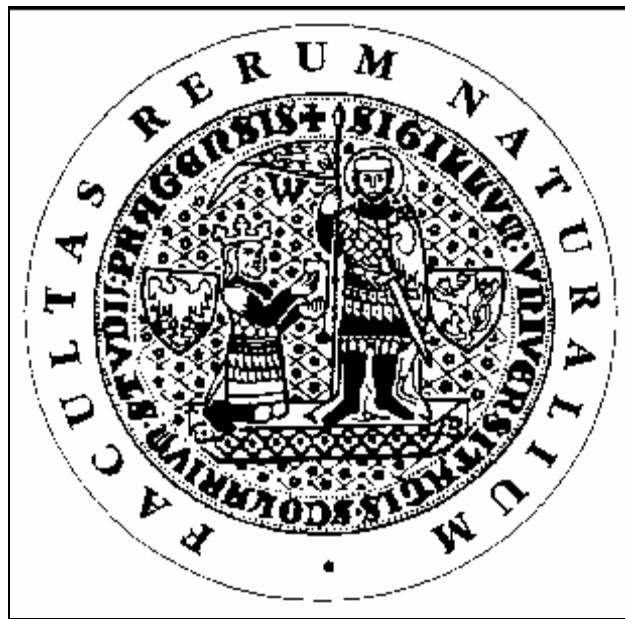


DIPLOMOVÁ PRÁCE

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



FUNKČNÍ ANALÝZA KVALITY SPERMIÍ PO PŮSOBENÍ VYBRANÝCH ENDOKRINNÍCH DISRUPTORŮ

Vedoucí: RNDr. Jiří Liberda, PhD.

Školitelka: doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své školitelce doc. RNDr. Janě Pěknicové, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce, za vstřícný přístup, neocenitelné rady a obětavou pomoc v průběhu jejího zpracování.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Jiřímu Liberdovi, PhD. za vedení mé diplomové práce a otci prof. Ing. Otomarovi Linhartovi, DrSc. za odbornou pomoc při zpracování mé práce.

Můj dík patří i Mgr. Sayyed Mohammad Hadi Alavi, Mgr. Azadeh Hatef za pomoc při experimentech na rybím modelu, Ing. Aleně Kubátové a Mgr. Lukášovi Dědovi za praxi získanou v Laboratoři diagnostiky pro reprodukční a za pomoc při zpracování experimentů na savčím modelu.

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky doc. RNDr. Jany Pěkníkové, CSc., a že jsem všechny prameny řádně citovala.“

V Praze dne

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	7
1 ÚVOD.....	9
A) SAVČÍ MODEL	9
1.1 FERTILIZACE	9
1.1.1 Morfologie spermie.....	10
1.1.1.1 Stavba hlavičky spermie.....	11
1.1.1.2 Struktura bičíku a jeho funkce.....	13
1.1.2 Epididymální maturace	15
1.1.3 Kapacitace.....	17
1.1.3.1 Kapacitace <i>in vivo</i>	17
1.1.3.2 Kapacitace <i>in vitro</i>	19
1.1.4 Akrosomová reakce	20
1.1.4.1 Akrosom	21
B) RYBÍ MODEL.....	23
1.2 ROZDÍL MEZI RYBÍMI A SAVČÍMI SPERMIEMI	23
1.2.1 Základní aspekty spermií chrupavčitých a kostnatých ryb.....	24
1.2.2 Klíčové faktory aktivující motilitu spermií ryb	25
1.2.3 Konsumace energie v průběhu pohybu rybích spermií	26
1.3 ENDOKRINNÍ DISRUPTORY A JEJICH VLIV NA REPRODUKCI ŽIVOČICHŮ	27
1.4 ROZDĚLENÍ ENDOKRINNÍCH DISRUPTORŮ.....	31
1.5 STRUKTURA A VLIV VYBRANÝCH ENDOKRINNÍCH DISRUPTORŮ NA SAVCE A RYBY	33
1.5.1 Zearalenone.....	34
1.5.2 Di(2-ethylhexyl) ftalát	37
1.5.3 Bisfenol A	40
1.5.4 Vinklozolin	43
2 CÍL PRÁCE	46
2.1 DETEKCE REPRODUKČNÍCH PARAMETRŮ A KVALITY SPERMIÍ PO PŮSOBENÍ VYBRANÝCH EDs.....	46
2.1.1 <i>In vitro</i>	46

3	MATERIÁL A METODY	47
3.1	CHEMIKÁLIE	47
3.2	BIOLOGICKÝ MATERIÁL	48
3.3	MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY	49
3.4	VYBRANÉ ENDOKRINNÍ DISRUPTORY	50
3.5	METODY	50
A)	SAVČÍ MODEL	50
3.5.1	Kapacitace <i>in vitro</i>	50
3.5.1.1	Příprava spermií	50
3.5.1.2	Zpracování spermií před a během kapacitace <i>in vitro</i>	52
3.5.1.3	SDS extrakce	52
3.5.1.4	Příprava preparátu pro nepřímou imunofluorescenci	53
3.5.1.5	Příprava preparátu pro průtokovou cytometrii	53
3.5.2	Průtoková cytometrie	54
3.5.3	Nepřímá imunofluorescence s monoklonálními protilátkami	55
3.5.4	Chlortetracyklinová analýza	55
3.5.5	Jednorozměrná elektroforéza (SDS PAGE)	57
3.5.6	Příčný přenos proteinů na membránu (Western blotting)	58
3.5.7	Vizualizace proteinů barvením	59
3.5.8	Imunodetekce proteinů pomocí monoklonálních protilátek	59
B)	RYBÍ MODEL	61
3.5.9	Zpracování spermií	61
3.5.10	Hodnocení procenta pohyblivých spermií	61
3.5.11	Vliv BPA na procento pohyblivých spermií a jejich rychlost	63
4	VÝSLEDKY	64
A)	SAVČÍ MODEL	64
4.1	ZPRACOVÁNÍ SPERMIÍ	64
4.2	KAPACITACE <i>IN VITRO</i>	64
4.3	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	65
4.4	NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE S MONOKLONÁLNÍMI PROTILÁTKAMI PROTI KANČÍM PROTEINŮM NA KANČÍCH SPERMIÍCH	71
4.4.1	Imunofluorescenční značení spermií pomocí monoklonálních protilátek ACR.2 a P-tyr	72

4.5	CHLORTETRACYKLÍNOVÁ ANALÝZA	77
4.6	SDS ELEKTROFORÉZA.....	79
4.7	IMUNODETEKCE PROTEINŮ S MONOKLONÁLNÍMI PROTILÁTKAMI ACR.2 A P-TYR.....	80
4.8	VYVOLÁNÍ CHEMILUMINESČNÍHO SIGNÁLU POMOCÍ TMB.....	85
B)	RYBÍ MODEL.....	86
4.9	HODNOCENÍ SPERMÍÍ	86
4.10	VLIV BPA NA PROCENTO POHYBLIVÝCH SPERMÍÍ	86
4.11	VLIV BPA NA RYCHLOST POHYBU SPERMÍÍ	87
5	DISKUSE.....	90
6	SOUHRN.....	94
7	ZÁVĚR	95
8	LITERATURA	96
9	PŘÍLOHY	110

SEZNAM ZKRATEK

ACR.2	monoklonální protilátka značící akrosin
ADR	androgenní receptor
AIDA	advanced image data analyzer
AM	aktivační médium
APS	persulfát amonný
AR	akrosomální reakce
Arg	Arginin
ATP	Adenosintrifosfát
BFB	bromfenolová modř
BPA	Bisfenol A
BSA	hovězí sérový albumin
cAMP	cyklický adeno in-3'5'-monofosfát
CASA	computer assisted sperm analysis
CD-1	outbrední linie myši
CTC	Chlortetracyklin
DAPI	4', 6'-diamidino-2-phenylindol dilaktát
DDE	dichlordifenyltrichlormethylmethan
DEHP	Di(2-ethylhexyl) ftalát
DES	diethylstilbestrol
Df	stupeň volnosti
dH ₂ O	deionizovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid
ED	endokrinní disruptor
ER	estrogenní receptor
F	distribuční funkce
FHB	fusarium head blight, plíseň hlavičková
FITC	fluorescein isothiokyanát
GAM-Px	kozí antisérum proti myším imunoglobulinů značené peroxidasou
GEN	genistein
IAM	vnitřní akrosomální membrána
IARC	International Agency for Research on Cancer
IF	nepřímá imunofluorescence
Ion	Ca-ionofor (vápenatý inofor)
IR	imobilizační roztok
Konc.	koncentrovaný
LYS	Lysin
MEHP	mono(2-ethylhexyl) ftalát
NK	negativní kontrola
OAM	vnější akrosomální membrána
P	hladina významnosti
PBS	fosfátem tlumený fyziologický roztok (Phosphate Buffered Saline)

PBS/TW	PBS obsahující 0,05% Tween 20
PK-A	proteinkinasa A
PK-C	proteinkinasa C
PM	plasmatická membrána
PPB	parts per billion (jedna miliardtina)
P-TYR	monoklonální protilátka značící fosfotyrosin
PVDF	polyvinylidenfluorid
PVC	polyvinylchlorid
RGB	red, green, blue
RNA	ribonukleová kyselina
RT	laboratorní teplota
RTG	rentgen
SDS	dodecylsírán sodný
SDS PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza s obsahem dodecylsírane sodného
SP/ML	spermie/ml
TBM	kultivační médium s obsahem Trisu (Tris buffered medium)
TBS	fyzilogický roztok s obsahem Trisu (Tris buffered saline)
TD	testicular dysgenesis syndrom
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
VIN	Vinklozolin
ZEN	Zearalenone
ZP	zona pellucida
α -ZOL	α – zearalenol
β -ZOL	β – zearalenol

1 ÚVOD

Ve své práci, která se týká funkční analýzy kvality spermií po působení vybraných endokrinních disruptorů, jsem použila k výzkumu dva biologické modely. Díky těmto dvěma modelům se celá diplomová práce rozděluje na dvě sekce: sekce A) savčí model, sekce B) rybí model.

A) SAVČÍ MODEL

1.1 FERTILIZACE

Fertilizace nebo-li oplození je proces, při němž splývají haploidní samčí a samičí gamety a vytváří jedince (diploidní zygotu/y) za účelem zformování nového organismu. Genotyp vzniklé zygoty se liší od obou rodičů. Samičí gameta, vajíčko (ovum), je nepohyblivá, naopak samčí gameta, spermie, je pohyblivá díky svému bičíku. Fertilizace je složitý děj zahrnující sekvenci dějů, které se týkají obou gamet, samčí gameta podléhá kapacitaci a akrosomální reakci, dochází k rozpoznání gamet, navázání spermie na vajíčko a fúze spermie s vajíčkem a následuje aktivace vajíčka. Na jednotlivých dějích fertilizace se podílejí nejen proteiny, které jsou na membráně samčích a samičích gamet, ale i molekuly a proteiny, které se vyskytují v pohlavních orgánech (Yanagimachi, 1994). Pro úspěšné oplození je nezbytné, aby obě gamety prošly specifickými fyzikálně-chemickými změnami. Spermie prochází procesem zrání v epididymu a kapacitací v reprodukčním orgánu samice, kde nabývají schopnosti oplodnit vajíčko. Během ejakulace procházejí spermie samčí pohlavní soustavou. Samčí pohlavní soustava sestává z varlat (testis), nadvarlat (epididymis), chámovodu (ductus deferens), prostaty, semenných vaků a bulbourethálních žláz (Copwerových žláz – mohutně vyvinuty u kance). Spermie se dostávají do styku se semennou plasmou, která je složena ze sekretu z výše vyjmenovaných žláz a orgánů. Semenná plasma slouží jako výživné a ochranné médium během cesty samičím reprodukčním traktem. Semenná plasma obsahuje důležité látky jako jsou různé polypeptidy, polyaminy, glykoproteiny, enzymy, ionty jako Na^+ , K^+ , citrát, fruktosu, volné aminokyseliny atd., které jsou důležité pro přežití spermie a pro vyvážení podmínek v novém prostředí (jako vysoká kyselost v samičím reprodukčním traktu). Další podmínkou úspěšného oplození je pohyblivost spermií. Motilní spermie

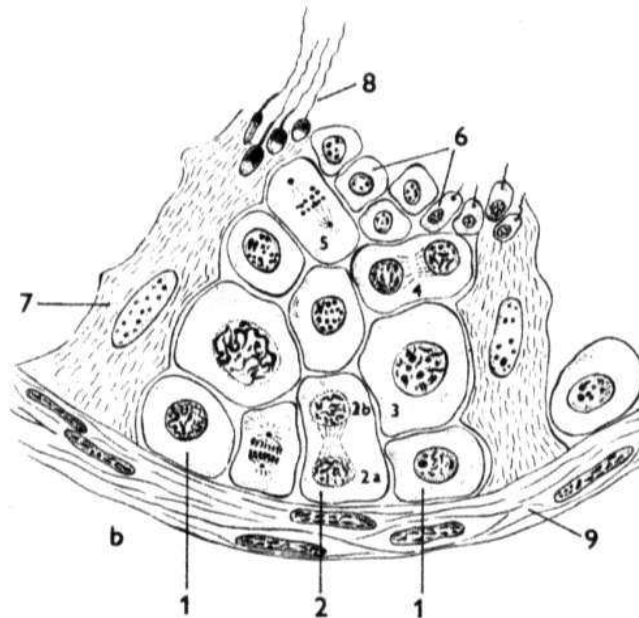
procházejí samičí pohlavní soustavou. Samičí pohlavní soustava se skládá z dělohy (uterus), vejcovodů (tuba uterina) a vaječníků (ovaria). Po vzájemném rozpoznání gamet dochází pomocí povrchových proteinů obou gamet k vazbě spermie na zona pellucida (ZP) vajíčka. Vzájemná interakce indukuje akrosomální reakci, kdy ve spermii probíhá fúze plasmatické membrány (PM) s vnější akrosomální membránou spermie (OAM) a k uvolnění obsahu akrosomu. (Jonakova et al., 2000; Manaskova et al., 2007). Po akrosomální reakci dochází k vystavení vnitřní akrosomální membrány (IAM) a k sekundární vazbě spermie s vajíčkem. Uvolní se intra-akrosomální proteiny, které umožní jednak vazbu spermie na vajíčko (Peknicova et al., 2001)., a jednak, díky proteolytické aktivitě enzymů v akrosomu, průnik spermii skrz ZP k plasmatické membráně vajíčka. Nakonec dochází k fúzi a k aktivaci vajíčka. Tyto děje vedou k dělení oplozeného vajíčka a k embryonálnímu vývoji (Yanagimachi, 1994).

1.1.1 Morfologie spermie

Spermii, mužské pohlavní buňce, je v současné době věnována stále větší a větší pozornost. Tato pozornost roste díky negativní situaci v lidské populaci, kde 15% párů v reprodukčním věku má problémy s reprodukcí. V 50% případů jsou právě mužské faktory příčinou neplodnosti. Z hlediska motility, viability a morfologie se spermie u mužů rozdělují na: normozoospermie (základní hodnoty spermiogramu jsou v normálních mezích, koncentrace nad 20 mil./ml), oligozoospermie (koncentrace méně jak 20 mil./ml), astenozoospermie (subnormální pohyblivost spermií), teratozoospermie (více než 50% morfologicky defektních), oligoastenoteratozoospermie (přítomnost oligo + asteno + teratozoospermie), azoospermie (bez spermií) a aspermie (bez ejakulátu) (dle WHO, 1988).

Spermie vznikají v semenných kanálcích varlat samců procesem zvaným spermatogeneze (Obr. 1). Spermatogeneze je speciálním typem buněčného dělení zvaný meiosa a trvá asi 64 dní. Tento proces sestává ze tří fází – fáze rozmnožovací, fáze růstová a fáze zrání. V první fázi se spermatogonie (primordiální gonocyty, 2n) mitoticky dělí až na primární spermatocyty (2n) a dostávají se do první fáze meiósy. V růstové fázi primární spermatocyty rostou a zvětšuje se u nich cytoplasma. V poslední fázi je dokončeno heterotypické dělení (meiosa I) a vznikají sekundární spermatocyty (2n). Ty se homeotypickým meiotickým dělení (meiosa II) dělí až na spermatidy (1n) u nichž jsou sníženy chromosomální sady 2n na haploidní 1n. Tyto haploidní buňky podléhají dalšímu

ději – spermiogenezi při níž se vyvíjejí na spermie. Spermiogeneze (spermateliosa) se skládá z několika fází při nichž dochází k zahušťování jádra, tvorbě bičíku, odvrhování cytoplasmy a vzniku akrosomu. Tímto procesem vzniká spermie (1n) (Romanovsky et al., 1988). Konečný tvar spermie je druhově specifický a do určité míry závisí na tvaru jádra. Savčí spermie se skládá z hlavičky a bičíku, které jsou vzájemně spojeny krčkem.

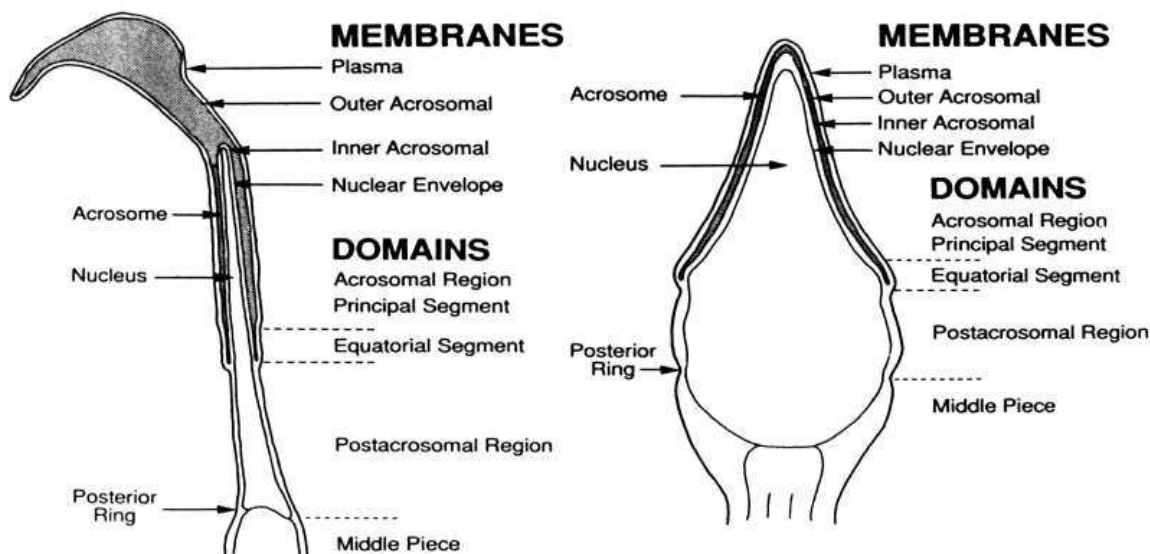


Obr. 1: Spermatogeneze

1. spermatogonie; 2. spermatogonie v mitose (vznik dvou dceřiných buněk 2a, 2b) (2a zůstává jako kmenová); 3. primární spermatocyt; 4. a 5. sekundární spermatocyt; 6. spermatidy; 7. cytoplasma Sertoliho buněk; 8. spermateliosa – spermie; 9. obal semenotvorného kanálku (Romanovsky et al., 1988).

1.1.1.1 Stavba hlavičky spermie

Hlavička spermie se skládá z malého množství cytoplasmy, cytoskeletárních struktur, jádra a akrosomu, tvořící „čepičku“ hlavičky spermie. Jádro spermie obsahuje haploidní genom. Hlavička spermie je složena z akrosomu, akrosomální čepičky, ekvatorální oblasti a postakrosomální oblasti (Obr. 2).



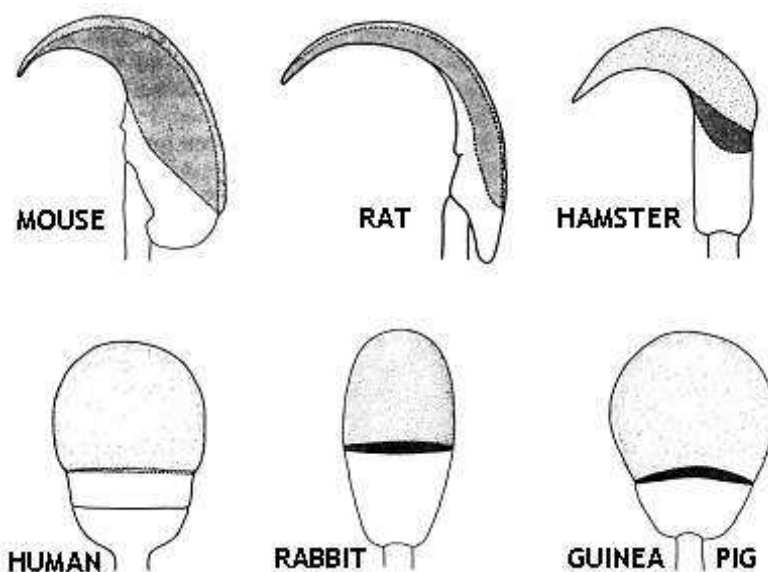
Obr. 2.: Struktura hlavičky spermie (Eddy et al., 1994).

Akrosom je specifická organela spermii, která pokrývá povrch hlavičky spermie a tvoří tzv. „čepičku“. Vzniká spojením sekrečních váčků uvolněných z Golgiho komplexu při spermatogenesi. Je to specializovaný lysozom, který prostřednictvím akrosomové reakce zajišťuje průnik spermie skrz ZP. Obsahuje specifické hydrolytické enzymy (proakrosin/akrosin, kyselá fosfatasa, proteinasy, fosfolipasy, glukosidasy např.: β -glukosidasa, hyaluronidasa, neuraminidasa; esterasy atd.), které jsou schopny rozštěpit glykoproteinový obal vajíčka (ZP). Nejlépe prostudovaným enzymem je akrosin (Obr. 3), který patří do rodiny serinových proteinas trypsinového typu (štěpí polypeptidový řetězec za Lys a Arg). C-koncová oblast proakrosinu je bohatá na prolin a předpokládá se, že tímto koncem je proakrosin přichycen k vnitřní membráně akrosomu (Hendrich et al., 1998). Druhým nejdůležitějším proteinem akrosomu je hyaluronidasa. Je vázána na vnitřní stranu akrosomální membrány, stejně jako akrosin. Úlohou hyaluronidasy je před splynutím spermie s plasmatickou membránou vajíčka štěpit hyaluronovou kyselinu v ZP a v perivitelliním prostoru vajíčka (Yanagimachi, 1994).

Tvar hlavičky je druhově specifický, může být např. vejčité a zploštělý (typické u většiny savců), protáhlý s ostrým koncem (u hlodavců) atd. (Obr. 4)



Obr. 3 : Stavba akrosinu (<http://www.all-science-fair-projects.com>).



Obr. 4 : Tvary hlaviček spermií u různých druhů savců (Eddy et al., 1994).

1.1.1.2 Struktura bičíku a jeho funkce

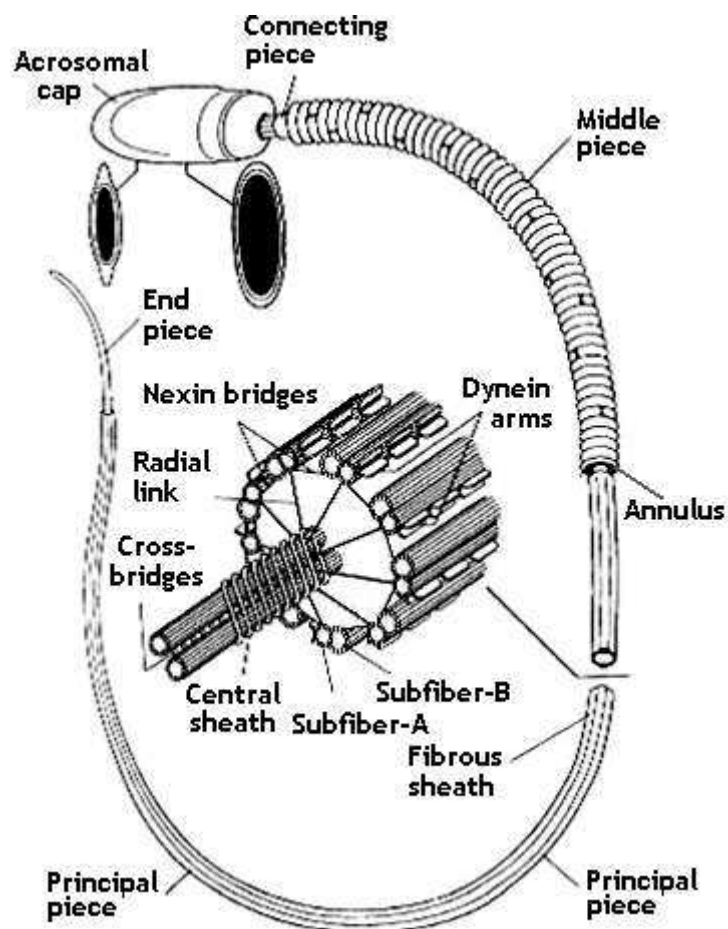
Bičík zajišťuje motilitu spermií a umožní spermii dostat se k oocytu, penetrovat skrz ZP a následně oplodnit vajíčko. Skládá ze čtyř strukturálně se lišících částí – spojovací část/krček (connecting piece), střední část (middle piece), hlavní část (principal piece) a koncová část (end piece) (Obr. 5). Různé části spermie se podléhají na vzniku a tvarování vln zakřivení a na vedení vln pohybu podél bičíku.

Přes krček je spojena hlavička s bičíkem spermie. Po celé délce bičíku v jeho vnitřní části se nachází axonema, která zajišťuje pohyb spermie a je obalena vnějšími denzními vlákny (outer dense fibers), která přiléhají k párům mikrotubulů. Axonema se skládá z 2 centrálních tubulů, které jsou obklopeny 9 mikrotubulárními dublety (A a B). Jejím základem tvoří α -tubulin a β -tubulin (56 a 54,5 kDa), dále kinesin (protein) jehož funkce

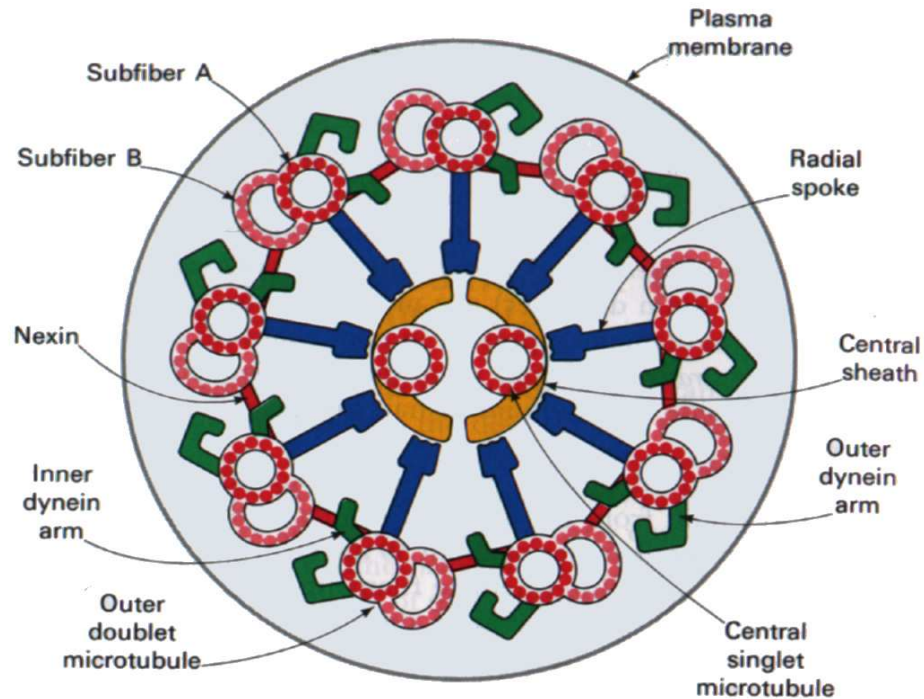
je pohybová (klouzáni mikrotubulů), dynein – tvoří ramínka mikrotubulů a nexin – spojuje sousedící dublety mikrotubulů (Obr. 6.) Dyneinová ramínka zajišťují ohyb mikrotubulů, jehož výsledkem je hadovitý pohyb. Radiální spojky spojující centrální tubuly a periferní mikrotubuly fungují na principu hvězdicovitého motoru, který spouští ohyb periferních mikrotubulů. Výsledkem tohoto procesu je třírozměrný rotační pohyb spermie.

Střední část spermie tvoří axonema s vnějšími denzními vlákny. Axonema je obalená mitochondrialní pochvou (mitochondrial sheath), která připomíná hustou šroubovici mitochondrií. Mitochondrie jsou pohybovým centrem bičíku, ve kterém se chemická energie mění na energii kinetickou. Délka mitochondrií je druhově specifická. Hlavní část představuje podstatnou část bičíku. Povrch jeho axonema tvoří fibrózní pochva (fibrous sheath). Fibrózní pochvu tvoří jemná vlákna, která obklopují vnější hustá vlákna. Tato vlákna regulují pohyb bičíku. Koncová část se skládá z axonemy a plasmatické membrány.

Vnitřní struktura bičíku je jako u hlavičky druhově specifická, některé druhy jako ryby mají strukturu značně zjednodušenou (Calvin et al., 1971; Linhart et al., 2003).



Obr. 5: Struktura bičíku (Fawcett 1975).



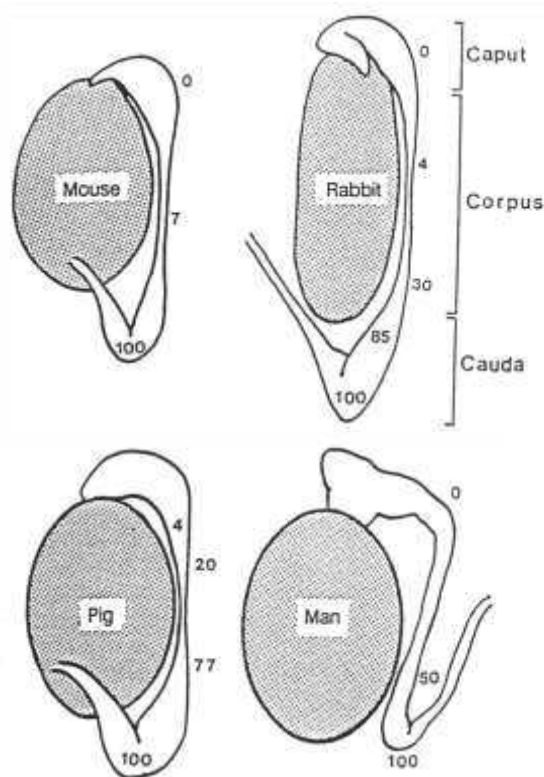
Obr. 6.: Schéma příčného řezu struktury bičíku (Cosson et al., 2008).

Pro úspěšné oplození vajíčka je důležité, aby se spermie dobře pohybovala. Po spermatogenesi se spermie pohybují velice málo. Proto je zapotřebí, aby spermie prodělala změny, které vedou k hyperaktivaci motility. K hyperaktivaci dochází v samičím pohlavním traktu při kapacitaci. Motilitu spermií zprostředkovává cAMP. Při hyperaktivaci dochází ke spotřebě ATP, zvýšení pH a intracelulárního Ca^{2+} . Tímto lze (u většiny druhů savců) rozeznat dva druhy pohybů spermií: motilita ejakulovaných spermií a motilita hyperaktivovaných spermií po kapacitaci (Yanagimachi, 1994).

1.1.2 Epididymální maturace

Po opuštění varlat (testes) nejsou savčí spermie schopné rozpoznat, interagovat a oplodnit vajíčko. Tuto schopnost získávají až při průchodu nadvarletem (epididymis). Po dokončení spermatogenese se spermie dostává do nadvarlete, kde jeho průchodem prodělává podstatné změny. Soubor těchto dějů a změn se nazývá epididymální maturace. Nadvarle se skládá ze tří částí: hlava (caput), tělo (corpus) a ocas (cauda). V prvních dvou částí nadvarlete prodělává spermie epididymální maturaci. Ocas nadvarlete slouží jako místo, kde se dokončuje epididymální maturace a spermie se zde shromažďují. Oblast epididymis, kde maturace probíhá, je však druhově specifická (Eddy et al., 1985). Většina

spermií nabude schopnosti fertilizace až po dosažení ocasu nadvarlete (Obr. 7) (Yanagimachi, 1994).



Obr. 7: Zvyšování fertilizační schopnosti spermií během průchodu epididymem (v%) (Yanagimachi, 1994).

Během zrání spermie v epididymu dochází k podstatným změnám na plasmatické membráně spermie. Tyto změny zahrnují: změny v rozmístění intramembránových proteinů a peptidů, některé proteiny jsou upravovány nebo nahrazeny proteiny z epididymu, mění se fyzikální a chemické vlastnosti lipidů a fosfolipidů, dochází k rychlé syntéze cholesterolu, který se zabudovává do PM, dochází ke změnám z hlediska fosforylace a sulfatace, mění se náboj membrány, PM získává schopnost vázat lektiny atd.

Dále se vytváří receptory důležité pro interakci spermie s vajíčkem, dochází ke změnám ve vzájemných schopnostech povrchu spermie, navazují se látky, které brání předčasné akrosomální reakci (např. cholesterol) atd. Ke změnám dochází pomocí sekrečního produktu epididymu – epididymální tekutině. Tato tekutina obsahuje důležité proteiny a glykoproteiny (transferin, albumin), enzymy (glykosyltransferasy, glykosidasy), taurin, L-karnitin, fruktosu, ionty: Na^+ , K^+ , $(\text{CO}_3)^{2-}$ atd. Existuje velké množství

epididymálních proteinů. Jejich funkce jsou různé a jsou druhově specifické. Některé se vážou na PM spermie, jiné působí jako maturační prostředí pro spermie. Zajišťují např.: rozpoznání gamet s následnou fúzí, navázání cholesterolu, ochranné účinky (antibakteriální) atd. (Eddy et al., 1985; Brooks et al., 1986, Jonakova, et al., 1998, 2000).

Nejdůležitější změnou během epididymální maturace je iniciace motility spermií. Po epididymální maturaci a opuštění epididymu se spermie pohybují aktivněji tzv. koordinovaným flagelárním pohybem. Změny vedou také k zajištění odolnosti a životaschopnosti těchto buněk (Eddy et al., 1985).

Epididymální maturace je tedy významný proces změn spermií, které připravují spermie na oplození v samičím pohlavním traktu. Dochází ke zvýšení odolnosti a motility spermií. Výsledkem je také eliminace defektních buněk – buněk, které nejsou schopny fertilizace.

1.1.3 Kapacitace

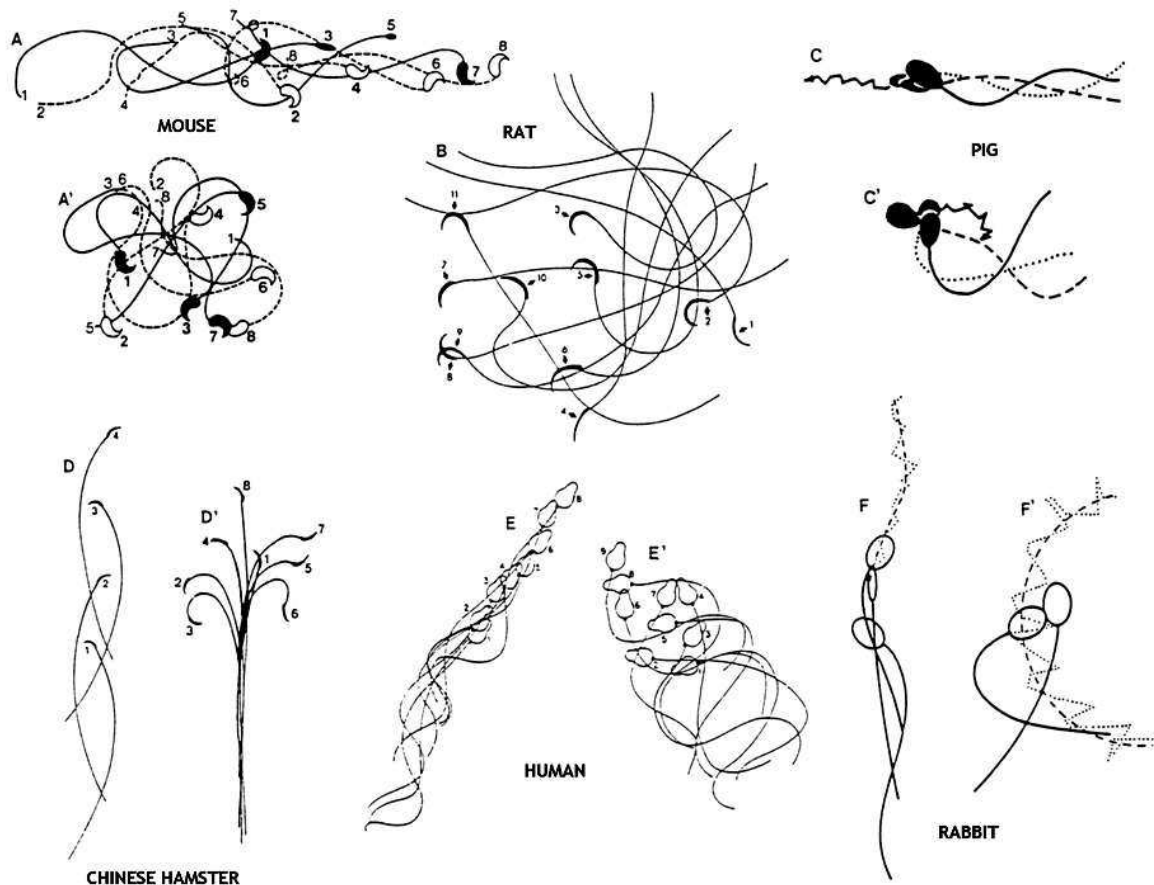
Spermie po ejakulaci nejsou schopné oplození, přestože proběhla maturace v epididymis, spermie musí podstoupit další maturaci, tzv. kapacitaci, která probíhá v reprodukčním traktu samice. Kapacitace označuje fyziologické změny spermie, které probíhají během jejich pobytu v samičím pohlavním traktu, kde interagují se složkami ovidukální tekutiny. Kapacitace se také spojuje s hyperaktivací, která napomáhá spermii uvolnit se z ovidukálního rezervoáru a fúzovat s vajíčkem. Kapacitace může být za určitých podmínek provedena i *in vitro* (Yanagimachi, 1994).

1.1.3.1 Kapacitace *in vivo*

Ke kapacitaci u savců dochází při průchodu spermií dělohou a vejcovodem – hlavně v isthmu vejcovodu. Isthmus je 2-3 cm dlouhá část vejcovodu napojujícího se na dělohu. Spermie jsou uchovány v isthmickém prostoru vejcovodu v podmínkách, které potlačují jejich motilitu, a prodlužují jejich fertilizační schopnosti. Spermatičké buňky se vážou na řasnatý epitel pomocí protein-sacharidové interakce (molekuly proteinu na povrchu spermie se vážou na sacharidové řetězce povrchu oviduktu (Liberda et., al., 2006). V ovidukálním rezervoáru se synchronizuje doba maturace spermií s ovulací oocytů a dochází k selekci nejschopnějších spermií. Poté se postupně uvolňují v závislosti na stupni připravenosti samčích pohlavních buněk a na stupni ovulace oocytů (Yanagimachi, 1994).

Při přechodu do kapacitačního procesu spermie ztrácí schopnost vázat se na povrch oviduktu. Dochází ke změnám ve složení PM. Mění se proteinové složení povrchu spermií. Dochází ke změnám v koncentracích intracelulárních iontů a ke spuštění signální kaskády, která připravuje spermii na kontakt s oocytem. Zvyšuje se koncentrace Na^+ , Ca^{2+} a HCO_3^- a klesá koncentrace K^+ . Zvýšená koncentrace HCO_3^- vede ke zvýšení pH uvnitř spermie a ke zvýšení koncentrace cAMP pomocí HCO_3^- depedentní adenylyl cyklasy. Adenylát cykláza se aktivuje změnou membránové fluidity (ovlivnění pohybu iontů přes membránu). cAMP pak zvyšuje aktivitu proteinkinasy A (PK-A) během kapacitace a realizuje se tak přenos signálu cAMP/PK-A dráhou. Konečným výsledkem je proteinová tyrosinová fosforylace cytoplasmatických proteinů spermie. Uvolňováním cholesterolu dochází k indukci proteinové fosforylace. Proteinová tyrosinová fosforylace je závislá na přítomnosti sérum albuminu, Ca^{2+} a NaHCO_3 v kapacitačním médiu. Uvolňováním cholesterolu dochází k indukci proteinové fosforylace, k destabilizaci membrány a k odstranění dekapacitačních faktorů (Yanagimachi, 1994).

Nedochází však jen ke změnám na plasmatické membráně, ale dochází i k hyperaktivaci motility. Hyperaktivovaná spermie se pohybuje nelineárně, kmitá více do stran a zesiluje se pohyb jejího bičíku a amplitudy kmitání bičíku (Obr. 8) (Suarez et al., 1991). Tento proces není náhodný, je řízen činností mnohých enzymů. Akrosomální reakce (viz dále) je pak odpovědí na dokončenou kapacitaci (Yanagimachi, 1994; Eddy et al., 1994).



Obr. 8: Změny charakteru pohybu spermií před a během hyperaktivace.

A-F: Pohyb spermií před hyperaktivací; A'-F': Pohyb spermií během hyperaktivace (Yanagimachi, 1994).

1.1.3.2 Kapacitace *in vitro*

Kapacitaci lze za určitých podmínek provádět u většiny savců *in vitro*. Podstatou kapacitace *in vitro* je odstranění semenné plasmy (ejakulátu) např. centrifugací a inkubace v kapacitačním médiu. Aby kapacitace úspěšně proběhla, je důležité zavést takové *in vitro* podmínky, které nejvíce připomínají přirozené podmínky. Je potřeba připravit médium, které se co nejvíce blíží fyziologické tekutině oviduktu. V minulosti se často používaly biologické tekutiny jako oviduktální, folikulární nebo krevní séra. Tato biologická média se později nahradila chemicky definovanými médii (Tyrodovo, Krebs-Ringerovo a jinými) s přidavkem energetických zdrojů (glukosa, laktát, pyruvát) a albuminu (Yanagimachi, 1994).

Kapacitace *in vitro* je rovněž druhově specifická. Většina druhů savců vyžaduje specifické složení média a podmínky, jako celkový čas kapacitace. Společnými komponenty kapacitačních médií jsou Ca^{2+} , HCO_3^- , zdroj energie (pyruvát, laktát, glukosa, fruktosa) a sérový albumin. Není to však vždy pravidlem, že tyto složky musí být součástí kapacitačního média. Bylo dokázáno, že některé spermie mohou kapacitovat i bez těchto látek nebo naopak proces kapacitace brzdit. Např. glukosa je základní složkou kapacitačního media u lidských, kančích a myších spermií. U spermií býka však tento proces brzdí (Galantino –Homer et al., 1997).

Nejdůležitějšími faktory, které regulují *in vitro* kapacitaci jsou teplota, čas, mezidruhové variace a použití rozdílného složení kapacitačního média.

Teplota – Optimální teplota je druhově specifická, u většiny se však pohybuje v rozmezí 37-38°C. I malý rozdíl teplot může působit na fyzikální stav membránových lipidů spermie a ovlivnit tak průběh kapacitace.

Čas – U různých druhů živočichů se liší doba potřebná k dokončení kapacitace. U myší, koček a lidí se uvádí jedna hodina, naopak např. u králíka až několik hodin. Kapacitace kančích spermií trvá 4h. Tyto odlišnosti jsou dány různými fyzikálními a chemickými vlastnostmi plasmatické membrány spermií jednotlivých druhů (Yanagimachi, 1994).

Mezidruhové rozdíly – U různých druhů živočichů se používají rozdílné látky pro kapacitaci. Nelze však také zanedbat individuální genetické rozdíly u samců téhož druhu, ale i mezi jednotlivými spermii téhož samce. Spermii některých druhů (i člověka) postačují jen média tvořená roztokem solí (Tyrodovo, Krebs-Ringerovo a jiná média) s vhodným zdrojem energie a proteinů. Pro určité druhy jsou však zapotřebí specifické limitující faktory, které nemohou být nahrazeny jinou složkou a bez nichž by kapacitace neproběhla. U býčích spermií je například zapotřebí heparin, který slouží k odstraňování komponent semenné plasmy z povrchů spermií, podporuje syntézu cAMP atd. (Visconti et al., 1998). U křečka byl zjištěn vliv sperm motility faktor, který chrání spermie před volnými radikály kyslíku vznikající během metabolismu spermií (Yanagimachi, 1994).

1.1.4 Akrosomová reakce

Akrosomová reakce (AR) nastává při prvním kontaktu spermie se ZP vajíčka (Austin a Bishop, 1958). Dochází k fúzi plasmatické membrány (PM) s vnější akrosomální membránou (OAM) vajíčka a k uvolnění obsahu akrosomu. Akrosomální váček se otevře,

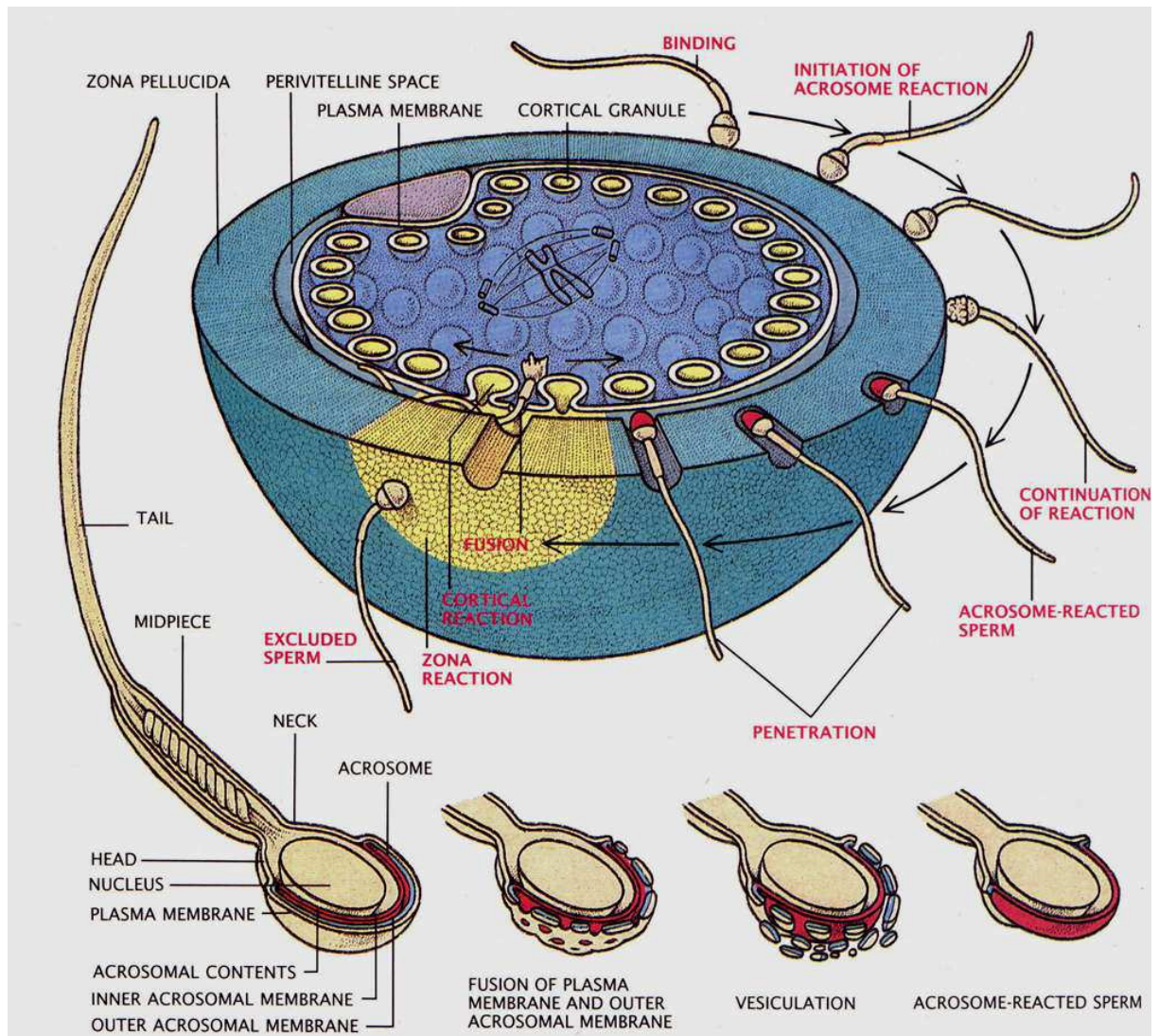
uvolní se jeho lytické enzymy a ty naštěpí glykoproteinový obal vajíčka. Dojde k vystavení vnitřní akrosomální membrány (IAM) a spermie se pomocí sekundární vazby váže na ZP.

Poté může spermie penetrovat ZP k plasmatické membráně vajíčka a dochází k fúzi obou gamet. Spermie, které prodělají akrosomovou reakci předčasně ztrácí své fertilizační schopnosti a nejsou schopny se vázat na ZP. Jde o nepravou akrosomovou reakci. Akrosomová reakce je odpovědí na správně dokončenou kapacitaci spermií. Primární funkcí této reakce je vstup a průnik spermie ZP. Slouží k vystavení vazebných míst na spermiu důležité pro uchycení na PM. Je to selekční proces, který vybírá jen spermie schopné oplození. Místa, kde dochází k fúzi membrán, jsou druhově specifická. Např. u člověka a křečka probíhá počátek splynutí pohlavních buněk na ekvatoriálním segmentu, kde je PM málo stabilní a je zde větší počet vazebných míst pro Ca^{2+} . Podmínkou spuštění akrosomové reakce je zvýšení koncentrace Ca^{2+} , zvýšení intracelulárního pH a produkce fúzogenních látek. Celý děj je kontrolován složitými signalizačními kaskádami. Při tomto procesu dochází k aktivaci fosfolipázy C (PL-C), zvyšuje se aktivita enzymů proteinkinasy A (PK-A) a proteinkinasy C (PK-C) a zvyšuje se koncentrace Ca^{2+} . Vyšší koncentrace Ca^{2+} vede k depolymeraci aktinu, k aktivaci plasmatických proteinů a ke změně jejich konformace, které umožní přiblížení membrán obou pohlavních buněk a jejich splynutí (Watson et al., 1986). Po fúzi membrán (nejčastěji v ekvatoriálním segmentu) pokračuje splynutí přes zadní oblast hlavičky a dochází k dekonenzaci jádra spermie. Poté vstupuje bičík do vajíčka a následuje splynutí lipidových vrstev membrány spermie a vajíčka (Obr. 9). Po úspěšné fúzi gamet dochází k aktivaci vajíčka, ke kortikální reakci, která zabrání polyspermii a ke vzniku pronukleu a zygoty (Yanagimachi, 1994).

1.1.4.1 Akrosom

Akrosom byl dříve považován za modifikovaný lysozom. Jeho obsah však prodělává změny během zrání spermie, a proto není typickou sekreční granulí. Akrosom se nachází na hlavičce spermie a hraje důležitou roli při průniku spermie do vajíčka. Akrosom obsahuje velké množství enzymů jako akrosin, kyselou fosfatázu, β -galaktosidázu, fosfolipázu, hyaluronidázu atd. Uvnitř tohoto váčku dochází k mobilizaci jeho enzymatického obsahu (neaktivní forma proakrosin (zymogen) se mění na aktivní akrosin) (Moos et al, 1993). Nejdůležitějším enzymem akrosomu je akrosin. Akrosin má dvě funkce, jednak jako proteolytický enzym pomáhá průniku skrz ZP (Cechova et al., 1984) a je

vazebným proteinem na ZP (Peknicova et al., 1994). Druhým důležitým proteinem akrosomu je hyaluronidasa. Popis akrosinu a hyaluronidasy viz 1.1. (Yanagimachi, 1994).



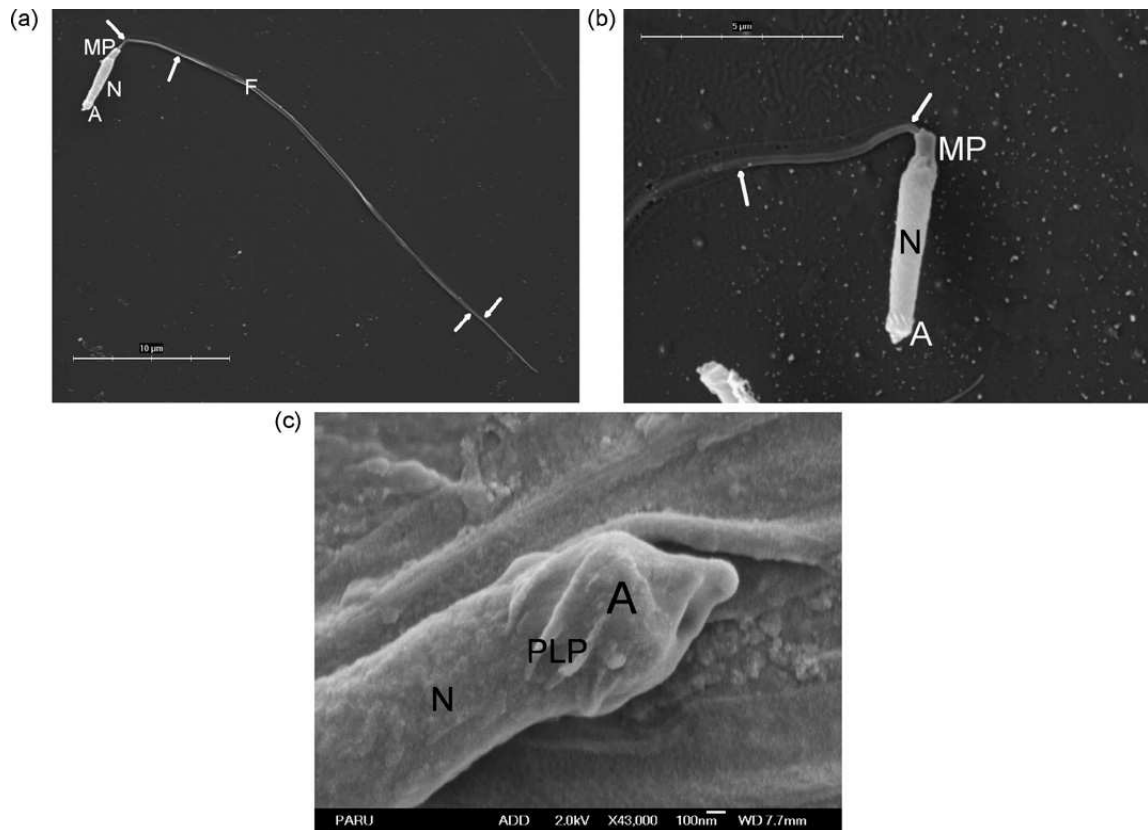
Obr. 9 : Schéma průběhu oplození vajíčka (Wassarman, 1990)

B) RYBÍ MODEL

1.2 ROZDÍL MEZI RYBÍMI A SAVČÍMI SPERMIEMI

Spermie patří mezi specializované buňky, které u druhů s vnějším osemeněním, kam patří i většina našich i mořských druhů ryb, jsou obvykle vypuzeny do vnějšího prostředí (vody). Buňky jsou nuceny vyrovnat se s extrémně odlišným prostředím v podobě sladké, brakické či slané vody.

Převážná většina znalostí o struktuře spermií ryb a nižších živočichů a pohybu bičíku spermií pochází z obsáhlých studií na modelovém mořském organismu mořské ježovky, který je považován za klasický model (Gibbons 1981). Přesto však, některé charakteristiky spermií u jiných druhů jako jsou ryby, ukazují na originální znaky doby pohybu (Billard, Cosson, 1988, 1992), iniciace pohybu (Cosson et al. 1995) nebo model motility bičíku (Cosson et al. 1999, Alavi et al. 2010), které byly zdokumentovány u spermií pstruha duhového jako zástupce lososovitých sladkovodních druhů ryb. V kontrastu s výsledky u pstruha duhového, mnohem méně informací je v současnosti známo o charakterizaci spermií chrupavčitých druhů tedy u veslonosa amerického nebo jeseterovitých ryb, které nejsou fylogeneticky příliš vzdáleny spermiím savčích druhů na straně jedné (Psenicka et al. 2009, Obr. 10). Na druhé straně lín a kapr patří mezi kostnaté ryby s fylogeneticky primitivními spermiemi (kulatá hlavička, velmi tenký bičík s rudimentem akrosomu a transglutaminasou, Kudo 1998). Doba pohybu spermií chrupavčitých je poměrně dlouhá až do 9 minut (Cosson et al., 2000), naproti tomu u sladkovodních kostnatých ryb převažuje pohyb spermií v řádu 15 až 50 s (Linhart et al., 1991), ale představa o čase pohybu spermií může být poměrně subjektivní, pokud se zahrne i období, kdy se pouze bičíky spermií chvějí.



Obr. 10: Ultrastruktura spermie jesetra malého pořízena skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) ukazuje na obrázku a) celou spermii (měřítko 10µm), šipky vyznačují začátek a konec lemu na bičíku, na obrázku b) větší detail hlavičky spermie, střední části s částí bičíku (měřítko 5µm) a na obrázku c) s detailem akrosomu na hlavičce spermie (měřítko 100 nm). Akrosom (A), jádro - nukleus (N), střední část (MP), bičík (F), (Psenicka et al., 2009).

1.2.1 Základní aspekty spermií chrupavčitých a kostnatých ryb

Spermie chrupavčitých ryb (*Chondrostea*) a kostnatých ryb (*Teleostea*) s vnějším o semeněním mají jednoduchou strukturu. Hlavní charakteristikou spermií chrupavčitých ryb (studovaných na *Acipenseridae*) je protáhlá hlavička s akrosomální strukturou o délce 5-10 µm, střední částí o délce 1µm s dvěma až devíti mitochondriemi a bičíkem o délce 50-100 µm se zřetelným ukončením a viditelným lemem. Vajíčka u chrupavčitých ryb mají hned několik mikropylárních otvorů např. u veslonosa amerického od 4 do 12 (Linhart a Kudo, 1997), kdežto u kostnatých ryb se vyskytuje jeden mikropylární otvor (Kudo, 1991). Kostnaté ryby mají primitivní jednoduchou strukturu spermií, hovoříme o tzv. „aqua sperm“ (Jamieson, 1991). Hlavička spermie je sférická o délce 2 - 3 µm s absencí

typického akrosomu. Velmi redukována střední část bičíku s centriolou a jednou až dvěma modifikovanými mitochondriemi a zřetelně ukončený bičík o průměru 0,1 μm s někdy přítomným lemem a délce od 40 do 60 μm je typickým pro třídu kostnatých ryb (Suquet et al., 1993).

Seminální plasma neobsahuje pouze kationty Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , ale také organické komponenty (glycidy, proteiny, lipidy atd., Linhart et al., 1991). Osmotický tlak, koncentrace K^+ , cukry a pH semenné plasmy okolo hodnoty 7 jsou hlavními inhibičními faktory motility spermií lososovitých ryb (*Salmonidae*) a osmotický tlak je hlavním inhibičním faktorem u kaprovitých ryb (*Cyprinidae*; Linhart et al., 1991; Linhart et al., 2000). Naopak iniciačním faktorem motility spermií je depolarizace plasmatické membrány. Spermie mají buněčné rezervy jako jsou fosfolipidy a glykolipidy využitelné v metabolismu (Billard et al., 1995; Linhart et al., 1995).

Pohybový aparát spermie je představován architekturou mikrotubulů v bičíku, který nazýváme axonem (Cosson, 1996). Periferní systém mikrotubulů je představován vždy jejich dubletem, obsahující ATPázu nazývaný dynein, který je regulován ionty Ca^{2+} . Vnitřní mikrotubuly se u některých druhů nevyskytují např. u úhoře říčního (*Anguilla anguilla*, Gibbons et al., 1983). Energie pro pohyb spermií je využívána ve formě ATP z glykolytických a oxidačních reakcí. U ryb s vnějším osemeněním je pohyb spermií limitován následujícími faktory: primitivní struktura spermií, endogenní využívání kapacity substrátů a kvantifikovaný metabolický proces, který může zabezpečit optimální pohyblivost spermií jen ve vhodném prostředí (Billard et al., 1995; Cosson et al., 1991; Cosson et al., 1999).

1.2.2 Klíčové faktory aktivující motilitu spermií ryb

Spermie převážné většiny druhů ryb jsou imotilní v testes a v genitálním traktu s koncentrací 10^{10} spermií. Vyznačují se krátkou periodou pohybu jen v případě vypuzení do externího prostředí s dobou pohybu 10-60 s u kostnatých sladkovodních ryb, několika minut (3-15) u chrupavčitých ryb a zhruba 30 minut u mořských druhů ryb (Billard et al., 1995; Cosson et al., 1999).

Převážná většina znalostí o pohybu bičíku pochází ze studií na mořských ježovkách, jako vhodném modelovém organismu (Gibbons, 1981). Nicméně, některé charakteristiky spermií jiných živočichů např. ryb ukazují na originální znaky s odlišnou dobou motility spermií (Billard a Cosson, 1992), iniciací motility nebo znaků motility

(Cosson et al., 1997). Spermie pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) byly používány jako specifický model sladkovodních druhů ryb. Faktory prostředí jako jsou ionty, pH nebo osmolalita, způsobují depolarizaci buněčných membrán a stimulují motilitu spermií. Scheuring (1925) byl první kdo poprvé podal informace o skutečnosti, že ionty Na^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+} redukuje inhibiční účinnost K^+ iontu u spermií pstruha obecného (*Salmo trutta*) s principem vyšší účinnosti bivalentních kationtů oproti Na^+ iontům. Synergický efekt mezi ionty vedl k vytvoření demonstrační studie sledující kontrolu motility změnou membránového potenciálu kombinačním efektem různých iontů (Boitano a Omoto, 1991).

Osmotický tlak, koncentrace K^+ spolu se sacharósu a pH semenné plasmy nižším než 7 jsou hlavní inhibiční faktory motility spermií u lososovitých ryb. U kaprovitých ryb a mořských druhů ryb je hlavním kontrolním faktorem motility spermií osmotický tlak (Linhart et al. 1991, Billard et al., 1995). Motilita spermií u chrupavčitých ryb a některých kostnatých (tilápie mosambická, *Tilapia mossambica*) je z části kontrolována osmotickým tlakem a z části iontovým efektem (Linhart et al. 1995b, Billard et al. 1999). Motilita spermií veslonosa amerického je inhibována zvýšenou úrovní velmi malé koncentrace K^+ při pH 7, bez doprovodného kumulativního efektu Ca^{2+} , jak dříve ukázal u lososovitých ryb Scheuring (1925). Cosson et al. (1989) zdokumentovali, že roztoky K^+ (nebo K^+ a Na^+), které běžně neindukují motilitu spermií u pstruha duhového, sloužily jako součást aktivačních roztoků po přidání malého množství Ca^{2+} . Spermie pstruha duhového vykazuje okamžitě po aktivaci a po celou dobu pohybu spermií cirkulární trajektorii. Bylo prokázáno, že Ca^{2+} ionty v průběhu periody krátkého pohybu jsou odpovědné za cirkulární dráhu spermie pstruha duhového (Cosson et al., 1989) a slouží rovněž k eliminaci inhibičního efektu K^+ na motilitu spermií. Rozdílný efekt Ca^{2+} iontů byly pozorovány u intaktních a demembranovaných spermií mnoha kostnatých ryb, např. spermií platýse turbot (*Psetta maxima*) platýse halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, Billard et al., 1993), sumce velkého (*Silurus glanis*, Billard et al., 1997) nebo úhoře říčního (Gibbons et al., 1985).

1.2.3 Konsumace energie v průběhu pohybu rybích spermií

Velmi rychlému pohybu spermií sladkovodních ryb s frekvencí vlnění bičíku na úrovni 60-90 Hz (Gibbons et al., 1985) odpovídá také daleko vyšší úroveň spotřeby energie ve srovnání se spermii savců. Vysoký energetický požadavek ATP na velmi rychlý pohyb není spermie schopna dlouhodobě krýt, proto je např. pohyb spermií pstruha

duhového dlouhý maximálně 30 s. Pokles rychlosti spermie s frekvencí vlnění bičíku koresponduje s úbytkem intracelulární koncentrace ATP. Při studiu *in vitro* u demembranovaných spermií bylo možné, při využití iniciační úrovně koncentrace ATP, udržet stejnou úroveň frekvence vlnění bičíku jako u intaktních spermií až po dobu 30 min. Nízká kapacita mitochondrií dostatečně rychle zásobit energií pohybový mechanismus spermie v průběhu motility byla potvrzena naměřením stejné úrovně respirace před a po iniciaci motility spermií u pstruha duhového (Christen et al., 1987). Využitelná energie pro potřeby pohyb bičíku se tedy generuje pouze z naakumulovaného ATP v pohybovém aparátu bičíku před začátkem aktivace. Po zastavení pohybu bylo dosaženo iniciačních hodnot intracelulární koncentrace ATP až po 15 min. V době pohybu spermií byla respirace mitochondrií experimentálně zablokována použitím 10 mM kyanidu a v druhém případě respirace nebyla zablokována. V obou případech bylo dosaženo stejného snížení fosfokreatinové úrovně. Znamená to tedy, že přísunové množství fosfokreatinu pro zajištění potřeby ATP neodpovídalo požadavku dostatečně rychlého pokrytí v průběhu pohybu nebo regenerace ATP.

U pstruha duhového princip zastavení pohybu spermií je ještě o něco složitější a vychází z jiné podstaty než pouze z jednoduchého vyčerpání ATP. Ve skutečnosti těsně před ukončením pohybu bičíku s frekvencí vlnění na úrovni 20 Hz není intracelulární úroveň ATP vyčerpána (zbývá zhruba koncentrace 0,5 – 1 mM). Přesto po 1-2 s dojde k zastavení vlnění bičíku. Toto náhlé zastavení koresponduje s vysokou úrovní extracelulárního vápníku, které způsobí snížení frekvence vlnění na nulu a intracelulární úroveň ATP je bez využití odčerpána (Billard a Cosson, 1990).

1.3 ENDOKRINNÍ DISRUPTORY A JEJICH VLIV NA REPRODUKCI ŽIVOČICHŮ

V posledních letech roste zájem o problematiku tzv. endokrinních disruptorů (EDs), chemických látek vyskytujících se v životním prostředí. Tyto látky mohou vyvolávat škodlivé účinky prostřednictvím interference s endokrinním systémem zvířat a lidí. Pod názvem EDs se definují chemické látky jako např. přírodní i syntetické hormony, přírodní součásti rostlin, pesticidy, látky používané při výrobě plastických hmot a různých konzumních výrobků, další průmyslově využívané látky a odpady. Mnohé z nich jsou velmi perzistentní, jiné se naopak rychle rozkládají a mohou tak působit jen po omezenou dobu, ale v kritickém období vývoje organismu (Hruba, 2009). Tyto látky kontaminují

naše životní prostředí a představují toxikologické reprodukční riziko. EDs se dělí do dvou skupin. První skupinou jsou xenoestrogeny: chemické látky, které vznikly lidskou činností. Druhou skupinu tvoří fytoestrogeny, látky, které se v přírodě přirozeně vyskytují v rostlinách. Tato kontaminanta mají estrogení či androgení aktivitu a mohou negativně ovlivnit vývoj a reprodukci savců včetně člověka (vom Saal et al., 1998; EPA, 1999).

Endokrinní disruptory mohou mít vliv na fertilitu živočichů. Endokrinní disruptor se definuje jako exogenní látka nebo směs látek, které interferují se syntézou, sekrecí, transportem, vazbou a činností nebo odbouráváním přirozených hormonů v těle. Přirozené hormony v těle jsou odpovědné za udržování stálého vnitřního prostředí, chování, reprodukce a vývoje (EPA, 1997). EDs ovlivňují funkce endokrinního systému a způsobují zdravotní potíže.

Každá chemická látka, stejně jako ED, má často mnohonásobné cesty působení, různorodé mechanismy působení a rozdílné cesty expozice. Právě působení endokrinních disruptorů je velmi často komplikované. Důležité je si objasnit, jak se organismy vystavují působení těchto chemikálií, zhodnotit jejich potenciální účinek a tomuto účinku se vyvarovat nebo ho alespoň omezit. EDs mohou působit mnoha mechanismy na mnohých orgánech. Největší pozornost je věnována mechanismům vazby na receptory, ale jsou studovány i další způsoby, jako syntéza, transport a metabolismus hormonů, které mohou být expozicí chemických látek rovněž ovlivněny (Hruba, 2009).

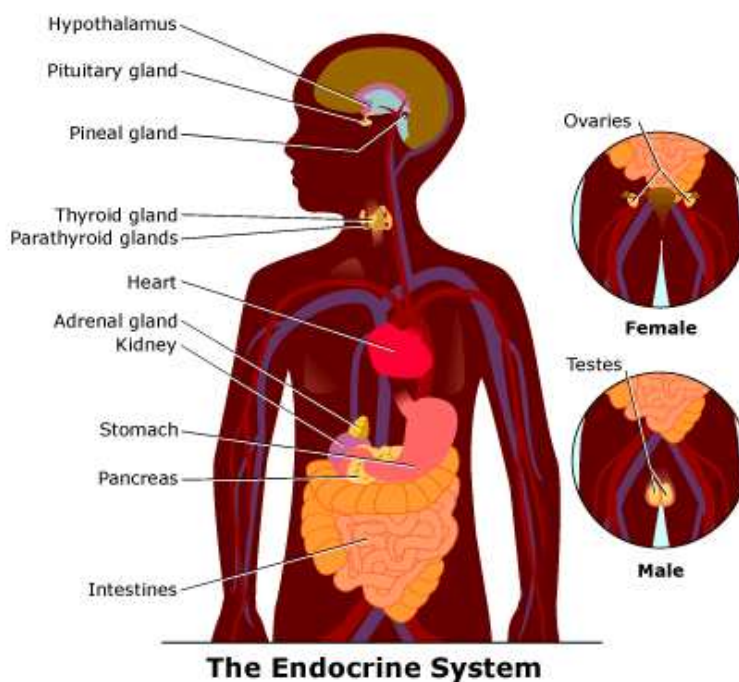
Činnost těchto látek je různorodá. Existuje mnoho domněnek o mechanismu působení těchto látek v těle. Mohou působit nepříznivě mnoha způsoby na endokrinní systém. Syntetické chemické látky po vstřebání do organismu napodobují nebo blokuji přirozenou funkci hormonů. K tomuto narušení může dojít prostřednictvím ovlivnění obvyklé hladiny hormonů, zastavení nebo stimulace produkce hormonů nebo změnit způsoby expozice hormonů v těle, což ovlivňuje funkce, které tyto hormony kontrolují (<http://www.nrdc.org/health/effects/qendoc.asp>). Jiné látky mohou pozměnit vazbu hormonu s jeho receptorem a tím ovlivnit normální buněčné funkce spojené s tímto hormonem. EDs často napodobují přirozené hormony, posilují je nebo naopak brzdí jejich funkci. Některé z nich přímo interagují s receptorem pro daný hormon. Do organismu se poté vyšle nadbytečná odpověď a dojde k abnormálním buněčným funkcím.

Působení EDs je individuální u každého organismu. K ovlivnění přispívají faktory jako věk, výživa, životní styl, životní prostředí atd. Tyto disruptory neovlivňují pouze

endokrinní systém, ale i systémy vyššího řádu, jako jsou nervový a imunitní systém (www.ffcr.or.jp).

Endokrinní systém je velice složitý systém, který je označován též jako soustava žláz s vnitřní sekrecí a společně s nervovým systémem se podílí na řízení funkcí organismu. Oba řídicí systémy spolu vzájemně komunikují a ovlivňují se. Hormony jsou poslové, které produkují žlázy s vnitřní sekrecí. Vylučují je do krve a ty jsou krví přenášeny ke tkáním a orgánům, na něž působí. Aby mohly hormony cílové buňky ovlivnit, musí se nejprve navázat na receptor, což si můžeme představit jako systém zámek a klíč. Navázáním se spustí kaskáda dějů se specifickým účinkem v buňce (<http://www.zdn.cz/clanek/priloha-pacientske-listy/endokrinni-system-452784>).

Endokrinní systém zahrnuje mozek a přidružené orgány. Mezi endokrinní orgány patří např. hypofýza, štítná žláza, nadledvinky a samčí a samičí reprodukční orgány (Obr. 11). Funkcí těchto žláz a jejich hormonů je regulace růstu, vývoje a funkce mnohých metabolických procesů. Pohlavní hormony, estrogeny u žen a androgeny u mužů, ovlivňují vývoj a správnou funkci reprodukčních orgánů. EDs narušují tento systém napodobováním či soutěžením o receptorová místa endogenních hormonů a mohou narušovat jejich funkci. Často jsou v závislosti na jejich aktivitě nazývány jako estrogenní nebo androgenní modulátory.



Obr. 11: Endokrinní systém člověka.

(http://kidshealth.org/parent/general/body_basics/endocrine.html)

Zdroje EDs jsou různorodé. Jedním ze zdrojů EDs je životní prostředí (voda, vzduch, půda). Dalšími zdroji jsou produkty vzniklé lidskou činností: detergenty, pesticidy, plasty (bisfenol A a ftaláty-MEHP), léčiva (diethylstilbestrol), průmyslové chemikálie (polychlorované bifenyly, dioxin), vedlejší produkty při výrobě papíru, kovů (kadmium, olovo, rtuť), látky vzniklé při spalování, atd. Díky jejich výskytu v životním prostředí se akumulují do potravy a vody, kterou přijímáme. Vyskytují se např.: v sóje, luštěninách, ovoci, atd. a hrají tak nepříznivou roli v přijímané potravě.

V několika posledních desetiletích došlo v lidské populaci k nárůstu výskytu testikulárních nádorů (Adami et al., 1994; Forman et al., 1994), defektů ve vývoji reprodukčních orgánů a snížila se kvalita mužského spermogramu (Jensen et al., 1995). Tyto změny se staly v krátkém časovém úseku. Předpokládá se, že jsou příčinou spíše nepříznivého vlivu prostředí a životního stylu, než příčinou genetických změn. K těmto změnám patří hlavně vzrůst výskytu nádorů varlat a prostaty, snížená kvalita spermatu, hypospadiie, kryptorchismus (Sharpe and Skakkeback., 1993, Safe, 2000). Tyto symptomy byly popsány jako „Testicular dysgenesis syndrome“ (TDS). TDS je vyvolán škodlivými látkami, jako EDs, vyskytujícími se v životním prostředí. Důsledkem vzniku těchto symptomů je narušení vývoje embryí a gonád během embryonálního vývoje (Skakkeback et al., 1987).

Ve většině států Evropy a také v České republice narůstá počet párů, u kterých se vyskytují problémy s reprodukcí. Příčiny mohou být různorodé. Často jsou podpořeny životním stylem jako kouření, stres, alkohol, popř. požívání drog a jiných omamných látek. Snižující se kvalita životního prostředí má rovněž negativní dopad na reprodukci savců včetně člověka (WHO, 2010).

Řada polutantů životního prostředí, včetně EDs, negativně ovlivňuje řadu funkcí v organismu živočichů, včetně člověka. U samců způsobují sníženou neplodnost, defekty v pohlavním vývoji, zvýšení rakoviny prostaty. U samic se rovněž vyskytují reprodukční problémy jako zvýšení rakoviny prsu, endometriosa. U obou pohlaví dochází k narušení imunitního systému. U dětí se mohou vyskytnout problémy s vývojem a chováním (Keith et al., 1997). Jinými defekty u živočichů jsou např.: nesestouplá varlata u pantera, malé penisy u aligátorů, změna pohlaví u ryb, změny chování u ptáků, nárůst rakoviny varlat a vrozených defektů, redukce počtu spermií atd (Gray et al., 2001). Kombinované *in vitro* a *in vivo* studie jsou důležité pro úplnou charakterizaci reprodukčních změn po působení endokrinních disruptorů, které tyto změny způsobují. Identifikovalo se mnoho pesticidů

(vinklozolin, DDE aj.), které se váží na potkaní i lidské receptory reprodukčních orgánů. Tato kontaminanta odkládají pubertu, redukují velikost pohlavních přídatných žláz a mění pohlavní znaky hlavně u samců. Dalšími známými EDs jsou ftaláty, které *in vitro* estrogenně způsobují malformace u samců potkanů a působí jako antagonisté androgenů v dělohách u samic (Gray, 1998).

U laboratorních zvířat existuje řada experimentálních dat, které popisují funkci a působení vybraných ED. Ve většině experimentů se ED aplikují v nízkých dávkách a nevyvolávají žádné akutní příznaky intoxikace. Dramatické účinky expozice těchto látek se často projevuje v pre- nebo v postnatálním vývoji. Negativní účinky byly zpozorovány u obou pohlaví, ačkoliv většina studií popisuje problémy u samčího pohlavního systému. Dá se to vysvětlit faktem, že většina EDs je estrogenního původu. Tyto negativní vlivy narušují reprodukční systém živočichů a jejich chování. Nejčastějšími symptomy jsou TDS, hypospadiie, rakovina varlat, zhoršená kvalita spermatu a jeho redukce (Gray et al., 2004; Stokes 2004).

Jednou z látek s estrogenní aktivitou je např. syntetický xenoestrogen diethylstilbestrol (DES). V letech 1945-71 byl DES, předepsán jako lék proti potráčivosti těhotným ženám. Tento lék způsobil však závažné zdravotní potíže dětem těchto žen. V roce 1971 lékaři zjistili nárůst vaginální rakoviny vrozených vad dělohy a vaječníků a poruch imunitního systému u dospívajících dívek. DES měl také negativní vliv na fertilitu dospělých synů, kde neprobíhala spermatogenese a synové měli problémy s reprodukcí. Tato látka byla zakázána a setkáme se s ní pouze v experimentech na zvířecím modelu, kde slouží jako pozitivní kontrola k testování vlivu různých látek na reprodukci (Jensen et al., 1995; Degen et al., 2000; Whitehead et al., 1981; Klip et al., 2002, Kyselova et al., 2004).

1.4 ROZDĚLENÍ ENDOKRINNÍCH DISRUPTORŮ

Endokrinní disruptory jsou látky vykazující estrogenní, antiestrogenní, androgenní a antiandrogenní aktivitu. Látky s estrogenní a antiestrogenní aktivitou obecně dělíme podle jejich původu do dvou skupin – xenoestrogeny a fytoestrogeny.

Xenoestrogeny jsou chemické látky vznikající lidskou činností a fytoestrogeny jsou přirozené látky a jsou obsaženy v rostlinách, které jsou součástí lidského jídelníčku.

Xenoestrogeny se podle chemické struktury dělí na:

- 1) Perzistentní organochloridy: řadí se mezi ně polychlorované bifenyly, dioxiny, furany atd. Jsou běžně používány v elektrických transformátorech, kosmetice, lakýrnictví, jako pesticidy atd. Jejich stupeň rozkladu v organismu je velice nízký a pomalý (Iwata et al., 1994).
- 2) Alkylfenoly a jejich deriváty: používají se jako průmyslové a domácí detergenty, herbicidy a pesticidy, barviva atd. (White et al., 1994)
- 3) Bisfenol A (BPA): 4,4- isopropylidenbifenol je intermediátem při výrobě polymerů, pryskyřic, polykarbonátů, antioxidantů, barviv. Monomery a oligomery bisfenolu A se mohou uvolňovat během polymerace, tepelnou degradací, autoklávováním apod. Uvolňuje se též z vnitřní vrstvy konzerv i z kompozitních zubních výplní. Bisfenol A ovlivňuje reprodukci, reprodukční parametry a kvalitu spermií u myší (Peknicova et al., 2002).
- 4) Ftaláty: používají se v průmyslu plastů, jako přísady do barev, lepidel a inkoustů. Patří mezi ně DEHP (di(2-ethylhexyl)ftalát), který je řazen mezi vývojově a reprodukčně toxické látky (Keith et al., 1997).

Fytoestrogeny se podle své chemické struktury dělí do pěti skupin:

- 1) Isoflavonoidy: patří mezi ně např. genistein (GEN). GEN je hlavní složkou sojových bobů. Mnohé studie prokázaly pozitivní vliv příjmu sojových produktů s nízkým výskytem nádorových onemocnění různých orgánů (Messina, 1999, Kyselova et al., 2004).
- 2) Flavonoidy: nachází se např. v zelenině, ovoci, zeleném čaji, bylinách atd. Extrakt bohatý na flavonoidy vedl u potkanů ke snížení počtu epididymálních spermií a ke zpomalení jejich motility (Das et al., 2004).
- 3) Koumesanty: významným zástupcem z této skupiny jsou výhonky vojtěšky (Messina, 1999).
- 4) Lignany: nacházejí se v potravinách bohatých na vlákninu jako jsou žito, semena lnu atd. (Strauss et al., 1998)
- 5) Zearalenone (ZEN): řadí se mezi mykotoxiny. Mykotoxiny jsou nízkomolekulární látky, které produkuje většina druhů hub (Betina, 1989).

EDs se podle jejich aktivity dále dělí anti-estrogeny, androgeny a antiandrogeny. Antiandrogeny se nacházejí v našem životním prostředí. Jestliže jsou antiandrogeny podávány během diferenciacce gonád při embryonálním vývoji mají negativní vliv na reprodukci u samců. Toto poškození bývá nevratné (Elzeinova et al., 2008). Puberta je dalším citlivým obdobím pro vývoj samčích reprodukčních orgánů. Setkáváme se také s ovlivněnými reprodukčními parametry po podávání antiandrogenů myším samcům v období puberty (Elzeinova et al., 2008).

Mezi nejznámější a účinné androgeny řadíme: linuron, flutamid a vinklozolin (Kelce and Wilson, 1997, Miyata et al., 2003, Elzeinova et al., 2008).

1.5 STRUKTURA A VLIV VYBRANÝCH ENDOKRINNÍCH DISRUPTORŮ NA SAVCE A RYBY

Následně budou popsány 4 vybrané EDs, které byly použity do pokusů. Budou diskutovány vztahy mezi strukturou, jejich způsobu vlivu na organismus a jejich možné role v nepříznivých podmínkách při vývoji a reprodukci.

Studované ED: Zearalenone, Di(2-ethylhexyl) ftalát, Bisfenol A a Vinklozolin.

1.5.1 Zearalenone

Identifikační informace:

CAS číslo: 17924-92-4

SYNONYMA: 3,4,5,6,9,10-hexahydro-14,16-dihydroxy-3-methyl-1H-2-benzoxacyclotetradecin-1,7(8H)-dione nebo 6-(10-hydroxy-6-oxo-*trans*-1-un-decenyl)- β -resorcylic-acid-lactone

Zkratka: ZEN

Fyzikální a chemické vlastnosti:

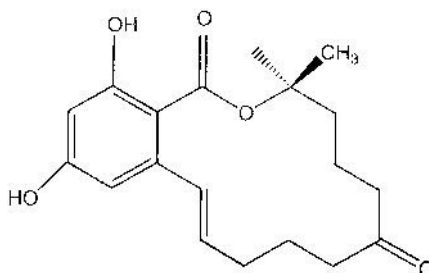
Sumární vzorec: C₁₈H₂₂O₅

Molekulová hmotnost: 318.36

Chemická struktura (Obr. 12).

Vlastnosti: bílá krystalická látka, která je prakticky nerozpustná ve vodě, ale rozpustná v ethylenacetátu, acetonitrilu, alkoholech, diethyletheru, benzenu, chloroformu atd.

(Betina, 1989, Budavari, 1989)



Obr. 12: Chemická struktura ZEN (Budavari, 1989).

Zearalenone (ZEN) patří mezi mykotoxiny, což jsou nízkomolekulární látky, které produkuje většina druhů hub. Nejznámější houby, které produkují tyto mykotoxiny, jsou *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Tyto sekundární metabolity mají své využití ve farmacii jako antibiotika nebo vystupují jako škodlivé mykotoxiny (Betina, 1989).

ZEN se získává z kmenů mnoha druhů hub, které se řadí do rodu *Fusarium* jako např.: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. nivale* atd. Poprvé byl izolován v roce 1962 Stobem a jeho jméno bylo odvozeno z houby *Giberella zae* z jehož mycelia byl získán. Tato houba kontaminuje kukuřici (*Zea mays*) (Betina, 1989; Logrieco et al., 2002). Rod *Fusarium* se rychle množí, produkuje rychle rostoucí kolonie s jasně zbarveným

myceliem. Tyto houby se hojně vyskytují v půdě a jsou schopny rozkládat celulosu v rostlinách. Tento efekt vede k onemocnění rostlin hlavičkovou plísní (FHB - *Fusarium head blight*) na kukuřici (Bottalico and Perrone, 2002, Logrieco et al., 2002). *Fusarium* pak napadá obiloviny (nejčastěji během kvetoucí fáze). Může však pokračovat ve své toxické aktivitě i během skladování. Vše je ovlivněno dalšími faktory jako např.: vlhkost semen, teplota a vlhkost vzduchu.

ZEN je velice stabilní látka, která nepodléhá změnám při vysokých teplotách a rychle se absorbuje orálním způsobem. V zemědělství je považován za nejrozšířenější mykotoxin, jehož výskyt se neustále sleduje.

ZEN byl v roce 1993 vyhodnocen IARC (International Agency for Research on Cancer) v roce 1993 a zařazen do skupiny látek člověku karcinogenní (IARC 1993, IARC 1999). Nicméně denní maximální tolerantní dávka je 0,5 µg/kg tělesné váhy. U myší a potkanů má nízkou akutní toxicitu po orálním podání (jedna dávka 20000mg/kg nezpůsobuje u těchto druhů smrt). Po dlouhodobějších výzkumech na experimentálních i domácích zvířatech se ukázalo, že ZEN je závislý na interakci s estrogenním receptorem. Bylo zjištěno, že prasata jsou na tuto látku nejcitlivějšími zvířaty. Na myších (krmeny 0,5 nebo 100 mg/kg ZEN) se neprokázaly žádné změny (NTP, 1982).

Nejdůležitější toxický účinek ZENU je jeho estrogenní účinek. Chemická struktura ZENU a jeho derivátů jako např. 17β-estradiolu, jim umožňuje kompetitivně se vázat na estrogenní receptor (ER). Díky jeho estrogenní aktivitě se řadí mezi endokrinní disruptory. Např. afinita ZENU k ER dělohy a vejcovodu je různá u různých zvířat a je v sestupném pořadí: prase, potkan, kur (Coulombe, 1993).

V *in vivo* pokusech způsobil ZEN u laboratorních zvířat (myš, potkan, křeček) změny v reprodukčním traktu, sníženou fertilitu, zvýšení embryo-letální reabsorbce, změny ve váze nadledvinek, štítné žlázy a příštítných tělísek, variace u hormonů (estradiol a progesteron) (Williams et al., 1989).

Ve studiích na prasatech se symptomy působení ZENU po podávání stravy kontaminovanou ZENem (o dávce 1mg/kg, ale i při mnohem nižších koncentracích především u samic v období puberty) prokázaly u samic. Mezi typické symptomy ZENU patří zarudnutí a otoky lůna, otoky prsních žláz, vesikulární a cystické folikuly na ováriích atd. Ačkoliv při malých dávkách nebyly patrné žádné vnější změny, pitva potvrdila vesikulární folikuly na ováriích. Vysoká citlivost k ZENU nebyla prokázána u samců (Diekman and Green, 1992). Podobných výsledků bylo dosaženo podáním ZENU (od 31,25

mg/den až po 500 mg/den) dojnícím, kde jediným účinkem ZENU bylo zmenšení žlutého tělíska (Weaver et al., 1986b). Ve studii ZENU na neplodnost a poklesy ve výnosu mléka (Bloomquist et al., 1982) bylo dosaženo závěru, že tyto efekty nejsou způsobeny pouze ZENem, ale i ostatními mykotoxiny v krmivu.

V *in vitro* studii na kancích byl zkoumán vliv ZENU a jeho derivátů (α -ZOL a β -ZOL) na spermie. U spermií byla analyzována jejich viabilita, apoptósa, stabilita chromatinu a motilita. Každý mykotoxin ovlivnil jednu ze specifických funkcí samčích buňek. ZEN a α -ZOL, v pikomolárním množství, negativně ovlivnily chromatinovou stabilitu spermie a jejich viabilitu a β -ZOL (avšak na mikromolární úrovni) ovlivnil motilitu spermií. Pomocí těchto přesných měření se prokázaly nepříznivé účinky ZENU, které mají negativní dopad na reprodukci kanců (Benzoni et al., 2008). Obdobná studie byla prováděna za účelem stanovení *in vitro* účinku ZENU a α -ZOL na kančích spermiích. Byly použity tři rozdílné koncentrace ZENU a α -ZOL. Parametry spermií, které se hodnotily byly viabilita, motilita a spontánní akrosomová reakce. Výsledky prokázaly, že obě látky (ZEN i α -ZOL) statisticky průkazně ovlivnily zkoumané parametry spermií. Proto lze tyto látky považovat za přímé toxikanty kančích spermií, které ovlivňují jejich schopnost fertilizace (Tsakmakidis et al., 2006).

1.5.2 Di(2-ethylhexyl) ftalát

Identifikační informace:

CAS číslo: 117-81-7

SYNONYMA: bis(2-ethylhexyl)ftalát; dioctyl ftalát; 1,2- benzendikarboxylová kyselina; bis(2-ethylhexyl) ester

Zkratka: DEHP

Fyzikální a chemické vlastnosti:

Sumární vzorec: C₂₄H₃₈O₄

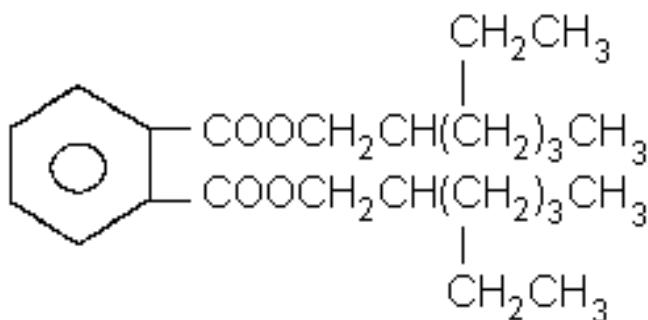
Molekulová hmotnost: 390, 54

Strukturní vzorec (Obr. 13).

Nebezpečné vlastnosti: je to dráždivá látka a může být škodlivá při požití nebo vdechnutí (Lenga et al., 1985). Špatně se střeává kůží. Při zahřátí na teplotu rozkladu se uvolňují štiplavý kouř, toxické plyny oxidu uhelnatého a oxid uhličitý (Lenga et al., 1985; Sax et al. 1981).

Reaktivnost: DEHP je neslučitelný s oxidačními materiály. Dále je nemísitelný s nitráty, silnými kyselinami a silnými alkáliemi (Sittig et al., 1985; Lenga et al., 1985).

Symptomy působení: zahrnují podráždění očí, sliznic, kůže. Může způsobit nevolnost, průjem a mírné žaludeční poruchy (Sittig et al., 1985).



Obr. 13: Strukturní vzorec DEHP (<http://www.bezjedu.arnika.org/chemicke-latky/di-2-ethylhexyl-ftalat-dehp>).

DEHP (di(2-ethylhexyl) ftalát), patří mezi ftaláty, které jsou řazeny mezi nejhojnější průmyslové kontaminanty našeho prostředí. Ftaláty jsou dobře známé díky jejich schopnosti dodávat plastům flexibilitu. DEHP se používá ve zdravotnickém

průmyslu jako změkčovadlo polyvinyl chloridu a pryskyřice. Některé produkty vyrobené z PVC mohou obsahovat až 40% DEHP. Tento ED je také využíván k nátěru kovových folií používaných jako vnitřní obal u jogurtů, krémů, mléka a k výrobě hliníkových folií. Slouží také jako rozpouštědlo inkoustu. Využíván je dále ve vývěvách jako akaracid v ovocných sadech, jako přísada v pesticidech, jako detektor netěsností v respirátorech apod. (Keith et al., 1997).

Ve vodě se DEHP biologicky rozkládá, adsorbuje se do sedimentů a zakoncentrovává se do vodních organismů. Atmosférický DEHP je přenášen na dlouhé vzdálenosti a odstraňován z ovzduší deštěm. K expozici u člověka dochází v pracovním prostředí, kde se DEHP vyskytuje, spotřebou pitné vody, jídla (hl. ryby, kde může dojít k bioakumulaci DEHP do jejich organismu), z jídla baleného v PVC, při transfúzi krve z krevních vaků z PVC apod. (Keith et al., 1997).

Ftaláty se hojně vyskytují ve vodním prostředí a nepříznivě ovlivňující reprodukci u savců avšak nemalé riziko představují také u ryb. Ve studii na zebříčkách (*Danio rerio*) se zkoumal vliv DEHP, nejvíce používaného ftalátu, na reprodukční zdraví samců zebříček. Samcům bylo injikováno 0,5; 50 nebo 5000 mgDEHP/kg váhy těla po dobu 10 dní. Účinky expozice byly hodnoceny pomocí úspěšnosti fertilizace, histologií varlat atd. U samců, kterým byla podávána dávka 5000 mg DEHP/kg váhy těla se snížila úspěšnost oplození oocytů u neovlivněných samiček. Přežití embryí a jejich následný vývoj nebyl ovlivněn žádnou z dávek DEHP. Tyto výsledky ukázaly, že vysoké koncentrace DEHP narušují spermatogenesi u dospělých zebříček a jejich reprodukční schopnosti (Uren-Webster et al., 2010)

DEHP, často nazývaný jako proliferátor peroxisomu, byl klasifikován IARC (International Agency for Research on Cancer) a NTP (National Toxicology Program) jako látka karcinogenní pro člověka (IARC,1982; NTP 1983). Tato domněnka je založena na základě provedených studií NTP na myších a krysách, které prokázaly zvýšení jaterních nádorů u obou pohlaví (NTP, 1982; Kluwe et al., 1982). Nebyly však zaznamenány žádné epidemiologické studie na karcinogenitu DEHP. S ohledem na vývoj mechanických studií o proliferaci peroxisomu se rozhodlo o přezkoumání klasifikace DEHP jako karcinogenní látky. Např. Doull et al. se domnívali, že je nepravděpodobné DEHP považovat za lidský karcinogen, protože DEHP uplatňuje svoji tumorigenní odpověď prostřednictvím procesu proliferace peroxisomu, ke kterému jsou lidé téměř úplně inertní. Zároveň však uznávají, že mechanismus tvorby jaterních nádorů u hlodavců díky vlivu DEHP není plně pochopen

(Doull et al., 1999). Znalosti o mechanismu účinku peroxisomu narůstají a s tím i výsledky, že DEHP by mohl způsobit rakovinu i u člověka.

Dále se působení DEHP testovalo u Sherman potkanů (skupina 32 samců a 32 samic). Tyto potkani byli dva roky udržováni na dietách obsahující 0,04; 0,13; nebo 0,4% DEHP (srovnatelné s dávkami 20, 60, a 195 mg DEHP/kg váhy těla). F1 skupina (80 zvířat) byla krmena stravou obsahující 0,04% DEHP po dobu jednoho roku. Úmrtnost u F1 ovlivněných potkanů a kontrolních skupin byla vysoká – 46,2 a 42,7% přežila do jednoho roka. Žádný efekt nebyl zpozorován u rodičovských skupin a nebyly nalezeny histologické poruchy orgánů. Rodičovské i F1 skupiny, které dostávaly stravu s 0,4% DEHP byly vzrůstově menší a došlo ke zvýšení hmotnosti jejich ledvin a jater (Carpenter et al., 1953).

V obdobné studii, kde byl zkoumán vliv na DEHP na fertilitu a reprodukční parametry, byla CD-1 myším (samcům i samicím) podávána strava s 0; 0,01; 0,1 a 0,3% DEHP. DEHP se prokázal jako reprodukční toxikant u obou pohlaví. U dávky 0,3% výrazně klesla plodnost CD-1 myší, snížil se počet živě narozených mláďat a došlo k poškození semenotvorných kanálků. DEHP se prokázal být fetotoxický a teratogenní (Singhe, 1972; Shiota a Nishimura, 1982).

Ve studii na kancích byl zkoumán vliv DEHP po pre-pubertální orální expozici u kanců na kvalitu spermatu. Cílem bylo zjistit, zda-li po působení tohoto ED se prokážou účinky, které by měly negativní dopad na reprodukci. Sperma bylo odebráno od post-pubertálních kanců (stáří 8-9 měsíců), kteří pili vodu s přidaným DEHP (300 mg DEHP/kg váhy kance) 3x týdně po dobu 3-7 týdnů. Sperma bylo rovněž odebíráno od kontrolních kanců (voda bez DEHP). Skupina ovlivněná DEHP měla výrazně nižší procento lineárně se pohybujících spermií ve srovnání s kontrolními vzorky a bičíky spermií měly větší amplitudy vlnění oproti kontrolním vzorkům. Spermie od kanců, které byly ovlivněny nízkou dávkou DEHP ukázaly kinematickou deviaci, oproti kontrolním, která by mohla být zapříčiněna endokrinním disruptorem DEHP (Spjuth et al., 2006).

1.5.3 Bisfenol A

Identifikační informace:

SYNONYMA: 4,4'-isopropylidendifenol, bis(4-hydroxyfenyl)methylmethan, bis(4-hydroxyfenyl)propan, bisfenol, 4,4'-bisfenol A, dian, 4,4'-dihydroxydifenylmethylmethan atd.

Fyzikální a chemické vlastnosti:

Sumární vzorec: $C_{15}H_{16}O_2$

Molekulová hmotnost: 228,29

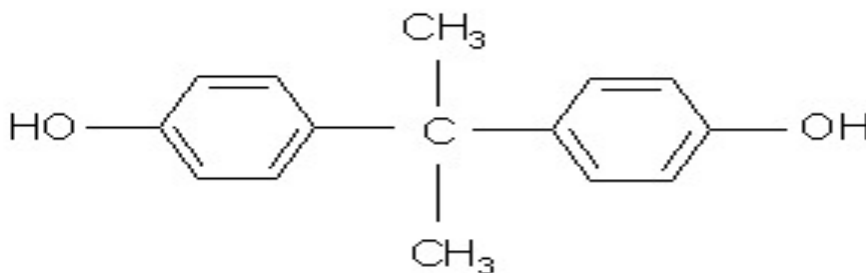
Zkratka: BPA

Chemická struktura (Obr. 14).

Vlastnosti látky: krystalky nebo vločky bílé až snědčí (žlutohnědé) barvy. Může být toxický při přijímání potravy, dýcháním nebo absorpcí kůží. Při zahřívání uvolňuje toxické výpary CO a CO₂. Je stálý za normálních laboratorních podmínek.

Reaktivnost: je neslučitelný se silnými oxidanty, se silnými zásadami a kyselými chloridy a anhydridy (Lenga, 1985).

Symptomy působení: zahrnují dráždění očí, nosu, hrdla, kůže, sliznice a horních cest dýchacích. Může způsobit kýčání, přecitlivělou pokožku, zrudnutí pokožky a otoky.



BISPHENOL A

Obr. 14.: Chemická struktura BPA (Gregory et al., 2008).

Bisfenol A (BPA) je jednou z nejvíce vyráběných látek po celém světě (více jak tři miliony tun ročně). Je intermediátem při výrobě polymerů, pryskyřic, polykarbonátů, antioxidantů, barviv atd. Je součástí polykarbonátových plastů, které se využívají jak pro výrobu plastových lahví na jedno použití tak i pro výrobu dětských láhví (Vandenberg et al., 2009). Polykarbonáty se dále využívají při konzervování, tím pádem šťáva z konzervované zeleniny obsahující BPA může u člověka zapříčinit rakovinu (Keith et al., 1997). Dále se tento ED používá jako umělá hmota v potravinářských obalech, pro výrobu regálů v lednicích, vratných obalů od džusů, mléka atd. Své uplatnění má také v elektrotechnice jako kompaktní disky, elektrické spotřebiče atd. (Gregory et al., 2008). Používá se také k výplni zubů (plomby). Primárním zdrojem výskytu BPA jsou emise při výrobě epoxidových pryskyřic, polykarbonátů a polysulfonových pryskyřic. Nejpravděpodobnější průnik této látky do organismu je inhalací a kožním kontaktem (např. při výrobě této látky).

Bisfenol A je znám svými estrogenními účinky již od roku 1938. Je uveden v EPA a ve World Wildlife Foundation jako modifikující endokrinní chemikálie (Keith et al., 1997). Napodobuje estrogeny a váže se na estrogení receptory. Afinity BPA k estrogením receptorům ERs je přibližně 10 000x slabší než u estradiolu (Gregory et al., 2008). Kromě jeho estrogení aktivity BPA také inhibuje nebo snižuje steroidogenezi varlat (Sohoni a Sumpter, 1998; Akingbemi et al., 2004).

Prokázalo se, že BPA mění koncentraci spermatu u živorodek (*Poecilia reticulata*) (Haubruge et al., 2000) a u pstruha obecného (*Salmo trutta fario*) v období tření (Lahnsteiner et al., 2005). Působením BPA se snižuje počet spermatogonických cyst, kde dochází k vývoji spermií, což indikuje špatný vývoj pohlavních orgánů u kapra obecného (*Cyprinus carpio L.*) (Mandich et al., 2007). Dále byl zpozorován nárůst vitellogeninu po působení BPA u samců tresky (*Gadus morhua*) (Larsen et al., 2006), halančíka rýžovištního (*Oryzias latipes*) (Tabata et al., 2001; Kang et al., 2002) a mihule (*Pimephales promelas*) (Sohoni et al., 2001). Tímto dochází u ryb k úbytku samců a nárůstu počtu samic, jelikož vitellogenin se přirozeně vyskytuje u samic. Ve studii na škebli koncentrace 16 µg/l BPA po 164 denní expozici snížila počet zralých spermií u sexuálně zralých samců (Sohoni et al., 2001). Všeobecně vyšší koncentrace BPA mají negativní dopad na reprodukci.

V současných *in vitro* studiích se zkoumá účinek BPA na motilitu a rychlost pohybu spermií u euroasijského okouna říčního (*Perca fluviatilis L.*) pomocí CASA

(Computer Assisted Sperm Analysis). Použitá koncentrace spermií byla 29×10^9 sp/ml (Alavi et al., 2007). Spermie se nepohybovaly díky vysoké osmotické koncentraci semenné plasmy. Po přidání vody a tím snížení osmotické koncentrace se spermie aktivovaly (Alavi et al., 2007; 2010). Doba trvání motility spermií u okouna je velice krátká (<1 min v čerstvé vodě). Rychlost pohybu spermií, procento motilních spermií a frekvence vlnění bičíku se rychle snížila po aktivaci spermií pomocí aktivačního média, které je závislé na osmotické koncentraci iontů. Osmotická koncentrace vyšší jak 300 mOsmol/kg potlačuje aktivaci spermií (Alavi et al., 2007). Účinky BPA na motilitu a rychlost pohybu spermií po jejich aktivaci je popsána níže, viz. 4.10 a 4.11.

Negativní účinek BPA byl prokázán i u savců. U mláďat potkanů (samců) došlo ke zmenšení varlat a ke snížení počtu spermií (Keith et al., 1997).

BPA se také testoval u outbrední linie myší (CD1), která je známa vysokým stupněm reprodukce, obvykle 12-13 mláďat na samici/vrh (AnLab Ltd., Praha). Tato outbrední linie byla použita ke dvěma experimentům. V prvním se zjišťoval účinek BPA na narozené potomky. Ve třech generacích CD1 myší byly porovnávány počty narozených mláďat dvou experimentálních skupin (podávány dávky BPA 2 a 20 ppb) s kontrolními skupinami. U skupiny myší, kde byly podávány dávky 2 ppb BPA, došlo ke snížení počtu narozených mláďat. U druhé skupiny myší (20 ppb BPA) nedošlo k úbytku mláďat, naopak u třetí generace myší došlo k nárůstu (cca 15-16 mláďat/samici). Dalším experimentem bylo zjištění účinku BPA na samčí reprodukční orgány. Váha varlat u experimentálních a kontrolních skupin byla srovnatelná. Na druhé straně histologické obrázky varlat (u skupin s 2 ppb BPA) ukázaly patologické změny, jako poškození semenných tubulů ve varlatech, snížení spermatogeneze atd. Histologické obrázky experimentální skupiny (20 ppb BPA) a kontrolní skupiny byly srovnatelné. Výsledky u outbrední linie myší (CD1) po podávání dvou dávek BPA (2 a 20 ppb) byly paradoxní, nižší dávka měla vyšší vliv na *in vivo* reprodukci a stav spermií, než vyšší dávka (Peknicova et al., 2002). Tento možný efekt (t.j. vyšší odpověď na nízkou koncentraci než na vyšší) je znám z endokrinologie, v praxi ukazuje na zvýšené riziko působení EDs s nízkou koncentrací.

1.5.4 Vinklozolin

Identifikační informace:

SYNONYMA: Ronilan, 3-(3,5-dichlorfenyl)-5-ethenyl-5-methyl-2,4-oxazolidineodine

Fyzikální a chemické vlastnosti:

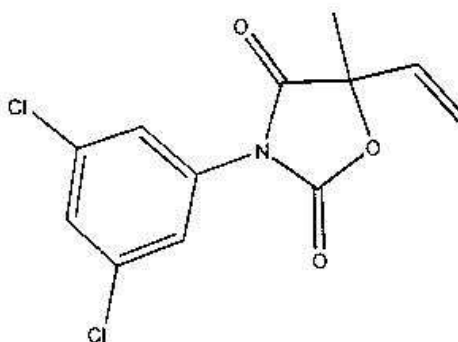
Sumární vzorec: C₁₂H₉NO₃Cl₂

Molekulová hmotnost: 286,11 (<http://chemfinder.camsoft.com>)

Zkratka: VIN

Chemická struktura (Obr. 15).

Riskantní (chronické) vlastnosti: nevykazuje žádné podstatné akutní nebo chronické riziko (Keith et al., 1997)



Obr. 15: Chemická struktura vinklozolinu (Keith et al., 1997).

Vinklozolin, 3-(3,5 dichlorfenyl)-5-methyl- 5-vinyloxazolidin-2,4-dione (VIN) patří mezi fungicidy. Tento pesticid se používá k hubení hub na ovoci, zelenině a okrasných rostlinách, (EPA, 1999) a je řazen mezi endokrinní disruptory. Chová se jako antiandrogen, který u potkanů poškozuje vývoj samčího reprodukčního systému během období sexuální diferenciacce. Jeho antiandrogenní účinky se projevují i u ostatních savců jako králík, myš a pes. VIN je dikarboximidový fungicid, který samotný není stabilní. Rozpadá se na dva metabolity M1 a M2, které mají také antiandrogenní aktivitu. Metabolity M1 a M2 mají životnost více jak 180 dní a jsou mobilní ve vodné fázi (Kelce et al., 1994; Wong et al., 1995; Kelce and Wilson, 1997). VIN je degradován

do prostředí nebo metabolizován v organismech do mnoha metabolitů (např. již zmíněné M1 a M2 metabolity), které tlumí (brzdí) androgenní receptory *in vitro*.

VIN *in vivo* inhibuje androgenní receptor (ADR), závislé geny a způsobuje anatomické defekty a poruchy jako snížení počtu spermií zmenšení anogenitální vzdálenosti, snížení váhy varlat, semenných váčků atd. (Gray et al., 1994).

Endokrinními disruptory jako je VIN jsou kontaminanty znečišťující životní prostředí. To může mít epigenetický dopad na zárodečnou linii a podpořit rozvoj nemocí i u následujících generací. Během období vývoje se v přirozené populaci jak samčí, tak samičí pohlaví může setkat s jednotlivci ovlivněnými těmito látkami.

Ve studii na potkanech se zkoumal způsob, jak tento fungicid působí na potomky obou pohlaví. Cílem výzkumu bylo zjistit, jak VIN působí během embryonálního vývoje gonád. Výsledky ukázaly změny v samčí zárodečné linii, které mají negativní dopad na reprodukci a vyvolaly rozvoj transgeneračních chorob u dospělých jedinců. Tyto choroby zahrnují poškození prostaty, abnormality u varlat, nemoce ledvin a vývoj tumorů. Tyto epigenetické transgenerační nemoci nám poskytují jedinečný pohled, ze kterého můžeme vyčíst počátky dědičných chorob u dospělých ve vztahu k rozvoji rakoviny (Skinner and Anway, 2007).

V obdobné studii na potkanech způsobil tento ED abnormality u samčí pohlavní soustavy jako zmenšení reprodukčních orgánů, hypospadii, nesestouplá varlata a zmenšení popř. i vymizení přídatných žláz (Hellwig et al., 2000; Gray et al., 2001). Jeho antiandrogenní vlastnosti mohou být jednou z příčin lidského syndromu dysgenese varlat tzv. testicular dysgenesis syndrom (TDS).

Dále byl studován vliv VIN na embrya u potkanů. Ukázalo se, že tento ED způsobuje choroby u první (F1) generace a také zapříčinil u dospělých zvířat z F1 generace a u všech následujících zkoumaných generací (F1-F4) rozvoj chorob nebo alespoň tkáňových nepravidelností. Mezi tyto nemoce patří onemocnění prostaty, ledvin, abnormality u varlat, u imunitního systému, rozvoj nádorů, ale také rozvoj kardiovaskulárních nemocí a krevních abnormalit jako např. hypercholesteremie. Tento výzkum prokázal, že na základě výzkumu endokrinních disruptorů, které způsobují transgenerační nemoci nebo abnormality byly objeveny molekulární podstaty těchto chorob (Anway et al., 2006).

Ve studii na CD1 myších byl pozorován vliv VINu na expresi vybraných genů varlat a proteinů spermií. Tímto ED byly vyvolány poškození reprodukčních parametrů u

myší během období puberty. Jako markery genové exprese ve varlatech byla použita skupina genů související s k akrosomem (preproacrosin, protein dinasu A ukotvující protein 110), androgenním receptorem (androgenní receptor, heat shock protein 70-2, APG-1, FK506 vazebný protein 5, gonadotropinem-regulovaná RNA helikasa varlat), ubiquitinem (ubiquitin aktivující enzym E1, ubiquitin konjugující enzym E2, ubiquitin lipasa E3) a apoptosou (p53, p21). Počet ovlivněných spermií a jejich stav byl počítán a hodnocen pomocí monoklonálních protilátek proti intra-akrosomálním proteinům, heat shock proteinu 70 a ubiquitinu. K rozlišení zda-li jde o poškozené či živé buňky (detekce apoptosy) byl použit TUNEL a anexin V. Vinklozolin působil velmi intenzivně na změnu v expresi vybraných genů. Dále došlo ke snížení značení intra akrosomálních proteinů. Po působení tohoto ED došlo k poškození akrosomu hlavně na úrovni proteinů. Při podávání VINu v období pohlavní diferenciaci a hlavně během puberty zapříčiní tato látka dramatické změny exprese genů i proteinů (Elzeinova et al., 2008).

Vinklozolin negativně působí i na domácí zvířata. Např. u psů, způsobil viditelné změny ve váze u samic i samců (u ledvin došlo k poklesu v jejich váze a ke zvýšení koncentrace tukových kapének v distálních tubulech) (Keith et al., 1997).

2 CÍL PRÁCE

2.1 DETEKCE REPRODUKČNÍCH PARAMETRŮ A KVALITY SPERMIÍ PO PŮSOBENÍ VYBRANÝCH EDs

2.1.1 *In vitro*

Cílem mé práce bylo zjistit, zda vybrané endokrinní disruptory (EDs) mají vliv na reprodukční parametry spermií. Moje práce se díky dvěma experimentálními modelům (savčí, rybí), na kterých byl zkoumán vliv vybraných EDs, dělí na dvě části: A) pokusy na praseti divokém (*Sus scrofa*), B) pokusy na okounu říčním (*Perca fluviatilis L.*).

- A) Na kančím modelu byl testován vliv vybraných EDs (ZEN, DEHP, VIN) na průběh kapacitace, akrosomální reakce *in vitro* a změny v detekci a lokalizaci vybraných proteinů. Experimenty se uskutečnily v Laboratoři diagnostiky pro reprodukční medicínu na Biotechnologickém ústavu AVČR, v. v. i. v Praze.
- B) Na rybím modelu byl zkoumán vliv vybraného ED (BPA) na motilitu a rychlost pohybu rybích spermií. Pokusy se uskutečnily v Laboratoři fyziologie reprodukce na Jihočeské univerzitě, Fakultě rybářství a ochrany vod ve Vodňanech.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 CHEMIKÁLIE

Aceton ACR.2	Penta, Chrudim, Česká republika Laboratoř diagnostiky pro reprodukční medicínu Biotechnologický ústav AVČR, v. v. i., Praha, Česká republika Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
Acrylamid mix	
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG	Invitrogen, Praha, Česká republika
Bisfenol A	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
Bromfenolová modř (BFB)	Lachema, Brno, Česká republika
Ca - ionofor	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
Cystein	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
Di(2-ethylhexyl) ftalát	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
Dihydrogenfosforečnan sodný(dihydrát)	Lachema, Brno, Česká republika
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
Dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
Ethanol	Penta, Chrudim, Česká republika
Formaldehyd	Lachema, Brno, Česká republika
GAM/Px	Invitrogen, Praha, Česká republika
Gelatin from Cold Water Fish Skin (želatina)	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
Glukosa	Lachema, Brno, Česká republika
Glycerol	Lachema, Brno, Česká republika
Hoechst 33342	Invitrogen, Praha, Česká republika
Hovězí sérový albumin (BSA)	Serva, Heidelberg, Německo
Hydrogen uhličitán sodný	Lachema, Brno, Česká republika
Chlorid draselný	Lachema, Brno, Česká republika
Chlorid sodný	Lachema, Brno, Česká republika
Chlorid vápenatý	Lachema, Brno, Česká republika
Chlortetracyklin (CTC)	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
Kyselina chlorovodíková	Lachema, Neratovice, Česká republika
Merkapthoethanol	Serva, Heidelberg, Německo
Methanol	Penta, Chrudim, Česká republika
N',N',N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg, Německo
Percoll	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Persulfát amonný (APS)	Serva, Heidelberg, Německo
Precision Plus Protein Standard All Blue	Biorad, Praha, Česká republika
Precision Plus Protein Standard Dual color	Biorad, Praha, Česká republika
P-tyr	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
Pyruvát sodný	Serva, Heidelberg, Německo
Simply Blue Safestain	Invitrogen, Praha, Česká republika
SuperSignal	Pierce, Rockford, USA
SWaM-FITC	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
Tris (hydroxymethyl) aminometan (TRIS)	Serva, Heidelberg, Německo
Tween 20	Serva, Heidelberg, Německo
Ustalovač s náplní, Kodak gbx chemikálie	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Vectashield H-1000 (4', 6'-diamidino-2-phenylindol dilaktát)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vectashield H-1000 s DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindol dilaktát)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vinklozolin	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
Vývojka s náplní, Kodak gbx chemikálie	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
Zearalenone	Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

3.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Experimentální zvířata

A) Kančí model: spermie byly získány od kanců prasete divokého (*Sus scrofa*) od dodavatele Proagro Nymburk a.s. z inseminační stanice v Nové Vsi. K experimentům bylo použito sperma od různých kanců. Sperma (dávky po 50 ml) bylo před zpracováním uchováno v lednici (1-4°C) a tmě. Před i během experimentu byla kontrolována kvalita spermií (bez morfologických defektů, dobré motility). Nemotilní popř. jinak poškozené spermie nebyly do pokusů začleněny. K pokusům byly použity kančí spermie díky jejich dobré dostupnosti, dobré plodnosti, poměrně lehké manipulovatelnosti, délce uskladnění (1-5 dní v ochranném médiu SUS při 1-4°C), vysoké koncentraci v jedné dávce a odolnosti k prostředí. Kančí spermie jsou poměrně velké (50-60 µm) a mají oválnou hlavičku o délce

7-10 μm a šířce 4-5 μm . Experimenty se uskutečnily v Biotechnologickém ústavu AVČR, v.v. i. v Praze v Laboratoři diagnostiky pro reprodukční medicínu.

Rybí model: spermie byly získány od 5 pohlavně zralých (stáří 2-3 roky) mlíčáků okouna říčního (*Perca fluviatilis L.*). Samci byli měřeni a váženi (délka těla: 205-230 mm a hmotnost: 110-162 g). Experiment se uskutečnil v reprodukčním období okouna říčního v druhé polovině března 2009. Před odběrem spermatu byli okouni narkotizováni hřebíčkovým olejem (33 mg/l). Spermie byly uvolněny z varlat jemnou břišní masáží vedenou od přední části ke genitální papile (otvoru). Spermie byly odebrány jednorázovými plastovými stříkačkami o objemu 5 ml. Odebrané vzorky musely být čisté bez jakékoliv kontaminace (voda, moč, krev, sliz). Vzorky byly během experimentu uchovány na ledu (0°C) a zpracovány v průběhu 24h. Při tomto jednorázovém výtěru bylo získáno 1-3 ml spermatu od každého samce s optimální koncentrací 54,3-68,59 x 10⁹ sp/ml a osmotickou koncentrací 300-306 mOsmol/kg. Experimenty se uskutečnily na Jihočeské univerzitě, Fakultě Rybářství a ochrany vod, v Laboratoři fyziologie reprodukce ve Vodňanech. K pokusům byly použity spermie okouna říčního díky jeho extrémní plodnosti, jednoduché manipulovatelnosti při zpracovávání a vysoké citlivosti spermií na kvalitu aktivačních médií a s tím související krátkou dobou pohybu, vysokou rychlostí, specifickou trajektorií a vysokou frekvencí pohybu bičíku. Okouní spermie jsou velice malé. Hlavička má délku 1,5 μm a bičík 25-30 μm s redukovanou střední částí. Jejich pohyb je časově velmi krátký (15-20s) s rychlostí pohybu 200 $\mu\text{m/s}$ a závisí na iontové úrovni aktivačního média či vody (Linhart, 2004)

3.3 MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY

Monoklonální protilátky slouží jako nástroje pro charakterizaci vybraných proteinů, stejně jako k charakterizaci neznámého proteinu a zjištění jeho funkce v buňce. Monoklonální protilátky proti intra-akrosomálním proteinům se využívají pro zjištění stavu akrosomu, jeho stupně poškození a pro hodnocení stavu spermií.

V mých pokusech byly použity monoklonální protilátky zakoupené od společností Sigma a Invitrogen nebo připravené na Oddělení diagnostiky pro reprodukční medicínu Biotechnologického ústavu AV ČR, v.v.i., Praha. Protilátky byly připravené proti kančím spermiím. Byla použita monoklonální protilátka proti kančímu akrosinu ACR.2. (Peknicova a Moos, 1990), která značí spermie v oblasti akrosomu a proteiny o atomové hmotnosti 50 – 55 kDa a fosfotyrosínová protilátka P-tyr (Sigma, Praha) značící

fosforylované proteiny savčích spermií v akrosomální i post akrosomální oblasti a proteiny o atomové hmotnosti 28 kDa a 30–34 kDa.

3.4 VYBRANÉ ENDOKRINNÍ DISRUPTORY

V experimentech byl sledován vliv vybraných EDs na morfologii spermií, jak ovlivňují průběh kapacitace, zda-li podporují nebo naopak brzdí akrosomální reakci a jaký mají dopad na reprodukci. Použité endokrinní disruptory (DEHP, ZEN, BPA a VIN) byly dodány společností Sigma-Aldrich, Praha, ČR. U BPA byl zkoumán jeho vliv na motilitu spermií a na jejich rychlost pohybu.

3.5 METODY

A) SAVČÍ MODEL

3.5.1 Kapacitace *in vitro*

3.5.1.1 Příprava spermií

Nejprve byla pomocí stolního mikroskopu (MEOPTA 263689, ČR) při zvětšení 100x zkontrolována motilita obdržených kančích spermií. Po posouzení standardní motility byly ejakulované spermie centrifugovány (200g; 15 min; RT), aby se oddělily od semenné plasmy, ve které byly uchovány. Semenná plasma nebyla k dalším experimentům použita. Peleta se spermiemi byla 2x promyta v 20-30 ml TBS (1x koncentrovaného) o RT (centrifugace 200g; 10 min; RT; Tab. 1.). Opět byla zkontrolována motilita spermií.

Pro výběr kvalitních spermií byla použita selekční metoda - promývání přes Percollový gradient. Ze zásobního 100% Percollu a TBM (10x a 1x konc.; Tab. 1 a 2) byl postupně připraven 90; 80; 70; 55 a 40% Percoll (Tab. 3). Percollový gradient byl postupně po kapkách navrstven do plastové zkumavky v následujícím pořadí: 80% - 2 ml; 70% - 2,5 ml; 55% - 2,5 ml a 40% - 2 ml. Suspenze promytých spermií v TBS (cca 2 ml) byla opatrně po kapkách navrstvena na Percollový gradient a centrifugována (200g; 1 h; RT). Po ukončení centrifugace byl odsán gradient nad 80%, tzv. byly odstraněny spermie, které neprošly do 80% Percollu a nepatřily k nejkvalitnějším spermiím. Spermie z 80% Percollu (nejkvalitnější – určeny pro kapacitaci *in vitro*) byly 2x promyty v 10 – 20ml TBM (1x konc.) o RT (200g; 10 min; RT). Po druhém promytí byla peleta resuspendována ve známém objemu (cca 5 – 10 ml) 1x konc. TBM + BSA (1 mg/ml).

Tab. 1: Složení TBS pufu 10x koncentrovaného.

Složka	Množství [mM]	Množství [g, ml]
Chlorid sodný	130	3,405
TRIS	20	1,210
dH ₂ O	-	500

[†]Pozn. 10x koncentrovaný roztok TBS byl uskladněn při +4°C. Pro kapacitaci *in vitro* byl použit 1x koncentrovaný roztok TBS. 10x koncentrovaný roztok TBS byl 10x naředěn dH₂O na výslednou koncentraci 1x a pH upraveno na 7,4.

Tab. 2: Složení TBM pufu 10x koncentrovaného.

Složka	Množství [mM]	Množství [g, ml]
Chlorid sodný	113,1	6,61
Chlorid draselný	3,0	0,2236
Chlorid vápenatý	10,0	1,11
TRIS	20,0	2,422
Glukosa	11,0	2,18
Pyruvát	5,0	0,55
dH ₂ O	-	100 ⁺

[†]Pozn. K přípravě 10x koncentrovaného roztoku TBM bylo příslušné množství složek doplněno do 100 ml dH₂O a pH upraveno na 7,7. 10x konc. TBM byl uskladněn při +4°C. Pro přípravu 1x konc. TBM byl pouze 10x konc. TBM naředěn dH₂O na 1x konc.

Tab. 3: Příprava Percollového gradientu.

Výsledná koncentrace Percollu [%]	Množství přidávaného Percollu [ml]	Přidávaný Percoll [%]	Množství TBM [ml]
90	16,20	100	1,8 ⁺
80	8,88	90	1,12
70	3,88	90	1,12
55	3,06	90	1,94
40	2,50	80	2,5

[†]Pozn. K přípravě 90% Percollu byl použit 10x konc. TBM. K přípravě zbývajících koncentrací Percollu (80%; 70%; 55% a 40%) byl použit 1x konc. TBM.

3.5.1.2 Zpracování spermií před a během kapacity *in vitro*

Resuspendované spermie v TBM + BSA byly naředěny na koncentraci $2,5 - 5 \times 10^7$ spermie/ml. Koncentrace byla počítána pomocí Bürkerovy komůrky. Do Bürkerovy komůrky (speciální podložní sklo s mřížkou) bylo odebráno 10 μ l 100x ředěné suspenze spermií v TBM + BSA a byl spočítán počet spermií ve 3 řádcích po 10 políčkách. Po zjištění celkového počtu spermií byly spermie naředěny na optimální koncentraci pro nepřímou imunofluorescenci, pro průtokovou cytometrii a chlortetracyklinovou (CTC) metodu - $2,5 - 5 \times 10^7$ spermie/ml. Poté byla suspenze optimálně naředěných spermií rozpipetována po 1 ml do 2 ml zkumavek s kulatým dnem s označeným časem kapacity a ovlivněním. Spermie byly ovlivněny rozpouštěcím médiem (ethanol - 20 μ g/l a 10 μ g/l) a příslušnými EDs (ZEN 20 μ g/l a 40 μ g/l; DEHP 20 μ g/l, 40 μ g/l a VIN 10 μ g/l a 20 μ g/l). Příslušné koncentrace ED byly zvoleny na základě *in vivo* pokusů na myších, které probíhají v Laboratoři diagnostiky pro reprodukční medicínu. Kontrolní vzorky sloužily pro vyloučení nespecifických reakcí. Neovlivněné spermie (bez ED i ethanolu) byly negativními kontrolami (NK). Spermie byly inkubovány při 37°C v 5% CO₂. Celkový čas kapacity byl 4h. Kapacitace byla hodnocena v časech 0, 120 a 210min. Po 210 min bylo do zbylých příslušných zkumavek přidáno 20 μ l 10 mM Ca-ionoformu a inkubováno (30 min; 37°C; 5% CO₂). Úkolem Ca-ionoformu je zastavit kapacitaci a vyvolat akrosomální reakci. Po 5 min inkubace bylo zkontrolováno, zda se spermie přestaly pohybovat.

V jednotlivých odebíraných časech kapacity byly spermie zpracovány na preparáty pro SDS extrakci, nepřímou imunofluorescenci, průtokovou cytometrii a CTC metodu.

3.5.1.3 SDS extrakce

SDS (dodecylsírán sodný) extrakty byly připraveny 2x konc. vzorkovým SDS pufrem (Tab. 4.). Z každé zkumavky (příslušný čas kapacity a ovlivnění) bylo do nové zkumavky odebráno cca 200 μ l suspenze spermií a centrifugováno (200g; 7 min; RT). Peleta spermií byla resuspendována v příslušném množství extrakčního pufru (100 μ l/ 10^6 spermií) a suspenze byla povařena (4 min; 100°C). Poté byla suspenze opět centrifugována (23 100g; 5 min; 4°C). Supernatant byl odebrán a rozpipetován po 50 μ l. Aliquoty s SDS extrakty i zbylé peletky byly zamraženy v -20°C a použity k dalšímu zpracování.

Tab. 4: Složení 2x koncentrovaného SDS pufru.

Složka	Množství [ml]
Glycerol	20
10% SDS	40
TRIS 1M; pH 6,8	16

3.5.1.4 Příprava preparátu pro nepřímou imunofluorescenci

Pro nepřímou imunofluorescenci byly zhotoveny preparáty spermií (příslušný čas kapacitace a ovlivnění) na podložním skle, tak že 10 μ l optimálně nareděných spermií v PBS bylo kápnuto na podložní sklo a rozetřeno. Po zaschnutí (RT) byla skla uschována při 4°C. Složení PBS (fosfátem tlumený fyziologický roztok (Tab. 5).

Tab. 5: Složení 10x konc.PBS⁺.

Složka	Množství [g, l]
NaCl	175, 4
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	55,2
dH ₂ O	2,0

⁺Pozn. V pokusech byl použit 1x konc. PBS 10x konc. PBS byl naředěn na 1x konc. a pH upraveno na 7,4.

3.5.1.5 Příprava preparátu pro průtokovou cytometrii

Pro přípravu preparátů pro průtokovou cytometrii je důležité spermie odebrané v daném čase kapacitace ihned zfixovat, aby v kapacitačním médiu neproběhla předčasná akrosomální reakce.

V čase odběru kapacitace byly spermie stočeny od kapacitačního média (200g; 10 min; RT). Po centrifugaci bylo odsáto kapacitační médium a spermie byly 2x fixovány fixačním médiem (viz níže). Do zkumavky s peletkou spermií bylo přidáno 800 μ l fixačního média. Nejprve byly spermie fixovány 100% methanolem - fixace 30 min při -20°C. Po doběhnutí fixace byly spermie centrifugovány (200g; 10 min; 4°C) a přidáno druhé fixační médium (800 μ l). Fixace: 15 min methanol + aceton (ředění 1:1) při -20°C.

Po ukončení druhé fixace byly spermie stočeny od fixačního média (200g; 10 min; 4°C) a 2x promyty v PBS (200g; 10 min; 4°C). K promytým spermiím bylo přidáno 180 μ l PBS a byly uschovány při 4°C pro pozdější zpracování. Tímto způsobem bylo

postupováno se všemi vzorky spermií v daném čase kapacitace. Ke každému času kapacitace i ovlivnění byly zpracovávány i kontrolní vzorky.

3.5.2 Průtoková cytometrie

Další metodou použitou k vyhodnocení kapacitace *in vitro* a míry ovlivnění příslušnými ED v průběhu kapacitace byla průtoková cytometrie. Oproti nepřímé imunofluorescenci, která je do jisté míry subjektivní metodou je průtoková cytometrie metoda objektivní a hodnotí procento kapacitovaných spermií.

K připraveným preparátům (zkumavky se spermiemi) na průtokovou cytometrii (viz. 3.5.1.5.) byly k zjištění detekce vybraných proteinů přidány protilátky. Negativní kontrola byla bez přidané protilátky. Tímto způsobem byl testován akrosin pomocí monoklonální protilátky (ACR.2). do připravených suspenzí spermií byla přidána protilátka (ředění 1000x v PBS). Inkubace probíhala přes noc na třepačce při 4°C. Následující den byly vzorky se spermiemi rozpipetovány po 100 µl do dvou 96 - jamkových destiček s kónickými dny a centrifugovány (200g; 10 min; 4°C). Po stočení bylo odstraněno inkubační médium a spermie byly 2x promyty ve vychlazeném PBS (200g; 10 min; 4°C). K promytým spermiím byla přidána sekundární protilátka, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG protilátka (ředění 1000x v PBS, Invitrogen, Praha, Česká republika) a směs byla inkubována ve tmě (1 h; 37°C). Po inkubaci byly spermie opět promyty 2x ve vychlazeném PBS (200g; 10 min; 4°C). Po druhém promytí bylo ke každé peletě spermií přidáno 100 µl PBS a spermie v PBS byly přeneseny do 96-jamkové destičky s kulatými dny. Před měřením byl ke vzorkům přidán Hoechst 33342 (Invitrogen, Praha, ČR), který označil fluorescenčně jádra buněk pro lepší detekci buněk pomocí průtokového cytometru.

Preparáty byly vyhodnoceny pomocí průtokového cytometru BD LSR II (BD, Beton Drive Franklin Lakes, NJ, USA) se čtyřmi excitačními dráhami - 405, 488, 561 a 633nm v kanálu pro FITC. Pro měření emise FITC byla použita 488nm excitace a detekce probíhala pomocí filtru 530/40. Hoechst 33342, kterým byl měřen obsah DNA, byl detekován na základě excitace 405 a emise 450/50 nm. Analýza byla vyhodnocena pomocí softwaru FlowJo 7.5.4. (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). Rozdíly mezi kontrolními a experimentálními vzorky byly porovnány a vyhodnoceny pomocí aritmetického průměru intenzity fluorescenčního záření v kanálu pro FITC.

3.5.3 Nepřímá imunofluorescence s monoklonálními protilátkami

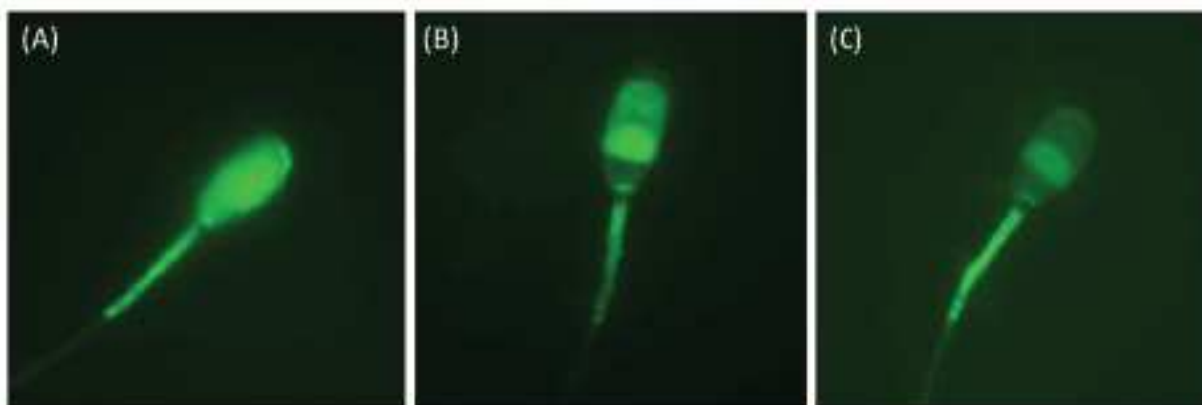
U připravených preparátů na IF byly nejprve označeny diamantovou tužkou místa se spermii a fixovány. Fixace: 10 min aceton (100%) při RT. Poté byla skla s fixovanými kančími spermii 3x důkladně propláchnuta v PBS a 1x v dH₂O. Po opláchnutí byla sklíčka vyskládána na vlhkou komoru a pro zamezení smíchání protilátek byl mezi vyznačená místa s fixovanými spermii nalepen proužek lepenky. Bylo nanášeno 30 µl primární protilátky a současně byla prováděna (u každého času kapacitace i ovlivnění) negativní kontrola bez primární protilátky. Jako primární protilátky byly použity: ACR.2 (ředění 1:1 v PBS, připravena v laboratoři), P-tyr (fosfotyrosinová protilátka; ředěna 400x, Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Jako negativní kontrola byl použit PBS bez monoklonální protilátky. Inkubace (1 h; 37°C) probíhala ve vlhké komůrce. Po inkubaci byla skla 3x opláchnuta v PBS a 1x v dH₂O. Po odmytí primární protilátky byla na skla nanášena sekundární protilátka SWaM-FITC konjugovaná s anti- mouse IgG protilátkou (30 µl, ředěna 1:64 v PBS). Po inkubaci (1 h; 37°C) a promytí (PBS a H₂O) byly preparáty fixovány ve Vectashieldu (montovací médium) s DAPI (Vector Lab., Burlingame, CA).

Preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu (NIKON ECLIPSE E 400, Japonsko) při zvětšení 600x (PLAN APO VC OIL, NIKON) a 400x (PLAN APO FLUOR, NIKON). Hodnotilo se 100 spermií v zorném poli, značení spermií bylo rozděleno do tří kategorií. Kategorie: A) nekapacitované spermie – mírná fluorescence v akrosomální oblasti, neporušený akrosom; B) kapacitované – intenzivní fluorescenční záření v akrosomální oblasti, neporušený akrosom; C) spermie po akrosomální reakci - slabý nebo žádný fluorescenční signál v hlavičce spermie s pozitivním ekvatorialním segmentem. K fotografování a ukládání obrázků byla použita VDS 1300 CCD kamera (Vosskuhler, Německo) a systém pro obrazovou analýzu NIS – ELEMETS AR verze 3.10 (Laboratory Imaging, Ltd., ČR, Praha).

3.5.4 Chlortetracyklinová analýza

Chlortetracyklinová (CTC) fluorescenční analýza byla další metodou pro vyhodnocení funkčního stavu spermií během i po kapacitaci *in vitro*. Jednotlivé vzorky byly hodnoceny ihned a v jednotlivých časech kapacitace (0, 120, 210 min a po Ca-

ionoforu). Ze suspenze kapacitovaných spermií bylo odebráno 45 μ l a napipetováno do malé zkumavky obalené v alobalu pro zamezení průniku světla. K 45 μ l suspenzi spermií bylo přidáno 45 μ l CTC roztoku (složení Tab. 6), resuspendováno a inkubováno 30 min při RT. Po inkubaci byly buňky fixovány fixačním roztokem (12,5% formaldehyd v 0,5 M Tris-HCl, složení Tab. 7). Poté bylo nanášeno 10 μ l suspenze spermií na podložní sklo. Pro zpomalení slábnutí fluorescence byla ke kapce suspenze spermií přidána 1 kapka Vectashieldu (montovací médium) bez DAPI (Vector Lab., Burlingame, CA). Suspenze spermií s Vectashieldem byla překryta krycím sklíčkem, odsáta přebytečná tekutina a zalakována bezbarvým lakem pro zamezení vysychání a změny kvality preparátu, které bylo podpořeno uložením preparátu ve vlhké komůrce ve tmě. Jednotlivé preparáty byly vyhodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu v oblasti fialového světla o vlnové délce 405 nm (NIKON ECLIPSE E 400, Japonsko) při zvětšení 400x (PLAN APO FLUOR, NIKON). Obrázky byly fotografovány a uloženy pomocí VDS 1300 CCD kamery (Vosskühler, Německo) a systému pro obrazovou analýzu NIS – ELEMETS AR verze 3.10 (Laboratory Imaging, Ltd., ČR, Praha). Spermie byly hodnoceny podle intenzity a lokalizace fluorescenčního záření v hlavičkách a rozděleny do tří kategorií. Kategorie: A) nekapacitované, akrosom intaktní buňky – jasná fluorescence po celé hlavičce spermie, pozitivní střední část bičíku; B) kapacitované, akrosom intaktní spermie – pozitivní fluorescence v ekvatoriálním segmentu hlavičky a ve střední části bičíku; C) kapacitované a akrosom zreagované buňky – slabá nebo žádná fluorescence na hlavičce spermie se zbývajícím pozitivním fluorescenčním signálem v ekvatoriální oblasti hlavičky a střední části bičíku, viz. Obr. 16. Spermie s nespecifickým fluorescenčním signálem nebyly do analýzy počítány.



Obr. 16: Ukázka hodnocených kategorií CTC metodou. A) nekapacitované spermie; B) kapacitované spermie; C) spermie po akrosomální reakci (Ded et al., 2010).

Tab. 6: Složení CTC roztoku⁺.

Složka	Množství [mM]	Množství na 50 ml CTC roztoku
CTC	0,75	17,9 mg
NaCl	130	380 mg
Cystein	5	30 mg
Tris	20	120 mg
HCl	20	80 µl
dH ₂ O	-	50 ml

⁺ Pozn. CTC roztok uchován ve tmě při 4°C, pH 7,8.

Tab. 7: Složení 100x konc. fixačního roztoku – 12,5% formaldehydu v 0,5 M Tris-HCl⁺.

Složka	Množství
12,5% formaldehyd	200 µg
Tris	848 mg
38% HCl	560 µl
dH ₂ O	14 ml (doplnit do tohoto objemu)

⁺ Pozn. V pokusech byl použit 1x konc. roztok – ředěno 1:99, pH 7,4.

3.5.5 Jednorozměrná elektroforéza (SDS PAGE)

Pro separaci proteinů podle jejich molekulové hmotnosti byla použita metoda jednorozměrné elektroforézy. Na jednorozměrnou elektroforézu byl připraven Tris/Glycin SDS - polyakrylamidový 12% separační gel a 3% zaostřovací gel, složení viz. Tab. 8 a 9.

Byla sestavena skla na vertikální elektroforézu a upevněna do stojánku. Nejprve byl nalit spodní separační gel (cca do 5,7 cm od horního okraje skla). Po zpolymerování byl mezi skla elektroforézy vložen 15 - jamkový hřeben a navrstven zaostřovací gel. Po zpolymerování zaostřovacího gelu byl vyndán hřebínek a skla seskládána do vany na elektroforézu. Elektroforéza byla zalita 1x konc. elektrodoým pufrem (60,6 g TRIS; 288 g glycin; 20 g SDS; dH₂O do 2l).

Mezitím byly připraveny vzorky, tj. extrakty spermií z kapacitace *in vitro* se vzorkovým SDS pufrem (viz. 3.5.1.3.) určené k separaci jejich proteinů. U jednotlivých vzorků byla změřena koncentrace buněk pomocí fluorometru Qubit (Invitrogen, Praha, Česká republika) a naředěna na koncentraci 10 µg na jamku pomocí 2x konc. vzorkového

SDS pufru barveného do modra (s BFB) a obsahující 5% merkaptoethanol. Vzorky byly během práce neustále drženy na ledu. Po naředění byly vzorky na 4 min povařeny na termobloku a centrifugovány (23100g; 5 min; 4°C). Poté byly vzorky opatrně nanášeny na gel (10 µl/jamku) společně se srovnávacími standardy molekulových hmotností (7 µl/jamku). Jako srovnávací standardy byly použity Precision Plus Protein Standard Dual color a All Blue (Biorad, ČR). Standardy sloužily nejen k rozeznání molekulové hmotnosti zkoumaného proteinu, ale i k označení začátku popř. konce gelu. Elektroforéza probíhala za nastavených podmínek konstantního proudu 16 mA/gel při měnícím se napětí 80 – 200 V a času 1,5h. Čas se upravoval v závislosti na rychlosti separace proteinů ve vzorcích.

Tab. 8: Příprava 12% separačního gelu na celkový objem 15 ml

Složka	Množství [ml]
dH ₂ O	2
30% Acrylamide mix	6
1,5 M Tris (pH 8.8)	3,8
10% SDS	0,15
10% APS	0,15
TEMED	0,006

Tab. 9: Příprava 3% zaostřovacího gelu na celkový objem 5 ml

Složka	Množství [ml]
dH ₂ O	3,4
30% Acrylamide mix	0,83
1,0 M Tris (pH 6.8)	0,63
10% SDS	0,05
10% APS	0,05
TEMED	0,005

3.5.6 Příčný přenos proteinů na membránu (Western blotting)

Po doběhnutí elektroforézy byla rozebrána skla elektroforézy a gely se separovanými proteiny byly ekvilibrovány v blotovacím pufru (72 g glycin; 15 g TRIS; 1 l CH₃OH; do 5l dH₂O). Gely byly přeneseny do vany s blotovacím pufrem na mřížku s předem připravenými a navlhčenými 3 vrstvami chromatografického papíru (Whatmann

3 mm Chr; Whatmann, USA) a jednou PVDF membránou (předem navlhčená v methanolu) (Immobilon, Millipore, USA). Na membránu byly tužkou vyznačeny okraje gelů. Gely byly překryty 3 vrstvami chromatografického papíru. Elektroforetický přenos probíhal v blotovacím pufru v přístroji Biorad (500 mA, 2h při 4°C). Za tuto dobu se proteiny příčně přenesly z gelu na membránu.

3.5.7 Vizualizace proteinů barvením

Gely po elektroforéze (popř. i po příčném přenosu proteinů na membránu pro ověření, zda se všechny proteiny přenesly na membránu) byly 2x po 10 min promyty v dH₂O na třepačce. Poté byly ponořeny do barvicího roztoku Simply Blue Safestain (Invitrogen) a barvily se na na třepačce na 1h při RT. Po nabarvení byly gely odbarvovány 2x 10 min v dH₂O na třepačce, aby došlo k odmytí pozadí a zviditelnění proteinů. Po odbarvení byly gely ponořeny do sušícího roztoku (50 ml glycerol; 400 ml etanol; dH₂O do 550 ml) na cca 10 min. Do sušícího roztoku byly přidány dvě vrstvy celofánu/gel (pro zvlhčení) a poté byl gel mezi těmito vrstvami celofánu vysušen a uschován.

3.5.8 Imunodetekce proteinů pomocí monoklonálních protilátek

Po příčném přenosu proteinů na membrány byly gely obarveny (viz. 3.5.6) a membrány s přenesenými proteiny byly promyty v roztoku PBS s Tween (PBS/TW, příprava: do 2l 1x konc. PBS o pH 7,4 1 ml Tweenu). Po promytí byly membrány inkubovány v blokačním pufru (PBS/TW + 3% želatina) cca 15 ml na membránu na třepačce 2 h při RT. Po inkubaci byly membrány promývány 6x 10 min v PBS/TW. Poté byla na danou membránu nanese zvolená primární protilátka naředěná v PBS/TW + 1% želatina a inkubováno přes noc na třepačce při 4°C. S primárními protilátkami probíhala současně negativní kontrola (jen PBS/TW + 1% želatina). Jako primární protilátky byly testovány ACR.2 (ředěna 5000x) a P-tyr (ředěna 4000x). Následující den po navázání monoklonálních protilátek byly membrány opakovaně promyty v PBS/TW (6x 10 min).

Poté byla aplikována sekundární protilátka GAM/Px (Invitrogen, 3000x ředěná v PBS/TW + 1% želatina) a inkubována (1 h; RT). Po ukončení inkubace byly membrány opakovaně promyty od sekundární protilátky (6x 10 min). Vyvolání navázaných protilátek byla provedena pomocí kitu SuperSignal (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, USA), který obsahuje substrát pro peroxidasu. Kit byl nanesen na membránu (4 ml/membránu) umístěné v kazetě. Po nanesení byla kazeta uzavřena a kit

se nechal působit 3 min. Chemiluminescenční signál byl vyvolán dvěma způsoby – 1) na RTG filmech X/OMAT LS (Eastman Kodak Copany, Usa) v temné komoře, 2) pomocí 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB).

První metodou byl film vložen do kazety pro přenos signálu na film. Délka expozice se upravovala podle síly signálu (15 s, 1 min, 3 min). Poté byl film vyvolán – ponořen na 1 min do vývojky, poté 1 min do 3% kyseliny octové pro opláchnutí filmu od vývojky a nakonec na 1 min do ustalovače pro ustálení navázaného signálu.

Druhou metodou bylo na membránu nanášeno cca 1 ml TMB, který vyvolal navázané protilátky. Reakce byla zastavena ponořením membrány do dH_2O . Pomocí vyvolaných navázaných protilátek byla určena atomová hmotnost zkoumaných proteinů. Intenzita signálu byla vyhodnocena pomocí počítačového programu AIDA (2D Densitometry).

B) RYBÍ MODEL

3.5.9 Zpracování spermií

Po odběru spermií bylo sperma okouna 2x ředěno pro snížení vysoké koncentrace spermií a pro synchronizaci jejich motility. Nejprve bylo sperma předředěno v imobilizačním roztoku (IR) (180 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 1,36 mM CaCl₂; 2,38 mM NaHCO₃; dH₂O; pH 8,0; osmolalita 340 mOsmol/kg). Sperma bylo předředěno v IR v poměru 1:50 (spermie:IR) a uchováno na ledu při 0°C. IR neaktivoval pohyb spermií, ale jeho úkolem bylo sperma inkubovat a dosáhnout ideální koncentrace pro následné hodnocení pohybu spermií (maximálně 100 pozorovaných spermií na monitoru).

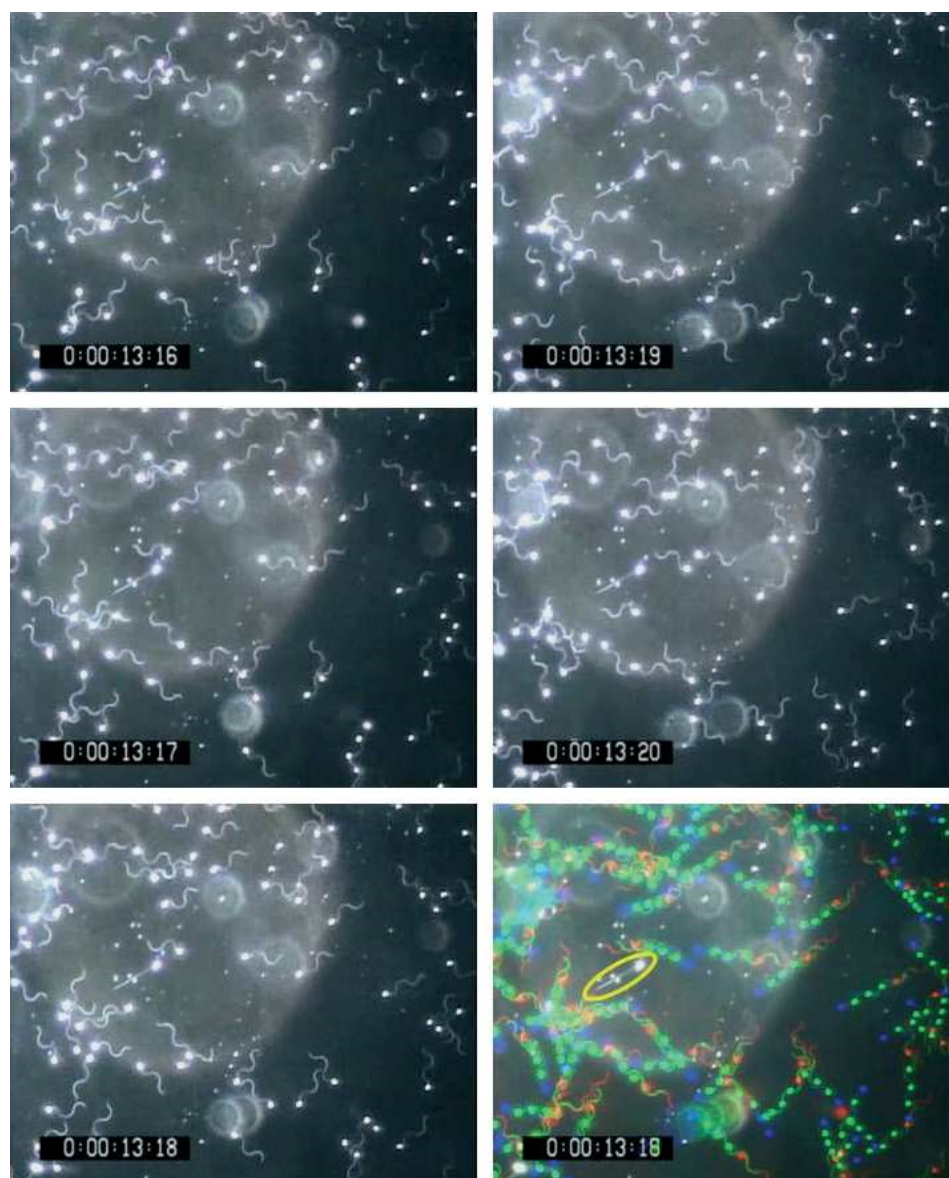
Předředěné sperma v IR o objemu 0,25 µl bylo napipetováno do 50 µl AM a tím i aktivováno aktivačním médiem (AM) (50 mM NaCl; 20 mM TRIS; pH 8,5; osmolalita 110 mOsmol/kg) v poměru 1:50 (spermie:AM). Aktivace spermií probíhala ihned na podložním skle na desce mikroskopu po přidání AM a pohyblivost spermií byla později ze záznamu hodnocena po 15, 30, 60, 45, 60 a 90s po aktivaci. K testování účinku BPA byl BPA nejprve rozpuštěn v 20 mM dimethylsulfoxidu (DMSO) a následně přidán do AM. Testované koncentrace BPA byly 2; 1,5; 1,25; 1,0; 0,5; 0,25 a 0,12 mM. Jako kontrola bylo použito 20 mM DMSO bez přídavku BPA. Aby se zabránilo adhesi spermií na podložní sklo, bylo před aktivací spermií přidáno do AM 0,1% bovine serum albumin (BSA, Serva). Předběžná pozorování dokázala, že BSA nijak neovlivňuje motilitu spermií u rozdílných koncentrací BPA.

3.5.10 Hodnocení procenta pohyblivých spermií

Pohyb spermií byl pozorován v otevřené kapce (bez krycího skla) pomocí mikroskopu (Olympus BX 50, Japonsko) se suchým kondenzorem, tmavým polem a objektivem Planochromát 20x, doplněný o stroboskopickou lampu s frekvencí blikajícího světla na úrovni 50 Hz. Poté byl pohyb přenášen kamerou 3 CCD video kamerou (SONY DXC-970MD, Japonsko) a zaznamenáván na video (SONY DVO-1000 MD, Japonsko) a to od 10 s po aktivaci pohybu spermií. Pohyb se vyhodnocoval počítačovou analýzou obrazu (Olympus Micro Image verze 4.0.1. pro Windows od Olympusu, ČR). Základem pro měření rychlosti bylo vždy 5 snímků ze záznamu s časovým odstupem 0,12s (25 snímků/s). Snímky byly postupně a uměle obarveny a to v pořadí: 1. snímek červeně, 2., 3. a 4. zeleně a 5. snímek modře. Bílé body se objevily u nepohyblivých spermií a to z efektu

RGB (vzájemným poskládáním barev červených, zelených a modrých bodů) viz Obr. 17. Rychlost pohybu spermií byla vyhodnocena na základě času a délky trajektorie pořízených snímků, tzn. měřila se vzdálenost pozice hlavičky spermie (vzdálenost mezi červenými a modrými body).

Procento pohyblivých spermií bylo vyhodnoceno počítáním červených bodů (pohyblivé spermie) a bílých bodů (nepohyblivé spermie). Procento pohyblivých spermií bylo hodnoceno u každého samce třikrát a rychlost pohybu u 50-60 spermií od každého samce.



Obr. 17: Obrázek je složen ze šesti snímků ukazující pohyb spermií okouna říčního. Černobílé obrázky jsou identifikovány časem – 13 s po aktivaci se snímky 16,17,18,19,20 (viz. údaje v černém poli). Poslední barevný snímek je složen z předchozích pěti obrázků a

to po umělém obarvení v pořadí: 1. snímek červeně, 2., 3. a 4. zeleně a 5. snímek modře. Bílé body se objevily u nepohyblivých spermií a to z efektu RGB (vzájemným poskládáním barev červených, zelených a modrých bodů, viz. v žlutém kroužku). Rychlost pohybu spermií byla vyhodnocena na základě času a délky trajektorie pořízených snímků, tzn. měřila se vzdálenost pozice hlavičky spermie (vzálenost mezi červenými a modrými body) na základě času potřebného pro zdolání této vzdálenosti. Procento pohyblivých spermií bylo vyhodnoceno počítáním červených bodů (pohyblivé spermie) a bílých bodů (nepohyblivé spermie) (Hatef et al., 2010).

3.5.11 Vliv BPA na procento pohyblivých spermií a jejich rychlost

BPA rozpuštěný v 20 mM DMSO byl napipetován do AM s následující finální koncentrací BPA 0; 0,12; 0,25; 0,5; 1,0; 1,25; 1,5 a 2,0 mM. Následně bylo přidáno 0,25 μ l naředěného spermatu v IR. Pohyb spermií byl okamžitě zaznamenán na video. Následně bylo ze záznamu analyzováno procento pohyblivých spermií a rychlost pohybu spermií v μ m/s. Analýzy se prováděly v identických časech a to vždy 15, 30, 45, 60 a 90 s od aktivace spermií. Jako kontrola bylo použito sperma v IR a aktivované v AM bez ED.

4 VÝSLEDKY

A) SAVČÍ MODEL

4.1 ZPRACOVÁNÍ SPERMIÍ

Kančí spermie se standardní motilitou byly promyty v 1x konc. TBS médiu. Selektce nejpohyblivějších spermií byla provedena centrifugací přes Percollový gradient. Nejvyšší spermie byly promyty v 1x konc. TBM médiu a naředěny na optimální koncentraci $2,5 - 5 \times 10^7$ spermie/ml. Takto připravené spermie byly použity na experiment kapacity *in vitro*.

4.2 KAPACITACE *IN VITRO*

Kapacitace *in vitro* probíhala při 37°C v 5% CO₂. Celkový čas kapacity byl 4h. Kapacitace byla hodnocena v časech 0, 120 a 210min a po přidání Ca-ionoformu, který vyvolal akrosomální reakci. V každém experimentu byly kapacitovány 3 druhy spermií: A) kontrolní vzorky (K) pro vyloučení nespecifických reakcí (bez přidání ethanolu nebo ED); B) vzorky ovlivněné rozpouštěcím médiem (médiem s ethanolom, M) a C) spermie ovlivněné příslušným ED. Do média byl přidán ethanol, protože zkoumané EDs (ZEN, DEHP, VIN) se v tomto médiu rozpouštějí. Koncentrace média s přidáním ethanolom byla při každém experimentu zvolena shodně s koncentrací příslušného ED, aby bylo možné porovnat rozdíly v efektu M a ED. Zkoumané ED byly zvoleny na základě *in vivo* pokusů na myších, které probíhají v Laboratoři diagnostiky pro reprodukční medicínu (BTÚ). V *in vivo* pokusech byly testovány EDs o koncentracích: ZEN – 20 µg/l; DEHP – 20 µg/l; VIN – 10 µg/l. Na základě těchto koncentrací byly zvoleny koncentrace EDs pro kapacitace *in vitro*. Byly použity koncentrace shodné s koncentracemi v *in vivo* pokusech a koncentrace dvakrát vyšší. Testované koncentrace v *in vitro* pokusech: ZEN – 20 µg/l a 40 µg/l; DEHP – 20 µg/l a 40 µg/l a VIN 10 µg/l a 20 µg/l. Nižší koncentrace byla testována u ZENU (10 µg/l). Při vyhodnocování se neukázaly rozdíly oproti koncentraci 20 µg/l, proto nebyly nižší koncentrace do výsledků zahrnuty a ani dále testovány. Každý experiment s příslušným ED byl opakován 2x – 5x.

Kapacitace *in vitro* byla vyhodnocena průtokovou cytometrií, nepřímou imunofluorescencí, chlortetracyklinovou analýzou, jednorozměrnou elektroforézou a imunodetekcí proteinů pomocí monoklonálních protilátek.

4.3 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Průtoková cytometrie byla hlavní relativně objektivní metodou pro vyhodnocení průběhu kapacitace, pro zdokumentování rozdílů mezi jednotlivými EDs, kterými byly spermie ovlivněny a pro zjištění míry jakou EDs ovlivnily průběh kapacitace. Tuto metodu doplňovaly nepřímá imunofluorescence a imunodetekce.

Vzorky pro průtokovou cytometrii byly zpracovány ihned po ukončení kapacitace *in vitro* (v časech 0; 120; 210 min a po přidání Ca – ionoforu (Ion). V každém čase byly připraveny kontrolní vzorky (K), s ethanolem (M) a s příslušným ED (ZEN, DEHP a VIN). EDs spolu s M byly testovány v koncentracích shodnými s *in vivo* a v koncentracích 2x vyšších, viz 4.2. Od každého času i ovlivnění bylo provedeno 8 opakování.

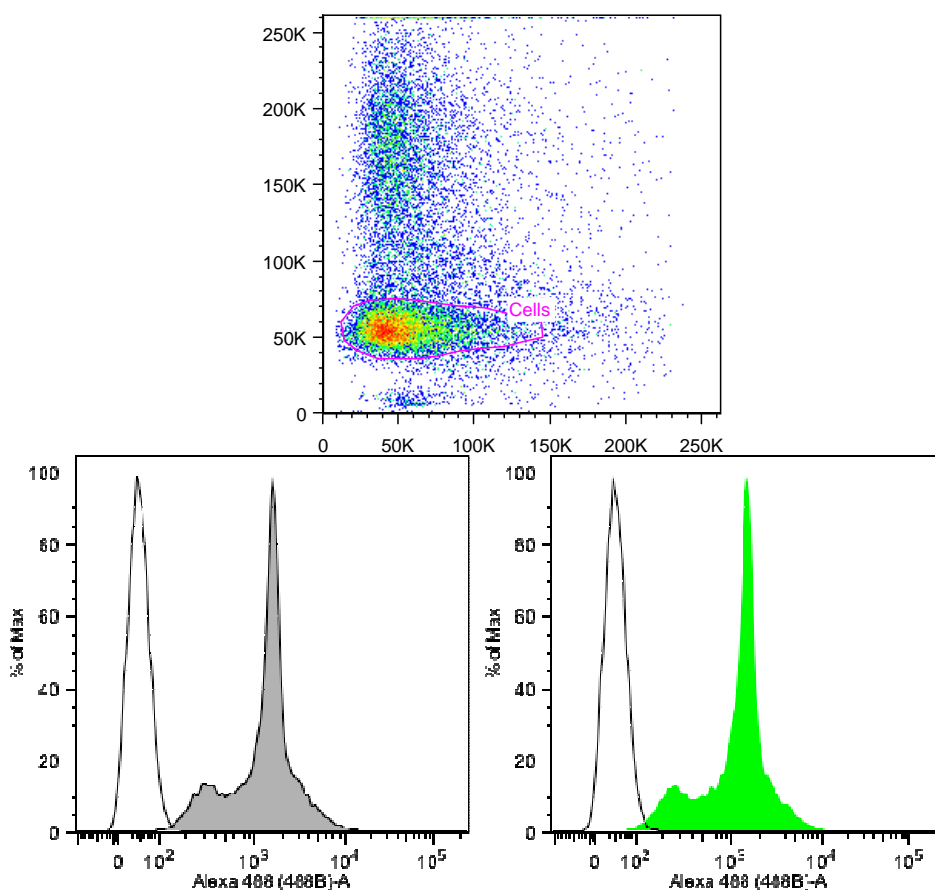
Jako optimální fixace spermií po kapacitaci *in vitro* byla zvolena fixace dvojitá (100% methanol - fixace 30 min při -20°C, methanol + aceton (ředění 1:1) – fixace 15 min při -20°C). Ke fixovaným vzorkům byla pro detekci relativní intenzity záření jednotlivých vzorků použita monoklonální protilátka ACR.2.

Analýza byla provedena pomocí průtokového cytometru BD LSR II (BD, Beton Drive Franklin Lakes, NJ, USA) s excitační vlnovou délkou laseru 488 nm, emisními filtry 530/40 a měření intenzity fluorescence v kanálu pro FITC. Analýza byla vyhodnocena pomocí softwaru FlowJo 7.5.4. (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). Rozdíly mezi kontrolními a experimentálními vzorky byly porovnány a vyhodnoceny pomocí aritmetického průměru a směrodatné odchylky intenzity fluorescenčního záření v kanálu pro FITC.

Výsledky byly hodnoceny v programu ANOVA, STATISTICA 7.0. Post hoc a analýza byla provedena pomocí testu Newman-Keuls. Srovnání bylo provedeno na různých hladinách významnosti: *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001. Výsledky počtu kapacitovaných spermií u kontrolních a ovlivněných skupin v časech 120, 210 min a po AR (po přidání Ca–ionoforu) spolu s hladinami významnosti jsou zaznamenány do tabulky níže (Tab. 10.) Vzájemné porovnání počtu kapacitovaných spermií (aritmetický průměr počtu spermií se směrodatnými odchylkami měření) ovlivněných různými koncentracemi EDs a jejich kontrolních vzorků spolu s hladinami významnosti jsou ukázány v časech 120

min a po AR a jsou zaznamenány do tabulky, viz. Tab. 11. Výsledky jsou vyneseny do sloupcových grafů níže (Obr. 19 a 20). Čas 0 min byl při vyhodnocování použit jako kovariát pro ostatní časy.

Vyhodnocování v programu FlowJo 7.5.4. (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA) je ukázáno na Obr. 18.

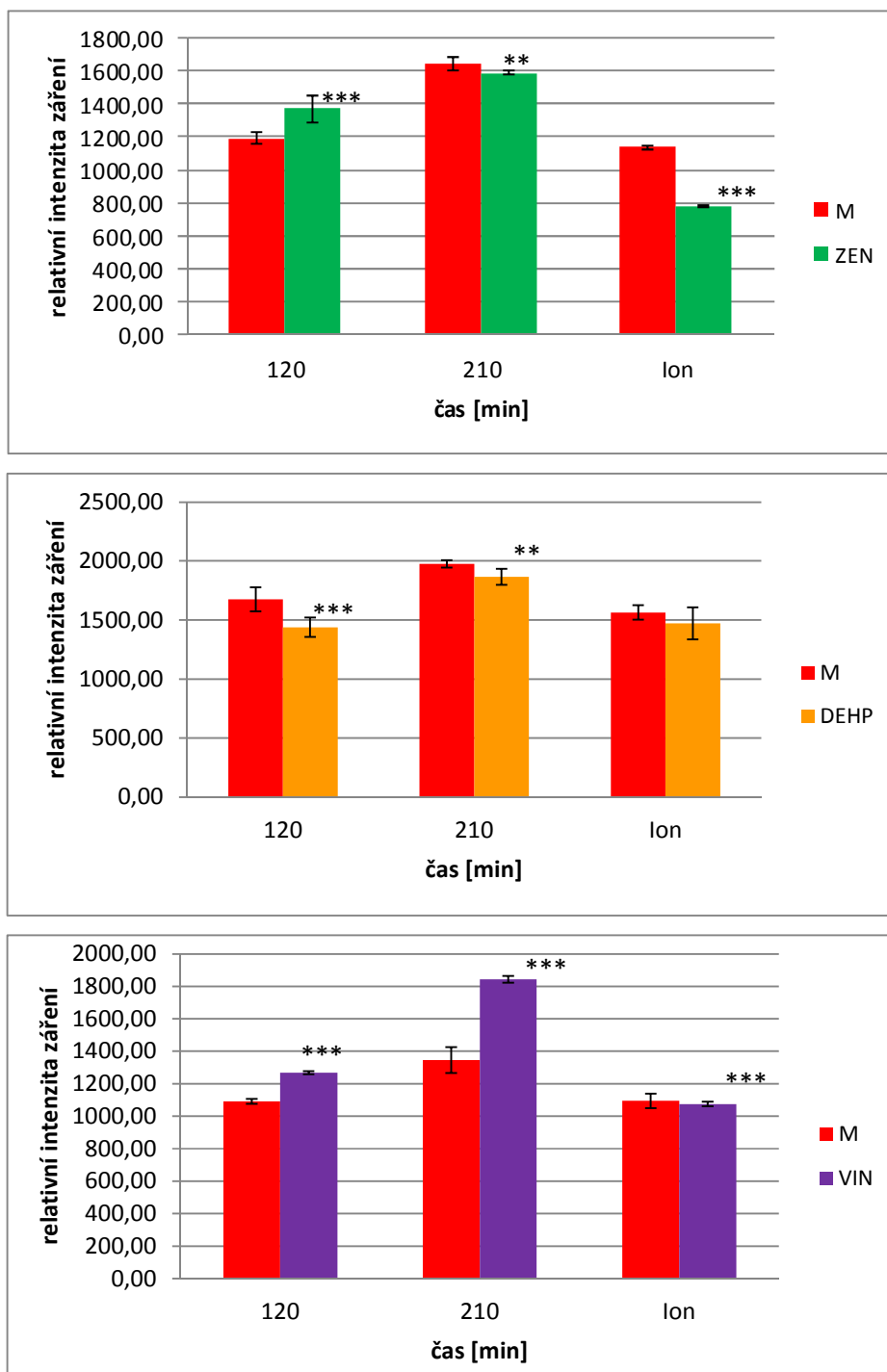


Obr. 18: Vyhodnocování průtokové cytometrie v programu FlowJo 7.5.4.

Na prvním obrázku je znázorněn výběr haploidních buněk (označené) vyznačujících se fluorescenčním zářením pomocí ACR.2 v kanálu pro FITC. Tento výběr byl použit pro vyhodnocování. Pro zlepšení intenzity záření buňek a snazší určení spermií byl přidán Hoechst, který měří obsah DNA v buňkách. Další obrázky reprezentují histogramy sledující závislosti počtu buněk na relativní intenzitě záření v kanálu pro FITC. Pomocí histogramů bylo možné sledovat nárůst/pokles fluorescenčního záření v průběhu kapacitace a srovnat rozdíly změn fluorescenčního záření mezi kontrolními (šedé) experimentálními (zelené) vzorky a kontrolními vzorky pro fluorescenci (bez ACR.2, bílé). Nárůst fluorescenčního záření odpovídal průběhu kapacitace. K poklesu fluorescenčního záření došlo až po akrosomální reakci.

Tab. 10: Vliv endokrinních disruptorů (ZEN, DEHP, VIN) během kapacitace v časech 120, 210 min a po indukci AR Ca- ionoforem (Ion) na savčí spermie. Analýza byla provedena pomocí aritmetického průměru a směrodatné odchylky relativní intenzity fluorescenčního záření. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí ANOVA testu na různých hladinách významnosti : *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

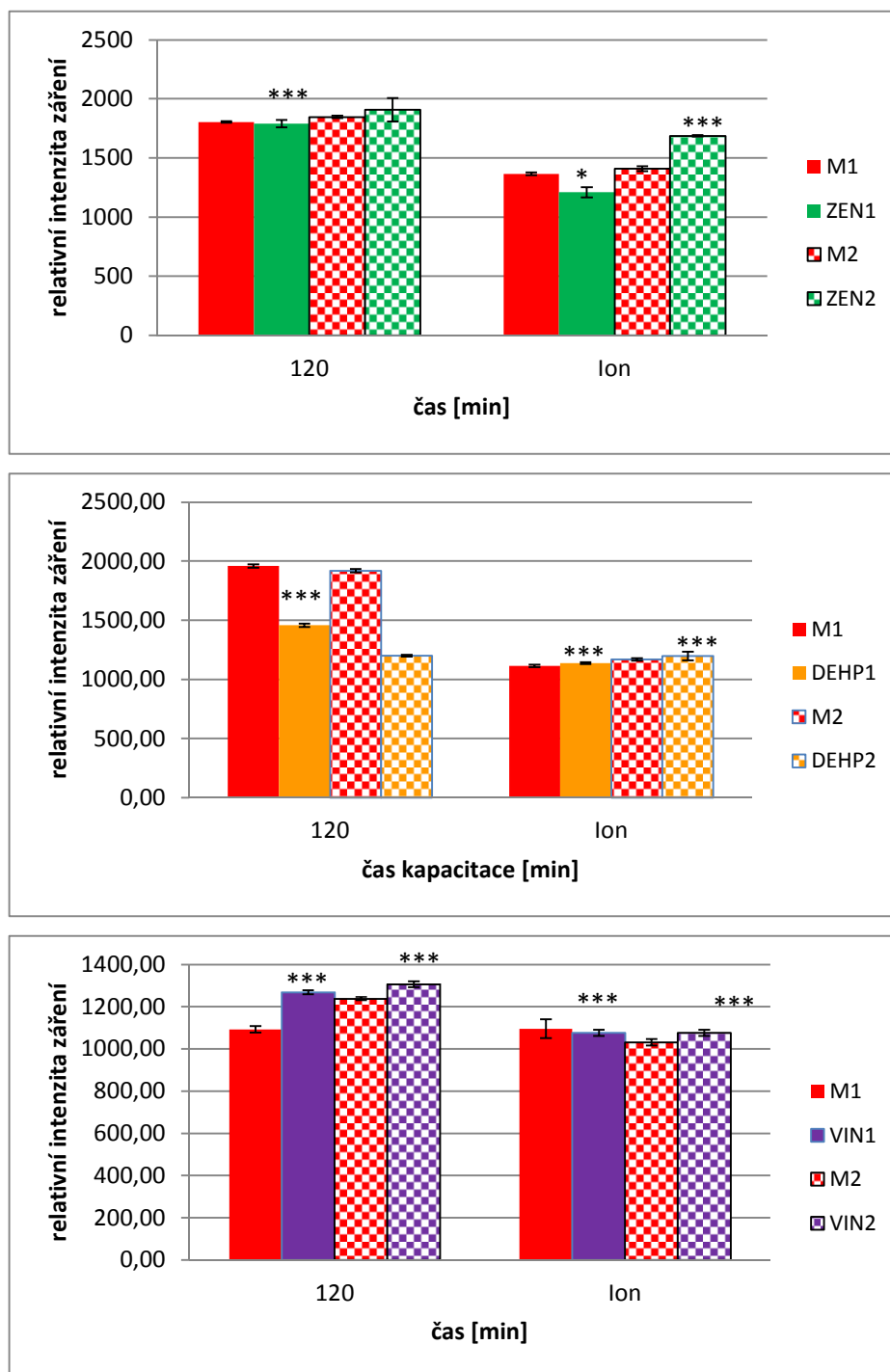
	120	210	Ion
M	1192,38 ± 34,33	1640,63 ± 40,97	1136,38 ± 10,97
ZEN	1371,88 ± 81,51***	1590,5 ± 14,39**	777,5 ± 9,8***
M	1676 ± 101,35	1974,38 ± 30,68	1563,63 ± 61,22
DEHP	1439,5 ± 82,57***	1865,13 ± 68,5**	1471,75 ± 135,45
M	1092 ± 14,92	1345 ± 79,58	1095 ± 44,73
VIN	1268 ± 9,49***	1844,38 ± 21,09***	1075,38 ± 14,66***



Obr. 19: Vliv endokrinních disruptorů, ZEN (první graf), DEHP (druhý graf) a VIN (třetí graf) na savčí spermie během kapacitace (120, 210 min.) a po přidání Ca-inoforu (Ion). M - kontrola bez ED. Sloupcové grafy, vyjadřující závislost relativní intenzity záření na času kapacitace, jsou vyneseny společně se směrodatnou odchylkou měření a hladinou významnosti.

Tab. 11: Vliv dvou koncentrací endokrinních disruptorů společně s kontrolními vzorky M (ZEN1, M1 – 20 µg/l; ZEN2, M2 - 40 µg/l; DEHP1, M1 – 20 µg/l; DEHP2, M2 - 40 µg/l, VIN1; M1 - 10 µg/l a VIN2; M2 - 20 µg/l) na savčí spermie v 120 minutách kapacitace a po přidání Ca-ionoforu. Analýza byla provedena pomocí aritmetického průměru a směrodatné odchylky relativní intenzity fluorescenčního záření. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí ANOVA testu na různých hladinách významnosti : *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001

	120	Ion
M1	1804,25 ± 6,96	1365,63 ± 11,69
ZEN1	1790,5 ± 30,6	1210,63 ± 42,56***
M2	1846,5 ± 10,37	1409,63 ± 19,65
ZEN2	1907,63 ± 98,35*	1687,25 ± 7,55***
M1	1958,13 ± 14,54	1115 ± 10,02
DEHP1	1458,13 ± 14,79***	1138,88 ± 6,79
M2	1920,1 ± 14,2	1170,21 ± 11,18
DEHP2	1201,38 ± 8***	1198,75 ± 36,91***
M1	1092 ± 14,92	1195 ± 44,73
VIN1	1268 ± 9,49***	1075,38 ± 14,66***
M2	1238,38 ± 8,28	1230,25 ± 15,34
VIN2	1306,63 ± 13,77***	1075,38 ± 14,66***



Obr. 20: Vliv dvou koncentrací endokrinních disruptorů, ZEN (první graf), DEHP (druhý graf) a VIN (třetí graf) na savčí spermie ve 120 min kapacitace a po přidání Ca-inoforu (Ion). M1 a M2 (dvě koncentrace shodné s koncentracemi ED) kontroly bez ED. Sloupcové grafy, vyjadřující závislost relativní intenzity záření na času kapacitace, jsou vyneseny společně se směrodatnou odchylkou měření a hladinou významnosti.

Všechny EDs měly statistický významný vliv (měřeny intenzitou záření) na savčí spermie ve srovnání s kontrolou a to i v nižších koncentracích (DEHP = 20 µg/l, ZEN = 20 µg/l a VIN = 10 µg/l). Nejvýznamnější statistické rozdíly mezi kontrolními a experimentálními skupinami u všech časů kapacitace s hodnotou $P < 0,001$ byly vyhodnoceny u VIN.

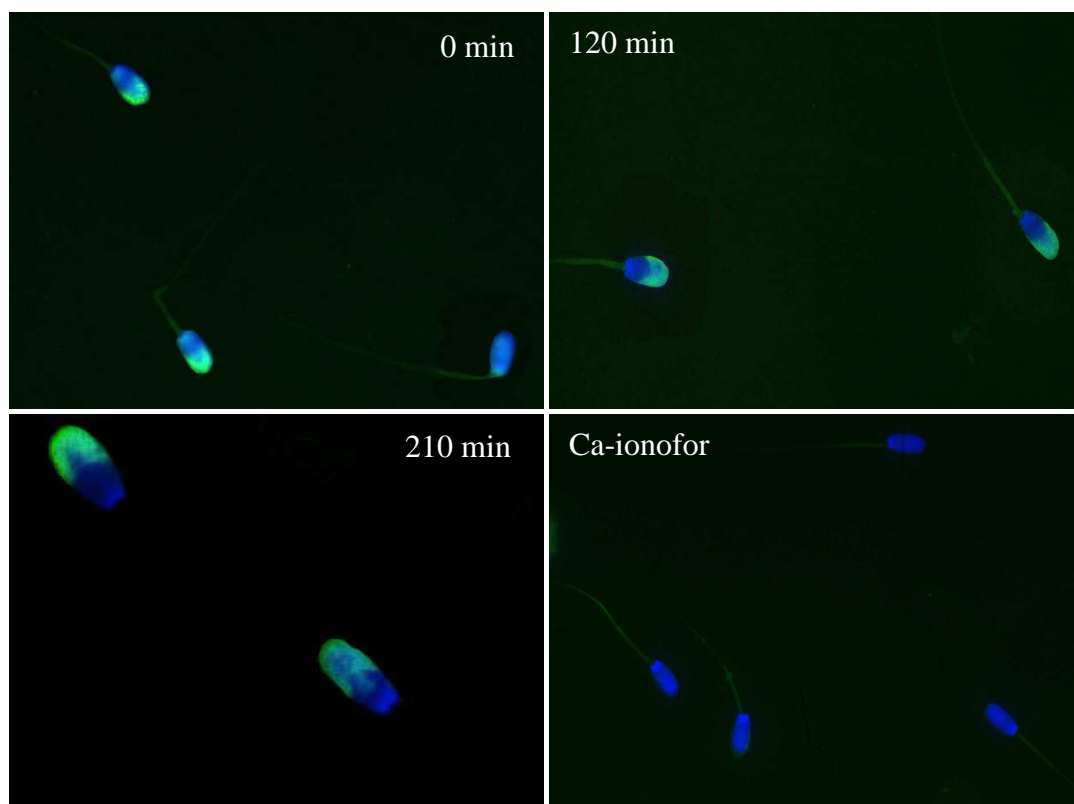
4.4 NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE S MONOKLONÁLNÍMI PROTILÁTKAMI PROTI KANČÍM PROTEINŮM NA KANČÍCH SPERMIÍCH

Preparáty s kančími spermii (viz 3.5.1.4) byly fixovány acetonem (10 min; RT). Acetonová fixace byla optimální pro značení testovaných protilátek, proto nebyla použita jiná fixace.

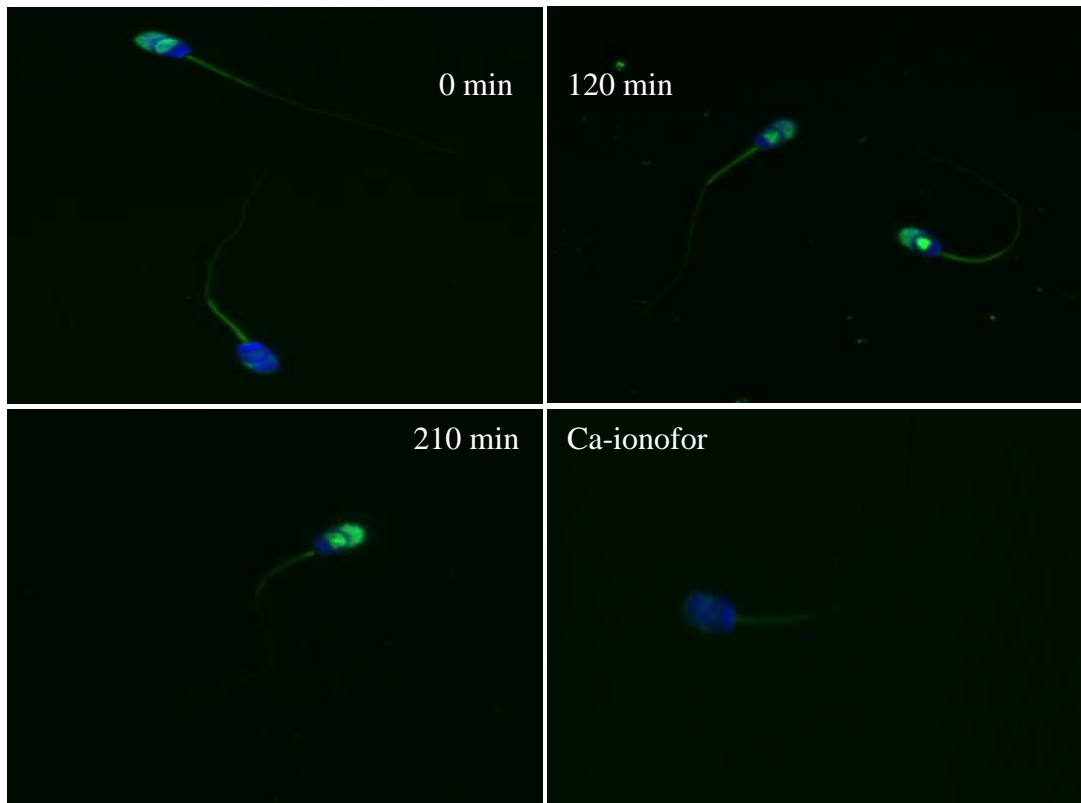
Pro účely sledování změn, které probíhají během kapacitace *in vitro* v hlavičce spermie, byly použity dvě monoklonální protilátky – ACR.2 a P-tyr. U obou protilátek byl sledován rozdíl v intenzitě značení intra-akrosomálních proteinů a v lokalizaci těchto proteinů v hlavičkách spermii v průběhu kapacitace *in vitro* (hodnocené časy kapacitace *in vitro*: 0; 120; 210 a 240 min (210 min + 30 min Ca-ionofofor). Intenzita značení proteinů v hlavičce spermii byla rozdělena do tří kategorií (viz další kapitoly). Z každého preparátu bylo spočítáno 100 buněk, které byly rozděleny do příslušných kategorií podle intenzity značení a představovaly tak procentuální zastoupení v každé kategorii. Bylo spočítáno 2–6 preparátů od každého času kapacitace

4.4.1 Imunofluorescenční značení spermii pomocí monoklonálních protilátek ACR.2 a P-tyr

Protilátka ACR.2 (proti akrosinu) značí u neporušených spermii z 98% akrosom. Protilátka P-tyr (proti fosfotyrosinu) značí v postakrosomální oblasti typický trojúhelník, bičík byl značený ve 2%. Změny imunofluorescenčního značení akrosinu pomocí ACR.2 a P-tyr byly sledovány ve 4 časech kapacity: čas 0 120,210 min, a po přidání Ca-ionoforu, viz. Obr. 21 a 22.

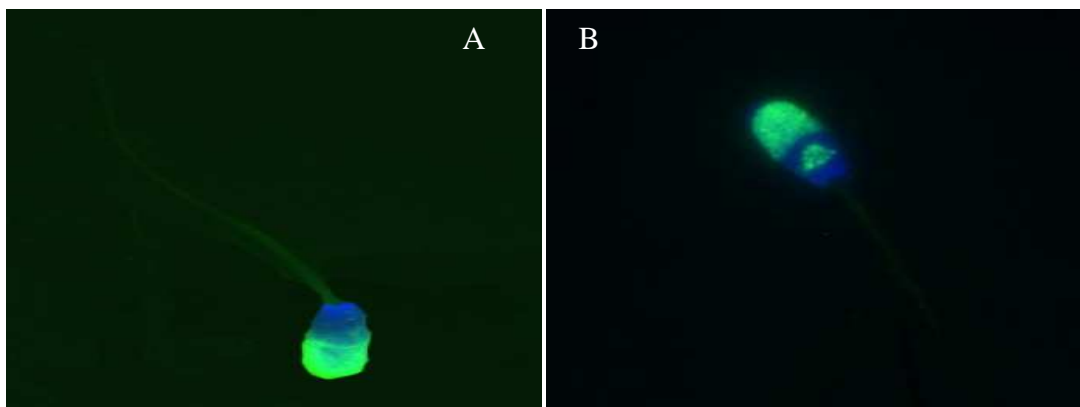


Obr. 21: Imunofluorescenční značení spermii pomocí protilátky proti akrosinu (ACR.2). Čtyři fotografie znázorňující průběh kapacity kančích spermii (čas 0min, 120min, 210 min a po přidání Ca-ionoforu - po akrosomální reakci). Na fotkách je ukázána lokalizace značení ACR.2 na kančích spermích spolu s intenzitou záření v daném čase kapacity.

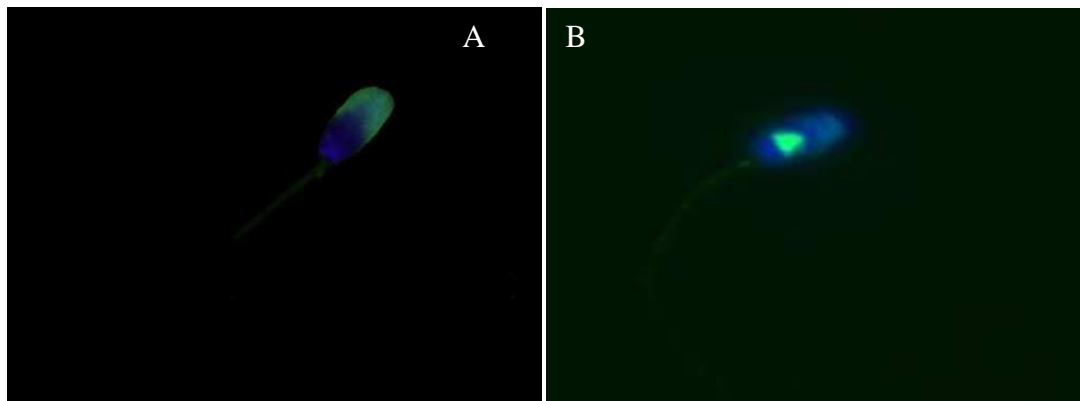


Obr. 22: Imunofluorescenční značení spermií pomocí protilátky proti fosfotyrosinu (P-tyr). Čtyři fotografie ukazující typické značení proteinů kančích spermií pomocí monoklonální protilátky P-tyr v průběhu kapacitace (čas 0min, 120min, 210 min a po přidání Ca – ionoforu - po akrosomální reakci).

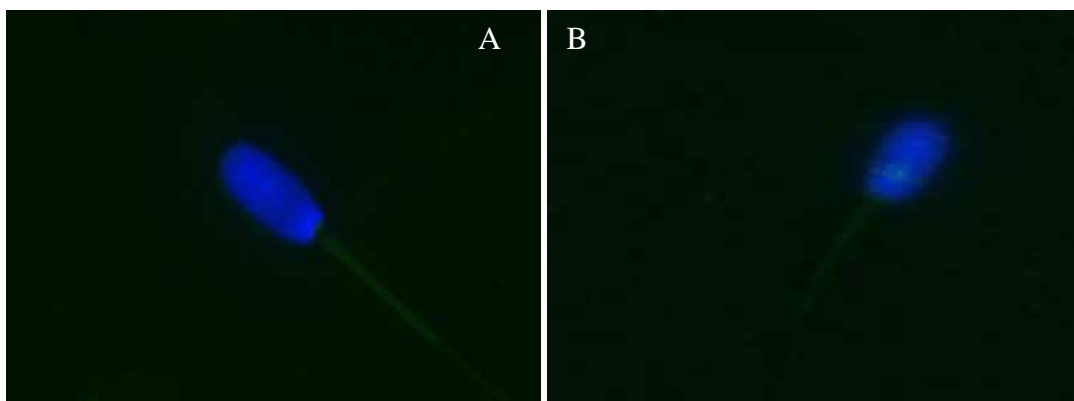
Imunofluorescenční značení proteinů v akrosomu bylo rozděleno do tří kategorií podle intenzity značení proteinů pomocí monoklonálních protilátek Kategorie: A) kapacitované – intenzivní fluorescenční záření v akrosomální oblasti, neporušený akrosom, viz. Obr. 23; B) nekapacitované spermie – mírná fluorescence v akrosomální oblasti viz. Obr. 24; C) spermie po akrosomální reakci - slabý nebo žádný fluorescenční signál v hlavičce spermie, viz. Obr. 25.



Obr. 23: Obrázky pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu ukazují kapacitované spermie (intenzivní fluorescenční záření v akrosomální oblasti). Obrázek A ukazuje spermie, jejichž intra-akrosomální proteiny jsou značené pomocí protilátky proti akrosinu (ACR.2) a obrázek B intra-akrosomální proteiny značené pomocí protilátky proti fosfotyrosinu (P-tyr).



Obr. 24: Obrázky ukazují nekapacitované spermie (mírná fluorescence v akrosomální oblasti) značené pomocí ACR.2 - obrázek A, značené pomocí P-tyr – obrázek B.



Obr. 25: Obrázky ukazující spermie po akrosomální reakci (slabý nebo žádný fluorescenční signál v hlavičce spermie) značené pomocí ACR.2 - obrázek A, značené pomocí P-tyr – obrázek B.

Intenzita značení proteinů v akrosomální části hlavičky spermií se v průběhu kapacitace *in vitro* zvyšovala. Až po přidání Ca-ionoforu došlo k uvolnění obsahu akrosomu (k akrosomální reakci) a intenzita značení proteinů v akrosomu se snížila na minimum. Výsledky imunofluorescenčního značení proteinů pomocí ACR.2 a P-tyr byly vyhodnoceny ve dvou časech kapacitace – v čase 120 min (během kapacitace) a po přidání Ca – ionoforu (po akrosomální reakci), kde jsou rozdíl nejvíce viditelné. Imunofluorescenční značení bylo hodnoceno u kontrolních vzorků (K), po přidání ethanolu do média (M) a po přidání příslušných EDs (ZEN, DEHP, VIN). Procentuální zastoupení buněk ve třech kategoriích a ve dvou časech kapacitace byly shrnuty do tabulek (Tab. 12 a 13)

Tab. 12: Procentuální zastoupení spermií značených ACR.2 v čase 120 min a po přidání Ca-ionoforu. K – kontrola, M – médium, ED – v pořadí první tabulka ZEN, druhá DEHP a třetí VIN; Ion (Ca-ionofor).

	120_K	120_M	120_ZEN	Ion_K	Ion_M	Ion_ZEN
A	52,4	48,3	46,9	26,0	22,9	23,7
B	27,2	32,6	31,9	20,4	24,7	22,9
C	20,4	19,1	21,3	53,6	52,4	53,4

	120_K	120_M	120_DEHP	Ion_K	Ion_M	Ion_DEHP
A	60	54,5	57,33	31	13,5	15
B	11	24	31	20	38	51
C	29	21,5	11,67	49	48,5	34

	120_K	120_M	120_VIN	Ion_K	Ion_M	Ion_VIN
A	65	63	49	19	12	13,5
B	20	18	33,5	10	15,5	19
C	15	19	17,5	71	72,5	67,5

Tab. 13: Procentuální zastoupení spermií značených P-tyr v čase 120 min a po přidání Ca-ionoforu. K – kontrola, M – médium, ED – v pořadí první tabulka ZEN, druhá DEHP a třetí VIN; Ion (Ca – ionofor).

	120_K	120_M	120_Z	Ion_K	Ion_M	Ion_ZEN
A	69,5	43,25	43,25	22,5	19,5	15
B	17,5	37,75	38	39	43,75	47
C	13	19	18,75	38,5	36,75	38

	120_K	120_M	120_DEHP	Ion_K	Ion_M	Ion_DEHP
A	63	61	38	25	26	18
B	30	35	48	15	15	32
C	7	4	14	60	59	50

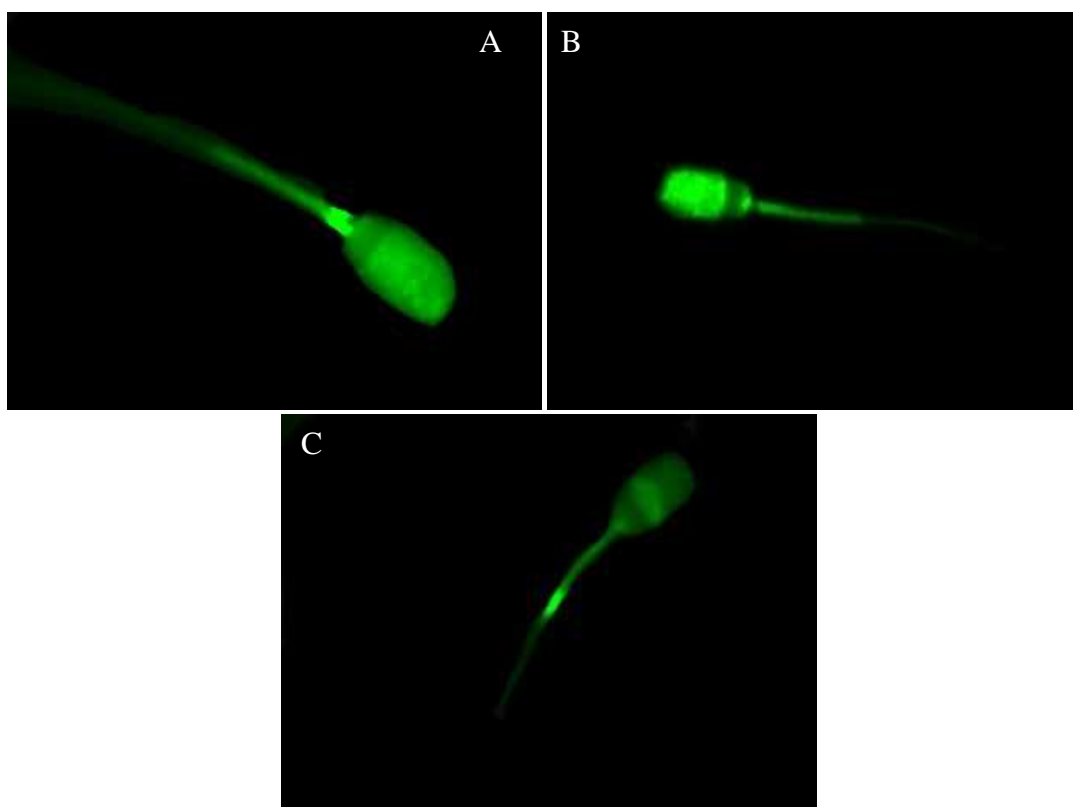
	120_K	120_M	120_VIN	Ion_K	Ion_M	Ion_VIN
A	25	23	24	10	9	9
B	40	39	33	32	33	40
C	35	38	43	58	58	51

Z výsledků procentuálního značení spermií pomocí ACR.2 a P-tyr lze vypožorovat, že v čase 120 min je cca 50% a více spermií kapacitovaných oproti Ca-ionoforu, kde u 50% a více spermií došlo k akrosomální reakci. Při porovnání % spermií po AR mezi kontrolními vzorky (K i M) se vzorky ovlivněnými EDs je viditelné, že endokrinní disruptory DEHP a VIN potlačují AR spermií oproti kontrolním vzorkům. U spermií ovlivněných ZENem a jeho kontrolních vzorků jsou % spermií po AR srovnatelné.

4.5 CHLORTETRACYKLINOVÁ ANALÝZA

Chlortetracyklinová (CTC) fluorescenční analýza byla další metodou pro vyhodnocení funkčního stavu spermií v experimentu kapacity *in vitro*. Funkční stav spermií byl hodnocen ihned v jednotlivých časech kapacity (0, 120, 210 min a po Ca-ionoforu).

Spermie, stejně jako v IF, byly řazeny do tří kategorií podle intenzity a lokalizace fluorescenčního záření v jejich hlavičkách. Z každého času kapacity a ovlivnění bylo spočítáno 100 buněk, které představovaly procentuální zastoupení v jednotlivých kategoriích. Kategorie: A) nekapacitované, akrosom intaktní buňky – jasná fluorescence po celé hlavičce spermie, pozitivní střední část bičíku; B) kapacitované, akrosom intaktní spermie – nefluorescenční pruh v postakrosomální oblasti, pozitivní fluorescence v ekvatoriálním segmentu hlavičky a ve střední části bičíku; C) kapacitované a akrosom zreagované buňky – slabá nebo žádná fluorescence na hlavičce spermie se zbývajícím pozitivním fluorescenčním signálem v ekvatoriální oblasti hlavičky a střední části bičíku viz. Obr. 26.



Obr. 26: Ukázka hodnocených kategorií CTC metodou. A) nekapacitované spermie; B) kapacitované spermie; C) spermie po akrosomální reakci.

Tuto analýzu se mi podařilo zoptimalizovat až u posledního testovaného ED - VINu. U ostatních EDs (ZEN a DEHP) nebyly preparáty hodnotitelné (nízká intenzita záření, vysoký počet spermií kapacitovaných v čase 0 min atd.). Proto jsou výsledky shrnuty v následující tabulce (Tab. 14) jen pro VIN. U spermií ovlivněných VINem byly analyzovány 2 koncentrace – VIN1 = 10 $\mu\text{g/l}$, VIN2 = 20 $\mu\text{g/l}$ společně s kontrolními vzorky, kde jako kontroly byly brány média (médium spermií s přidaným ethanolem) o stejné koncentraci jako VIN (M1 = 10 $\mu\text{g/l}$ a M2 = 20 $\mu\text{g/l}$).

Tab. 14: Procentuální zastoupení spermií v kategoriích A, B, C v časech 120, 210 min a po přidání Ca-ionoforu. M – médium o dané koncentraci (M1 = 10 µg/l a M2 = 20 µg/l), VIN – vinklozolin o dané koncentraci (VIN1 = 10 µg/l, VIN2 = 20 µg/), Ion – Ca – ionofor.

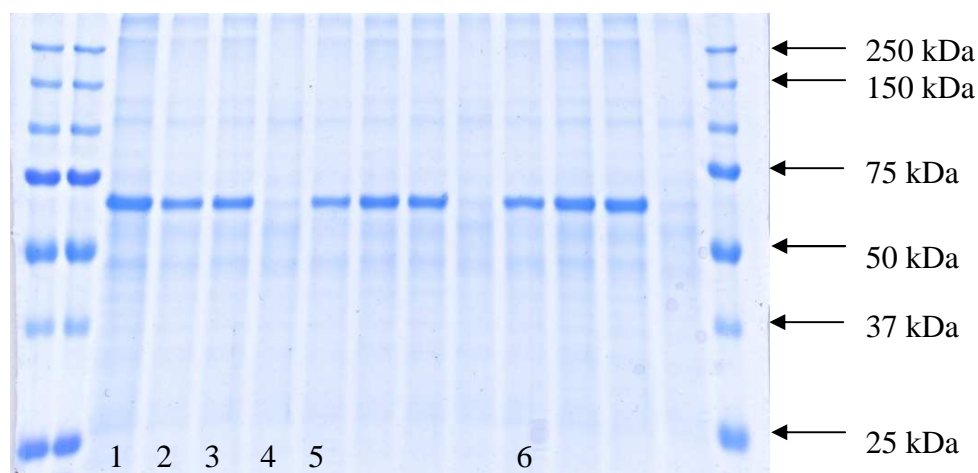
	0_M1	0_VIN1	120_M1	120_VIN1	210_M1	210_VIN1	Ion_M1	Ion_VIN1
A	76	74	67	51	45	56	0	0
B	13	13	24	29	36	32	1	5
C	11	13	9	20	19	12	99	95

	0_M2	0_VIN2	120_M2	120_VIN2	210_M2	210_VIN2	Ion_M2	Ion_VIN2
A	78	74	58	52	54	58	0	0
B	10	13	26	33	29	29	2	5
C	12	13	16	15	17	13	98	95

Z výsledků je vidět % nárůst kapacitovaných spermií v průběhu kapacitace *in vitro*. Po přidání Ca – ionoforu došlo u většiny spermií k AR (kategorie C, Ion_M a Ion_VIN). Rozdíly ve všech kategoriích (A, B, C) mezi koncentracemi VINu a jeho kontrol jsou minimální.

4.6 SDS ELEKTROFORÉZA

Pro separaci proteinů podle jejich molekulové hmotnosti byla použita metoda jednorozměrné elektroforézy. Jednorozměrná elektroforéza byla provedena s SDS extrakty kančích spermií (viz. 3.5.1.3). Všechny vzorky byly v redukcujícím prostředí. Na elektroforézu byly nanášeny kontrolní vzorky bez ED, (K) nebo M (médium s ethanolom) a vzorky po působení příslušného ED. Vzorky (K a M) a experimentální vzorky (ZEN) byly nanášeny podle času kapacitace (0, 120, 210 min a Ca-inofor (Ion). Tímto poskládáním vzorků bylo možné sledovat průběh kapacitace v jednotlivých časech a bylo možné srovnat jednotlivé vzorky mezi sebou. Pro ukázkou molekulových hmotností proteinů byl gel s rozdělenými proteiny obarvenými v barvicím roztoku Simply Blue Safestain (Invitrogen) (viz. Obr. 27).



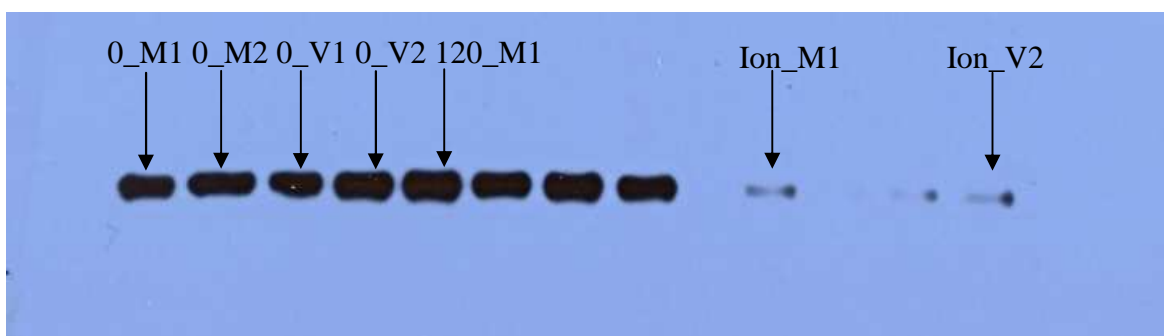
Obr. 27: 1D elektroforéza s SDS vzorky kančích spermií. Vzorky byly nanášeny v pořadí: kontrolní vzorky (K, 4 vzorky), vzorky s rozpouštěcím médiem (M, 4 vzorky) a vzorky s ED (ZEN, 4 vzorky): 1) 0 min_K, 2) 120 min_K, 3) 210 min_K, 4) Ion_K, 5) 0 min_M, 6) 0 min_ZEN

Po rozdělení proteinů proběhly imunodetekce se dvěma monoklonálními protilátkami ACR.2 a P-tyr. Monoklonální protilátka ACR.2 specificky značila v oblasti 50-55 kDa a P-tyr v oblastech 30-34 kDa a 28 kDa (viz. 4.7).

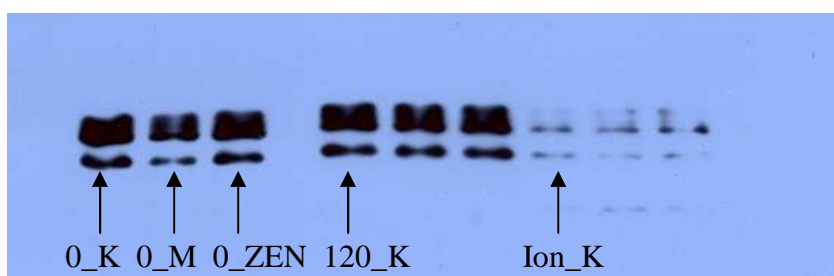
4.7 IMUNODETEKCE PROTEINŮ S MONOKLONÁLNÍMI PROTILÁTKAMI ACR.2 A P-TYR

Po příčném přenosu proteinů na membrány byly gely obarveny (viz. 3.4.8.) a na membrány s přenesenými proteiny byly navázány monoklonální protilátky ACR.2 nebo P-tyr. Navázané protilátky byly vyvolány pomocí kitu SuperSignal a chemiluminescenční signál byl vyvolán na RTG filmech v temné komoře. Detekované proteiny, stejně jako u SDS elektroforézy, značily průběh kapacitace, změny mezi jednotlivými časy kapacitace a vzorky (K, M, EDs) (Obr. a 28 a 29).

Monoklonální protilátka ACR.2 specificky značila akrosin v oblasti 50-55 kDa a P-tyr proti fosfotyrosinu specificky značila v oblastech 30-34 kDa a 28 kDa. Ukázka detekovaných proteinů viz Obr. 28 a 29.

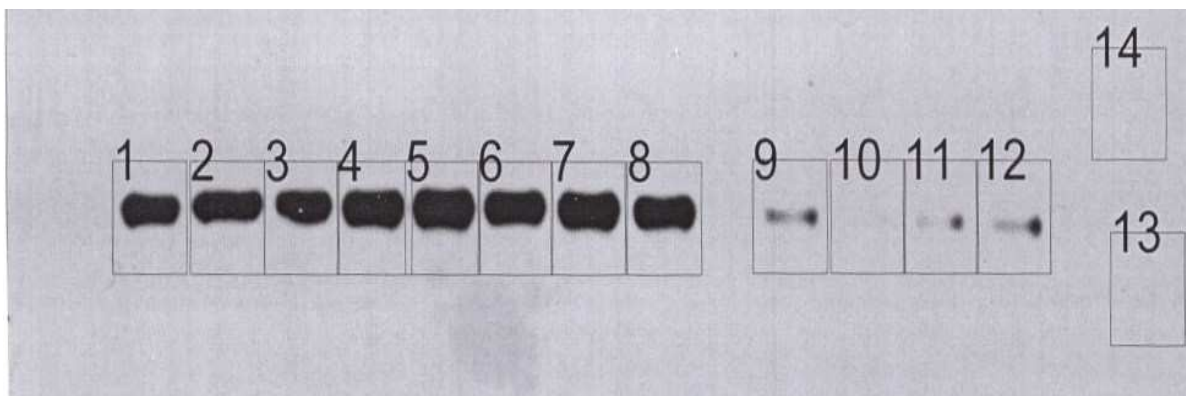


Obr. 28: Imunodetekce proteinů s monoklonální protilátkou ACR.2. Na obrázku jsou ukázány kontrolní vzorky (M - spermie s rozpouštěcím médiem) a s ED (spermie ovlivněné VIN) ve dvou koncentracích - V1; M1 - 10 $\mu\text{g/l}$ a V2; M2 - 20 $\mu\text{g/l}$. vzorky jsou srovnány podle časů kapacitace (0 min, 120 min a po AR - po přidání Ca – ionoforu).



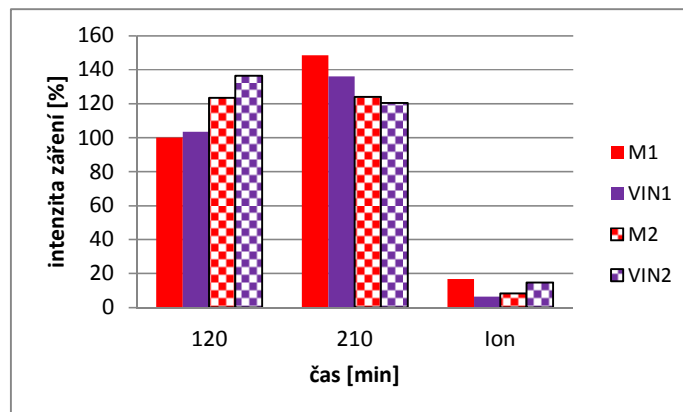
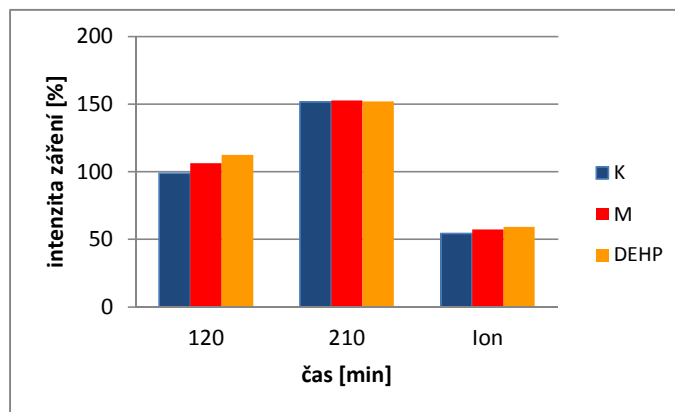
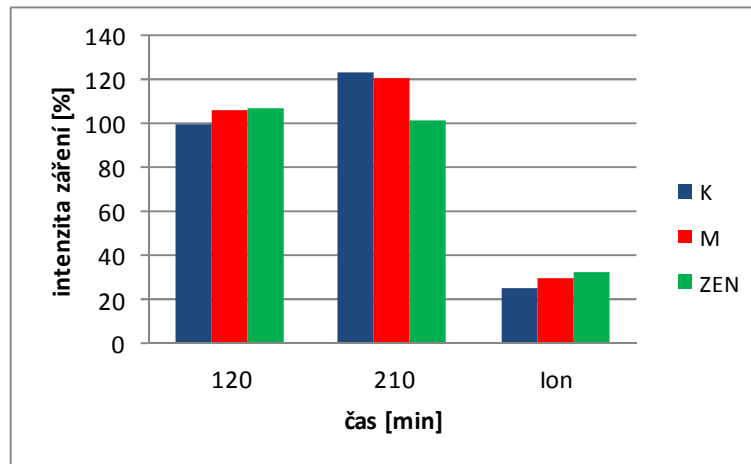
Obr. 29: Imunodetekce proteinů s monoklonální protilátkou P-tyr. Na obrázku jsou ukázány kontrolní vzorky (K), vzorky spermií s rozpouštěcím médiem (M) a s ED (spermie ovlivněné ZEN). Vzorky jsou srovnány podle časů kapacitace (0 min, 120 min a po AR - po přidání Ca – ionoforu).

Pro zjištění intenzity vyvolaného chemiluminescenčního signálu byl použit počítačový program 2D Densitometry AIDA (Advanced Image Data Analyzer). Intenzita signálu byla měřena v procentech. Jako 100% signál byl zvolen kontrolní vzorek v čase 0 min a označen jako standard 100%. Dále bylo vybráno pozadí (background 0%) a druhý standard blízko pozadí o hodnotě 0%. Jednotlivé vzorky byly vždy vybrány stejným rámcem (obdelník) a tím byla zajištěna stejná plocha měření u každého vzorku. Ukázka měření v programu AIDA (viz. Obr. 30).

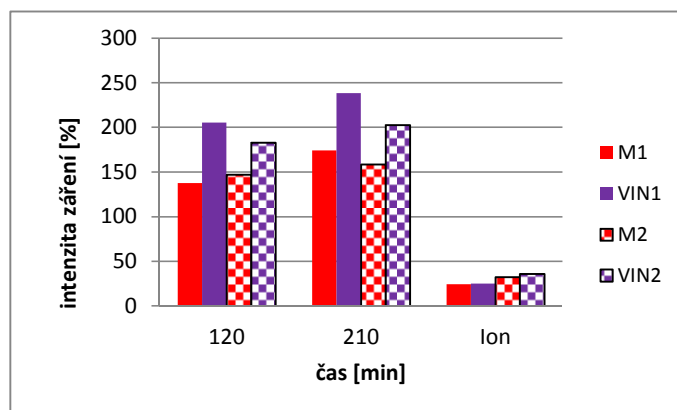
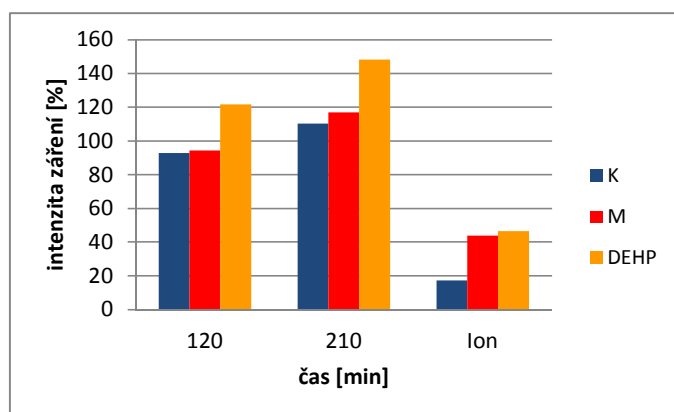
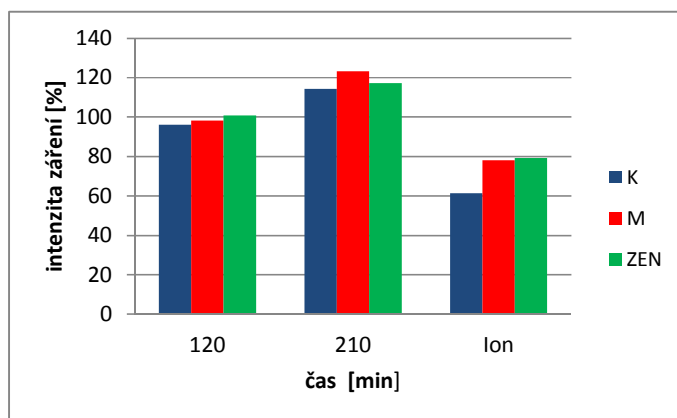


Obr. 30: Měření intenzity vyvolaného chemiluminescenčního signálu v počítačovém programu 2D Densitometry AIDA. Obdélníček číslo 1 představuje standard se 100% intenzitou signálu, obdélníček 13 je druhý standard s 0% intenzitou záření a obdélníček 14 zobrazuje pozadí.

Změřená intenzita signálu (v %) byla vynesena do sloupcových grafů (viz. Obr. 31 a 32) Byly vyneseny časy 120 min, 210min a po AR (po přidání Ca-ionoforu). Čas 0 min byl brán jako 100% signál a ostatní časy byly s ním procentuálně srovnány. Dvě koncentrace EDs spolu s kontrolními vzorky (médiu s ethanolem o stejné koncentraci jako ED) jsou ukázány pouze u VINu. U ZENu a DEHP byly výsledky rozdílných koncentracích zanedbatelné. Z grafů je možné vysledovat průběh kapacitace podle zvyšující se/snižující se intenzity signálu a porovnat, jak příslušný ED ovlivnil kapacitaci spermií oproti kontrolním vzorkům. V průběhu kapacitace (od času 0 min po 210 min) došlo k nárůstu intenzity signálu. Po přidání Ca-ionoforu, kdy dochází k AR, se intenzita značených proteinů snižovala. Rozdíly mezi jednotlivými ED jsou patrné z následujících grafů.



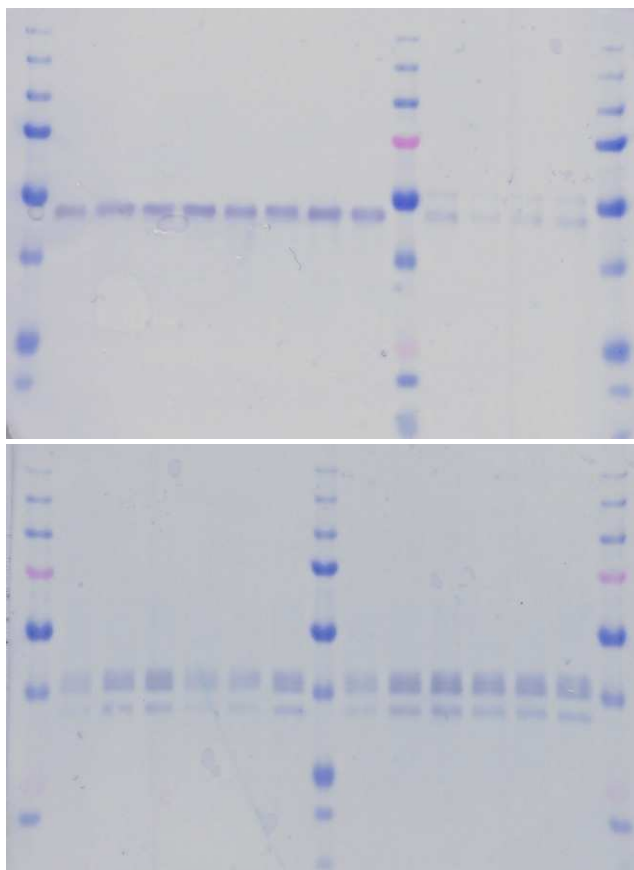
Obr. 31: Tři grafy znázorňující závislost intenzity záření buněk značených ACR.2 na času kapacity *in vitro*. Vedle sebe jsou vždy vyneseny kontrolní vzorky (K), vzorky ovlivněné ethanolom (M) a vzorky s ED v pořadí – první graf ZEN, druhý graf DEHP a třetí VIN. U třetího grafu jsou vyneseny dvě koncentrace VIN společně s kontrolními vzorky (koncentrace vzorků viz.4.2, číslo jedna označuje koncentraci nižší, číslo dva koncentraci vyšší). Jako kontrolní vzorky byly použity vzorky s médiem a přidaným ethanolom.



Obr. 32: Tři grafy závislosti intenzity záření buněk značených P-tyr na času kapacitace *in vitro*. Vedle sebe jsou vždy vyneseny kontrolní vzorky (K), vzorky ovlivněné ethanolom (M) a vzorky s ED v pořadí – první graf ZEN, druhý graf DEHP a třetí VIN. U třetího grafu jsou vyneseny dvě koncentrace VIN společně s kontrolními vzorky (koncentrace vzorků viz.4.2, číslo jedna označuje koncentraci nižší, číslo dva koncentraci vyšší). Jako kontrolní vzorky byly použity vzorky ovlivněné přidaným ethanolom (M).

4.8 VYVOLÁNÍ CHEMILUMINESČNÍHO SIGNÁLU POMOCÍ TMB

Druhou metodou použitou k vyvolání signálu navázaných monoklonálních protilátek (ACR.2 a P-tyr) pomocí kitu SuperSignal (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, USA) bylo navázaní 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). TMB vyvolal navázané protilátky ihned po nanesení na membránu. Intenzita signálu vyvolaná TMB byla velice nízká (viz. Obr. 33), proto tato metoda nebyla použita k vyhodnocování. Jako optimální metoda se prokázala vyvolání signálu na RTG filmy (viz. 4.7) a byla k hodnocení využívána.



Obr. 33: Imunodetekce proteinů s navázanými monoklonálními protilátkami ACR.2 (obrázek nahoře) a P-tyr (obrázek dole) pomocí TMB.

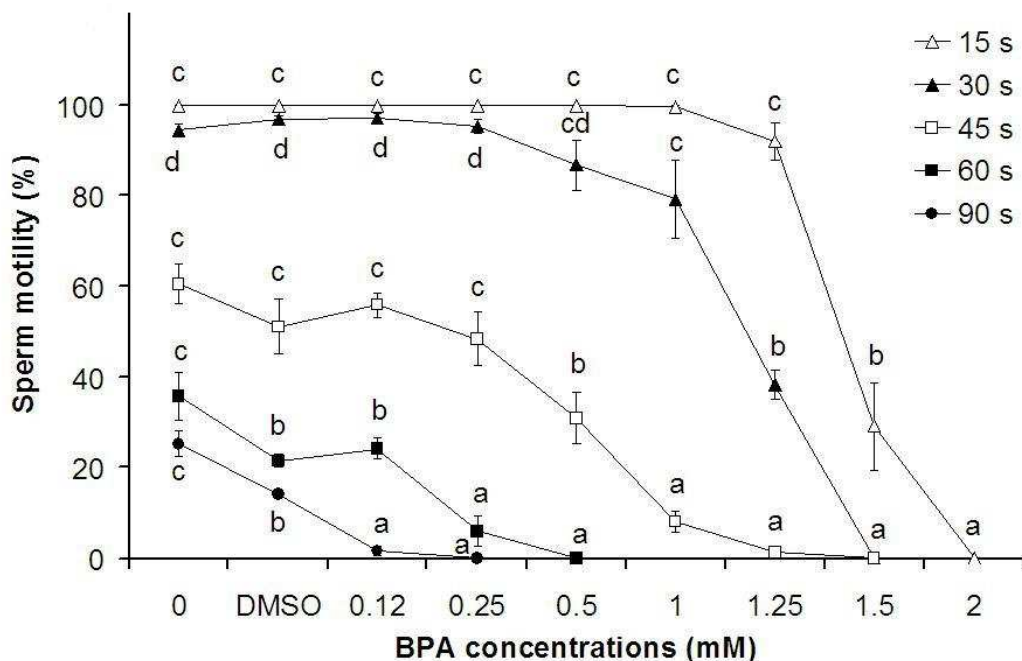
B) RYBÍ MODEL

4.9 HODNOCENÍ SPERMÍÍ

Z velkého množství vzorků a DVD záznamů bylo u okouna říčního vyhodnoceno procento motilních spermií a jejich rychlost pohybu a to jak u spermií ovlivněných BPA, tak u kontrolních spermií. Procento motilních spermií u kontrolních vzorků po 10 s po aktivaci představovalo hodnotu 95%.

4.10 VLIV BPA NA PROCENTO POHYBLIVÝCH SPERMÍÍ

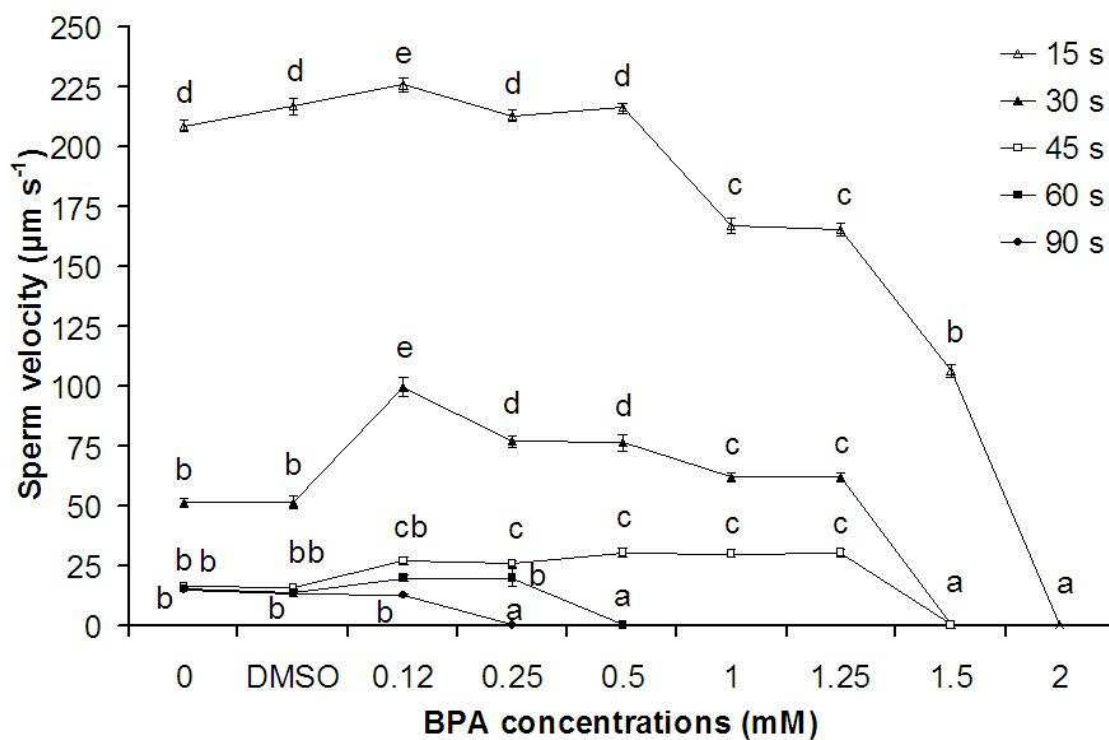
Významný účinek BPA na pohyblivost spermií byl pozorován u každého času po aktivaci ($P < 0,001$ v čase 15; 30; 45; 60 a 90 s po aktivaci). Pohyblivost spermií byla zcela potlačena přidáním BPA o koncentraci 2 mM (Obr. 35). Doba pohybu spermií se snižovala se zvyšující koncentrací přidávaného BPA. U kontrol, 25,3% spermií bylo pohyblivých v čase 90s po aktivaci, zatímco jen 1,3% spermií bylo pohyblivých v AM s 0,12 mM BPA. 15 s po aktivaci v AM s 1,5 mM BPA významně pokleslo množství pohyblivých spermií. Procento motilních spermií kontrolních a ovlivněných BPA s koncentrací nižší jak 1,25 mM se po 15 s po aktivaci od sebe nelišily, ale procento pohyblivých spermií ovlivněných 1,0 mM BPA po 30s a 0,5 mM BPA po 45 s po aktivaci se výrazně snížil. U nejnižších koncentrací BPA (0,25 a 0,12 mM) a u konečné periody pohyblivosti spermií (60 a 90 s po aktivaci) bylo procento pohyblivých spermií velice nízké (Obr. 34) 0,1% DMSO nijak neovlivnil procento pohyblivých spermií.



Obr. 34: Graf ukazuje závislost % pohyblivých spermií okouna říčního na koncentraci BPA. Křivky označují čas po aktivaci spermií v AM (Hatef A. et al., 2010).

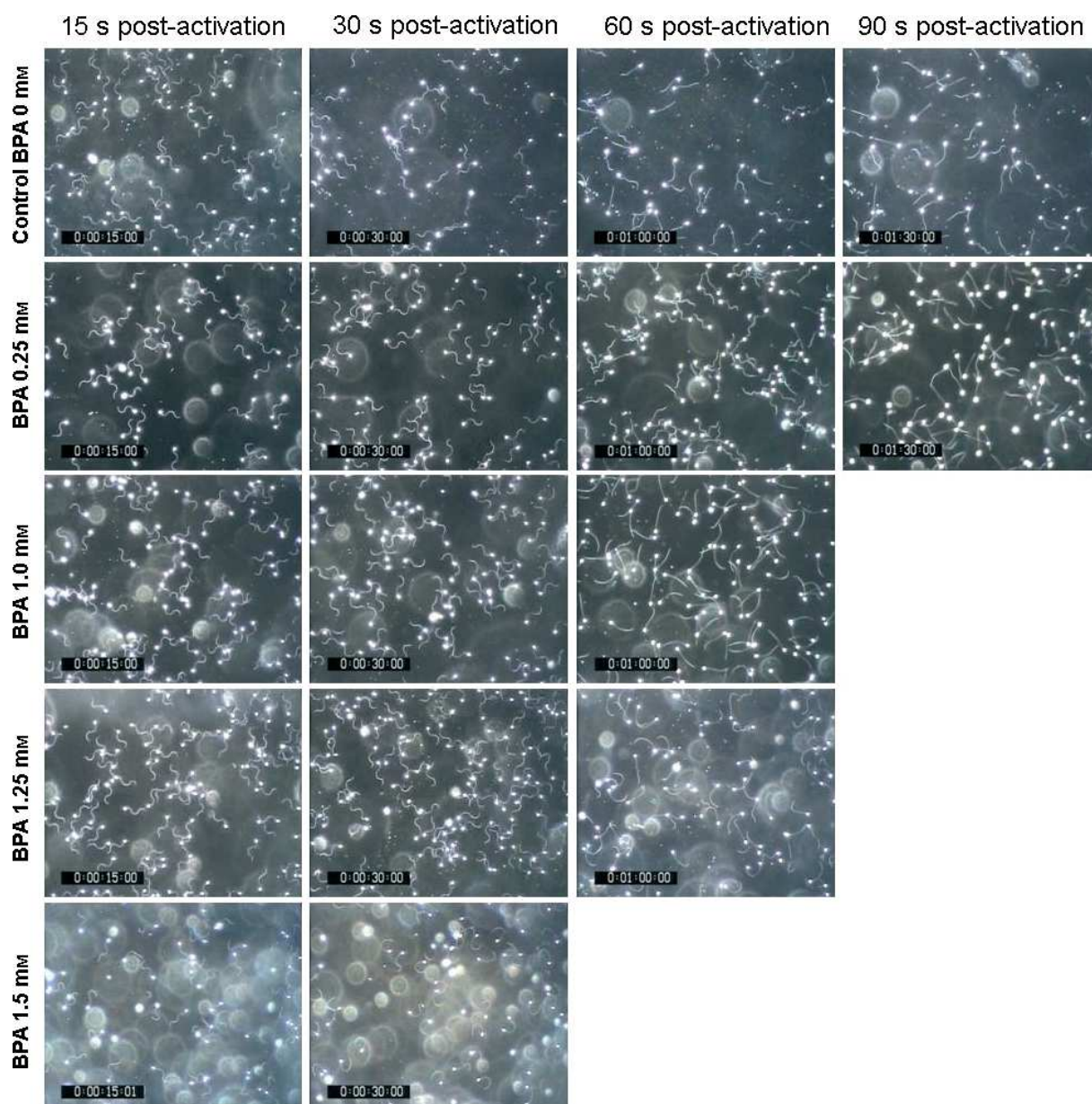
4.11 VLIV BPA NA RYCHLOST POHYBU SPERMIÍ

Rychlost pohybu spermií byla výrazně ovlivněna BPA po 15 s aktivaci a rychle se snižovala u koncentrace 1 mM BPA ($df = 4$; $F = 151,10$; $P < 0,001$). Rychlost pohybu spermií byla vyšší u 0,12 – 0,25 mM BPA než u kontrolních skupin a skupin s přidaným DMSO. BPA také ovlivnil rychlost pohybu spermií po 30 a 45 s po aktivaci ($df = 4$; $F = 29,06$ a $17,17$; $P < 0,001$). Nejvyšší rychlost pohybu byla zaznamenána 30 s po aktivaci u koncentrace 0,12 mM BPA. Rychlost pohybu spermií byla také ovlivněna BPA 60 s po aktivaci ($df = 4$; $F = 1,58$; $P < 0,05$) a 90s po aktivaci ($df = 4$; $F = 1,16$; $P < 0,05$) (Obr. 35)



Obr. 35: Graf ukazuje závislost rychlosti pohybu spermií okouna říčního na koncentraci BPA. Křivky ukazují čas po aktivaci spermií v AM (Hatef A. et al., 2010).

Zajímavé bylo, že tvar pohybu bičíku do písmene C byl pozorován u 1,25 mM BPA 60 s po aktivaci a u 1,5 mM BPA 30 s po aktivaci kdy je obvykle pohyb spermií u konce. U kontrolních skupin byl bičík spermií v konečném stádiu pohybu (90 s po aktivaci) rovný (Obr. 36).



Obr. 36: Obrázky ukazují pohyb spermií okouna říčního v jednotlivých časech po aktivaci - 15, 30, 45, 60 a 90 s a za různých podmínek ovlivněný - BPA o koncentracích 0; 0,25; 1,0; 1,25 a 1,5 mM. Pohyblivé spermie mají bičík ve tvaru „C“, ukazuje kruhový pohyb, oproti tomu nepohyblivé spermie mají bičík rovný (Hatef A. et al., 2010).

5 DISKUSE

U laboratorních zvířat existuje řada experimentálních dat, které popisují funkci a působení vybraných EDs. Ve většině experimentů se EDs aplikují v nízkých dávkách a nevyvolávají žádné akutní příznaky intoxikace. Účinky expozice těchto látek se často projevuje v pre- nebo v postnatálním vývoji. Ačkoliv většina studií popisuje problémy u samčího pohlavního systému, negativní účinky EDs byly pozorovány u obou pohlaví. Logicky lze toto vysvětlit faktem, že většina EDs je estrogenního původu (Gray et al., 2004; Stokes 2004) a důvod proč se většina laboratoří zaměřuje na samčí pohlaví souvisí s poklesem kvality spermií u samců a v důsledku toho s nárůstem neplodnosti a také s dostupností materiálu pro testy

V mé práci byl na savčím modelu studován efekt tří EDs - ZEN, BPA a VIN na průběh *in vitro* kapacitace a akrosomální reakce a možný vliv na oplození. Mnohé studie na EDs popisují účinek vybraných EDs na zralé spermie u různých druhů savců. V mé práci byl studován vliv vybraných EDs na savčím modelu a to praseti divokém. Obdržené výsledky ze všech metod mohou být použitelné pro hledání konkrétního mechanismu jejich působení na savčí organismus. V práci jsem využila různé metody detekce změn v průběhu kapacitačního procesu a fyziologického stavu spermií, které ve své kombinaci pomohly odkrýt pravděpodobný vliv EDs na kapacitaci a fyziologický proces zrání spermií.

Vliv vybraných EDs byl zkoumán na praseti divokém hlavně u ZENU (u DEHP méně studií, u VINu žádné). Vliv VINu a DEHP byl zkoumán především na jiných savčích modelech (myš, krysa, křeček atd.). V *in vitro* studii na kancích byl zkoumán vliv ZENU a jeho derivátů (α -ZOL a β -ZOL) na viabilitu, apoptosu, chromatinovou stabilitu a motilitu spermií. Tyto látky již v pikomolárním množství negativně ovlivnily chromatinovou stabilitu spermie a jejich viabilitu a β -ZOL, rovněž avšak na mikromolární úrovni ovlivnil motilitu spermií. Pomocí relativně přesných měření se prokázaly poměrně nepříznivé účinky ZENU na reprodukci kanců (Benzoni et al., 2008). Obdobná studie byla prováděna za účelem stanovení *in vitro* účinku ZENU a α -ZOL na kancích spermiích. Byly použity tři rozdílné koncentrace ZENU a α -ZOL. Parametry u spermií, které se hodnotily byly viabilita, motilita a spontánní akrosomová reakce. Výsledky prokázaly, že obě látky (ZEN i α -ZOL) průkazně ovlivnily viabilitu, motilitu a spontánní akrosomovou reakci spermií (Tsakmakidis et al., 2006). V *in vivo* studiích na kancích byl studován vliv DEHP na

kvalitu spermatu. Sperma bylo odebráno od post-pubertálních 8-9 měsíců starých kanců, kteří pili vodu s 300 mg DEHP/kg váhy kance a to 3x týdně po dobu 3-7 týdnů. Skupina s přídatkem DEHP měla výrazně nižší procento lineárně se pohybujících spermií ve srovnání s kontrolními vzorky a bičíky spermií měly větší amplitudy vlnění oproti kontrolním vzorkům (Spjuth et al., 2006). VIN byl studován zejména na potkanech a myších. V jedné ze studií na CD1 myších byl pozorován vliv VINu na expresi vybraných genů varlat a proteinů spermií. Po působení tohoto ED došlo ke snížení značení intra-akrosomálních proteinů a k poškození akrosomu hlavně na úrovni proteinů (Elzeinova et al., 2008).

U savčího modelu jsem zjistila, že po působení vybraných EDs došlo v průběhu kapacitace *in vitro* (od času 0 min po 210 min) k nárůstu počtu značených intra-akrosomálních proteinů spermií pomocí monoklonálních protilátek ACR.2 a P-tyr. Zvyšoval se počet značených buněk, viz. průtoková cytometrie, ale i intenzita imunofluorescenčního signálu značící proteiny spermií. Po přidání Ca-ionoforu, který způsobil AR, se intenzita značených proteinů/buněk snížila. Zkoumané ED průkazně ovlivňovaly průběh kapacitace i akrosomální reakce ve srovnání s kontrolními vzorky. V průběhu kapacitace nízké koncentrace EDs ve většině případů byly nepřesně vyhodnotitelné a velmi se odlišovaly podle dávky spermatu, závisely na samci a období kdy se experimenty prováděly tedy zřejmě zralosti spermatu. Ovšem ve vyšších koncentracích jednoznačně EDs potlačovaly akrosomální reakci a tudíž snižovaly počet spermií schopných prodělat normální akrosomální reakci a tím ztratily schopnost oplození. Průtoková cytometrie prokázala potlačení akrosomální reakce u všech EDs ve vyšších koncentracích. Vyhodnocením vzorků pomocí IF ukázalo, že DEHP a VIN částečně potlačují AR spermií oproti kontrolním vzorkům. U spermií ovlivněných ZENem a jeho kontrolních vzorků jsou procenta značených spermií po AR srovnatelné. Imunodetekce ukázala na malé potlačení akrosomální reakce u všech EDs. Pro vlastní toxikologické testy koncentrace ED v *in vivo* pokusech jsme využili obvyklých postupů a koncentrace jsme převzali a přepočítaly z registru National Toxicology Program, 1982. Následně koncentrace vybraných EDs k testům na úrovni *in vitro* byly zvoleny podle nejnižších účinných koncentrací EDs testovaných v *in vivo* pokusech na myších na Biotechnologickém ústavu AVČR, v. v. i. v Praze.

In vitro studie na okounu říčním ukázala, že BPA ovlivňuje procento pohyblivých spermií a jejich rychlost pohybu. BPA o různých koncentracích ovlivňoval procento

pohyblivých spermií, trajektorii spermií, dobu, po kterou se pohybovaly a rovněž jejich rychlost. Největší změny byly pozorovány zejména u spermií inkubovaných ve vyšších koncentracích BPA (Obr. 36). Dále moje studie na rybím modelu poměrně detailně prokázaly, že *in vitro* působení BPA zvyšuje rychlost pohybu spermií a to především u nízkých koncentrací (0,12-0,25 mM). Pohyb spermií se jednoznačně zkracoval s koncentrací BPA. Koncentrace BPA zkracovala dobu pohybu spermií a tím i jeho procento pohyblivých spermií. Koncentrace 1.5 mM jednoznačně zablokovala pohyb po 15 s od aktivace spermií. Vyšší účinky BPA se prokázaly až v pozdějším období od aktivace spermií a to v časech 45, 60 a 90 s po aktivaci spermií. Především procento pohyblivých spermií po 60 s od jejich aktivace kleslo již při nejnižších koncentracích a to 0,12 – 0,25 mM BPA. Mechanismus účinku nízkých koncentrací BPA na vyšší rychlost pohybu spermií u rybího modelu není znám a bude podroben dalšímu detailnímu výzkumu. Obdobného efektu nižší koncentrace a vyšší účinek byl prokázán ve studiích na myším modelu po působení BPA (Peknicova et al., 2002). Nicméně není dobře známo, jakým způsobem BPA proniká do spermie, zda narušuje plasmatickou membránu spermie nebo celou strukturu bičíku. Plasmatická membrána je obdobně jako u všech buněk i u spermií nepostradatelná. U rybích spermií hraje důležitou regulační roli při zahájení pohyblivosti spermií v důsledku reakce na změnu osmotického tlaku (Alavi et al., 2007). Bylo prokázáno, že BPA narušuje energetiku spermie t.j. ovlivňuje úroveň ATP a jeho spotřebu v průběhu aktivaci spermie. Do současnosti ovšem nevíme, na jakém principu BPA působí na ATP. Lahnsteiner et al. (2005) studoval u pstruha obecného v období vrcholné reprodukce *in vivo* efekt BPA na pohyblivost a rychlost pohybu spermií. Prokázali, že pohyblivost spermií a jejich rychlost pohybu byla nižší u samců, kteří byli vystaveni působení BPA o koncentracích 1,75; 2,40 a 5,0 µg/l a to po dobu tří týdnů na začátku a uprostřed reprodukčního období. Žádný efekt nezjistili na konci reprodukčního vývoje. Nedávná studie na karasu obecném (*Carassius carassius* L., Hatef a kol., nepublikováno) v akváriích po dobu jednoho měsíce ukázala, že u samců chovaných ve vyšších koncentracích BPA jak 1 µg/l, došlo průkazně k snížení procenta pohyblivých spermií, ale rovněž i k snížení rychlosti pohybu spermií. Toto působení BPA by mohlo být spojeno s jeho anti-androgenní aktivitou.

Nejen BPA, ale i jiné EDs působí na charakter pohybu rybích spermií. Ve splaškových vodách se nacházejí nejrůznější alkylfenoly. Hara et al. (2007) publikovali u halančíka rýžovištního (tzv. medaka) pokles procenta pohyblivých spermií i jejich rychlosti pohybu

spermií a to po 60 s inkubace spermatu v 100 µg/l nonylfenolu. Další látka jako je 2,4-dichlorfenol o koncentraci 1 mg/l rovněž významně snížila pohyblivost a rychlost pohybu spermií u sumce afrického (*Clarias gariepinus*), jak prokázal v *in vitro* pokusech Lahnsteiner et al. (2004). U pstruha obecného a mníka (*Lota lota* L.) 2,4-dichlorfenol o koncentracích 0,01 a 10 mg/l snížil procento pohyblivých spermií, avšak žádný účinek se neprokázal u rychlosti pohybu spermií. V opačném případě, 2,4-dichlorfenol o vysoké koncentraci 100 mg/l paradoxně výrazně zvýšil rychlost pohybu spermií u jelce (*Leuciscus cephalus*) a neměl žádný efekt na procento pohyblivých spermií (Kang et al., 2002). Tento výsledek ovšem nemusí být odezvou na efekt vlastní látky jako takové, ale může jít o účinek osmotické koncentrace látky, která se mohla projevit vyšším procentem pohyblivých spermií.

6 SOUHRN

Ve své práci jsem studovala vliv vybraných endokrinních disruptorů na spermie savců a ryb.

Savčí model

U savčího modelu zkoumané EDs průkazně ovlivňovaly průběh kapacitace i akrosomální reakci ve srovnání s kontrolními vzorky. Metodou průtoková cytometrie jsem prokázala nárůst počtu značených buněk v průběhu kapacitace a snížení počtu značených buněk po AR a porovnála rozdíly mezi experimentálními vzorky a kontrolními. Ve vyšších koncentracích EDs jednoznačně potlačovaly akrosomální reakci a tudíž snižovaly počet spermií schopných oplození. Vypovídací schopnost výsledků detekce akrosomální reakce byla potvrzena využitím různých metodických přístupů (imunofluorescence, imunodetekce).

Rybí model

U rybího modelu *in vitro* studie ukázala, že BPA ovlivňuje procento pohyblivých spermií a jejich rychlost pohybu. BPA o různých koncentracích ovlivňoval procento pohyblivých spermií, trajektorii spermií, dobu, po kterou se pohybovaly a rovněž jejich rychlost. BPA v nízkých koncentracích (0,12-0,25 mM), zvyšoval rychlost pohybu spermií a zároveň snižoval procento pohyblivých spermií a dobu motility. Mechanismus účinku nízkých koncentrací BPA na vyšší rychlost pohybu spermií u rybího modelu není znám a bude podroben dalšímu detailnímu výzkumu.

7 ZÁVĚR

Podařilo se mi zjistit, že vybrané endokrinné disruptory (ZEN, DEHP a VIN) ovlivňují průběh kapacitace a akrosomální reakce u kančích spermií a u rybích spermií (BPA) ovlivňuje motilitu spermií. Jestliže dané fyziologické děje jsou narušené, je ohrožen úspěch oplození a reprodukce jak u savců, tak u ryb.

Endokrinní disruptory, jako možné polutanty životního prostředí, ohrožují reprodukci obou druhů živočichů a mají dopad i na reprodukci lidí.

8 LITERATURA

Adami H., Bergström R., Zatöski W., Möhner M., Storm H., Ekblom A., Tretli S., Teppo L., Ziegler H., Rahu M., Gurevicius R., Stengrevics A. (1994): Testicular cancer in nine northern European countries. *Int J Cancer* 59:33-38

Akingbemi B. T., Sottas C. M., Koulova A. I., Klinefelter, G. R., Hardy M. P. (2004): Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen Bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat leydig cells. *Endocrinol* 145: 592–603

Alavi S. M. H., Rodina M., Hatef, A., Stejskal V., Policar T., Hamackova J., Linhart O. (2010): Sperm motility and monthly variations in the semen characterization of *Perca fluviatilis* (Teleostei Percidae). *Czech J Anim Sci* 55: 174–182

Alavi S. M. H., Rodina M., Policar T., Kozak P., Psenicka M., Linhart O. (2007): Semen of *Perca fluviatilis* L: sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. *Theriogenol* 68: 276–283

Anway M. D., Leathers C., Skinner M. K. (2006): Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endokrinol* 147: 5515-5523

Austin C. R., Bishop M. W. H. (1958): Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. *Proc Roy Soc (London), series B*, 149: 241

Benzoni E., Minervini F., Giannoccaro A., Fornelli F., Vigo D., Visconti A. (2008): Influence of in vitro exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality. *Reprod Toxicol* 25 (4): 461-467

Betina, V. (1989): Bioactive molecules, mycotoxins. Vol. 9: Elsevier, Amsterdam

Billard R., Cosson M. P. (1988): Sperm motility in rainbow trout *Parasalmo mykiss*: effect of pH and temperature. V knize: *Reproduction in Fish Basic and Applied Aspect in Endocrinology and Genetics* (eds. Breton B., Zohar Y.), INRA, Paris 161-167

- Billard R., Cosson M. P. (1990): The energetics of fish sperm motility. V knize: Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects (ed. Gagnon C.), CRC Press, Boston: 153-173
- Billard R., Cosson M. P. (1992): Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. J Exp Zool 261: 122-131
- Billard R., Cosson J., Perche G., Linhart O. (1995): Biology of sperm and artificial reproduction in carp. Aquacul 129: 95-112
- Billard R., Linhart O., Fierville F., Cosson J. (1997): Motility of *Silurus glanis* spermatozoa in the testicles and in the milt. Polish Arch Hydrobiol 44: 115-122
- Billard R., Cosson J., Fierville F., Brun R., Rouault T., Williot P. (1999): Motility analysis and energetics of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* spermatozoa. J Appl Ichthyol 15: 199-203
- Bloomquist C., Davidson J. N., Pearson E. G. (1982): Zearalenone toxicosis in prepubertal dairy heifers. J Am Vet Med Assoc 180: 164-165
- Boitano S., Omoto C. K. (1991): Membrane hyperpolarization activates trout sperm without an increase in intracellular pH J Cell Sci 98: 343-349
- Bottalico A., Perrone G. (2002): Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. Eur J Plant Path 108: 611-624
- Brooks D. E., Means A. R., Wright E. J., Singh S. P., Tiver K. K. (1986): Molecular cloning of the cDNA for androgen-dependent sperm-coating glycoproteins secreted by the rat epididymis. Eur J Biochem 161: 13-18
- Budavari S., O'Neil M. J., Smith A., Heckelman P. E. (eds.) (1989): The Merck Index Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey, USA
- Calvin H. I., Bedford J. M. (1971): Formation of disulfid bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. J Reprod Fertil 13: 65-75

- Carlsen E., Giwercman A., Keiding N., Skakkebaek N. E. (1992): Evidence for decreasing quality of semen during 50 years. *Br Med J* 305: 609-613
- Carpenter C. P., Weil C. S., Smyth H. F. (1953): Chronic oral toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate for rats and guinea pigs. *Arch Indust Hyg Occup Med* 8: 219-226
- Christen R., Gatti J. L., Billard R. (1987): Trout sperm motility: the transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of ATP following the activation of the flagellar movement. *Eur Biochem* 166: 667-671
- Cosson J. (1996): A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. *Cell Biol Int* 20: 83-94
- Cosson J., Billard R., Cibert C., Dréanno C., Linhart O., Suquet M (1997): Movements of fish sperm flagella studied by high speed videomicroscopy coupled to computer assisted image analysis. *Polish Arch Hydrobiol* 44: 103-113
- Cosson J., Billard R., Cibert C., Dréanno C., Suquet M (1999): Ionic factors regulating the motility of fish sperm. *V knize: The male gamete: From basic science to clinical applications*, (ed. Gagnon C.), Cache River Press, Vienna, IL, USA 161-186
- Cosson J., Linhart O., Mims S. D., Shelton W. L., Rodina M. (2000): Analysis of motility parameters from paddlefish (*Polyodon spathula*) and shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platorynchus*) spermatozoa. *J Fish Biol* 56: 1348-1367
- Cosson J. (2008): The motility apparatus of fish spermatozoa. *V knize: Fish spermatology* (eds. Alavi S.M.H., Cosson J., Coward K., Rafiee G.), Alfa Science Ltd: 281-316
- Cosson M. P., Andre F., Billard R. (1995): CAMP/ATP relationship in the activation of trout sperm motility: their interaction in membrane-deprived models and in live spermatozoa. *Cell Motil Cytoskel* 31: 159-176
- Cosson M. P., Billard R., Letellier L. (1989): Rise of internal Ca^{2+} accompagnies the initiation of trout sperm motility *Cell Motil Cytoske.* 14: 424-434

- Cosson M. P., Cosson J., Billard R. (1991): Synchronous triggering of trout sperm is followed by an invariable set sequence parameters whatever the incubation medium. *Cell Motil Cytoskel* 20: 55-68
- Coulombe R. A. (1993): Symposium: biological action of mycotoxins. *J Dairy Sci* 76: 880-891
- Cechova D., Jonakova V., Zelezna B., Petelikova J. (1984): Ram proacrosin. A simple methods for isolation of proacrosin free of inhibitors, and proacrosin autoactivation studies. *Androl* 16: 477-481
- Das S., Parveen S., Kundra C. P., Pereira B. M. (2004): Reproduction in male rats as vulnerable to treatment with the flavonoid-rich seed extracts of *Vitex negundo*. *Phyther Res* 18:8-13
- Ded L., Dostalova P., Dorosh A., Dvorakova-Hortova K., Peknicova J. (2010).Effect of estrogens on boar sperm capacitation *in vitro*. *Reprod Biol Endocrinol* 8: 87-101
- Degen G. H., Bolt H. M. (2000): Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. *Int Occup Environ Health* 73: 433-441
- Doull J., Elcombe C., Lake B. G., Swenberg J., Wilkinson C., Williams G., van Gemert M. (1999): A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phtalate: application of the new U.S. EPA risk assessment guildenes. *Regul Toxicol Pharmacol* 29: 327-357
- Eddy E. M., O'Brien D.A. (1994): The spermatozoon, Chapter 2, v knize: *The physiology of reproduction* (ed. Knobil E., Neil J.D.), Second Edition, New York. Raven Press: 29-78
- Eddy E. M., Vernon R. B., Müller C. H., Hahnel A. C., Fenderson B.A. (1985): Immunodissection of sperm surface modifications during epididymal maturation. *Am J Anat* 174: 225-237
- Elzeinova F., Novakova V., Buckiova D., Kubatova A., Peknicova J. (2008): Effect of low dose of vinclozolin on reproductive tract development and sperm parameters in CD1 outbred mice. *Reprod Toxicol* 26:231-238

- EPA (1997): Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. EPA/630/R-96/012
- EPA (1999): Reproductive and development toxicity of bisphenol A. www.bisphenol-a.org/toxicology/reproductive.html
- Forman D., Moller H. (1994): Testicular Cancer. *Cancer Surv* 19/20: 323-341
- Galantino-Homer H. L., Visconti P. E., Kopf G. S. (1997): Regulation of protein tyrosine Phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod* 56: 707-719
- Gibbons B. H., Baccetti B., Gibbons I. R. (1985): Motility of the 9+0 Flagellum of *Anguilla* sperm. *Cell Mot* 5 333-350
- Gibbons B. H., Gibbons I. R., Baccetti B., (1983): Structure and motility of the 9+0 flagellum of eel spermatozoa. *J Submicrosc Cytol* 15: 15-21
- Gibbons I. R. (1981): Cilia and flagella of eukaryotes. *J Cell Biol* 91: 107-124
- Gray L. E. (1998): Xenoendocrine disruptors: laboratory studies on male reproductive effects. *Toxicol Lett* 102-103: 331-335
- Gray L. E., Ostby J., Wolf C. J., Lambright C., Parks L., Veeramachaneni D. N., Wilson V., Price M., Hotchkiss A., Orlando E., Guillette L. (2001): Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Human Reprod Update* 7: 248-264
- Gray L. E., Ostby J. S., Kelce W. R. (1994): Developmental effects of an environmental antiandrogen: The fungicide Vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 129: 46-52
- Gray L. E., Wilson V., Noriega N., Lambright C., Furr J., Stoker T. E., Laws S. C., Goldman J., Cooper R. L., Foster P. M. (2004): Use of the laboratory rat as a model in endocrine disruptor screening and testing. *Inst Lab Anim Resour J* 45 (4): 425-437

Gregory M., Aravindakshan J., Nadzialek S., Cyr D. G. (2008): Effects of endocrine disrupting chemicals on testicular functions, v knize: Fish spermatology (ed. Alavi S. M. H., Cosson J., Coward K. and Rafiee G.). Alpha Science Ltd, Oxford, UK: 161–214

Gregory, M., Aravindakshan, J., Nadzialek, S., and Cyr, D. G. (2008): Effects of endocrine disrupting chemicals on testicular functions. V knize: Fish spermatology (eds: Alavi S. M. H. Cosson J., Coward G., Rafiee K.): 161-214, Alpha Science Int Ltd., Oxford, U.K.

Hara Y.; Strussmann C. A.; Hashimoto S. (2007): Assessment of short-term exposure to nonylphenol in Japanese medaka usingsperm velocity and frequency of motile sperm. Arch Environ Contam Toxicol. 53: 406–410

Hatef A., Alavi S. M. H., Linhartova Z., Rodina M., Policar T., Linhart O. (2010): In vitro effects of Bisphenol A on sperm motility characteristics in *Perca fluviatilis* L. (Percidae; Teleostei). J Appl Ichtyol (26): 696-701

Haubruge E., Petit F., Gage M. J. (2000): Reduced sperm count in guppies (*Poecilia reticulata*) following exposure to low levels of tributyltin and bisphenol A. Proc. R. Soc. Lond., Biol Sci 267: 2333–2337

Hellwig J., van Ravenzway B., Mayer M., Gembardt C. (2000): Pre- and postnatal oral toxicity of vinclozolin in Wistar and Long-Evans rats. Regul Toxicol Pharmacol 32: 42-50

Hendrich J. L., Urch U. A., Hardy D. M. (1998): Structure-function properties of the sperm enzyme acrosin. V knize Enzymes in Agricultural Biotechnology, Washington. ACS Books: 1-10

Hruba D. (2009): Endokrinní disruptory. Hygiena číslo 1 ročník 54: 23-26

IARC (1982): Di(2-ethylhexyl)phtalate. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 29: 269-294

IARC (1993): Monographs of the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some naturally occurring substances. Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, France

- IARC (1999): Overall evaluation of carcinogenicity to humans IARC monographs 1-73: 1-36
- Iwata M., Tanabe S., Sakai N., Nishimura A., Tatsukawa R. (1994): Geographical distribution of persistent organochlorines in air, water, and sediments from Asia and Oceania, and their implications for global redistribution from lower latitudes. *Environ Pollut* 85: 15-33
- Jamieson B. G. M. (1991): Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa. Cambridge University Press: 230-295
- Jensen T. K., Toppari J., Keiding N., Skakkeback N. E. (1995): Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? *Clin Chem* 41: 1896-1901
- Jonakova V., Kraus M., Veselsky L., Cechova D., Bezouska K., Ticha M. (1998): Spermadhesins of AQN and AWN family, DQH sperm surface protein and HNK protein in heparin binding fraction of boar seminal plasma. *J Reprod Fertil* 114: 25-34
- Jonakova V., Manaskova P., Kraus M., Liberda J., Ticha M. (2000): Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Mol Reprod Dev* 56:275-277
- Kang I. J., Yokota H., Oshima Y., Tsuruda Y., Oe T., Imada N., Tadokoro H., Honjo T., (2002): Effects of bisphenol A on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 21: 2394–2400
- Keith L. H. (1997): Environmental endocrine disruptors: a handbook of property data
- Kelce W. R., Monosson E., Gamcsik M. P., Laws S. C., Gray L. E. (1994): Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 126: 276-285
- Kelce W. R., Wilson E. M. (1997): Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. *J Mol Med* 75: 198-207
- Klip H., Verloop J., van Gool J., Koster M., Burger C., van Leeuwen F. (2002): Hypospadias in sons of women to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Lancet* 359: 1102-1107

- Kluwe W. M., Haseman J. K., Douglas J. F., Huff J. E. (1982): The Carcinogenicity of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. *J Toxicol Environ Health* 10: 797-815
- Kudo S. (1991): Fertilization, cortical reaction, polyspermy-preventing and anti-microbial mechanisms in fish eggs. *Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica, Monograph* 16: 313-340
- Kudo S. (1998): Role of sperm head syndecan at fertilization in fish. *J Exp Zool* 281: 620-625
- 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. *Theriogenol* 61: 1307-1325
- Lahnsteiner F.; Mansour N.; Berger B. (2004) : The effect of inorganic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. *J Fish Biol* 65: 1283–1298
- Lahnsteiner F., Berger B., Kletzl M., Weismann T. (2005): Effect of bisphenol A on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, *Salmo trutta f. fario*. *Aquat Toxicol* 75: 213–224
- Larsen B. K., Bjørnstad A., Sundt, R. C., Taban I C.; Pampanin D. M., Andersen O. K. (2006): Comparison of protein expression in plasma from nonylphenol and bisphenol A-exposed Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) by use of SELDI-TOF. *Aquat Toxicol* 78S. 25–33
- Lenga R. E. (1985): *The Sigma-Aldrich Library of Chemical Safety Data*. Edition 1. Sigma-Aldrich Corporation
- Liberda J., Manaskova P., Prelovska L., Ticha M., Jonakova V. (2006). Saccharide-mediated interactions of boar sperm surface proteins with components of the porcine oviduct. *J Reprod Immunol* 71:112-125
- Linhart O., Kudo S. (1997): Surface ultrastructure of paddlefish (*Polyodon spathula* Walbaum, 1792) eggs before and after fertilization. *J Fish Biol* 51: 573-582

- Linhart O., Slechta V., Slavik T. (1991): Fish sperm composition and biochemistry. Bull Inst Zool. Academia Sinica 16: 285-311
- Linhart O., Kudo S., Billard R., Šlechta V., Mikodina Y. V. (1995): Morphology composition and fertilization of carp eggs: a review. Aquacul 129: 75-93
- Linhart O., Mims S. D., Shelton W. L. (1995): Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon and paddlefish. J Fish Biol 47:902-909
- Linhart O., Rodina M., Cosson J. (2000): Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: Sperm motility and hatching success of embryos. Cryobiol 41: 241-250
- Linhart O. (2004). Řízená reprodukce ryb. VÚRH JU Vodňany, 200 s
- Linhart O., Cosson J., Mims S. D., Rodina M., Gela D., Shelton W. D. (2003): Fish Physiol Biochem 28: 203-205
- Logrieco A., Mulè G., Moretti A., Bottalico A. (2002): Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with maize ear rot Europe. Eur J Plant Path 108: 597-609
- Manaskova P., Peknicova J., Elzeinova F., Ticha M., Jonakova V. (2007): Origin, localization and binding abilities of boar DQH sperm surface protein tested by specific monoclonal antibodies . J Reprod Immunol 74: 103-117
- Mandich A., Bottero S., Benfenati E., Cevasco A., Erratico C., Maggioni S. (2007): In vivo exposure of carp to graded concentrations of bisphenol A. Ge Comp Endocrinol 153: 15-24
- Messina M. J. (1999): Legumes and soy beans: overview of their nutritional profiles and health effects. Am J Clin Nutr 70:439-450
- Miyata K., Yabushita S., Sano M., Okuno Y., Matsuo M. (2003): Effects of perinatal exposure to flutamide on sex hormone responsiveness in F1 male rats. J Toxicol Sci 28: 149-163
- Moos J., Peknicova J., Tesarik J. (1993): Relationship between molecular conversion of acrosin and the progression of exocytosis in the calcium ionophore-induced acrosome reaction. Biochem Biophys Acta 1176: 199-207

NTP (National Toxicology Program) (1982): Carcinogenesis Bioassay of Di(2-ethylhexyl)phthalate (CAS No. 117-81-7) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Feed Study). Research Triangle Park

NTP (National Toxicology Program) (1982): Carcinogenesis bioassay of zearalenone in F344/N rats and F6C3F1 mice. National Program Technical Report Sereis, N 255

NTP (National Toxicology Program) (1983): Third Annual Report on Carcinogenesis. Research Triangle Park

Peknicova J., Moos J. (1990): Monoclonal antibodies against boar acrosomal antigens labeling undamaged acrosomes of spermatozoa in immunofluorescence test. *Androl* 22: 427-435

Peknicova J., Moos J., Mollova M., Srsen V., Capková J. (1994): Changes in immunochemical localization of acrosomal and sperm proteins in boar spermatozoa during capacitation and induced acrosome reaction. *Anim Reprod Sci* 35: 255

Peknicova J., Capkova J., Geussova G., Ivanova M., Mollova M. (2001): Monoclonal antibodies to intra-acrosomal proteins inhibit gamete binding in vitro. *Theriogenol* 56: 211-223

Peknicova J., Kyselova V., Buckiova D., Boubelik M. (2002): Effect of endocrine disruptor on mammalian fertility. Application of monoclonal antibodies against sperm proteins as markers for testing sperm damage. *Amer J Reprod Immunol* 47:311-318

Psenicka M., Vancova M., Koubek P., Tesitel J., Linhart O. (2009): Fine structure morphology of sterlet (*Acipenser ruthenus* L. 1758) spermatozoa and acrosin localization. *Anim Reprod Sci* 111: 3-16

Romanovsky, A., Cizek F., Kaplanek F., Nedvidek j., Pazourek J., Seifert J., Vana J. (1988): Rozmnožování živočichů, v knize: *Obecná biologie*, Státní pedagogické nakladatelství Praha, 519-560

Safe S. H. (2000): Bisphenol A and related endocrine disruptors. *Toxicol Sci* 56:251-252

- Sax N. I. (1981):v knize: Cancer Causing Chemicals.(ed. Van Nostrand Reinhold), New York
- Semczuk M., Semczuk-Sikora A. (2001): New data on toxic metal intoxication (Cd, Pb, and Hg in particular) and Mg status during pregnancy. *Med Sci Monit* 7: 332-340
- Sharp R. M., Skakkebaek N. E. (1993): Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*, 341:1392-1395
- Shiota K. a Nishimura H. (1982): Teratogenity of di-2-ethylhexyl phtalate and di-n-butyl phtalate in mice. *Environ Health Perspect* 45(0): 65-70
- Scheuring L. (1925): Biologische und physiologische untersuchungen an forellensperma. *Arch Hydrobiol* 4: 181-318
- Singhe A. R., Lawrence W. H., Autian J. (1972): Teratogenicity of phtalate esters in rats. *J Pharmacol Sci* 61:51
- Sittig M. (1985): Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens, 2nd Ed. Noyes, Pulications. Park Ridge
- Skakkebaek N. E., Berthelsen J. G., Giwercman A., Miller J. (1987): Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gynocytes and precursor of all types of germ cell tumours excerpt spermatocytoma. *Int J Nadrol* 10: 19-28
- Skinner M. K., Anway M. D. (2007): Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on the development of disease and cancer. *Crit Rev Oncog* 13: 75-82
- Sohoni P., Sumpter J. P (1998): Several environemtal oestrogens arealso anti-androgens. *J Endocrinol* 158: 327–339
- Sohoni P., Tyler C. R., Hurd K., Caunter J., Hetheridge M., Williams T., Woods C., Evans M., Toy R., Gargas M., Sumpter J. P. (2001): Reproductive effects of long-term exposure to Bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 35: 2917-2925

- Spjuth L., Saravia F., Johannisson A., Lundeheim N., Rodriguez-Martinez H. (2006): Effects of pre-pubertal boars to di(2-ethylhexyl) phthalate on their frozen-thawed sperm viability post-puberty. *Androlog* 35 (5): 186-194
- Stokes S. H. (2004): Selecting appropriate animals models and experimental designs for endocrine disruptor research and testing studies. *Institute of Laboratory Anim Resour J* 45 (4): 387-393
- Strauss L., Santti R., Saarinen N., Streng T., Joshi. S., Mäkelä S. (1998) Dietary phytoestrogen and their role in hormonally dependent disease. *Toxicol Lett* 102-3:349-354
- Suarez S. S., Katz D. F., Owen D. H., Andrew J. B., Powell R. L. (1991): Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm *Biol Reprod* 44: 375-381
- Suquet M., Dorange G., Omnes M. H., Normant Y., Le Roux A., Fauvel C. (1993): Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus*) *J. Fish Biol* 42: 509-516
- Tabata A., Kashiwada S., Ohnishi Y., Ishikawa, H., Miyamoto N., Itoh M., Magara, Y. (2001): Estrogenic influences of estradiol- 17 beta, p-nonylphenol and bisphenol-A on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations. *Water Sci Technol* 43: 109–116
- Tsakmakidis I. A., Lymberopolous A. G., Alexopoulos C., Boscoc C. M., Kyriakis S. C. (2006): In vitro effect of zearalenone a alpha-zearalenol on boar sperm characteristics and acrosome reaction. *Reprod In Domest Anim* 41 (5): 394-401
- Uren-Webster T. M., Lewis C., Filby A. L., Paull G. C., Santos E. M. (2010): Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. *Aquat Toxicol* (33): 360-369
- Vandenberg L. N., Maffini M. V., Sonnenschein C., Rubin B. S.; Soto A. M. (2009): Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrinol* 30: 75–95
- Visconti P. E., Galantino-Homer H., Moore G. D., Bailey J. L., Ning X., Fornes M., Kopf G. S. (1998): The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl* 19: 242-248

- Vom Saal F. S., Cooke P. S., Buchanan D. L., Palanza P., Thayer K. A., Nagel S. C., Parmigiani S., Welshons W. V. (1998): A physiologically based approach to the study of bisphenol A and the other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 14:239-260
- Watson P. F., Plumer J. M. (1986): Relationship between calcium binding sites and membrane fusion during the acrosome reaction induced by ionophore in ram spermatozoa. *J Exp Zool* 238: 113-118
- Weaver G. A., Kurtz H. J., Behrens J. C., Robison T. S., Seguin B. E., Bates F. Y., Mirocha C. J. (1986b): Effect of zearalenone on dairy cows. *Am J Vet Res* 47: 1826-1828
- White R., Jobling S., Hoare S. A., Sumpter J. P., Parker M. G. (1994): Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinol*, 135: 175-182
- Whitehead E. D., Leiter E. (1981): Genital abnormalities and abnormal semen analysis in patients exposed to diethylstilbestrol in utero. *J Urol* 125: 47-50
- World Health Organization WHO (1998): Laboratory manual for examination of human semen and semen cervical mucus interaction. 3th edition. Cambridge Univ Press
- World Health Organization (2010): Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edition. Geneva, Switzerland
- Williams B. A., Mills K. A. T., Burroughs C. D., Bern A. (1989): Reproductive alteration in female C57BL/Crgl mice exposed neonatally to zearalenone an estrogenic mycotoxin *Cancer Lett*, 46: 225-228
- Wong C., Kelce W. R., Sar M., Wilson E. M. (1995): Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. *J Biol Chem* 270: 19998-20003

Použité internetové odkazy:

[2011-01-30]: www.ffcr.or.jp

[20011-01-25]: <http://chemfinder.camsoft.com>

[20011-02-01] <http://www.zdn.cz/clanek/priloha-pacientske-listy/endokrinni-system-452784>

[20011-02-03] http://kidshealth.org/parent/general/body_basics/endocrine.html

[20011-02-03] <http://www.all-science-fair-projects.com>

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Hatef A., Alavi S. M. H., Linhartova Z., Rodina M., Policar T., Linhart O. (2010): In vitro effects of Bisphenol A on sperm motility characteristics in *Perca fluviatilis* L. (Percidae; Teleostei). *J Appl Ichtyol* (26): 696-701

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka