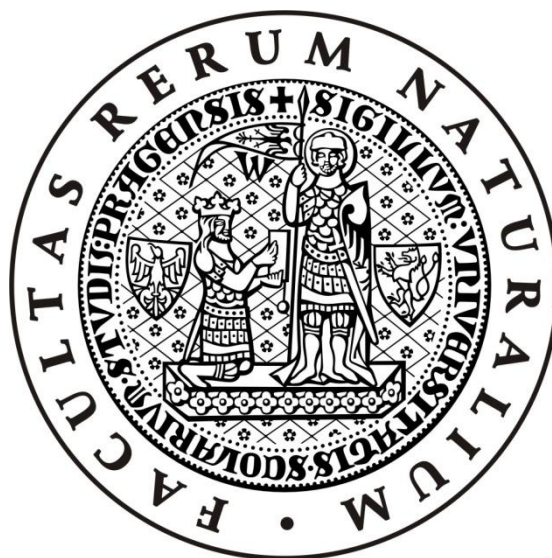


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

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

Magda Tejnická

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Kateřina Hortová, PhD.

# **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury.

Ve Vraném nad Vltavou dne 6. 9. 2010

.....

Magda Tejnická

## **Poděkování**

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

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

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

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

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

# Obsah

<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>8</b>
<b>1. ÚVOD A CÍLE .....</b>	<b>10</b>
CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	12
1.1 Studie vlivu vybraných estrogenů na kapacitaci myších spermií in vitro s detekcí míry tyrozinové fosforylace.....	12
1.2 Hodnocení stavu akrozómu myších spermií po kalcium ionoforem indukované akrozomální reakci in vitro.....	12
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>13</b>
2.1 STAVBA A FUNKCE SAVČÍ SPERMIE .....	13
2.1.1 Hlavička spermie .....	14
2.1.2 Jádro .....	14
2.1.3 Akrozóm spermie a jeho funkce .....	15
2.1.2 Bičík .....	16
2.2 ŽIVOT SPERMIE .....	17
2.2.1 Vývoj spermie .....	17
2.2.2 Oplodnění .....	18
2.3. KAPACITACE .....	19
2.3.1 Biologie in vivo kapacity .....	20
2.3.2 Tyrozinová fosforylace.....	22
2.3.3 Hyperaktivace spermie .....	23
2.3.4 Kapacity in vitro.....	24
2.3.5 Dekapacitační faktory .....	25
2.4 AKROZOMÁLNÍ REAKCE.....	25
2.4.1 Indukce akrozomální reakce.....	25
2.4.2 Molekulární mechanismy akrozomální reakce .....	27
2.4.3 Vazba spermie na vajíčko .....	28
2.4.4 Úloha fosfolipáz v indukcii akrozomální reakce .....	28
2.4.5 Role aktinu při spuštění akrozomální reakce.....	28
2.4.6 Induktory akrozomální reakce .....	29
2.4.7 Spontánní akrozomální reakce .....	29
2.4.8 Akrozomální reakce in vitro.....	29

2.5 ESTROGENY .....	30
2.5.1 Funkce estrogenů .....	31
2.5.2 Výskyt estrogenů .....	32
2.5.3 Struktura estrogenů.....	33
2.5.4 Biosyntéza estrogenů .....	33
2.5.5 Transportní proteiny estrogenů a metabolismus .....	35
2.5.6 Enzymový komplex aromatáza .....	35
2.5.7 Estrogeny v dráze buněčného přežití.....	36
2.5.8 Terapeutické estrogeny a syntetické estrogeny .....	36
2.5.9 Estrogenní receptory .....	37
2.5.10 Mechanismus účinku estrogenů .....	39
2.5.11 Role receptorů GPR30 v rychlé signalizační dráze .....	39
2.6 ROLE ESTROGENŮ V SAMČÍ REPRODUKCI .....	40
2.6.1 Estrogenní receptory u mužů.....	41
2.6.2 Estrogeny u myši.....	42
2.6.3 Knockout modely myši.....	43
2.7 VYLUČOVANÉ ESTROGENY .....	44
2.7.1 Hormony ve vodě.....	45
<b>3. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>46</b>
3.1 MATERIÁL.....	46
3.1.1 Chemikálie .....	46
3.1.2 Roztoky .....	47
3.1.3 Přístroje .....	49
3.1.4 Další použitý materiál.....	50
3.1.5 Protilátky a fluorescenčně značené próby .....	50
3.1.6 Živočišný materiál pro odběr spermií .....	50
3.2 METODY.....	51
3.2.1 Příprava jednotlivých koncentrací estrogenů .....	51
3.2.2 Kapacitace spermií in vitro .....	51
3.2.3 Indukce akrozomální reakce in vitro.....	53
3.2.4 Hodnocení akrozomální reakce .....	53
3.2.5 Fluorescenční metody.....	54
3.2.6 SDS – PAGE elektroforéza a imunodetekce proteinů.....	54
4.1 HODNOCENÍ TYROZINOVÉ FOSFORYLACE V HLAVIČCE SPERMIE MYŠI PO KAPACITACI IN VITRO A STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ .....	57
4.1.1 Statistické vyhodnocení průběhu tyrozinové fosforylace při kapacitaci in vitro u spermií ovlivněných 17- $\beta$ -estradiolem (Tabulka 4.1) .....	59

4.1.2 Statistické vyhodnocení průběhu tyrozinové fosforylace při kapacitaci in vitro u spermií ovlivněných estronem (Tabulka 4.2).....	60
4.1.3 Statistické vyhodnocení průběhu tyrozinové fosforylace při kapacitaci in vitro u spermií ovlivněných estriolem (Tabulka 4.3).....	61
4.1.4 Statistické vyhodnocení průběhu tyrozinové fosforylace při kapacitaci in vitro u spermií ovlivněných 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem (Tabulka 4.4) .....	62
4.2 ELEKTROFORETICKÉ HODNOCENÍ TYROZINOVÉ FOSFORYLACE Z LYZÁTU CELÝCH SPERMIÍ .....	63
4.2.1 Tyrozinová fosforylace u spermií ovlivněných 17- $\beta$ -estradiolem.....	63
4.2.2 Tyrozinová fosforylace u spermií ovlivněných estronem .....	64
4.2.3 Tyrozinová fosforylace u spermií ovlivněných estriolem .....	65
4.2.4 Tyrozinová fosforylace u spermií ovlivněných 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem.....	66
4.3 HODNOCENÍ INDUKOVANÉ AKROZOMÁLNÍ REAKCE A STATISTICKÉ ZHODNOCENÍ ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ .....	68
4.3.1 Statistické vyhodnocení výsledků indukované akrozomální reakce in vitro u spermií ovlivněných 17- $\beta$ -estradiolem (Tabulka 4.5).....	70
4.3.2 Statistické vyhodnocení výsledků indukované akrozomální reakce in vitro u spermií ovlivněných estronem (Tabulka 4.6) .....	71
4.3.3 Statistické vyhodnocení výsledků indukované akrozomální reakce in vitro u spermií ovlivněných estriolem (Tabulka 4.7).....	72
4.3.4 Statistické vyhodnocení výsledků indukované akrozomální reakce in vitro u spermií ovlivněných 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem (Tabulka 4.8).....	73
<b>5. DISKUZE.....</b>	<b>74</b>
<b>6. ZÁVĚR.....</b>	<b>80</b>
<b>7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>81</b>

## Abstrakt

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

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

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

Na laboratorních myších kmene BALB/c byl detailně studován vliv estrogenních hormonů 17- $\beta$ -estradiolu, estronu, estriolu a syntetického 17- $\alpha$ -ethinylestradiolu na kapacitaci a akrozomální reakci *in vitro*. Efekt daných látek byl hodnocen mírou tyrozinové fosforylace v hlavičce spermií při kapacitaci *in vitro* a to jak pod fluorescenčním mikroskopem, tak pomocí elektroforézy. Paralelně byl rovněž hodnocen stav akrozómu po kalcium ionoforem indukované akrozomální reakci.

Z našich výsledků lze usuzovat, že rostoucí koncentrace estrogenů v životním prostředí může představovat možné riziko v pozměňování několika mechanismů přispívajících ke schopnosti spermie oplodnit vajíčko.

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

## Abstract

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

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

For many years, estrogens have been considered typically female sex hormones. It is now certain that they are also very important in the regulation of male reproduction. Endogenous estrogens in mammalian males are an important part of the endocrine system. Estrogens play an important role in the development of germ cells, spermatogenesis and processes leading to successful egg fertilization such as a capacitation or acrosomal reaction. Tyrosine phosphorylation is one of the essential steps for the properly ongoing process of capacitation in sperm followed by a fusion of plasma and outer acrosomal membrane of sperm and sequential exocytosis of the acrosomal vesicle followed by sperm-egg fusion.

We used laboratory strain of BALB/c mice for a detailed study of the effect of three natural estrogenic hormones 17- $\beta$ -estradiol, estron, estriol and synthetic 17- $\alpha$ -ethinylestradiol on capacitation and acrosomal reaction *in vitro*. The effect of these estrogens was evaluated by the ratio of tyrosine phosphorylation in a sperm head during capacitation *in vitro* with the using of the fluorescent microscope and also SDS PAGE electrophoresis. Simultaneously, we evaluated the state of the acrosome after calcium ionophore induced acrosomal reaction.

Our results indicate that the increasing concentration of estrogens in the environment can be a potential risk in altering specific mechanisms of sperm ability to fertilize the egg.

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



## Seznam zkratek

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

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

# 1. Úvod a cíle

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

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

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

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

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

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

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

## **Cíle diplomové práce**

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

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

Míru tyrozinové fosforylace jsme zjišťovali dvěma způsoby:

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

#### **1.1.2 Elektroforetickým hodnocením tyrozinové fosforylace z lyzátu celých spermií.**

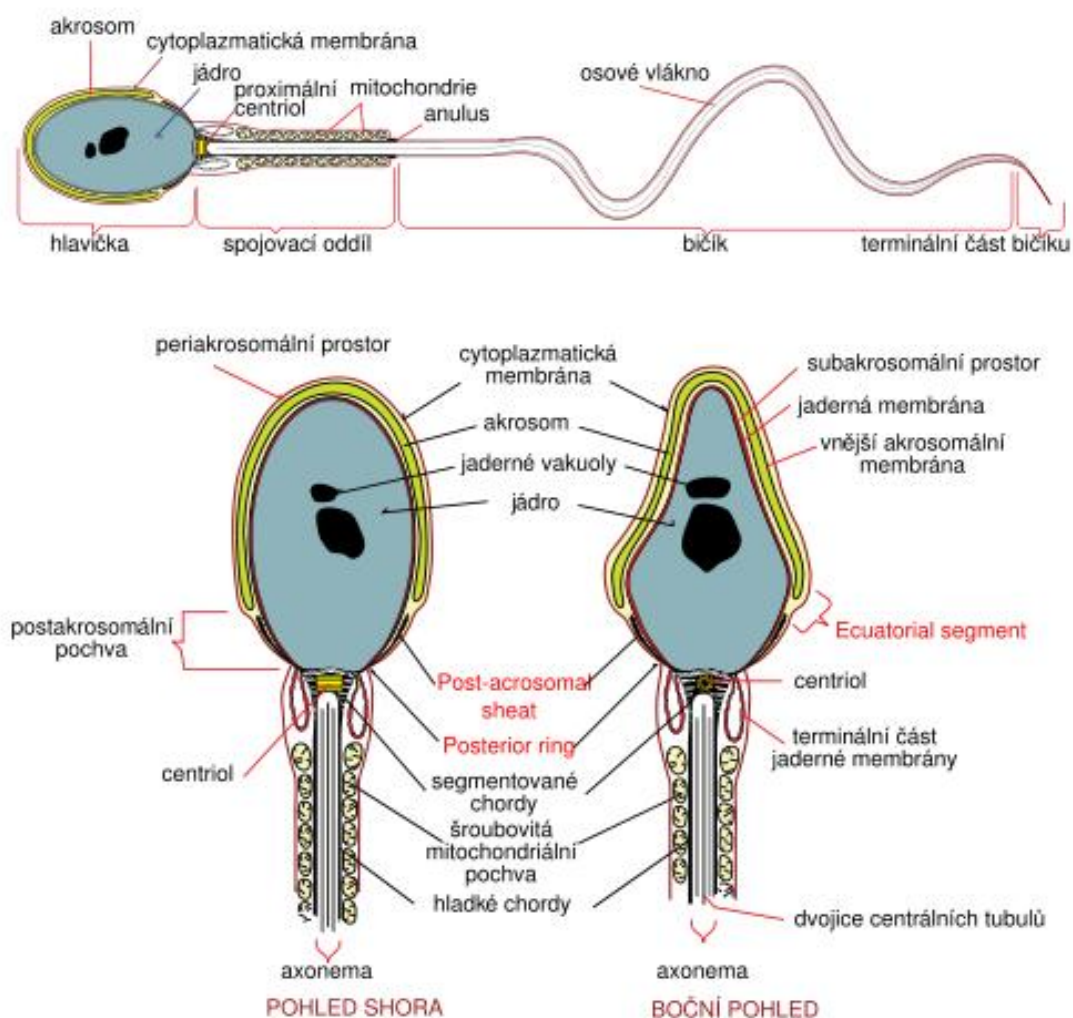
### **1.2 Hodnocení stavu akrozómu myších spermií po kalcium ionoforem indukované akrozomální reakci *in vitro*.**

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

## 2. Literární přehled

### 2.1 Stavba a funkce savčí spermie

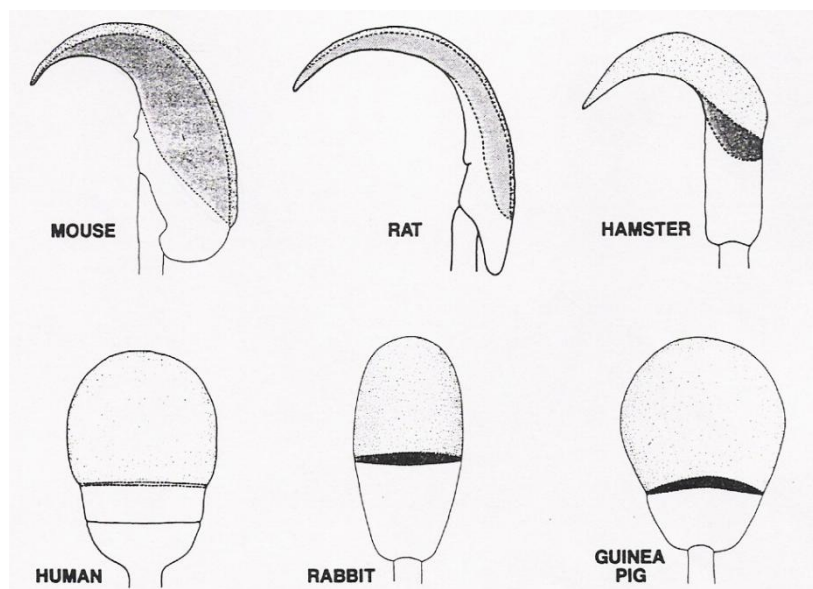
Spermie jsou samčí gamety s vysoce specializovanou funkcí a strukturou. Jsou to haploidní buňky, které jsou konečným stádiem procesu spermatogeneze probíhajícím ve varlatech, přesněji v semenotvorných kanálcích. Po vypuzení z těchto kanálek se hromadí v nadvarleti, kde dosahují schopnosti pohybu. Skládají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



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

### 2.1.1 Hlavička spermie

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



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

### 2.1.2 Jádro

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

### 2.1.3 Akrozóm spermie a jeho funkce

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

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

#### Struktura akrozómu

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

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

#### Složky akrozómu

Akrozóm obsahuje velké množství rozmanitých enzymů, některé z nich jsou specifické jen pro spermatogenní buňky (akrozin, kyselá fosfatáza,  $\beta$ -galaktosidáza, fosfolipáza, hyaluronidáza, neuraminidáza), jiné enzymy – kyselé hydrolázy se běžně vyskytují v lysozómech (Eddy & O'Brien 1994).



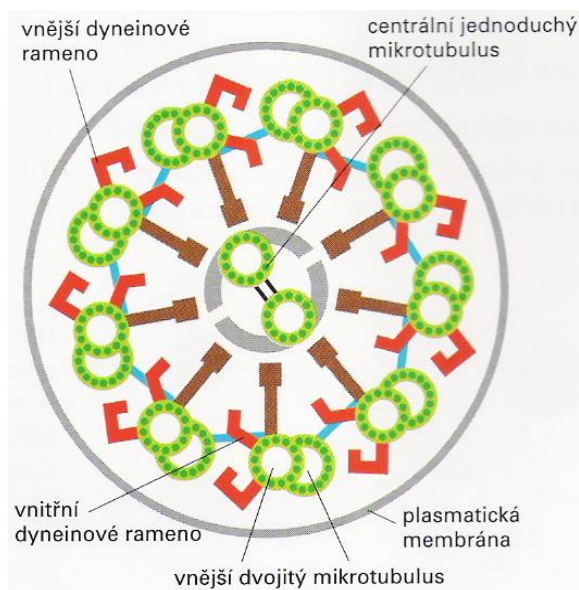
Nejlépe prozkoumaným enzymem je akrozin z rodiny serinových proteáz, který se v akrozómu vyskytuje ve formě neaktivního zymogenu proakrozinu a v průběhu akrozomální reakce (AR) je štěpen na enzymaticky aktivní akrozin (Yanagimachi 1994).  $\alpha$ -Akrozin je C-koncovou částí přichycen k vnitřní akrozomové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

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

Ostatní enzymy akrozómu napomáhají průniku skrz kumulární matrix.

### 2.1.2 Bičík

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



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

## 2.2 Život spermie

### 2.2.1 Vývoj spermie

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

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

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

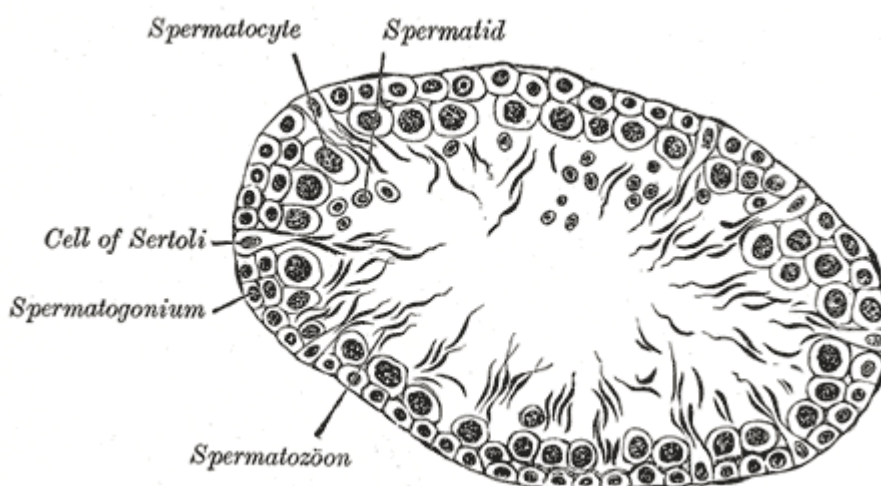
Při spermatogenezi nejdříve dochází k mitotickému dělení spermatogonií, pohlavních kulovitých samčích buněk, za tvorby primárních spermatocytů (2n). Spermatocy-

ty I. řádu se dělí prvním meiotickým dělením, při kterém vznikají spermatocyty sekundární (n). U spermatocytů II. řádu probíhá druhé meiotické dělení za vzniku spermatid, které se už dále nedělí.

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

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

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



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

### 2.2.2 Oplodnění

Spermie opouštějí nadvarle chánovodem. Při jedné ejakulaci u člověka se uvolní 2–4 ml ejakulátu obsahující asi 100–120 mil. spermií/ml. Pokud počet spermií klesne pod 20–50 mil. nebo je malé množství ejakulátu, je muž neplodný. Ejakulát koaguluje, ale během 15–30 minut opět zkapalní. Oplozovací schopnost si spermie zachovávají 22–24 h

po ejakulaci. Pohybují se rychlostí 3–6 mm/min. Ve vývodných cestách ženy spermie vyhledávají teplo, a tím také vajíčko. Samčí spermie nejsou schopné oplodnit vajíčko ihned po ejakulaci. Vyžadují určitou fázi pobytu v samičím reprodukčním traktu, aby se staly funkčně způsobilé k oplození (Visconti *et al.* 1995). Pouze pohyblivé spermie se po přibližně dvou hodinách dostanou do nálevky vejcovodu, kde nastane oplodnění vajíčka. Při průchodu samičím pohlavním ústrojím podstupují četné biochemické a fyziologické změny, souhrnně označovány jako kapacitace (Abou-haila & Tulsiani 2009, Yanagimachi 1994).

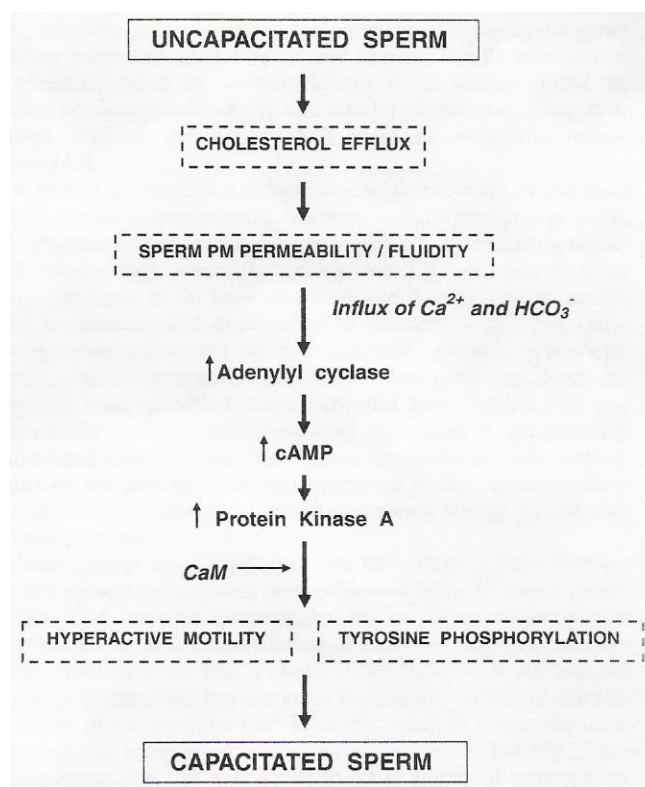
### 2.3. Kapacitace

Savčí spermatické buňky prodělávají neustálé změny během spermatogeneze ve varlatech, zrání v nadvarlatech a v samičím reprodukčním traktu v průběhu kapacitace (Tulsiani *et al.* 1998). Proces kapacitace je konečný krok zrání savčích spermií a je potřeba pro dosažení schopnosti spermie oplodnit vajíčko (Baldí *et al.* 2000). Historicky byla kapacitace definována jako časový interval inkubace spermie (*in vivo* nebo *in vitro*), který je nutný k dosažení zralosti spermie (Chang 1984). Tento krok je biochemický proces, *in vivo* nastává po ejakulaci v ženském reprodukčním traktu, *in vitro* kapacitace může proběhnout v ejakulátu nebo ve vzorku odebraném z nadvarlete (Visconti *et al.* 1995). Kapacitační reakce zahrnuje (obr. 2.5), mimo jiné, pohyb iontů přes plazmatickou membránu, vyvazování cholesterolu tzn. změnu fluidity membrány, nárůst cyklického adenosin monofosfátu (cAMP), tyrozinovou fosforylaci (p-Tyr) mnoha proteinů a v neposlední řadě polymerizaci aktinu, která je závislá na vazbě adenosin trifosfátu (ATP), následně prudkou depolymerizaci aktinu, čímž je navozena akrozomální reakce.

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

Nyní může dojít k akrozomální reakci, která vede k vylití akrozómu, penetraci ZP a oplodnění vajíčka (Yanagimachi 1994, Tulsiani *et al.* 1997).

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



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

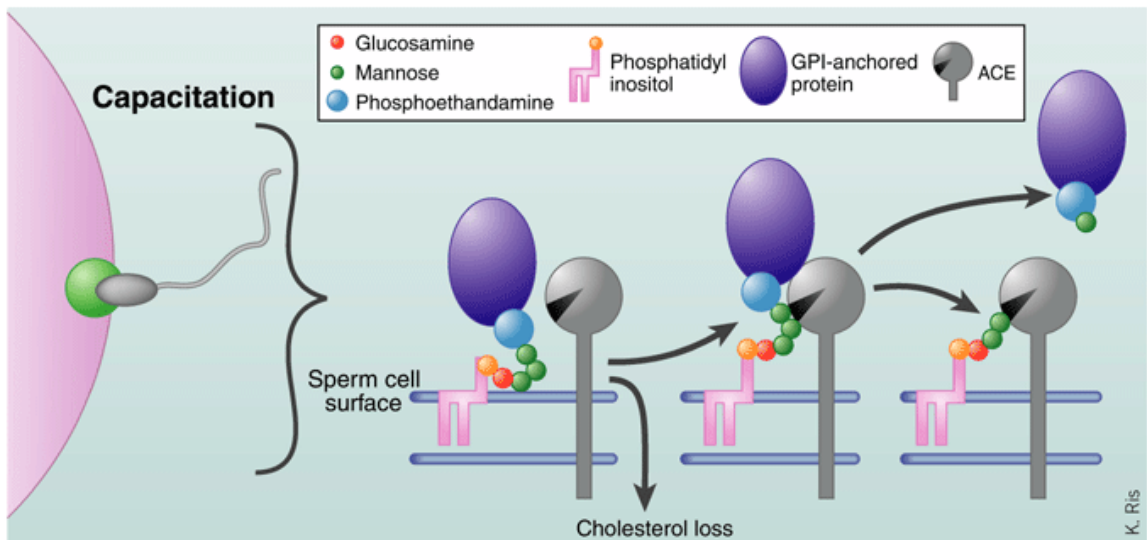
### 2.3.1 Biologie *in vivo* kapacitace

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

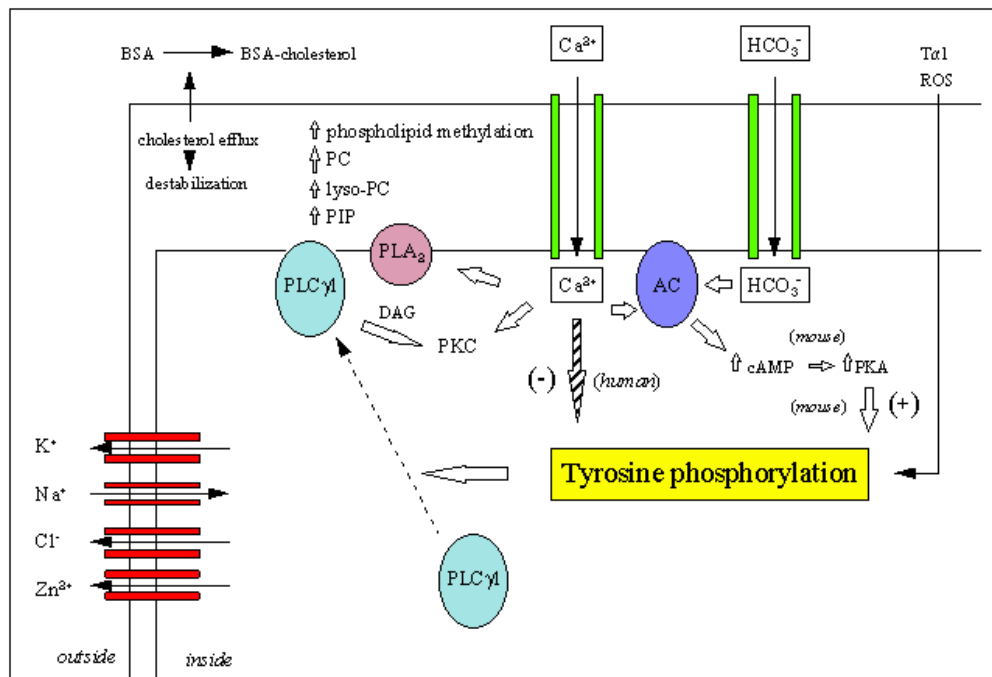
je enzym přítomen v akrozómu i na povrchu spermie (Meyers & Rosenberger 1999), dovolující bezpečný průchod kapacitované spermii se stále intaktním akrozómem.

Změny probíhající na povrchu ejakulované spermie při *in vivo* kapacitaci zahrnují: odstranění adsorbovaných proteinů a glykoproteinů ze semenné plazmy, pozměnění (např. metylace fosfolipidů) a přebudování molekul plazmatické membrány (PM), výsledkem je odhalení receptorů na spermii důležitých pro rozpoznání a vazbu na vajíčko (Jones 1998, Yanagimachi 1994). Efflux cholesterolu (obr. 2.6) mění propustnost a tekutost PM, což umožňuje vtok iontů  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{HCO}_3^-$ , které aktivují intracelulární druhé posly (Abou-haila & Tulsiani 2009, Tulsiani *et al.* 2003). Spustí se signální kaskáda (obr. 2.7) zahrnující a) aktivaci adenylát cyklázy (AC) a produkci cAMP; b) stimulaci protein kinázy A (PKA) a dalších proteinových kináz; c) tyrozinovou fosforylaci skupiny molekul spermie; d) hyperaktivaci spermii (Zeng *et al.* 1995, Visconti *et al.* 1999).

Vtok  $\text{HCO}_3^-$  je umožněn  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  iontovou pumpou a je jí přisuzován vzrůst vnitrobuněčného pH (Demarco *et al.* 2003). Hladina  $\text{HCO}_3^-$  je nízká v nadvarleti, ale vysoká v semenné plazmě a ve vejcovodu. Tyto změny v koncentraci  $\text{HCO}_3^-$  v samčím a samičím reprodukčním traktu hrají důležitou roli v potlačení kapacitace v nadvarleti a naopak podporu tohoto děje *in vivo* v samičím rozmnožovacím ústrojí (Naz & Rajesh 2004). Kapacitace indukovaná některými biologickými a farmakologickými sloučeninami je regulována různými signálními dráhami, které zahrnují PKA, protein kinázu C (PKC) a protein tyrozin kinázu (PTK) (Thundathil *et al.* 2002). cAMP/PKA aktivita je spojená tyrozinovou fosforylací proteinů (Aitken *et al.* 1998). Hodně efektů cAMP je zprostředkovaných přes aktivaci PKA, která nepřímo podporuje tyrozinovou fosforylaci proteinů fibrózní pochvy fosforylací Ser/Thr zbytků a aktivaci tyrozin kináz (Leclerc *et al.* 1996). Mitogen aktivující protein kinázy (MAPK) patří do rodiny extracelulárních kináz regulujících signály (ERK) a jsou přítomny u spermii, kde jsou zapojeny do funkce spermii (Naz *et al.* 1992). MAPK dráhy se účastní 3 sekvenčně aktivované kinázy: MAPK kináza kinázy (Ser/Thr), MAPK kináza a MAPK (Kolch 2000).



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



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

### 2.3.2 Tyrozinová fosforylace

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

ans, 1983). U proteinů spermie může fosforylace probíhat na tyrozinových, serinových a threoninových zbytcích, ale tyrozinová fosforylace je nejdůležitější a je primárním ukazatelem procházejících signálních drah v buňce (Naz & Rajesh 2004).

Zdá se, že existují tři hlavní cesty přenosu signálu vedoucího ke kapacitaci. 1) cAMP/PKA dependentní, cAMP je druhý posel aktivující PKA, která patří mezi serin/threoninové kinázy a reguluje p-Tyr (Thundathil *et al.* 2002). 2) Dráha receptorové tyrozin kinázy (př. Epidermální růstový faktor - EGF) a 3) Nereceptorová protein tyrozin kinázová dráha (Naz & Rajesh 2004).

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

U proteinů v oblasti akrozomální hlavičky souvisí p-Tyr se schopností interagovat se ZP. U myši byly popsány 2 chaperony endoplasmu (erp99) a heat shock protein 60 (hsp60), které se vyskytují na plazmatické membráně hlavičky spermie v oblasti podílející se na vazbě k ZP. Aktivací těchto dvou proteinů, pomocí p-Tyr během kapacitace, dochází ke spuštění konformačních změn usnadňujících sestavení ZP receptorového komplexu na povrchu spermie a následné fúzi membrán spermie a vajíčka (Asquith *et al.* 2004, Naz & Rajesh 2004). Visconti *et al.* (1995) zkoumal souvislost mezi mírou tyrozinové fosforylace a stavem kapacitace u myších spermií. Pozoroval časově závislý vzrůst p-Tyr specifických proteinů o velikosti od 40 do 120 kDa, který koreloval s kapacitačním stavem. V průběhu kapacitace se procento spermií, kde dochází k p-Tyr na hlavičce spermie, mění. V prvních 120 min kapacitace dochází k p-Tyr v hlavičce spermie u 10 – 15 % celkové populace spermií. Po 180 min kapacitace dojde k zpomalení p-Tyr, která probíhá už jen u 7 – 9 % (Dvořáková-Hortová *et al.* 2008).

### **2.3.3 Hyperaktivace spermie**

Spermie získá hyperaktivní motilitu díky tyrozinové fosforylaci proteinů bičíku (Holt & Harrison 2002). Spermie uvolněné ze semenné plazmy plavou v přímé trajektorii a rychleji než hyperaktivované. Bičík hyperaktivovaných spermií se mrská v hlubokých ohybech, pohyb je méně symetrický. Tento pohyb se liší v tekutinách s různou viskozitou a elasticitou a je nezbytný pro průchod oviduktním hlenem a kumulární matrix, vazbu na



vajíčko a průběh akrozomální reakce (Yanagimachi 1994, Suarez & Ho 2003). Pro iniciaci a udržení hyperaktivované motility jsou nutné extracelulární  $\text{Ca}^{2+}$  ionty působící společně s axonemou bičíku na spuštění hyperaktivace (Suarez & Ho 2003). Po proběhlé kapacitaci se na povrchu bičíku spermie odhalí receptory, které po aktivaci stimulují G protein, který pro změnu aktivuje  $\text{Ca}^{2+}$  kanály dovolující krátkodobý vstup  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Tyto  $\text{Ca}^{2+}$  stimulují adenylát cyklázu a tím se zahájí syntéza cAMP a kinázová kaskáda (Abou-haila & Tulsiani 2009). Zmíněný G-protein ještě aktivuje  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  kanály (antiport), čímž dochází ke vzrůstu vnitrobuněčného pH (Yanagimachi 1994). Hyperaktivace může být kritická pro úspěch oplození, protože zvyšuje zdatnost spermie oddělit se od stěny vejcovodu, pohybovat se vzhůru spletitou dutinou vejcovodu, prostupovat hlenovým obsahem a proniknout *zona pellucida* vajíčka (Suarez & Ho 2003).

#### 2.3.4 Kapacitace *in vitro*

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

V kapacitačním médiu musí být obsažena příslušná koncentrace elektrolytů, zdrojů energie, proteiny bovinního sérum albuminu (BSA),  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{NaHCO}_3$ . Klíčové sekundární signální molekuly regulující kapacitaci spermií jsou  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  a cAMP (Abou-haila & Tulsiani 2009). Na myším modelu bylo předvedeno, že podmínky napomáhající kapacitaci spermiím z *cauda epididymis* podněcují tyrozinovou fosforylací skupiny proteinů o velikosti 40 – 120 kDa.

Sérum albumin, obvykle hovězí BSA, je používán jako vychytávač cholesterolu z plazmatické membrány spermie. Vychytávání cholesterolu je nezbytné v regulaci intracelulární signalizace během kapacitace.

Výsledkem přidání  $\text{HCO}_3^-$  do média je stimulace pohyblivosti spermie a její hyperaktivace zprostředkované aktivací AC a tyrozinovou fosforylací proteinu 3 zakotvující proteinkinázu A (AKAP3), což doplňuje PKA (Luconi *et al.* 2004).

### 2.3.5 Dekapacitační faktory

Kapacitaci předchází ztráta nebo přemístění povrchových inhibičních faktorů, které vznikají sekrecí nadvarlat a přídatných žláz, což vyvolá rychlý vzrůst schopnosti oplodnit vajíčko. Dekapacitační faktory (DF) na PM spermií jsou proteiny: protein vázající mastné kyseliny, sekreční protein bohatý na cystein (CRISP1), fosfatidylethanolamin vazebný protein (PBP) a bezejmenný dekapacitační faktor 10 (DF10) (Nixon *et al.* 2006).

DF je glykoprotein o velikosti 40 kDa vázající se na GPI-kotevní membránový receptor umístěný v postakrozomální oblasti hlavičky nekapacitované spermie z ocasu nadvarlete. DF pozitivně ovlivňují aktivitu  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázy PM. Disociací DF se redukuje aktivita  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázy, což vede ke vzrůstu vnitrobuněčné hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a doprovodné stimulaci kapacity. DF brání předčasnému zahájení kapacity (Nixon *et al.* 2006).

## 2.4 Akrozomální reakce

Při akrozomální reakci dochází k fúzi plazmatické membrány a vnější akrozomální membrány (obr. 2.8), což vede k uvolnění akrozomálních enzymů rozrušující obaly vajíčka a k vystavení nových membránových domén (Breitbart & Spungin 1997). Spermie může potom proniknout do vajíčka a oplodnit ho. Klinické studie identifikovaly skupinu mužů, jejichž neplodnost byla spojena s nesprávnou akrozomální reakcí (Benoff 1997, Abou-haila & Tulsiani 2009).

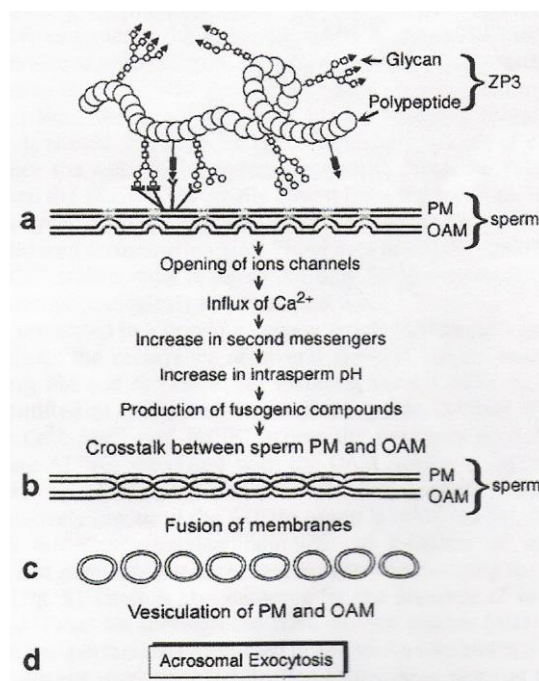
### 2.4.1 Indukce akrozomální reakce

Uvažuje se, že signálem zahajujícím akrozomální reakci (AR) u myši a několika jiných druhů je rozpoznání a vazba receptorů kapacitované spermie s ligandy na ZP (Tulsiani *et al.* 1997). Specifické cukerné zbytky na ZP3 jsou rozpoznávány komplementárními cukr vazebnými enzymy (glykosidázami, glykosyltransferázami) nebo lektinu podobnými proteiny na povrchu spermie a indukují AR pouze při kovalentní vazbě na proteinovou kostru (Loeser & Tulsiani 1999). Proteinová kostra ZP3 glykoproteinu napomáhá seskupení povrchových receptorů spermie. ZP se váže k nejméně dvěma povrchovým receptorům na plazmatické membráně spermie (Breitbart & Spungin 1997).

Hladina  $\text{Ca}^{2+}$  ve spermii je před navázáním na ZP velmi nízká, ale v extracelulární tekutině je mnohem vyšší. Kontakt gamet opačného pohlaví otevírá  $\text{Ca}^{2+}$  kanály, což vede k trvalému přibývání  $\text{Ca}^{2+}$  a dalších druhých posílů cAMP, inositol tri-fosfátu ( $\text{IP}_3$ ). Vzrůst cAMP aktivuje cAMP-dependentní (protein kináza A),  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentní a fosfolipid-dependentní kinázy a zahajuje signální kaskádu, při které se zvyšuje vnitřní pH spermie. V odpovědi na tyto změny začne depolymerizace F-aktinu, který tvoří fyzickou bariéru mezi PM spermie a ve vnější akrozomální membráně (OAM), na monomerní G-aktin. Vzrůst  $\text{Ca}^{2+}$  také aktivuje fosfolipázu  $\text{A}_2$ , která štěpí mastné kyseliny membránových fosfolipidů na lysofosfolipidy podporující fúzi membrán a jejich vezikulaci. Formace váčků z PM a OAM dovoluje uvolnění složek akrozómu do místa vazby spermie k vajíčku (Abou-haila & Tulsiani 2009). Silný účinek hydrolytických enzymů umožní hyperaktivované spermii vniknout do vajíčka a oplodnit ho (Abou-haila & Tulsiani 2000).

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

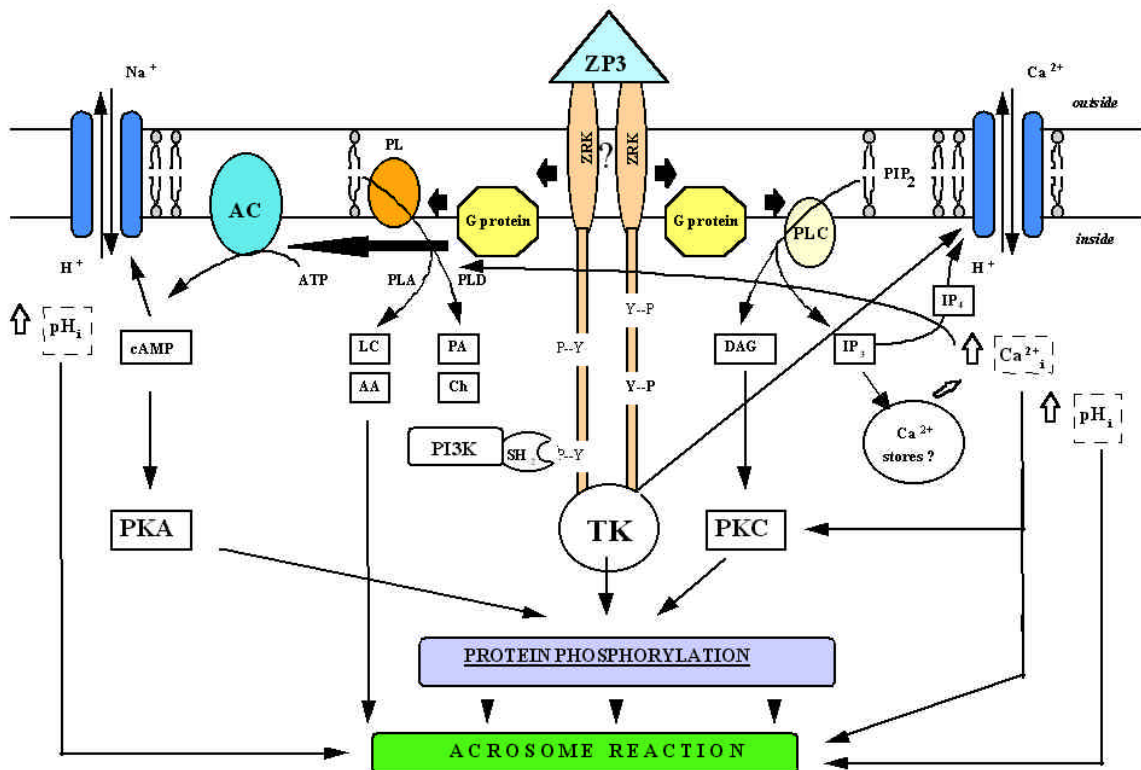
Vazba kapacitované spermie na ZP dále zvyšuje obsah  $\text{Ca}^{2+}$  iontů uvnitř spermie a začíná nová signální kaskáda, která otevírá  $\text{Ca}^{2+}$  kanály v PM spermie a OAM a vyvolá vylití akrozómu. Hydrolytické působení akrozomálních enzymů uskutečněné v místě vazby spermie k vajíčku spolu s mrskavým pohybem hyperaktivované spermie jsou důležité faktory řídící penetraci ZP a oplození vajíčka (Abou-haila & Tulsiani 2009).



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

## 2.4.2 Molekulární mechanismy akrozomální reakce

ZP se váže k nejméně dvěma různým receptorům na PM (obr. 2.9). Jeden z receptorů je spojený s G-proteiny aktivující PLC $\beta$ , druhý tyrozin kinázový (TK) aktivuje PLC $\gamma$ . Vazba na receptor reguluje AC vedoucí k zvýšení cAMP a zapnutí PKA. PKA otevírá napětově ovládaný Ca<sup>2+</sup> kanál v OAM, který vypouští Ca<sup>2+</sup> zevnitř akrozómu do cytosolu. Toto je první zvýšení hladiny Ca<sup>2+</sup> iontů vedoucí k aktivaci PLC $\gamma$ , která hydrolyzuje fosfatidyl-inositol bisfosfát (PIP<sub>2</sub>) na diacylglycerol (DAG) a IP<sub>3</sub> vedoucí k translokaci PKC do PM a její aktivaci (Baldi *et al.* 2000). PKC otevírá napětově ovládaný Ca<sup>2+</sup> kanál v PM, otevírá se i IP<sub>3</sub> aktivovaný vápníkový kanál, což vede k druhé vlně Ca<sup>2+</sup> v cytosolu (Breitbart & Naor 1999). Vzrůst Ca<sup>2+</sup> iontů vede k fúzi membrán a exocytóze akrozómu. Gi i TK receptory mohou také zapínat Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> pumpu způsobující zásaditost cytosolu. PKC aktivuje fosfolipázu A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) generující kyselinu arachidonovou z membránových fosfolipidů. (Breitbart & Spungin 1997).



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

### 2.4.3 Vazba spermie na vajíčko

Vazba spermie na vajíčko se odehrává ve dvou etapách. Nejdříve jsou kapacitované spermie volně a vratně přimknuty na ZP pomocí PM překrývající jejich akrozóm, potom dojde k pevné nevratné vazbě (Loeser & Tulsiani 1999). První interakce mezi spermii a vajíčkem u myši se účastní ZP3 vazebné glykoproteiny, které slouží jako primární vazebné místo a induktor AR díky glykanovým řetězcům a bílkovinné kostře molekul, která se propojuje a seskupuje receptory spermie (Loeser & Tulsiani 1999). Sekundární vazebná místa zajišťuje ZP2 glykoprotein na ZP vajíčka. Tato interakce zprostředkovaná cukernými zbytky spouští signální dráhu vedoucí k fúzi PM a OAM a následné AR. Tyto události jsou nejlépe prozkoumané u myši, ale u ostatních druhů živočichů se odehrávají podobně.

### 2.4.4 Úloha fosfolipáz v indukci akrozomální reakce

Fosfolipázy vyskytující se v akrozómu spermie jsou aktivovány pomocí  $\text{Ca}^{2+}$  a mají důležitou úlohu v exocytóze akrozómu.

Činností PLC se tvoří DAG, který aktivuje PKC a také reguluje působení fosfolipázy  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ).  $\text{PLA}_2$  je aktivována přes G-proteiny a PKA a PKC signální dráhu, která štípe zbytky mastných kyselin z fosfolipidů za vzniku lysofosfolipidů, což podporuje fúzi membrán (Spungin *et al.* 1995).

### 2.4.5 Role aktinu při spuštění akrozomální reakce

Cytoskelet v hlavičce spermie je bohatý na aktin a vyskytuje se ve formě filamentární (F-aktin) nebo v monomerním stavu (G-aktin). F-aktin poskytuje lešení k udržení PLC navázané na PM spermie a zajišťuje fyzickou bariéru, která brání fúzi OAM a PM spermie (Brener *et al.* 2003). Odpovědí na přibývání  $\text{Ca}^{2+}$  a zvyšování pH je depolymerizace F-aktinu na G-aktin, který se rozptyluje a tím se dostává PM blíže k OAM (Spungin *et al.* 1995).

#### 2.4.6 Induktory akrozomální reakce

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

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

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

#### 2.4.7 Spontánní akrozomální reakce

K této reakci dochází bez vnějšího stimulu. Věří se, že tato reakce je nefyziologická a závisí na různých faktorech např. na výběru kapacitačního média. U většiny savců jsou spermie, které prošly spontánní AR neschopné vazby a oplození vajíčka, nicméně současný výzkum poukazuje na možné výjimky (ústní prezentace na konferencích, Okabe *et al.*, Hortová *et al.*) Pokusem bylo zjištěno, že tyto spermie jsou schopné oplodnit vajíčko zbavené *zona pellucida* a zplodit normální potomky, to naznačuje nepřítomnost receptorů pro rozpoznání a vazbu spermií na ZP (Yanagimachi 1994).

#### 2.4.8 Akrozomální reakce *in vitro*

Pohyb  $\text{Ca}^{2+}$  iontů z extracelulárního média do nitra spermie je kritický krok, který reguluje vylití akrozómu (De Blas 2002). U několika druhů hlodavců jsou spermie, inkubované v médiu bez vápníku, neschopné projít AR, pokud se do média vápník nedodá. Kapacitované lidské spermie byly neschopné odpovědi nefyziologickému kalcium ionoforu do doby, než bylo toto činidlo přidáno do média s již obsaženým vápníkem. Přítomnost

cAMP může vyvolat kalcium ionofor-dependentní AR, dokonce když je vápník prakticky nepřítomný v médiu, ale tento cyklický nukleotid není náhradou za  $\text{Ca}^{2+}$  ionty při AR indukované ZP. cAMP může vynechat požadavek transportu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů jen v případě chemicky indukované AR (Abou-haila & Tulsiani 2009).  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní ATPáza spojená s OAM má funkci pumpy udržující v akrozómu hladinu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů poměrně nízkou, dokud je inhibována (Tulsiani *et al.* 1998). Do vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  a sestavení složek signální transdukční dráhy jsou zapojené další  $\text{Ca}^{2+}$  transportní kanály jako napětím ovládané kanály nebo  $\text{IP}_3$  kanály (O'Toole *et al.* 2000). V průběhu AR dochází k přerozdělení  $\text{Ca}^{2+}$  mezi OAM a PM z anteriorní oblasti do equatoriálního segmentu, kde membrány fúzí, což vede k exocytóze akrozómu (Abou-haila & Tulsiani 2009).

Son & Meizel (2003) nedávno publikovali výsledky o nikotinovém acetylcholinovém receptoru (nAChR) obsahující  $\alpha 7$  podjednotku, který u myších spermií hraje roli v AR iniciované ZP3 nebo acetylcholinem. Antagonisté nAChR jako bungarotoxin nebo conotoxin blokují AR, která byla spuštěna pomocí ACh nebo ZP získané z myších vajíček, ale neinhibují AR indukovanou kalcium ionoforem. To napovídá tomu, že  $\alpha 7$  podjednotka nAChR má úlohu až po influxu  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 2.5 Estrogeny

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

Fyziologie samčích gonád je zčásti pod kontrolou rovnováhy estrogenů a androgenů, s proteinem P450 aromatazou sloužící jako modulátor (Carreau & Hess 2010).

### 2.5.1 Funkce estrogenů

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

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

U myších samců se hladina estrogenu v séru pohybuje mezi 5 – 20 pg/ml (Yang 2006).

Estrogeny hrají zásadní roli v neuroendokrinní regulaci reprodukce. Hormon 17- $\beta$ -estradiol je nepostradatelný pro normální činnost neurosekrečního systému. 17- $\beta$ -estradiol působí buď prostřednictvím dvou podtypů jaderných estrogenních receptorů, ER $\alpha$  a ER $\beta$ , nebo přímo na membránové proteiny (Luconi *et al.* 2002). 17- $\beta$ -estradiol při fyziologické koncentraci (100 pM až 1 nM) zvyšuje Ca<sup>2+</sup> aktivované K<sup>+</sup> proudy přes ER $\beta$  (Nishimura *et al.* 2008). Během estru u myši se hladina 17- $\beta$ -estradiolu obsaženého v plazmě pohybuje mezi 10<sup>-11</sup> M až 10<sup>-10</sup> M (Bergman *et al.* 1992).

17- $\beta$ -estradiol indukuje rychlý vzrůst koncentrace Ca<sup>2+</sup> uvnitř buněk. Tento efekt je závislý na přítomnosti vápníku mimo buňky, proto není pozorovatelný v médiu bez vápníku. Křivka vzrůstu vápníku je dvoufázová a odpovídá dávce. První je v nanomolárním rozsahu (efektivní koncentrace 50 = 0.60  $\pm$  0.12 nmol/l) a druhá složka je v mikromolárním rozmezí (efektivní koncentrace 50 = 3.80  $\pm$  0.26  $\mu$ mol/l). 17- $\beta$ -estradiol



stimuluje tyrozinovou fosforylaci několika proteinů spermie zahrnující funkční estrogen receptorový protein (29 kDa) a určuje redukci odpovědi vápníku na progesteron, s výslednou inhibicí AR stimulované progesteronem. Nicméně nebyl doposud zjištěn přímý efekt 17- $\beta$ -estradiolu na AR. Vliv 17- $\beta$ -estradiolu na vápník je zprostředkován membránovým receptorem, který hraje roli ve ztlumení negenomické dráhy progesteronu během oplození (Luconi *et al.* 1999).

## 2.5.2 Výskyt estrogenů

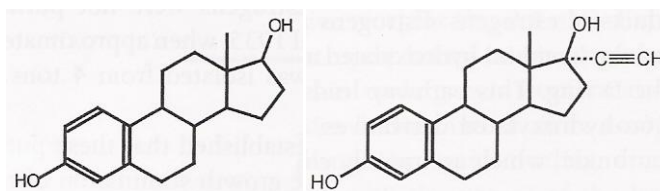
Tři hlavní druhy estrogenů jsou 17- $\beta$ -estradiol, estriol a estron (obr. 2.10). Syntéza estrogenů se liší podle pohlaví a věku. Estrogeny jsou primárně syntetizovány v rostoucích folikulech ve vaječnicích, ve žlutém tělísku a v placentě. LH stimuluje produkci estrogenu ve vaječnicích. Některé estrogeny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

Od první menstruace do menopauzy je primárním estrogenem 17- $\beta$ -estradiol, který je produkován hlavně v zárodečných buňkách vaječnicků. Hladina 17- $\beta$ -estradiolu kolísá v průběhu menstruačního cyklu a vzrůstá před ovulací.

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

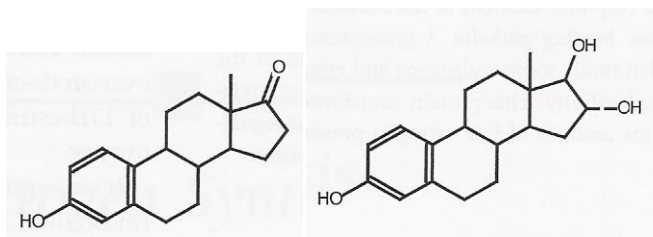
U mužů jsou syntetizovány ve varlatech, v nadvarlatech, ve spermatu stejně jako v mozku (Hess *et al.* 2001), více viz Kapitola 2.6.

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



17- $\beta$ -Estradiol

17- $\alpha$ -Estradiol



Estron

Estriol

**Obr. 2.10** Chemické vzorce estrogenů (Smith 1999).

### 2.5.3 Struktura estrogenů

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

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

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

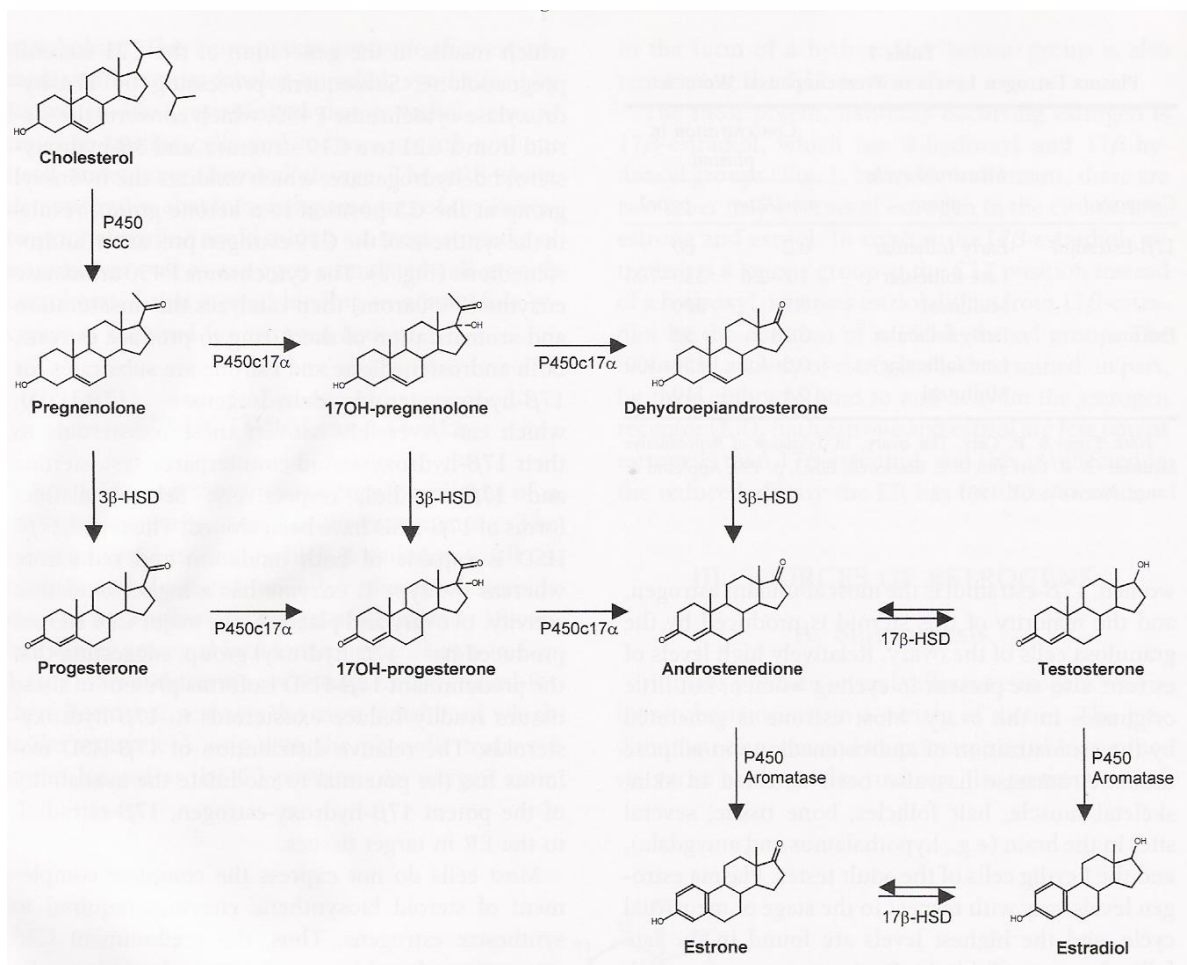
### 2.5.4 Biosyntéza estrogenů

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

Prvním krokem je odstranění postranního řetězce cholesterolu pomocí enzymu z cytP450, čímž vzniká pregnenolon (C21). Následně se uplatňuje 17- $\alpha$ -hydroxyláza cytP450, která převádí steroidy C21 na strukturu C19. 3- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza

poté oxiduje hydroxylovou skupinu na ketonovou skupinu na C3 pozici, čímž vzniká C19 estrogenní prekursor androstenedion, který prochází bazální membránou do okolních buněk granulózy. V buňkách granulózy se uplatňuje další enzym – cytochrom P450 aromatáza (P450arom), která katalyzuje aromatizaci A kruhu a dává vznik estronu. Estron i androstenedion jsou substráty pro enzym – 17- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázu, která zvrátne mění estron na 17- $\beta$ -estradiol a androstenedion na testosteron. 17- $\beta$ -estradiol může vznikat i z testosteronu za účasti aromatázy.

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



**Obr. 2.11** Schéma biosyntézy steroidních hormonů (Smith 1999).

### 2.5.5 Transportní proteiny estrogenů a metabolismus

Estrogeny jsou sekretovány do krevního oběhu, kde cirkulují ve vázané a nevázané formě. V krevní plazmě se ve volné formě vyskytují pouze 2-3 % 17- $\beta$ -estradiol, který je schopen vstoupit do cílové buňky a projevit své biologické účinky. Zbylé množství je vázáno na albumin (60 %) nebo na globulin vázající pohlavní hormony (SHBG) (38 %) a v takovémto stavu je inaktivní (Smith 1999). Estron se také majoritně váže na albumin. Při estrogenním transportu má vazba estrogenů na albuminy nižší afinitu než vysokoafinitní vazba na SHBG. Podle afinity k vazebným proteinům plazmy a jejich koncentraci se mění jejich metabolický obrat. Syntéza SHBG probíhá v játrech a je ovlivňována pohlavními steroidy. Estrogeny syntézu SHBG zvyšují, naopak androgeny a gestageny ji snižují, proto nacházíme vyšší koncentraci SHBG u žen než u mužů. Ženy s nízkou koncentrací SHBG (např. ženy obézní) mají sníženou vazebnou kapacitu pro estrogeny a až několikanásobně zvýšenou koncentraci volně cirkulujících estrogenů.

Játra jsou klíčovým orgánem pro metabolismus a vylučování estrogenů. Estrogeny jsou v játrech metabolizovány dvěma rozdílnými cestami. Hydroxylací v poloze 16 (kruhu D) vzniká slabý estrogen estriol a jeho izomer. Hydroxylací v polohách 2 a 4 (kruhu A) vznikají katecholestrogeny. Metabolity estrogenů jsou konjugovány v játrech a ledvinách na glukuronidy a sulfáty. Asi 50 % těchto konjugovaných derivátů je vylučováno močí. Další 50 % podléhá enterohepatální cirkulaci. Konjugované estrogeny jsou vylučovány žlučí do střeva, kde jsou hydrolyzovány. Asi 80 % estrogenů vyloučených žlučí se zpět absorbují a vrací se do jater, zbylých 20 % odchází se stolicí (Smith 1999).

### 2.5.6 Enzymový komplex aromatáza

Konverze androgenů na estrogeny je katalyzována enzymovým komplexem známým jako aromatáza, její funkcí je aromatizace A-kruhu androgenů na fenolický A-kruh charakteristický pro estrogeny, s doprovodnou ztrátou C19 methylové skupiny. Tento enzymový komplex je umístěn v endoplazmatickém retikulu buněk, kde je exprimován (Thompson & Siiteri 1974).

Skládá se ze dvou součástí: 1) první je cytochrom P-450, produkt genu CYP19A1. Je to hemový protein odpovídající za vazbu C19 steroidního substrátu a katalýzu reakcí vedoucí k tvorbě fenolického A-kruhu (Nebert *et al.* 1989). 2) Druhou část tvoří flavopro-

tein NADPH cytochrom P-450 reduktáza, která je esenciální v endoplazmatickém retikulu mnoha buněčných typů a převádí redukční ekvivalenty z NADPH na cytochrom P-450 (Graham-Lorence *et al.* 1991).

Aromatáza byla kromě buněk reprodukční soustavy, také nalezena v dalších tkáních a buňkách zahrnujících tukové buňky a pokožkové fibroblasty, kosterní svalstvo, vlasové folikuly, kostní tkáň, syncytiotrophoblast a několik míst v mozku (Nelson & Bulun 2001).

### **2.5.7 Estrogeny v dráze buněčného přežití**

U lidských ejakulovaných spermií 17- $\beta$ -estradiol prodlužuje životnost spermií prostřednictvím dráhy fosfatidylinositol-3-OH kinázy (PI3K)/Akt, kde jsou proteiny jako PDK1, Akt, GSK-3, Bcl-2, dohromady s ERK1/2, která je také spojena se signály buněčného přežití. 17- $\beta$ -estradiol stimuluje kaskádu aktivující ERK1/2 k inhibici apoptózy. Tato kináza slouží k zprostředkování buněčného přežití v odpovědi na různé růstové faktory přicházející z mnoha buněčných typů. ER  $\alpha$  interaguje s p55 regulační podjednotkou PI3K, zatímco ER  $\beta$  vzájemně působí s Akt1 (Aquila *et al.* 2004).

### **2.5.8 Terapeutické estrogeny a syntetické estrogeny**

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

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

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

Jako indikátory působení estrogenů na plod se používají hormony (diethylstilbestrol (DES), hormonální antikoncepce a estrogenu), kdy se přímým měřením jejich příjmu zjistí jejich zastoupení v těle. Mezi 425 dokumenty bylo 81 publikací s výsledkem, že prenatální účinek estrogenů nedokládá způsobení poruch ve vývoji samčích rozmnožovacích orgánů (Storgaard *et al.* 2006).

### 2.5.9 Estrogenní receptory

Estrogeny jsou lipofilní sloučeniny, tudíž mohou procházet difúzí přes plazmatickou membránu a vázat se k vysokoafinitním receptorovým proteinům. Estrogenní receptory (ERs) patří do rodiny jaderných receptorů, která zahrnuje receptory pro ostatní steroidy, vitamíny a thyroïdní hormony (Smith 1999). ERs jsou ligandem ovládané transkripční faktory, které vážou estrogeny s vysokou afinitou a pozitivně regulují expresi cílových genů v jádře. Změnou exprese těchto genů se kódují určité proteiny, čímž vznikne estrogení odpověď v cílových buňkách a tkáních (Beato *et al.* 1995, Hewitt *et al.* 2005). Většina receptorů je lokalizována do jaderného kompartmentu, ale některé mohou zůstat v cytoplasmě a mohou být translokovány do plazmatické membrány. Jaderné estrogení, progesteronové a androgení receptory byly nalezeny v plazmatické membráně u různých typů buněk (Levin 2008, Pedram *et al.* 2007).

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

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

Kromě klasických ERs existuje i membránový receptor, který se nazývá GPR30 a patří do rodiny receptorů spojených s G-proteiny (GPR) (Revankar *et al.* 2005, Prossnitz

*et al.* 2008). Po vazbě estrogenu na receptor se, v závislosti na umístění receptoru, spouští odlišné signální dráhy. Tyto dráhy mohou uvést do pohybu produkci oxidu dusnatého (NO), zaplavit buňku vápníkem nebo iniciovat uvolnění hormonu. Molekulární odpověď trvá vteřiny až minuty, což se dramaticky liší od odpovědi genovou expresí trvající hodiny až dny.

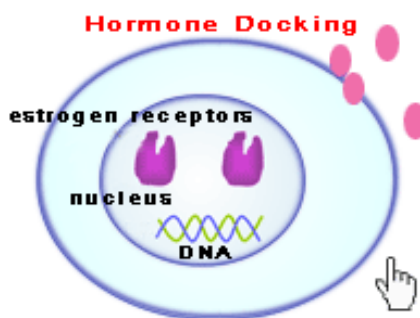
### **Estrogenní receptory $\alpha$ a $\beta$ (ER $\alpha$ a ER $\beta$ )**

Existují dva typy ERs a to ER $\alpha$  a ER $\beta$  (Gustafsson 1999), které mají shodnou selektivitu k ligandům, ale reakce na tyto estrogenní sloučeniny mohou být různorodé (Kuiper *et al.* 1997). Oba se skládají z 6 strukturních a funkčních domén. Obsahují několik trans-aktivačních domén, jejich DNA vazebné domény jsou identické z 96 %, ligand vazebné domény jsou homologní z 55 % (Smith 1999), ale rozdílné ve zkrácení N-koncové části u ER $\beta$  proteinu, který má molekulovou hmotnost jen 45 kDa na rozdíl od ER $\alpha$  (66 kDa) (Brown 1999). DNA vazebná doména je bohatá na cystein a je formovaná do motivu dvou „zinkových prstů“, jejichž struktura je stabilizována dvěma ionty zinku. Po homodimerizaci ER se touto doménou ER navazuje na estrogenní responzivní elementy (ERE), což je sekvence DNA, která kontroluje transkripci estrogen responzivních genů (Korach 2000).

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

### 2.5.10 Mechanismus účinku estrogenů

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



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

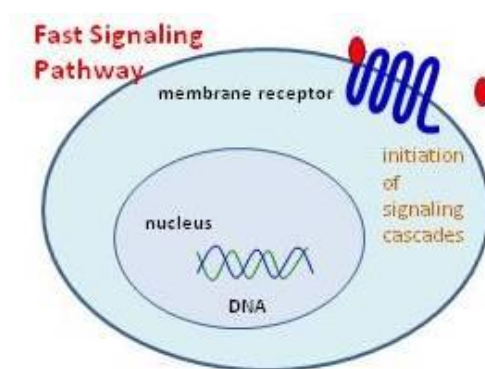
### 2.5.11 Role receptorů GPR30 v rychlé signalizační dráze

Další možné působení estrogenů se kromě klasických estrogenních receptorů ER $\alpha$  a ER $\beta$ , odehrává přes receptory růstových faktorů a GPR. GPR30 jsou receptory spojené s heterotrimerickými G-proteiny se 7 transmembránovými doménami (obr. 2.13), jejich N-konec směřuje ven z buňky a C-konec je lokalizován do cytoplazmy (Prossnitz *et al.* 2007). GPR30 po vazbě estrogenu zahajuje signální kaskádu zahrnující generaci druhých posílů Ca<sup>2+</sup>, cAMP, and NO, stejně jako aktivaci receptorových tyrozin kináz (Paul Micevych *et al.* 2009). GPR30 působí nezávisle na estrogenních receptorech (ER $\alpha$  a ER $\beta$ ) a přenáší signály přes EGF receptory (Filardo & Thomas 2005). Mohou zprostředkovávat i klasickou transkripční (genomickou) signalizaci. Na rozdíl od dlouhodobé genomové



odpovědi, je signalizační dráha pomocí GPR30 velmi rychlá (Revankar *et al.* 2005). Biochemické změny během kapacitace indukované estrogenu nastávají rychle díky negenomické akci ERs, protože spermie jsou považovány za transkripčně inaktivní (Aquila *et al.* 2004). GPR30 signalizace je doprovázená mobilizací vápníku, proto se signalizace přes tento typ receptoru zdá být dobrým kandidátem estrogenní dráhy na spermií.

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



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

## 2.6 Role estrogenu v samčí reprodukci

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

1997). 17- $\beta$ -estradiol je schopen ovlivnit kapacitaci a akrozomální reakci u lidských ejakulovaných spermii. (Aquila *et al.* 2004).

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

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

### 2.6.1 Estrogenní receptory u mužů

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

ER $\alpha$  se u mužů nevyskytuje ve varlatech, ale je primárně lokalizován v epitelu vývodných kanálků, kde je jeho exprese nejvyšší (Hess 2003). Regulují zde expresi proteinů zapojených ve vstřebávání tekutin. Vývodné kanálky jsou zodpovědné za vstřebávání až

90 % luminální tekutiny *rete testis* (Hess 2000). Při zablokování funkce estrogenního receptoru zůstane samec neplodný (Hess *et al.* 2001).

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

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

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

## 2.6.2 Estrogeny u myší

Myší zárodečné buňky ve varlatech obsahují enzym P450 aromatázu (P450arom), která přeměňuje androgeny na estrogeny. Tento náleznaznačuje, že tyto buňky jsou schopné produkovat estrogen. Další studie ukázaly, že P450arom je přítomná v zárodečných buňkách varlat i u jiných druhů živočichů (Janulis *et al.* 1996).

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

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

17- $\beta$ -estradiol stimuluje kapacitaci a akrozomální reakci po přidání k nekapacitovaným spermiím v porovnání s neovlivněnými spermiemi (Adeoya-Osiguwa *et al.* 2003). Nedávná studie *in vivo* (Spearow *et al.* 1999) ukázala významný genetický rozdíl v citlivosti k estrogenům mezi různými druhy myší. U vysoce senzitivního kmene myší

k estrogenům se varlata samců zmenšila a množství spermií v semenotvorných kanálcích dramaticky pokleslo. Na rozdíl od více rezistentního kmene, kde téměř nedošlo ke změně ve spermatogenezi ani ve velikosti varlat. Tento poměrně značný rozsah v citlivosti má velký význam při určení bezpečnostních hranic pro muže.

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

### 2.6.3 Knockout modely myši

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

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

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

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

U uvedených modelů nalézáme stěžejní poruchy, které zahrnují narušení morfologie varlat, zastavení spermatogeneze ve stádiu časně spermiogeneze, pokles koncentrace spermií, snížení jejich motility a schopnosti oplodnit vajíčko, závažné roztažení vývodných

kanálků a významné přetvoření normálního hormonálního profilu, jež ve výsledku ovlivňují samčí neplodnost (Jones & Simpson 2000).

## 2.7 Vylučované estrogeny

Jakost povrchových a podzemních vod je ohrožována mnoha chemikáliemi, které člověk vyrábí. Řada studií přítomnosti farmak a lidských hormonů v životním prostředí byla prováděna během 70. – 80. let (Křesinová *et al.* 2009, Aherne & Briggs 1989), avšak tehdy detegovaná stopová množství vzbuzovala malou pozornost, až do doby zjištění spojitosti mezi syntetickou antikoncepcí 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem a vlivem na ryby (Křesinová *et al.* 2009, Snyder & Mulder 2001). Nebezpečí takových látek spočívá v tom, že se ve vodách vyskytují v nesmírně malém množství, řádově v jednotkách až desítkách nanogramů v litru vody. Přes tato malá množství mohou mít při dlouhodobém výskytu negativní vliv na životní prostředí, na organismy a v konečném důsledku na člověka. Estrogenní látky se dostávají do těla v pitné vodě nebo z potravy a interferují s činností endogenních hormonů, což může mít negativní efekt na vývoj a reprodukci (Křesinová *et al.* 2009, Quinn *et al.* 2004, Van den Belt *et al.* 2003). Konkrétní údaje a poznatky o takovém působení na člověka však dosud chybí (Křesinová *et al.* 2009).

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

Bylo prokázáno, že tyto přírodní i syntetické estrogenní hormony mají vliv na změny pohlaví ryb. Hormony se sice neuvěřitelně naředí v říční vodě, ale na rybí samce mají nežádoucí účinky i při extrémně nízkých koncentracích. V důsledku probuzení samičích hormonů začínají samci tvořit jikry, následuje neschopnost oplození samice a dochází

k vymírání rybí populace. Ryby nejsou zdaleka jedinými živočichy, kteří jsou k látkám s hormonálními účinky vnímaví, se stejným problémem se setkáváme i u žab a mlžů.

### 2.7.1 Hormony ve vodě

Přírodní estrogení hormony estron, 17- $\beta$ -estradiol, estriol i syntetický 17- $\alpha$ -ethinylestradiol jsou vylučovány lidmi do životního prostředí a jsou průkaznými endokrinními disruptory už v přítomnosti ng/l (Khanal *et al.* 2006). Odhaduje se, že produkce estrogenů ženskou populací v Praze je 2,1 g/den (Pačes 2002). Kromě lidských hormonů se do vod dostávají i hormony zvířat a látky, které mají podobné chemické vlastnosti jako hormony.

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

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

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

## 3. Materiál a metody

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

Amonium persulfate (A3678, Sigma)

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

Calcium ionofore A23187 (C7522, Sigma)

Dulbecco's phosphate buffered saline modified, without  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{MgCl}_2$  (D5652, Sigma)

Estriol (E1253, Sigma)

Estron (E9750, Sigma)

Etanol (02862, Penta)

17- $\alpha$ -ethinylestradiol (E4876, Sigma)

17- $\beta$ -estradiol (E7879, Sigma)

Formaldehyd (47629, Penta)

Glycin (G8898, Sigma)

Hoechst – bis-benzimidazol (H33258, Sigma)

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

Metanol (65543, Penta)

Paraffinöl (8904.1, Roth)

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

Precision Plus Protein All Blue Standard – (BioRad)

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

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

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

Triton X-100 (T-9284, Sigma)

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

### **3.1.2 Roztoky**

#### **PBS (10× koncentrovaný)**

1 l destilované H<sub>2</sub>O

80 g NaCl

2 g KCl

28,65 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pro 12 H<sub>2</sub>O)

2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### **Sterilní PBS**

100 ml tkáňové kultury

0,96 g Dulbecco's phosphate buffered saline modified (obsahující NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pro 7 H<sub>2</sub>O) 1,15 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/l)

#### **3,7 % formaldehyd**

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

#### **15 mmol NH<sub>4</sub>Cl**

0,4 g NH<sub>4</sub>Cl rozpuštěno v 500 ml PBS

#### **0,1 % Triton**

500 µl ředěno v 500 ml PBS

#### **TBS (10× koncentrovaný)**

100 ml destilované H<sub>2</sub>O

8 g NaCl

1,2 g TRIS

#### **1% BSA**

0,1 g rozpuštěno v 10 ml PBS

#### **ELFO elektrodotový pufr**



3 g Tris  
14,4 g glycinu  
1 g SDS  
1 l destilované H<sub>2</sub>O

### **ELFO roztoky**

**Roztok A** – 30 g akrylamidu

0,8 g BIS  
do 100 ml destilované H<sub>2</sub>O

**Roztok B** – 10 g SDS

do 100 ml destilované H<sub>2</sub>O

**Roztok C** – 22,75 g Tris

do 250 ml destilované H<sub>2</sub>O  
pH upraveno pomocí HCl na hodnotu 8,8

**Roztok D** – 3 g Tris

do 100 ml destilované H<sub>2</sub>O  
pH upraveno pomocí HCl na hodnotu 6,8

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

**PBS – Tween 0,05%**

1 l PBS  
500 µl Tween

### **Pufr na blot**

3 g Tris  
14,4 g glycinu  
200 ml metanolu  
do 1 l destilované H<sub>2</sub>O

### **Redukující vzorkový pufr**

2,4 ml roztoku D  
2 ml roztoku B (tj. 3,3% SDS)  
1 ml glycerolu

0,5 ml destilované H<sub>2</sub>O  
72 mg DTT – dithiotreitol  
1 mg bromfenolové modři

### **10% separační gel**

5 ml roztoku A  
7,5 ml roztoku C  
2,5 ml destilované H<sub>2</sub>O  
150 µl roztoku B  
7 µl TEMED  
persíran amonný 150 µl roztoku G  
5% zaostřovací gel  
1 ml roztoku A  
3 ml roztoku D  
2 ml destilované H<sub>2</sub>O  
100 µl roztoku B  
5 µl TEMED  
persíran amonný 90 µl roztoku G

### **3.1.3 Přístroje**

Analytické váhy WPS 360/C/2 (Radwag)  
Autokláv OT 12 (Nüve)  
Binolupa Stemi 2000 (Zeiss)  
Centrifuga MiniSpin® Plus (Eppendorf)  
Centrifuga Micro 200 (Hettich Zentrifugen)  
ELFO sestava – Mini vertical gel electrophoresis unit SE 260 (Hoeffer Scientific)  
ELFO sestava na nalévání gelů – Dual gel caster SE 245 (Hoeffer Scientific)  
Fluorescenční mikroskop BX 40 (Olympus)  
Flow box EN 12469 (Biohazard CleanAir)  
Inkubátor EN 025 (Nüve)  
Konfokální mikroskop DM IRE2 (Leica)  
Magnetická míchačka RCT Basic (IKA Werke)

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

### **3.1.4 Další použitý materiál**

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

### **3.1.5 Protilátky a fluorescenčně značené próby**

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

### **3.1.6 Živočišný materiál pro odběr spermií**

Laboratorní myš inbrední BALB/c, SPF kmen, Anlab  
Laboratorní myš inbrední BALB/c, SPF kmen, Velaz

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava jednotlivých koncentrací estrogenů

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

### 3.2.2 Kapacitace spermií *in vitro*

Ve sterilním flow boxu se do příslušného počtu připravených petriho misek ( $35 \times 10$  mm) napipetovalo fertilizační M2 médium (s obsahem 0,4% BSA). Do dvou misek tvořících zásobu se dávalo 200  $\mu\text{l}$  čistého M2 média a do misek s kontrolními vzorky 100  $\mu\text{l}$  čistého M2 média. V miskách ovlivněných estrogenem bylo 100  $\mu\text{l}$  M2 média smícháno s určitým estrogenem (o výsledné koncentraci estrogenu 200; 20; 2; 0,2 nebo 0,02  $\mu\text{g/l}$ ). Takto napipetované kapky byly převrstveny parafinovým olejem (cca 700  $\mu\text{l}$ ), (obr. 3.1). Všechny misky byly inkubovány minimálně 30 minut v termostatu o stálé teplotě 37 °C a 5%  $\text{CO}_2$ .



**Obr. 3.1** Petriho miska s kapkou kapacitačního média převrstveného parafinovým olejem.

Do zásobních misek byl po vytemperování vložen terminální 4-5 region levé a pravé *cauda epididymis* z dospělého samce myši usmrčeného cervikální dislokací. Spermie se nechaly 10 minut uvolňovat z tkáně do média při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Poté ze zásobních misek bylo rozpipetováno 5 µl suspenze spermií do všech ostatních misek (výsledná koncentrace spermií byla cca  $5 \times 10^6$  /ml), (obr. 3.2). Od této chvíle se začala měřit doba kapacity a v časových intervalech 5 (ihned po rozpipetování ze zásobních misek), 30, 60, 90, a 120 minut byly prováděny odběry vzorků (obr. 3.3). Tyto vzorky byly použity buď na přípravu preparátů pro hodnocení tyrozinové fosforylace po kapacitaci spermií *in vitro* nebo na přípravu vzorků pro SDS polyakrylamidovou elektroforézu.



**Obr. 3.2** Příprava preparátů pro hodnocení tyrozinové fosforylace po kapacitaci spermií *in vitro*.

Vzorky odebrané v příslušných časech byly stáčeny 2×7 minut při 2300 rpm a promývány v TBS (pH = 7,34). Po odebrání druhého supernatantu byla zbylá suspenze spermií rozetřena na podložní sklíčka a nechala se zaschnout. Následně se preparáty fixovaly ve formaldehyd tritonu. Dále byla sklíčka blokována 1% BSA a značena primární protilátkou proti fosforylovaným tyrozinovým zbytkům a sekundární protilátkou s navázaným fluoroforem. Na konec byly preparáty překryty montovacím médiem a krycím sklíčkem. Připravené preparáty se hodnotily pod fluorescenčním mikroskopem, kdy se určoval počet buněk označených protilátkou z celkového počtu sta buněk a jejich zastoupení bylo vyjádřeno v procentech.



Obr. 3.4 Odběr vzorků spermií v daném čase kapacitace.

### 3.2.3 Indukce akrozomální reakce *in vitro*

V průběhu kapacitace spermií *in vitro* se paralelně prováděla i indukce akrozomální reakce pomocí 0,5 mM kalcium ionoforu (1  $\mu$ l/100  $\mu$ l média), který byl přidáván ve 30, 60, 90 a 120 minutách kapacitace spermií *in vitro*. Spermie byly kapacitovány při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> a byly vystaveny působení CaI po dobu 60 min (kromě **kap30 + CaI5\***, kde CaI byl přidán, avšak spermie byly ihned odebrány, CaI tedy mohl působit jen krátkou dobu, než byly spermie odebrány a standardně zpracovány). Vzorky byly odebírány v časech s označením **kap30 + CaI5\***, **kap30 + CaI60**, **kap60 + CaI60**, **kap90 + CaI60** a **kap120 + CaI60**. Jako negativní kontrola k těmto experimentálním skupinám sloužila **kap0 bez CaI**, tzn. nulový čas kapacitace, kdy nebyl ke spermiím přidán CaI a vzorky byly ihned odebrány po rozpipetování ze zásobních misek. Všechny odebrané vzorky byly poté hodnoceny pod fluorescenčním mikroskopem.

### 3.2.4 Hodnocení akrozomální reakce

U každého vzorku spermií odebraného v daném čase byl hodnocen stav akrozómů. Na podložní skličko bylo umístěno 10  $\mu$ l suspenze spermií s M2 médiem a přidán 2,5  $\mu$ M PNA lektin s navázaným fluoroforem (značící intaktní akrozóm) a 1  $\mu$ M hoechst (značící jádro spermie). Poté bylo pod fluorescenčním mikroskopem počítáno

procentuální zastoupení živých spermií, které prodělaly akrozomální reakci (z celkového množství 100 buněk) a spermií s intaktním akrozómem.

### **3.2.5 Fluorescenční metody**

#### **Fixace formaldehyd-triton**

Zaschnuté preparáty byly vloženy na 10 minut do 3,7% formaldehydu v PBS. Následovalo promytí (2-3×) v PBS (pH = 7,36) a inkubace po dobu 5 minut s 15 mM NH<sub>4</sub>Cl a opětovné promývání v PBS (2-3×). Poté se preparáty nechaly inkubovat maximálně 3 minuty v 0,1% tritonu v PBS a byly promyty 3×5 minut v PBS. Na závěr byly zality PBS a uloženy do chladu před dalším zpracováním.

#### **Nepřímá imunofluorescence**

Fixované preparáty byly 45-60 minut blokovány pomocí 1% BSA a 5 minut promývány v PBS. Poté byly inkubovány 2 hodiny s primární protilátkou (ředěna ve sterilním PBS) při pokojové teplotě ve vlhké komůrce chráněné před světlem. Po uplynulé době byla protilátka odmyta 5×5 minut v PBS a nanesena próba s navázaným fluoroforem. Po hodinovém působení byla protilátka odmyta 3×5 minut v PBS a preparát byl zamontován do speciálního média (Vectashield mounting medium) a poté analyzován pod fluorescenčním mikroskopem.

### **3.2.6 SDS – PAGE elektroforéza a imunodetekce proteinů**

#### **Příprava vzorku a počítání koncentrace spermií**

Vzorky spermií byly odebírány v časových intervalech 0, 30, 60, 90 a 120 minut kapacitace. Promyty v PBS a stáčeny 10 minut při 12 000 rpm. Po odebrání veškerého supernatantu bylo k peletce přidáno 100 µl PBS a důkladně resuspendováno. Pro zjištění koncentrace spermií byla použita Bürkerova komůrka, na kterou bylo naneseno 10 µl připravené suspenze. Byly počítány buňky v šestnácti čtvercích obsažených v jedné jednotce.

Výsledná koncentrace buněk/ml byla vypočítána podle tohoto vzorce:

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

### **Příprava SDS gelu a elektroforetické rozdělení proteinů**

Po nalití všech složek 10% separačního gelu a jeho převrstvení destilovanou vodou došlo k jeho polymeraci. Přebytečná voda se odsála filtračním papírem.

Na zpolymerovaný gel se navrstvil 5% zaostřovací gel a pomocí hřebenu, který se vložil do ještě neztuhlého gelu, se vytvořily jamky pro nanesení vzorků. Hřeben byl vyjmut po úplné polymeraci gelu. Gely, uzavřené mezi skleněnou a plastovou deskou, byly upevněny do elektroforetického přístroje a celá sestava byla zalita elektrodoým pufrem. Do každé jamky se Hamiltonovou pipetou nanoslo 15  $\mu\text{l}$  vzorku nebo 10  $\mu\text{l}$  standardu. Přístroj byl nastaven na 110 V a po přechodu vzorků do zaostřovacího gelu se napětí navýšilo na 140 V. V gelu byl sledován transport bromfenolové modři. Po ukončení elektroforézy se z rozložené aparatury vyjmuly gely a byl odříznut zaostřovací gel. Dále se pracovalo jen se separačním gelem.

### **Western blot**

Do aparatury na přenos proteinů byly vloženy nejprve 4 listy chromatografických papírů, poté nitrocelulózová membrána, na kterou se položil gel a nakonec další 4 chromatografické papíry. Jednotlivé složky byly vlhčeny blotovacím pufrem. Pro přenos proteinů je potřeba proud 0,8 mA na 1  $\text{cm}^2$  nitrocelulózové membrány po dobu 1,5 hodiny.

### **Detekce proteinů**

Nejprve se membrána zavodnila v roztoku PBS-Tween 0,05% na 15 minut. Poté byla 1 hodinu blokována v roztoku 5% mléka s PBS-Tween 0,05% (10 g mléka na 200 ml PBS-Tween 0,05%). Po zablokování nespecifických vazebných míst byla 1,5 hodiny inkubována v roztoku primární protilátky ředěné 1% mlékem v PBS-Tween 0,05%. Po uplynulé době byla primární protilátka odmyta roztokem PBS-Tween 0,05% 6 $\times$ 5 minut. Poté byla ponořena do roztoku sekundární protilátky s 1% mlékem v PBS-Tween 0,05% a 1 hodinu inkubována. Na závěr byla sekundární protilátka odmyvána 5 $\times$ 5 minut



v PBS-Tween 0,05%. Pomocí chemiluminiscenční sady se proteiny s navázanou peroxidázou detekovaly na RTG filmu a pomocí automatu, který obsahuje lázeň s vývojkou a ustalovačem, se osvětlené RTG filmy vyvolaly.

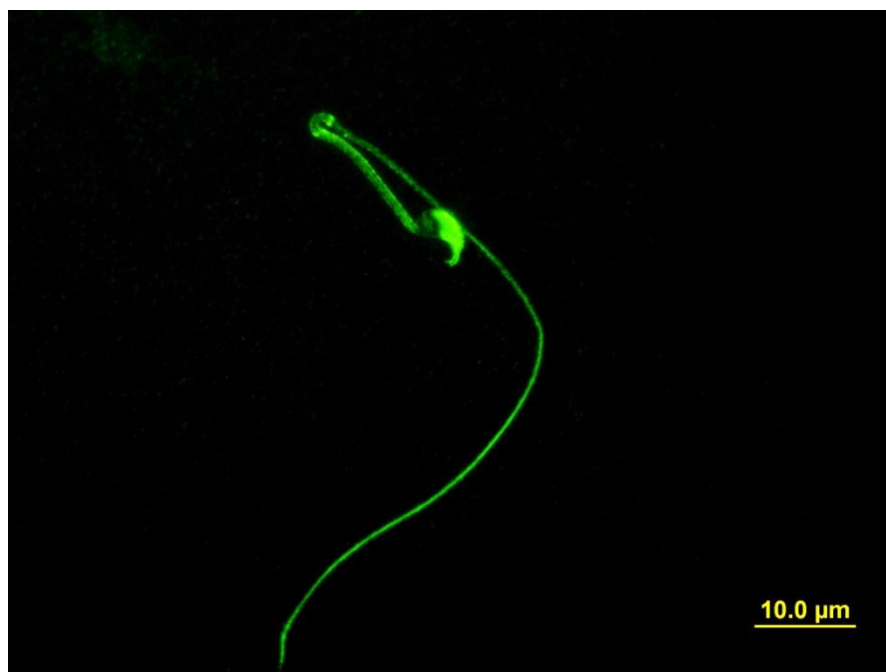
## 4. Výsledky

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

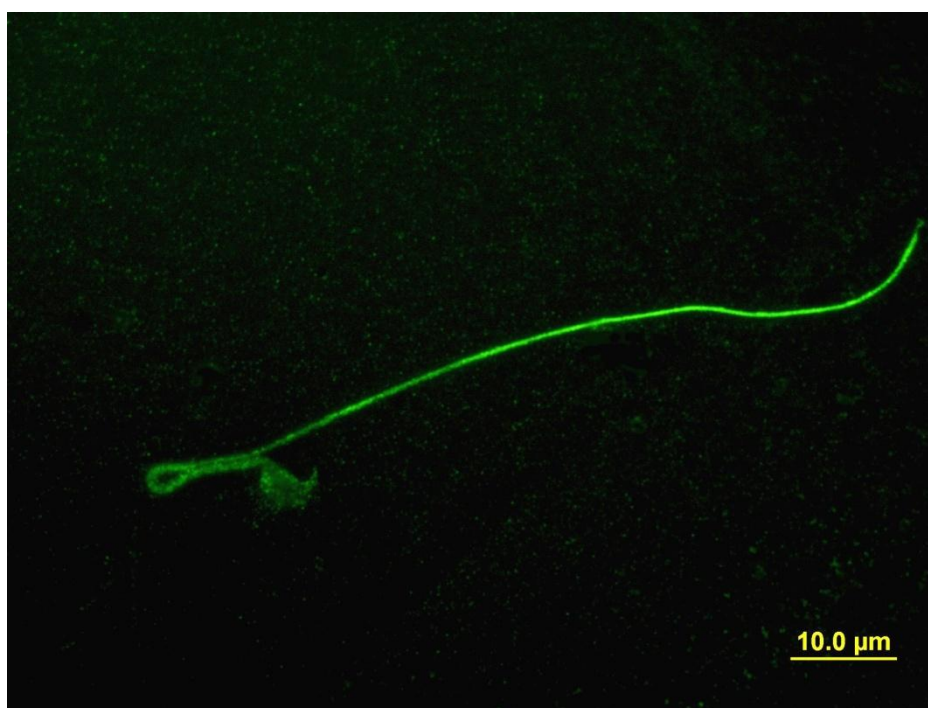
Při hodnocení tyrozinové fosforylace v hlavičce spermií pod fluorescenčním mikroskopem byl zaznamenán počet pozitivních (obr. 4.1) a negativních (obr. 4.2) spermií v celkovém množství 200 buněk na sklíčko. Estrogeny byly použity v pěti různých koncentracích 0,02 µg/l; 0,2 µg/l; 2 µg/l; 20 µg/l a 200 µg/l.

Toto hodnocení bylo prováděno minimálně osmkrát u každé koncentrace daného typu estrogenu 17-β-estradiolu, estronu, estriolu a 17-α-ethinylestradiolu v kapacitačním médiu. Z těchto pozorování bylo vypočteno průměrné procento buněk značených protilátkou proti fosfotyrozinu se střední chybou průměru. Tyto výsledky byly statisticky analyzovány.

Experimentální data byla analyzována programem STATISTICA 6.0. Pro statistickou analýzu rozdílů mezi porovnávanými skupinami byla použita jednosměrná analýza kovariance (ANCOVA) a jako post hoc metoda pro zjištění rozdílů v jednotlivých koncentracích se využil Turkey test. Jako kovariát byl použit průměr daného parametru, v našem případě počet fosfotyrozin-pozitivních buněk v čase nula. P hladina <0,05\*; <0,01\*\*; a 0,001\*\*\* byla považováno za signifikantní.



**Obr. 4.1** Tyrozinová fosforylace v hlavičce a bičíku spermie myši – pozitivně značený akrozomální region hlavičky spermie a bičík ve střední a hlavní části.



**Obr. 4.2** Tyrozinová fosforylace v hlavičce a bičíku spermie myši – negativní signál v hlavičce spermie a pozitivní signál ve střední části bičíku.

#### 4.1.1 Statistické vyhodnocení průběhu tyrozinové fosforylace při kapacitaci *in vitro* u spermií ovlivněných 17- $\beta$ -estradiolem (Tabulka 4.1)

Nejnižší koncentrace 17- $\beta$ -estradiolu **0,02  $\mu\text{g/l}$**  se ukázala bez statisticky významného vlivu na kapacitaci spermií *in vitro* v kapacitačním médiu. Průběh kapacitace byl srovnatelný s kontrolním vzorkem, kdy v obou případech docházelo k pozvolnému nárůstu p-Tyr v hlavičce spermie s časem, nejvyšší v 90 minutách kapacitace.

Při koncentraci **0,2  $\mu\text{g/l}$**  byla p-Tyr statisticky významně ( $P<0,01$ ) vyšší oproti kontrole ve 30 minutách naopak signifikantní pokles p-Tyr oproti kontrole byl v 60 minutách ( $P<0,01$ ) a v 90 minutách ( $P<0,05$ ).

U koncentrace **2  $\mu\text{g/l}$**  nedocházelo k statisticky signifikantnímu projevu působení 17- $\beta$ -estradiolu na tyrozinovou fosforylaci oproti kontrole.

U vzorků s koncentrací **20  $\mu\text{g/l}$**  měl 17- $\beta$ -estradiol výrazný prokapacitační efekt v čase 30 minut, kdy byla p-Tyr statisticky významně vyšší ( $P<0,01$ ). V průběhu času byla již experimentální skupina shodná s kontrolou.

V médiu s koncentrací estrogenu **200  $\mu\text{g/l}$**  se procento pozitivně svítících spermií zvyšovalo s časem kapacitace až do 90 minut, kdy byl nárůst signifikantně vyšší ( $P<0,01$ ) oproti kontrole.

Vzorky s koncentrací estrogenu 0,02  $\mu\text{g/l}$ , 2  $\mu\text{g/l}$  a 200  $\mu\text{g/l}$  měly shodný trend ve vývoji kapacitace s kontrolním vzorkem, kdy byla p-Tyr maximální v 90 minutách (kromě vzorku s koncentrací 2  $\mu\text{g/l}$ ), ale lišily se v procentuálním zastoupení značených buněk. Zbývající dva vzorky s koncentrací 0,2  $\mu\text{g/l}$  a 20  $\mu\text{g/l}$  měly statisticky významný nárůst p-Tyr oproti kontrole ve 30 minutách kapacitace a tudíž se projevil předčasný prokapacitační efekt.

Tabulka 4.1

17-beta-Estradiol p-Tyr BalbC	5	30	60	90	120
Kontrola	8,537 $\pm$ 1,000	9,744 $\pm$ 1,019	10,856 $\pm$ 1,225	11,456 $\pm$ 1,226	9,701 $\pm$ 1,200
0,02 $\mu\text{g/l}$	8,552 $\pm$ 0,640	10,121 $\pm$ 0,970	10,279 $\pm$ 0,780	12,278 $\pm$ 1,265	10,533 $\pm$ 0,706
0,2 $\mu\text{g/l}$	8,746 $\pm$ 1,032	11,158 $\pm$ 0,494**	6,028 $\pm$ 0,210**	9,498 $\pm$ 1,052*	8,355 $\pm$ 0,751
2 $\mu\text{g/l}$	10,568 $\pm$ 1,169	9,608 $\pm$ 0,679	9,980 $\pm$ 0,928	10,383 $\pm$ 0,679	10,201 $\pm$ 0,799
20 $\mu\text{g/l}$	10,431 $\pm$ 1,262	14,020 $\pm$ 1,689**	11,710 $\pm$ 1,308	11,105 $\pm$ 1,021	9,519 $\pm$ 1,115
200 $\mu\text{g/l}$	10,106 $\pm$ 1,167	10,504 $\pm$ 1,195	11,210 $\pm$ 1,015	14,588 $\pm$ 1,079**	10,780 $\pm$ 0,917

průměr  $\pm$  střední chyba průměru

\* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$  v porovnání s kontrolou

červeně - výsledky se signifikantně vyšším procentem značených hlaviček spermií

modře - výsledky se signifikantně nižším procentem značených hlaviček spermií

#### 4.1.2 Statistické vyhodnocení průběhu tyrozinové fosforylace při kapacitaci *in vitro* u spermií ovlivněných estronem (Tabulka 4.2)

Vliv estronu v nejnižší koncentraci **0,02 µg/l** nebyl po srovnání s kontrolou statisticky významný a průběh kapacitace koreloval s kontrolním vzorkem.

Při koncentraci **0,2 µg/l** estronu v médiu byl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) v pěti minutách kapacitace a v 60 minutách, kdy byla p-Tyr vyšší u experimentálních vzorků než u kontroly.

U estrogenu s koncentrací **2 µg/l** se prokapacitační efekt objevil v čase 30 minut, kdy bylo více p-Tyr u ovlivněných vzorků.

V koncentraci **20 µg/l** se ukázal signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) ve 30 minutách, kdy bylo procento kapacitovaných spermií vyšší v porovnání s kontrolním vzorkem. S časem se p-Tyr zvyšovala až na statisticky významnou ( $P < 0,05$ ) hodnotu v 90 minutách od začátku kapacitace.

Projev estronu v koncentraci **200 µg/l** na míru tyrozinové fosforylace jako markeru kapacitace spermií byl ve 30 a v 60 minutách, signifikantně vyšší ( $P < 0,05$ ) než u kontroly.

U vzorků s koncentrací 0,02 µg/l, 0,2 µg/l, 2 µg/l a 200 µg/l byla p-Tyr ve vývoji maximální v 60 minutách kapacitace, u koncentrace 20 µg/l dosahovala maxima v 90 minutách.

Tabulka 4.2

Estron p-Tyr BalbC					
	5	30	60	90	120
Kontrola	9,430±0,474	9,528±0,791	10,587±0,726	11,93±0,748	10,822±0,961
0,02 µg/l	9,197±0,562	10,162±0,795	11,591±1,097	10,778±0,751	11,238±1,180
0,2 µg/l	<b>10,722±0,970*</b>	10,202±1,290	<b>12,577±0,826*</b>	12,135±0,830	10,474±0,862
2 µg/l	10,934±1,558	<b>11,248±1,382*</b>	11,313±1,104	10,502±1,179	9,653±0,898
20 µg/l	10,756±1,422	<b>12,415±1,861*</b>	12,93±2,003	<b>13,438±1,101*</b>	13,23±2,276
200 µg/l	10,973±1,509	<b>12,589±1,564*</b>	<b>14,453±1,387*</b>	12,512±1,198	11,138±1,364

průměr ± střední chyba průměru

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  v porovnání s kontrolou

červeně - výsledky se signifikantně vyšším procentem značených hlaviček spermií

#### 4.1.3 Statistické vyhodnocení průběhu tyrozinové fosforylace při kapacitaci *in vitro* u spermií ovlivněných estriolem (Tabulka 4.3)

V nejnižší koncentraci estrogenu **0,02 µg/l** se ukázal výrazný signifikantní rozdíl ve 30 minutách kapacitace ( $P < 0,01$ ), další statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) se vyskytl ve 60 minutách, kdy byla p-Tyr vyšší u experimentálních skupin.

Při koncentraci **0,2 µg/l** estriolu v médiu bylo signifikantně ( $P < 0,05$ ) vyšší procento na p-Tyr značených spermií ve 30 a 60 minutách. Další signifikance ( $P < 0,01$ ) se projevila ve 120 minutách, kdy byla p-Tyr vyšší rovněž u experimentálních buněk.

U estrogenu při koncentraci **2 µg/l** byla signifikantně ( $P < 0,05$ ) zvýšená p-Tyr ve 30 minutách kapacitace v porovnání s kontrolou.

U koncentrace **20 µg/l** se v pěti minutách ukázal signifikantně nízký ( $P < 0,01$ ) počet značených spermií.

Při koncentraci **200 µg/l** v médiu bylo u experimentální skupiny signifikantně snižené ( $P < 0,05$ ) procento spermií v pěti minutách kapacitace. Tyrozinová fosforylace byla maximální v čase 120 minut, kdy bylo procento značených buněk signifikantně vyšší ( $P < 0,05$ ) než u kontroly.

U vzorků s koncentrací 0,02 µg/l, 0,2 µg/l a 2 µg/l byla p-Tyr statisticky významně vyšší ve 30 minutách kapacitace, u koncentrace 2 µg/l byla v tomto čase zároveň maximální. U koncentrace 0,02 µg/l byla p-Tyr ve svém vývoji s maximálním počtem značených buněk v 60 minutách kapacitace a koncentrace 0,2 µg/l dosahovala nejvyšších hodnot ve 120 minutách. U vzorků s koncentrací 20 µg/l a 200 µg/l vývoj kapacitace začínal na signifikantně nižším počtu značených buněk v pěti minutách kapacitace s nárůstem v průběhu kapacitace do maximálních hodnot ve 120 minutách kapacitace, zde se dá usuzovat počáteční vliv na zpomalený průběh kapacitace, který byl v čase vykompenzován.

Tabulka 4.3

Estriol p-Tyr BalbC					
	5	30	60	90	120
Kontrola	9,778±0,804	8,860±0,587	9,557±0,855	10,742±0,427	10,451±0,760
<b>0,02 µg/l</b>	9,766±1,459	<b>12,131±0,563**</b>	<b>12,425±0,901*</b>	11,224±2,344	10,416±0,999
<b>0,2 µg/l</b>	11,509±1,634	<b>11,043±1,646*</b>	<b>12,662±1,704*</b>	10,221±1,213	<b>13,328±1,801**</b>
<b>2 µg/l</b>	10,867±1,338	<b>11,386±1,022*</b>	10,684±1,967	10,655±1,211	10,867±1,509
<b>20 µg/l</b>	<b>5,763±1,600**</b>	9,034±0,620	9,088±0,435	9,897±0,718	11,554±2,142
<b>200 µg/l</b>	<b>6,876±1,020*</b>	9,330±0,971	10,126±0,592	10,207±0,903	<b>11,354±0,702*</b>

průměr ± střední chyba průměru

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  v porovnání s kontrolou

červeně - výsledky se signifikantně vyšším procentem značených hlaviček spermií

modře - výsledky se signifikantně nižším procentem značených hlaviček spermií

#### 4.1.4 Statistické vyhodnocení průběhu tyrozinové fosforylace při kapacitaci *in vitro* u spermií ovlivněných 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem (Tabulka 4.4)

17- $\alpha$ -ethinylestradiol měl v koncentraci **0,02  $\mu\text{g/l}$**  v pěti minutách kapacitace signifikantně nižší ( $P<0,05$ ) p-Tyr než kontrola.

Celý průběh kapacitace u vzorků s koncentrací **0,2  $\mu\text{g/l}$**  v médiu měl stejný vývoj jako kontrolní skupina a nedocházelo k statisticky významnému odlišení.

U koncentrace **2  $\mu\text{g/l}$**  došlo v 60 minutách kapacitace k signifikantně ( $P<0,01$ ) vyšší p-Tyr u experimentálního vzorku.

V koncentraci **20  $\mu\text{g/l}$**  byl zaznamenán signifikantní rozdíl z hlediska koncentrace a i typu estrogenu, a to ve 30 minutách ( $P<0,05$ ), v 60 minutách ( $P<0,001$ ), v 90 minutách ( $P<0,001$ ) kapacitace a ve 120 minutách ( $P<0,05$ ), kdy bylo vyšší procento tyrozinově fosforylovaných buněk u experimentálních skupin.

V nejvyšší **200  $\mu\text{g/l}$**  koncentraci tohoto estrogenu došlo v 30 minutách, v 90 minutách kapacitace k signifikantnímu ( $P<0,05$ ) nárůstu p-Tyr od kontroly. Ve 120 minutách byla signifikance ještě posílena ( $P<0,01$ ).

U koncentrace 0,02  $\mu\text{g/l}$  byl vývoj kromě času pět minut kapacitace srovnatelný s průběhem kapacitace u kontrolního vzorku. Průběh kapacitace u koncentrace estrogenu 0,2  $\mu\text{g/l}$  se shoduje s kontrolním vzorkem a maxima dosahuje v čase 90 minut kapacitace. V koncentraci 2  $\mu\text{g/l}$  byl signifikantní nárůst p-Tyr oproti kontrole v čase 60 minut kapacitace. U koncentrací 20  $\mu\text{g/l}$  a 200  $\mu\text{g/l}$  byl signifikantní prokapacitační efekt pozorován ve 30 resp. 60, 90 i 120 minutách kapacitace.

Tabulka 4.4

17-alfa-Ethinylestradiol p-Tyr BalbC					
	5	30	60	90	120
Kontrola	12,676 $\pm$ 0,977	12,891 $\pm$ 1,214	13,859 $\pm$ 0,532	13,490 $\pm$ 1,131	12,904 $\pm$ 0,907
<b>0,02 <math>\mu\text{g/l}</math></b>	<b>10,943<math>\pm</math>1,323*</b>	13,935 $\pm$ 1,712	12,140 $\pm$ 1,238	14,426 $\pm$ 0,700	12,835 $\pm$ 1,274
<b>0,2 <math>\mu\text{g/l}</math></b>	12,531 $\pm$ 1,300	12,570 $\pm$ 0,539	13,158 $\pm$ 0,910	13,189 $\pm$ 0,644	12,484 $\pm$ 1,071
<b>2 <math>\mu\text{g/l}</math></b>	13,184 $\pm$ 1,886	12,931 $\pm$ 0,931	<b>15,433<math>\pm</math>1,015**</b>	14,309 $\pm$ 1,347	13,184 $\pm$ 1,545
<b>20 <math>\mu\text{g/l}</math></b>	11,444 $\pm$ 0,980	<b>14,499<math>\pm</math>1,203*</b>	<b>16,479<math>\pm</math>0,441***</b>	<b>18,772<math>\pm</math>1,671***</b>	<b>14,621<math>\pm</math>1,175*</b>
<b>200 <math>\mu\text{g/l}</math></b>	11,096 $\pm$ 1,301	<b>14,817<math>\pm</math>1,610*</b>	13,956 $\pm$ 1,036	<b>16,540<math>\pm</math>0,891*</b>	<b>16,008<math>\pm</math>1,763**</b>

průměr  $\pm$  střední chyba průměru

\* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$  v porovnání s kontrolou

červeně - výsledky se signifikantně vyšším procentem značených hlaviček spermií

modře - výsledky se signifikantně nižším procentem značených hlaviček spermií

## 4.2 Elektroforetické hodnocení tyrozinové fosforylace z lyzátu celých spermií

Po inkubaci spermií z nadvarlete v kapacitačním médiu se odebíraly vzorky spermií ovlivněných koncentrací 0,02; 0,2; 2; 20 a 200  $\mu\text{g/l}$  příslušného estrogenu v kapacitačním médiu a zároveň neovlivněných (kontrolních) v příslušných časech kapacitace *in vitro*. První odběr se prováděl v čase 5 minut, kdy se spermie po vložení do média ihned odebraly, následovaly odběry v čase 30, 60, 90 a 120 minut kapacitace. Jednotlivé vzorky byly dále zpracovávány a použity pro testování.

Pomocí SDS – PAGE elektroforézy byl pozorován časově závislý vzrůst ve fosforylaci tyrozinových zbytků skupiny proteinů o molekulové hmotnosti  $M_w$  v rozmezí 40-120 kDa u všech pozorovaných vzorků spermií. Stupeň tyrozinové fosforylace (p-Tyr) p95/116 hexokinázy, která je hlavním proteinem s fosforylovanými tyroziny na membráně myších spermií (Visconti *et al.* 1995), je neměnný během inkubační periody.

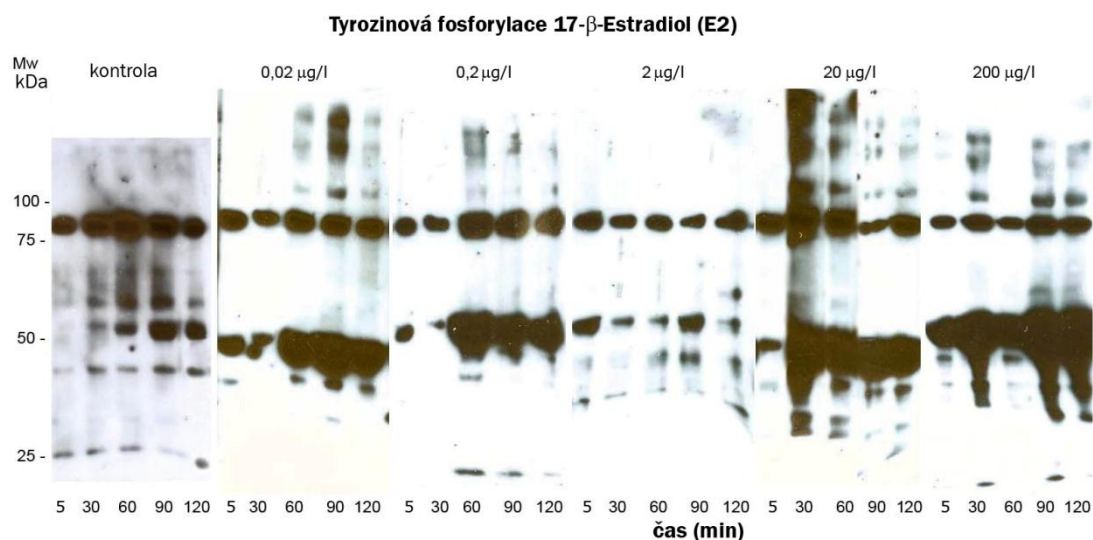
### 4.2.1 Tyrozinová fosforylace u spermií ovlivněných 17- $\beta$ -estradiolem

Na vyvolaném RTG filmu s výsledkem SDS-PAGE fosforylovaných proteinů (obr. 4.3) dochází u kontrolního vzorku k pozvolnému vzrůstu p-Tyr v 60 minutách kapacitace s maximem v 90 a 120 minutách. Dvě nejnižší koncentrace 0,2  $\mu\text{g/l}$  a 0,02  $\mu\text{g/l}$  estrogenu se od 60 minut kapacitace projevovaly zvýšenou p-Tyr v proteinech s  $M_w$  v oblasti 40-60 kDa po porovnání s kontrolou. U koncentrace 2  $\mu\text{g/l}$  17- $\beta$ -estradiolu v médiu byla p-Tyr slabší než u kontrolního vzorku v časech kapacitace 30, 60, 90 a 120 minut a naopak silnější v nulovém resp. 5 min čase. Dále můžeme pozorovat výrazný prokapacitační efekt u dvou nejvyšších koncentrací 20  $\mu\text{g/l}$  a 200  $\mu\text{g/l}$ , který se výrazně projevuje především u proteinů s  $M_w$  v rozmezí 40-70 kDa již ve 30 minutách kapacitace a svých maxim dosahuje v 90 a 120 minutách kapacitace.

Při porovnání výsledků z fluorescenčního hodnocení p-Tyr v hlavičce spermie s výsledky SDS-PAGE celých spermií nalézáme shodu v rozdílech u koncentrace 20  $\mu\text{g/l}$  (30 minut) a 200  $\mu\text{g/l}$  (90 minut), kdy docházelo k zvýšení p-Tyr u experimentálních skupin. U koncentrace 0,2  $\mu\text{g/l}$  se výsledky neshodovaly. Statisticky bylo imunofluorescenční hodnocení nárůstu p-Tyr v 30 minutách kapacitace u experimentální skupiny spermií vyšší a v 60 a 90 minutách nižší než u kontroly, ale výsledek SDS-PAGE ukazuje opačné hodno-



ty – nižší p-Tyr v 30 minutách a vyšší p-Tyr v 60 a 90 minutách u experimentální skupiny. Průběh p-Tyr na fotografii z SDS-PAGE u koncentrace 2 µg/l byl kromě nulového času resp. času 5 min slabší než u kontroly, ale u výsledků z fluorescenčního hodnocení byl průběh bez signifikantních odlišností od kontroly.



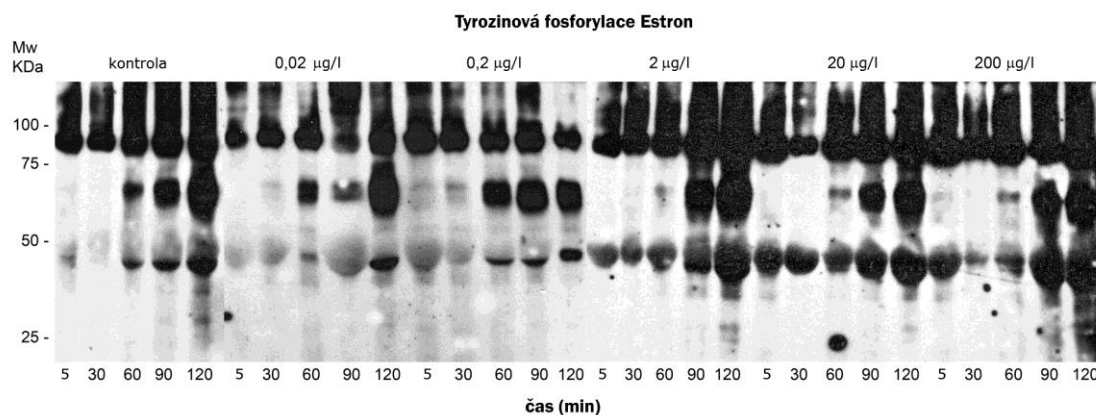
**Obr. 4.3** Výsledek p-Tyr lyzátu spermií ovlivněných 17-β-estradiolem v porovnání s kontrolou hodnocených na fotografiích z SDS-PAGE.

#### 4.2.2 Tyrozínová fosforylace u spermií ovlivněných estronem

U kontrolního vzorku sledujeme na vyvolaném RTG filmu s výsledkem SDS-PAGE (obr. 4.4) první nárůst v p-Tyr proteinů s Mw okolo 45 kDa a 65 kDa v 60 minutách s maximy ve 120 minutách. U estronu v koncentraci 0,02 µg/l je průběh p-Tyr srovnatelný s kontrolou. Poněkud rychlejší nárůst p-Tyr můžeme pozorovat při koncentraci 0,2 µg/l, kdy je dosaženo nejvyšších hodnot p-Tyr již v čase 60 a 90 minut. Při porovnání výsledků u vzorků spermií inkubovaných v médiu s koncentrací estronu 2 µg/l, 20 µg/l i 200 µg/l, s kontrolou, můžeme vidět zesílenou p-Tyr proteinů o molekulové hmotnosti mezi 40-50 kDa, která začíná již v pěti minutách kapacitace. Maximálních hodnot, u těchto zmiňovaných koncentrací, p-Tyr dosahuje v časech 90 a 120 minut.

Výsledky fluorescenčního postupu hodnocení se shodovaly ve všech statistických signifikancích p-Tyr s výsledkem SDS-PAGE, tj. v koncentraci 200 µg/l, v časech 30 a 60 minut, u 20 µg/l v časech 30 a 90 minut, u 2 µg/l v 30 minutách kapacitace a u koncentrace 0,2 µg/l v časech 5 a 60 minut. Všechny signifikance ukazovaly zvýšenou p-Tyr při porov-

nání s kontrolou. Při hodnocení SDS-PAGE se dále shodoval i projev estronu v koncentraci 0,02  $\mu\text{g/l}$ .



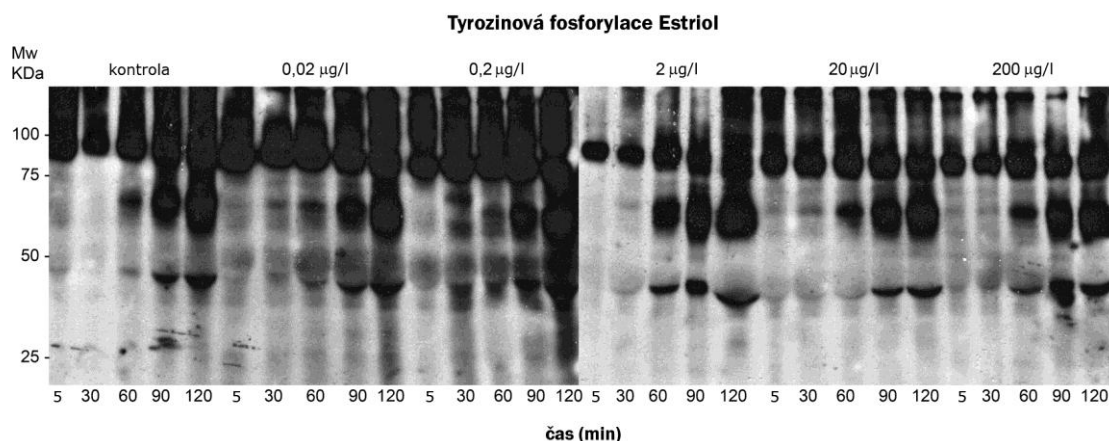
**Obr. 4.4** Výsledek p-Tyr lyzátu spermií ovlivněných estronem v porovnání s kontrolou hodnocených na fotografiích z SDS-PAGE elektroforézy.

#### 4.2.3 Tyrozínová fosforylace u spermií ovlivněných estriolem

Po hodnocení RTG filmu s výsledkem SDS-PAGE fosforylovaných proteinů (obr. 4.5) můžeme sledovat, že v kontrolním vzorku docházelo k prvnímu nárůstu p-Tyr u proteinů s Mw okolo 65 kDa v 60 minutách a s maximy v 90 a 120 minutách, kdy přibývá i fosforylace proteinů o Mw 65 kDa. U nejnižší koncentrace estriolu 0,02  $\mu\text{g/l}$  se průběh kapacity mírně lišil v časech 30 a 60 minut, kdy byla p-Tyr zvýšená u experimentální skupiny na rozdíl od kontrolního výsledku. Rychlejší zvýšení fosforylace proteinů můžeme pozorovat u vzorku s 0,2  $\mu\text{g/l}$  estriolu, kdy již v čase 30 minut docházelo k nárůstu p-Tyr oproti kontrole. U spermií inkubovaných v médiu s koncentrací estriolu 200  $\mu\text{g/l}$ , 20  $\mu\text{g/l}$  a především u 2  $\mu\text{g/l}$  se projevoval prokapacitační efekt estrogenu, kdy výrazný nárůst p-Tyr se objevoval u proteinů o Mw kolem 45 a 65 kDa už v 60 minutách kapacity v porovnání s kontrolou. Souhrnně můžeme říci, že p-Tyr proteinů vzrůstala s dobou pobytu spermií v kapacitačním médiu a maximálních hodnot dosahovala v časech 90 a 120 minut inkubace u všech koncentrací estriolu.

Po porovnání výsledků z fluorescenčního hodnocení p-Tyr v hlavičce spermií s výsledky SDS-PAGE celých spermií nalézáme shodu ve statisticky signifikantních rozdílech z fluorescenčního hodnocení u koncentrací 2  $\mu\text{g/l}$  (v 30 minutách), 0,2  $\mu\text{g/l}$  (v 30, 60 a 90 minut) a u 0,02  $\mu\text{g/l}$  (v časech 30 a 60 minut). U koncentrace 200  $\mu\text{g/l}$  a 20  $\mu\text{g/l}$  se

signifikantní výsledky z fluorescenčního hodnocení neshodují s elektroforetickým postupem. V pěti minutách kapacitace u obou koncentrací je p-Tyr signifikantně nižší u fluorescenčního hodnocení, ale u elektroforetického je shodná s kontrolou. U koncentrace 200  $\mu\text{g/l}$  v čase 120 minut je signifikantně vyšší počet fosforylovaných hlaviček spermií u fluorescenčního hodnocení na rozdíl od výsledku z SDS-PAGE, kde se p-Tyr v tomto čase neodlišuje od kontroly.



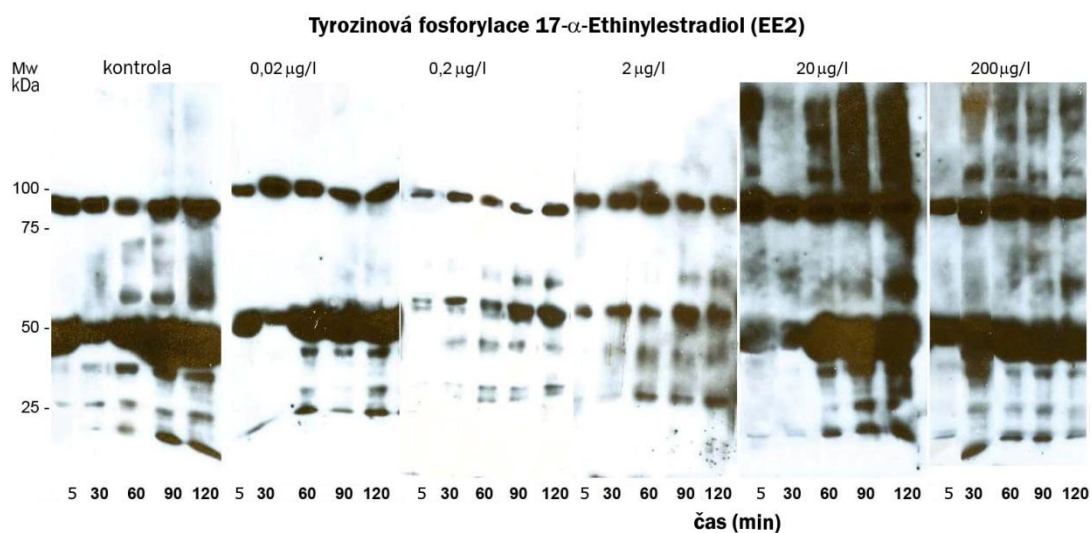
**Obr. 4.5** Výsledek p-Tyr lyzátu spermií ovlivněných estriolem v porovnání s kontrolou hodnocených na fotografiích z SDS-PAGE elektroforézy.

#### 4.2.4 Tyrozínová fosforylace u spermií ovlivněných 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem

Na vyvolaném RTG filmu s výsledkem SDS-PAGE (obr. 4.6) byl průběh kapacitace u kontrolního vzorku stejný s experimentálním vzorkem o nejnižší (0,02  $\mu\text{g/l}$ ) koncentraci estrogenu v médiu, naopak menší vliv měl estrogen v koncentraci 0,2  $\mu\text{g/l}$  a 2  $\mu\text{g/l}$  v porovnání s kontrolou. Projev syntetického 17- $\alpha$ -ethinylestradiolu byl prokapacitační v koncentraci 20  $\mu\text{g/l}$  a 200  $\mu\text{g/l}$ . U koncentrace 20  $\mu\text{g/l}$  byla při srovnání s kontrolou p-Tyr silnější u proteinů s Mw v oblasti 100 kDa v 60 minutách kapacitace a s maximy v 90 a 120 minutách, zato u koncentrace 200  $\mu\text{g/l}$  bylo navýšení fosforylace patrné již ve 30 minutách kapacitace a se shodnými maximy.

Při porovnání výsledků z fluorescenčního hodnocení p-Tyr v hlavičce spermie s výsledky SDS-PAGE celých spermií nalézáme shodu ve statisticky významném navýšení p-Tyr u experimentálních skupin v koncentracích 200  $\mu\text{g/l}$  (30 minut) a 20  $\mu\text{g/l}$  (60, 90 a 120 minut) a v signifikantně nízké p-Tyr v nulovém čase kapacitace u koncentrace

0,02  $\mu\text{g/l}$ . Naopak odlišnosti od signifikantně vyššího procenta fosforylovaných hlaviček spermií u experimentálních skupin se vyskytují u výsledků z SDS-PAGE u koncentrace 2  $\mu\text{g/l}$  (v 60 minutách, kdy je p-Tyr nižší u ovlivněné skupiny), dále u koncentrace 20  $\mu\text{g/l}$  (v 30 minutách se výsledek shoduje s kontrolou) a u koncentrace 200  $\mu\text{g/l}$  (v 90 minutách i ve 120 minutách se výsledek shoduje s kontrolou).



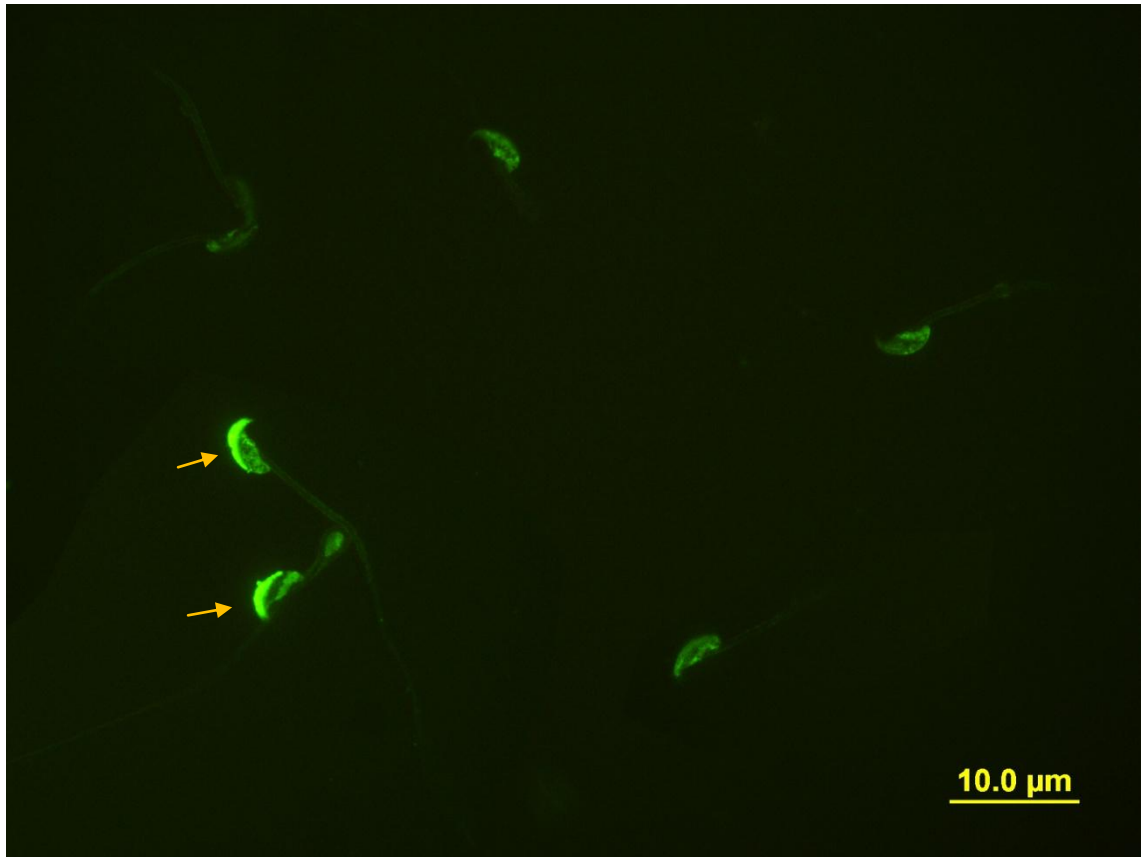
**Obr. 4.6** Výsledek p-Tyr lyzátu spermií ovlivněných 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem v porovnání s kontrolou hodnocených na fotografiích z SDS-elfo.

### 4.3 Hodnocení indukované akrozomální reakce a statistické zhodnocení získaných výsledků

Akrozomální reakce byla indukována pomocí kalcium ionoforu (CaI), který byl přidáván ve 30, 60, 90 a 120 minutách kapacitace spermií *in vitro*. Estrogeny byly připraveny v pěti různých koncentracích 0,02 µg/l; 0,2 µg/l; 2 µg/l; 20 µg/l a 200 µg/l. CaI se kromě času **kap30 + CaI5\*** (kde CaI působil jen přibližně 5 minut) nechal působit jednu hodinu a vzorky byly odebírány v časech s označením **kap30 + CaI60**, **kap60 + CaI60**, **kap90 + CaI60** a **kap120 + CaI60**. Negativní kontrolou k těmto experimentálním skupinám byly spermie bez přidaného CaI, které byly odebírány v pěti minutách kapacitace, **kap0 bez CaI**. Hodnocení akrozomální reakce v hlavičce spermií se provádělo pod fluo- pod fluorescenčním mikroskopem.

Počet spermií, které prošly indukovanou akrozomální reakcí (obr. 4.7) byl jednoznačně závislý na čase kapacitace a postupně vzrůstal s dobou kapacitace. Všechna data byla transformována do procentuálního zastoupení spermií, které prošly CaI indukovanou akrozomální reakcí z celkového množství počítaných buněk. U každé koncentrace daného typu estrogenu v kapacitačním médiu bylo hodnocení prováděno minimálně osmkrát.

Pro statistické hodnocení rozdílů mezi jednotlivými skupinami byla použita analýza kovariance **ANCOVA** a jako post hoc metoda pro zjištění rozdílů v jednotlivých koncentracích se využil **Newman-Keuls test**. Jako kovariát byl použit průměr daného parametru, v našem případě procento buněk, u kterých proběhla akrozomální reakce v čase kap0 bez CaI. Důvod pro to je ten, že je nutné do statistického zpracování zahrnout rozdíly v tomto parametru, které by jinak mohly silně zkreslovat výsledky rozdílů mezi kontrolní a experimentálními skupinami v dalších časech.



**Obr. 4.7** Skupina spermií s intaktním akrozómem (viz. šipky) a spermií po dokončené akrozomální reakci.

#### 4.3.1 Statistické vyhodnocení výsledků indukované akrozomální reakce *in vitro* u spermií ovlivněných 17- $\beta$ -estradiolem (Tabulka 4.5)

U 17- $\beta$ -estradiolu v koncentraci **0,02  $\mu\text{g/l}$**  byla signifikance ( $P < 0,001$ ) v čase kap30 + CaI5\*, kdy méně ovlivněných spermií podstoupilo AR na rozdíl od kontroly.

Procento spermií po prodělané AR a ovlivněných 17- $\beta$ -estradiolem v koncentraci **0,2  $\mu\text{g/l}$**  bylo v čase kap30 + CaI5\* signifikantně ( $P < 0,01$ ) nižší než u kontroly.

V koncentraci **2  $\mu\text{g/l}$**  17- $\beta$ -estradiolu v kapacitačním médiu v čase kap30 + CaI5\* proběhla AR u signifikantně ( $P < 0,001$ ) menšího procenta ovlivněných spermií.

Při koncentraci **20  $\mu\text{g/l}$**  estrogenu se projevil statisticky významný rozdíl od kontroly v čase kap30 + CaI5\*, kdy bylo signifikantně nižší procento experimentálních buněk, které prodělaly AR v porovnání s kontrolou.

U 17- $\beta$ -estradiolu v koncentraci **200  $\mu\text{g/l}$**  byl v časech kap0 bez CaI ( $P < 0,05$ ) a kap30 + CaI5\* ( $P < 0,001$ ) signifikantní rozdíl, a to v nižším procentu buněk prošlých AR v porovnání s kontrolou. V čase kap120 + CaI60 bylo naopak signifikantně ( $P < 0,01$ ) vyšší procento ovlivněných spermií, kde proběhla AR.

U všech koncentrací bylo signifikantně nižší procento spermií, u kterých proběhla AR, v čase kap30 + CaI5\*. U koncentrace 200  $\mu\text{g/l}$  byly signifikance i v čase kap0 bez CaI, s nižším procentem spermií po akrozomální reakci a v čase kap120 + CaI60 s vyšším procentem spermií po akrozomální reakci.

Tabulka 4.5

17-beta-Estradiol AR BalbC						
	kap0 bez CaI	kap30 + CaI5*	kap30 + CaI60	kap60 + CaI60	kap90 + CaI60	kap120 + CaI60
kontrola	3,491 $\pm$ 0,404	15,049 $\pm$ 1,258	47,706 $\pm$ 2,610	61,712 $\pm$ 2,140	69,327 $\pm$ 1,859	76,967 $\pm$ 0,855
<b>0,02 <math>\mu\text{g/l}</math></b>	3,333 $\pm$ 0,460	<b>11,140<math>\pm</math>0,758***</b>	46,985 $\pm$ 3,148	61,054 $\pm$ 3,285	69,956 $\pm$ 1,354	78,502 $\pm$ 1,704
<b>0,2 <math>\mu\text{g/l}</math></b>	3,850 $\pm$ 0,268	<b>11,222<math>\pm</math>2,479**</b>	47,984 $\pm$ 5,378	57,994 $\pm$ 2,552	70,492 $\pm$ 2,049	79,924 $\pm$ 2,155
<b>2 <math>\mu\text{g/l}</math></b>	4,067 $\pm$ 0,672	<b>10,746<math>\pm</math>1,425***</b>	49,948 $\pm$ 5,104	61,977 $\pm$ 4,505	70,846 $\pm$ 3,203	77,148 $\pm$ 1,390
<b>20 <math>\mu\text{g/l}</math></b>	2,901 $\pm$ 0,257	<b>11,836<math>\pm</math>1,683**</b>	49,103 $\pm$ 2,819	58,969 $\pm$ 3,793	70,587 $\pm$ 0,825	77,560 $\pm$ 2,127
<b>200 <math>\mu\text{g/l}</math></b>	<b>2,348<math>\pm</math>0,481*</b>	<b>9,513<math>\pm</math>1,517***</b>	47,306 $\pm$ 4,286	59,769 $\pm$ 4,226	70,957 $\pm$ 1,508	<b>78,657<math>\pm</math>1,993*</b>

průměr  $\pm$  střední chyba průměru

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  v porovnání s kontrolou

červeně - výsledky se signifikantně vyšším procentem spermií po akrozomální reakci

modře - výsledky se signifikantně nižším procentem spermií po akrozomální reakci

#### 4.3.2 Statistické vyhodnocení výsledků indukované akrozomální reakce *in vitro* u spermii ovlivněných estronem (Tabulka 4.6)

V koncentraci **0,02 µg/l** ani v koncentraci **0,2 µg/l** estronu v kapacitačním médiu se neobjevil statisticky významný rozdíl. Počet buněk, které prodělaly akrozomální reakci, se zvyšoval v souladu s kontrolním vzorkem a dosahoval 80 %.

Při koncentraci **2 µg/l** estronu v médiu se v čase kap30 + CaI5\* projevilo signifikantně nižší procento ( $P < 0,05$ ) značených buněk.

U koncentrace **20 µg/l** bylo statisticky významně nižší procento ( $P < 0,05$ ) buněk, u kterých proběhla akrozomální reakce při srovnání s kontrolou.

Při statistickém hodnocení procenta spermii, které byly ovlivněny estronem v koncentraci **200 µg/l** a prošly akrozomální reakcí, byl nalezen signifikantní rozdíl v čase kap0 bez CaI ( $P < 0,05$ ) a v čase kap30 + CaI5\* ( $P < 0,05$ ), procento ovlivněných značených buněk bylo nižší v obou časech.

U dvou nejnižších koncentrací se nevyskytly signifikantní rozdíly v procentuálním zastoupení spermii po akrozomální reakci. V čase kap30 + CaI5\* došlo ke statisticky významným rozdílům u vzorků s třemi nejvyššími koncentracemi estrogenu a v čase kap0 bez CaI byla další signifikance u koncentrace 200 µg/l, kdy nižší procento spermii prodělalo akrozomální reakci v porovnání s kontrolou.

Tabulka 4.6

Estron AR BalbC						
	kap0 bez Cal	kap30 + Cal5*	kap30 + Cal60	kap60 + Cal60	kap90 + Cal60	kap120 + Cal60
kontrola	2,706±0,353	9,821±1,385	37,697±4,440	57,133±4,074	71,955±1,637	82,067±1,017
<b>0,02 µg/l</b>	2,900±0,771	7,518±1,487	40,851±5,602	56,405±5,881	72,661±2,878	81,152±2,577
<b>0,2 µg/l</b>	2,366±0,259	8,979±1,839	47,733±8,668	51,890±5,389	72,754±3,825	81,645±1,509
<b>2 µg/l</b>	2,409±0,368	<b>7,752±0,598*</b>	38,225±5,593	56,462±4,182	67,572±3,319	82,228±1,955
<b>20 µg/l</b>	2,129±0,312	<b>7,203±0,632*</b>	34,273±3,509	48,860±6,973	67,901±3,128	80,621±3,447
<b>200 µg/l</b>	<b>1,494±0,267*</b>	<b>6,337±0,623*</b>	40,780±5,338	51,079±5,605	66,376±4,870	77,802±1,109

průměr ± střední chyba průměru

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  v porovnání s kontrolou

modře - výsledky se signifikantně nižším procentem spermii po akrozomální reakci



#### 4.3.3 Statistické vyhodnocení výsledků indukované akrozomální reakce *in vitro* u spermií ovlivněných estriolem (Tabulka 4.7)

V nejnižší koncentraci estrogenu **0,02 µg/l** statisticky významně nižší procento spermií podstoupilo AR a to v časech kap90 + CaI60 (P<0,001) a kap120 + CaI60 (P<0,01).

U koncentrace **0,2 µg/l** se projeví tři signifikantní výkyvy, všechny s nižším procentem buněk po AR u experimentální skupiny a ve stejné hladině významnosti (P<0,05). Nejdříve v čase kap0 bez CaI, dále v kap30 + CaI60 a nakonec v kap90 + CaI60.

U estriolu v koncentraci **2 µg/l** v čase kap30 + CaI5\*proběhla AR u signifikantně menšího procenta (P<0,05) ovlivněných než kontrolních buněk. Oproti tomu statisticky významně více spermií z experimentální skupiny prošlo AR v časech kap30 + CaI60 (P<0,01) a kap60 + CaI60 (P<0,05).

Tři signifikantní odlišnosti od kontroly se objevily v koncentraci estrogenu **20 µg/l** v čase kap30 + CaI60, kap60 + CaI60 a kap90 + CaI60. V kap30 + CaI60 (P<0,05) i v čase kap60 + CaI60 (P<0,01) bylo více ovlivněných buněk, které prošly AR. Naopak v kap90 + CaI60 (P<0,05) bylo méně experimentálních než kontrolních buněk, u kterých došlo k AR.

U koncentrace **200 µg/l** estriolu v kapacitačním médiu se neprojevil statisticky významný rozdíl mezi procenty experimentálních a kontrolních buněk, u kterých proběhla akrozomální reakce (AR).

U koncentrace 0,02 µg/l, 0,2 µg/l a 20 µg/l byla shodná signifikance v čase kap90 + CaI60, kdy bylo u experimentálních vzorků nižší procento spermií po akrozomální reakci než u kontrolních. Naopak v čase kap30 + CaI60 a kap60 + CaI60 došlo ke statisticky významnému zvýšení procenta spermií po akrozomální reakci u koncentrace 2 µg/l a 20 µg/l.

Tabulka 4.7

Estriol AR BalbC						
	kap0 bez CaI	kap30 + CaI5*	kap30 + CaI60	kap60 + CaI60	kap90 + CaI60	kap120 + CaI60
kontrola	2,420±0,218	8,848±1,374	28,846±2,679	40,340±2,436	63,100±2,427	76,940±2,382
<b>0,02 µg/l</b>	2,368±0,535	6,632±2,586	27,818±4,646	36,555±4,509	<b>54,404±2,220***</b>	<b>71,776±2,347**</b>
<b>0,2 µg/l</b>	<b>1,946±0,104*</b>	6,840±2,493	<b>23,383±2,329*</b>	41,156±3,083	<b>57,838±2,728*</b>	73,599±3,800
<b>2 µg/l</b>	2,407±0,559	<b>6,864±0,973*</b>	<b>36,313±4,788**</b>	<b>47,380±4,502*</b>	60,794±2,129	78,015±2,933
<b>20 µg/l</b>	2,669±0,261	9,782±2,048	<b>35,029±4,744*</b>	<b>51,440±4,205**</b>	<b>58,414±3,207*</b>	74,741±3,495
<b>200 µg/l</b>	2,102±0,429	7,596±1,641	27,311±6,032	44,594±6,767	61,995±4,562	74,859±3,647

průměr ± střední chyba průměru

\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 v porovnání s kontrolou

červeně - výsledky se signifikantně vyšším procentem spermií po akrozomální reakci

modře - výsledky se signifikantně nižším procentem spermií po akrozomální reakci

#### 4.3.4 Statistické vyhodnocení výsledků indukované akrozomální reakce *in vitro* u spermii ovlivněných 17- $\alpha$ -ethinylestradiolem (Tabulka 4.8)

V kap30 + CaI60 u nejnižší koncentrace estrogenu **0,02  $\mu\text{g/l}$**  podstoupilo AR statisticky významně ( $P < 0,05$ ) nižší procento ovlivněných spermii než kontrolních. Další signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ) byl v čase kap120 + CaI60, kdy naopak více experimentálních než kontrolních spermii absolvovalo AR.

Tři signifikantní výkyvy se projevy v **0,2  $\mu\text{g/l}$** . Nejdříve v časech kap30 + CaI60 ( $P < 0,05$ ) a kap90 + CaI60 ( $P < 0,05$ ), kdy bylo nižší procento spermii, u kterých proběhla AR. Naopak u posledního statistického odlišení v čase kap120 + CaI60 ( $P < 0,01$ ) bylo vyšší procento buněk po AR u experimentální skupiny než u kontroly.

U koncentrace **2  $\mu\text{g/l}$**  17- $\alpha$ -ethinylestradiolu v kapacitačním médiu nedošlo k významnému signifikantnímu odklonu.

V koncentraci **20  $\mu\text{g/l}$**  se projevil statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) v kap60 + CaI60. U experimentální skupiny proběhla AR u nižšího procenta spermii v porovnání s kontrolou.

Při koncentraci estrogenu **200  $\mu\text{g/l}$**  v časech kap30 + CaI5\* a kap60 + CaI60 byl signifikantní rozdíl ( $P < 0,05$ ), kdy došlo k AR u nižšího procenta ovlivněných spermii než kontrolních. S opačným procentuálním výsledkem se setkáváme v kap120 + CaI60, kdy signifikantně více ( $P < 0,01$ ) ovlivněných spermii absolvovalo AR v porovnání s kontrolou.

U koncentrací 0,02  $\mu\text{g/l}$ , 0,2  $\mu\text{g/l}$  a 20  $\mu\text{g/l}$  bylo v čase kap30 + CaI60 shodně statisticky významně nižší procento spermii po AR. V čase kap120 + CaI60 naopak došlo k signifikantnímu zvýšení počtu spermii, které podstoupily AR, u vzorku s koncentrací estrogenu 0,02  $\mu\text{g/l}$ , 0,2  $\mu\text{g/l}$  a 200  $\mu\text{g/l}$ .

Tabulka 4.8

17-alfa-Ethinylestradiol AR BalbC						
	kap0 bez Cal	kap30 + Cal5*	kap30 + Cal60	kap60 + Cal60	kap90 + Cal60	kap120 + Cal60
kontrola	5,666 $\pm$ 0,939	12,527 $\pm$ 1,745	32,045 $\pm$ 2,930	42,559 $\pm$ 3,747	62,442 $\pm$ 2,812	67,409 $\pm$ 2,983
<b>0,02 <math>\mu\text{g/l}</math></b>	6,227 $\pm$ 2,190	11,625 $\pm$ 2,510	<b>25,771<math>\pm</math>4,064*</b>	43,131 $\pm$ 3,178	60,150 $\pm$ 3,826	<b>71,257<math>\pm</math>2,907*</b>
<b>0,2 <math>\mu\text{g/l}</math></b>	5,214 $\pm$ 2,240	11,458 $\pm$ 2,649	<b>25,149<math>\pm</math>3,734*</b>	39,675 $\pm$ 5,268	<b>50,935<math>\pm</math>5,105*</b>	<b>73,167<math>\pm</math>3,883**</b>
<b>2 <math>\mu\text{g/l}</math></b>	5,265 $\pm$ 1,352	10,651 $\pm$ 0,326	31,921 $\pm$ 4,628	40,711 $\pm$ 5,608	62,841 $\pm$ 3,035	65,081 $\pm$ 3,686
<b>20 <math>\mu\text{g/l}</math></b>	4,926 $\pm$ 1,229	10,042 $\pm$ 1,555	<b>26,244<math>\pm</math>3,542*</b>	40,998 $\pm$ 5,667	56,911 $\pm$ 5,624	62,817 $\pm$ 3,562
<b>200 <math>\mu\text{g/l}</math></b>	4,379 $\pm$ 1,153	<b>9,516<math>\pm</math>0,815*</b>	29,148 $\pm$ 4,487	<b>35,589<math>\pm</math>3,298*</b>	64,929 $\pm$ 2,518	<b>71,507<math>\pm</math>5,417**</b>

průměr  $\pm$  střední chyba průměru

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  v porovnání s kontrolou

červeně - výsledky se signifikantně vyšším procentem spermii po akrozomální reakci

modře - výsledky se signifikantně nižším procentem spermii po akrozomální reakci

## 5. Diskuze

Gwatkin & Williams (1970) při pozorování efektu estrogenů a progesteronu na kapacitaci spermií králíka *in vitro* zjistili inhibiční efekt folikulární tekutiny s přidavkem těchto hormonů. Briggs (1973) získal podobné výsledky se spermiemi křečků. K opačnému závěru dospěl Bathla *et al.* (1999) se signifikantně vyšším počtem spermií inkubovaných v izolované děloze s přidavkem estrogenů. Nedávno bylo objasněno, že estrogeny a různé xenoestrogeny mají stimulační efekt na kapacitaci, akrozomální reakci a schopnost oplození u myších spermií (Adeoya-Osiguwa *et al.* 2003). Navíc preinkubace s estrogeny nepozměňuje schopnost lidských spermií splynout s vajíčkem (Francavilla *et al.* 2003). Za těchto okolností je však nutné si uvědomit, že k řádnému oplození dochází právě při správném a fyziologickém načasování procesů, jakož je kapacitace a akrozomální reakce, které tomuto předcházejí. Urychlení těchto procesů nemusí tudíž vést k úspěšné fertilizaci vajíčka spermií.

Ačkoli několik předešlých studií uvádí vliv estrogenů na zralé spermie u různých druhů živočichů, je zde několik rozporných výsledků v této oblasti. Výsledky z každé použité metody mohou být užitečné pro hledání specifických mechanismů, které zprostředkovávají estrogenní efekt v savčích spermiích.

Děd *et al.* (2010) prováděli výzkum vlivu estrogenů na kapacitaci kančích spermií *in vitro* a došli k závěru, že estrogeny stimulují kapacitaci kančích spermií, ale odlišně u jednotlivých zdrojových zvířat. Stimulační efekt závisel na času kapacitace a byl velmi ovlivněn rozdíly v reakci na estrogeny u individuálních zvířat. K testování kapacitace byly v citované publikaci používány kromě 17- $\beta$ -estradiolu i další estrogeny, a to estron, estriol a syntetický 17- $\alpha$ -ethinylestradiol. Naše výsledky jednotlivých pokusů u fluorescenčně hodnocených hlaviček spermií nebyly specifikovány na jedince, z tohoto důvodu byla použita uniformní populace BALB/c myši. Výsledky byly shromažďovány do konečného souboru dat pro vybraný estrogen o dané koncentraci a času kapacitace v době odběru vzorku. Z konečných statistických výsledků jsou nicméně patrné odchylky od průměrných hodnot, což může naznačovat, že spermie z *cauda epididymis* reagují na estrogeny a kapacitují i u jednotlivých myších samců BALB/c individuálně. U našich výsledků se projevoval stimulační efekt rozdílně u typu a koncentraci estrogenu. Velice zajímavé a relevantní v souvislosti s individuální odpovědí jedince na vlivy estrogenních hormonů je i publikace Spearow *et al.* (1999), kteří zjistili velké rozdíly mezi kmeny myši v citlivosti k narušení

reprodukčního vývoje dospívajícího samce při působení 17- $\beta$ -estradiolu. Rozdíly v účincích 17- $\beta$ -estradiolu na jednotlivé kmeny myši, jakož i dávka 17- $\beta$ -estradiolu na relativní váhu varlat a spermatogenezi byly vysoce signifikantní ( $P < 0.0001$ ). Maturace spermatid byla odstraněna již nízkými dávkami 17- $\beta$ -estradiolu v kmenech jako C57BL/6J a C17/J1s. Naopak rozsáhle používaný kmen myši CD1 linie, který byl vybrán pro početnost vrhů, ukázal malou nebo žádnou inhibici v zrání spermií, a to ani v odpovědi na 16ti násobnou dávku 17- $\beta$ -estradiolu. Toto poukazuje na fakt, že kmen myši vybraný pro vysokou plodnost mohl velmi podhodnotit výsledky vlivu 17- $\beta$ -estradiolu na rozvrácení samčího reprodukčního vývoje.

U Děd *et al.* (2010) měly jednotlivé estrogény relativně stejný efekt na průběh kapacitace. Estrogény u kančích spermií stimulovaly kapacitační proces v závislosti na koncentraci a signifikantně zvyšovaly počet spermií prošlých akrozomální reakcí indukované pomocí *zona pellucida*. V našem případě nelze jednoznačně říci, že estrogény měly stejný vliv na kapacitaci, u některých estrogenů byla vliv u nižších koncentrací, někde naopak u vyšších. Pro indukci AR jsme používali CaI, který jsme nechávali působit jednu hodinu. U 17- $\beta$ -estradiolu a estronu naše výsledky nevykazovaly shodu s Děd *et al.* (2010), docházelo naopak k signifikantnímu snížení AR v porovnání s kontrolou. U dalších dvou estrogenů 17- $\alpha$ -ethinylestradiolu a estriolu došlo v některých časech a koncentracích ke statisticky významnému snížení i zvýšení počtu spermií u kterých proběhla AR.

Adeoya-Osiguwa *et al.* (2003) došli k závěru, že u nekapacitovaných myších spermií 17- $\beta$ -estradiol v koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$  signifikantně stimuluje kapacitaci a akrozomální reakci, ale u kapacitovaných spermií nemá tento estrogen vliv žádný. U našich výsledků ve shodné koncentraci 17- $\beta$ -estradiolu jsme nezaznamenali statisticky významný rozdíl na začátku kapacitace, ale naproti tomu došlo ke konci kapacitace k signifikantnímu navýšení procenta

p-Tyr spermií. Adeoya-Osiguwa *et al.* (2003) zkoušeli přidat 17- $\beta$ -estradiol o vyšší koncentraci (10  $\mu\text{mol/l}$ ) do směsi nekapacitovaných spermií zjistili, že se signifikantně stimuluje schopnost spermie oplodnit vajíčko v porovnání s kontrolními vzorky. Zda tyto odpovědi mají vliv na plodnost *in vivo*, je potřeba stanovit

Kontrolní vzorky u výsledků Grasa *et al.* (2009) ukázaly p-Tyr proteinů v oblasti hlavičky beranní spermie, hlavně rozšířenou v ekvatoriální oblasti, u některých buněk s umístěním v akrozomálním nebo postakrozomálním segmentu. *In vitro* kapacitace podporuje fosforylaci bičíku i akrozómu a AR indukuje ztrátu značení akrozómu a následný

vzrůst značení v postakrozomální oblasti a v bičíku. Změny ve fosforylaci proteinů během kapacitace a akrozomální reakce u beranních spermii můžou mít fyziologické významy spojující jisté fosforylované proteiny k specifickým oblastem spermie, které jsou zapojeny do akrozomální exocytózy a rozpoznání, vazby a penetrace *zona pelucida*.

V průběhu kapacitace a oplození se u většiny studovaných druhů živočichů tyrozin fosforylované proteiny spermie nacházejí převážně v bičíku a přítomnost p-Tyr v hlavní části bičíku koreluje se získáním hyperaktivace motility (Grasa *et al.* 2009).

Dále Děd *et al.* (2010) dokázali nestejný efekt 17- $\beta$ -estradiolu na kapacitaci v různých časech inkubace. První signifikantní rozdíl mezi kontrolou a experimentálními vzorky byl v 60 minutách a odpověď byla ve 120 minutách kapacitace. V pozdějších kapacitačních stádiích ve 180 min rozdíly mezi kontrolou a experimentální skupinou nebyly signifikantní. My jsme pozorovali po 30 minutách signifikantní nárůst p-Tyr u dvou koncentrací, v 60 minutách pak statisticky významný pokles u jedné koncentrace a v 90 minutách výsledky u jedné koncentrace vykazovaly signifikantní nárůst a u jiné signifikantní pokles značených buněk. Naproti tomu ve výsledcích z SDS-PAGE elektroforézy byl kromě koncentrace 2  $\mu\text{g/l}$  větší nárůst p-Tyr proteinů v porovnání s kontrolou. Pozorované časově závislé efekty estrogenů na vývoj kapacitace jsou důležité objevy. Nejednotnost v hodnocení procesu kapacitace je patrná z jednotlivých publikací, kde autoři analyzovali kapacitaci spermii buď pouze po 30 minutách (Adeoya-Osiguwa *et al.* 2003), nebo naopak až po 180 – 300 minutách (Bathla *et al.* 1999) a nebo dokonce až pouze po 360 minutách (Gwatkin & Williams 1970) a tato skutečnost může být důležitý zdroj některých protichůdných výsledků.

Z publikovaných prací vyplývá, že efekt estrogenů na kapacitaci savčích spermii by měl být analyzován v pečlivě vybraných časech kapacitace, jenž odráží probíhající kapacitaci u jednotlivých druhů. Navíc analýza vlivu estrogenů v závislosti na kapacitačním čase může být užitečnější než hledání specifických molekulárních procesů, které časově korelují s vysoce signifikantním vlivem estrogenů (např. vtok vápníku, cholesterolový eflux, polymerizace aktinu, fosforylace proteinů, atd.) (Baldi *et al.* 2009).

Děd *et al.* (2010) rozpoznali velké rozdíly v reakci na estrogény během kapacitace *in vitro* mezi vzorky z různých individuálních kanců, takové výkyvy jsou předpokladatelné v heterogenní populaci jedinců. Tomuto jsme se snažili předcházet zvolením inbredního laboratorního kmene myši BALB/c avšak i tak jsme pozorovali určité individuální výkyvy mezi jednotlivými jedinci. Analýza různé vnímavosti k estrogenům mezi individuálními

zvířaty v testované populaci může být důležitá, protože individuální variabilita silně působí na celkové výsledky. Navíc detailní analýza individuí s vysokou a nízkou citlivostí k estrogenům může objasnit mechanismus estrogenní akce ve spermiích.

U vzorků s velkou citlivostí k estrogenům má 17- $\beta$ -estradiol výrazný účinek v koncentraci běžně požadované pro buněčnou odpověď zprostředkovanou estrogenními receptory (Nawata *et al.* 1981, Blair *et al.* 2000). Skutečnost, že vyšší koncentrace estrogenů v buňkách, kde jsou estrogenní receptory téměř saturované, bude stále zvyšovat počet kapacitovaných buněk v závislosti na koncentraci, navrhuje, že estrogenní efekt ve vysoké koncentraci, může být zprostředkován jiným mechanismem než přes estrogenní receptory (např. změnami v membráně) (Baldi *et al.* 2009). Tato myšlenka je dále podporována skutečností, že ve vzorcích s nesignifikantní odpovědí k 1  $\mu$ M 17- $\beta$ -estradiol, estrogeny mají výrazný vliv ve vysokých koncentracích (10-100  $\mu$ M), které jsou dále od koncentrace potřebné pro buněčnou odpověď zprostředkovanou estrogenními receptory v somatických buňkách. U našich výsledků se objevila signifikantní odpověď v koncentraci 200  $\mu$ g/l (nebo-li 1  $\mu$ M) 17- $\beta$ -estradiolu, a to signifikantně zvýšené procento kapacitovaných spermií v 90 minutách kapacitace, tato koncentrace byla zároveň nejvyšší, kterou jsme v našich experimentech použili. Tento fakt nasvědčuje tomu, že specifické mechanismy (jako např. signalizace přes receptory) jsou odpovědné za citlivost k estrogenům v nízké koncentraci, ale je nefunkční ve vzorcích v koncentracích 1-10 nM 17- $\beta$ -estradiolu. Přesto vysoké experimentální koncentrace estrogenů (10-100  $\mu$ M) jsou vzdálené od fyziologické hladiny estrogenů v plazmě (e.g.  $10^{-10}$  -  $10^{-11}$  M pro 17- $\beta$ -estradiol u myšičích a krys) (Nishimura *et al.* 2008). Nicméně na druhou stranu koncentrace estrogenů ve folikulární tekutině je vyšší a spermie možná proto budou vystaveny vysokým koncentracím během kapacitace v samičím reprodukčním traktu (Ouellette 2005, Tarlatzis 1993).

U výsledků Grasa *et al.* (2009) kapacitace zvyšuje proteinovou tyrozinovou, serinovou a treoninovou fosforylací, zatímco indukce AR pomocí CaI způsobuje signifikantní pokles fosforylace hlavně v těch proteinech, u kterých došlo k nárůstu fosforylace při kapacitaci. My jsme nezkoušeli zjistit průběh stavu fosforylace v proteinech spermií, u kterých jsme indukovali AR pomocí CaI, ale bylo by vhodné nějakou podobnou studii udělat a porovnat p-Tyr u vzorků zároveň kapacitovaných s indukovanou AR a pouze kapacitovaných.

Děd *et al.* (2010) dokázali signifikantní účinek estrogenů na ZP indukovanou AR. Děd *et al.* (2010) a signifikantně zvyšovaly počet spermií prošlých akrozomální reakcí indukované pomocí *zona pellucida*.

Počet spermií po AR byl signifikantně vyšší ve všech experimentálních skupinách. Výsledky z indukované AR byly mikroskopicky hodnoceny a také potvrzeny objektivními biochemickými metodami. Proto výsledky získané ze ZP indukované AR nejsou pouze pro potvrzení kapacitačního experimentu, ale také svědčí o tom, že estrogeny mají skutečné fyziologické účinky na kapacitaci spermií, jako analýza založená částečně na molekulárních a buněčných markrech kapacitace (vtok vápníku, akrozomální změny). Navíc analýza objektivními biochemickými metodami (ELISA, acrosin assay) poskytuje důležitá podporující data k subjektivním mikroskopickým metodám hodnocení.

My jsme se setkali spíše se snížením AR po inkubaci s estrogeny, může docházet k předčasnému seepnutí dráhy p-Tyr, která nemohla být dokončena polymerizací aktinu a jeho následnou depolymerizací, proto je AR opožděna oproti kontrole.

Grasa *et al.* (2006) zjistili, že inkubace beranních spermií v kapacitačních podmínkách, je spojena se vzrůstem p-Tyr. V další studii Grasa *et al.* (2009) ukázali, že AR indukovaná pomocí CaI způsobila ztrátu značení fosforylovaných proteinů v akrozomální doméně a následný vzrůst pozitivního signálu u fosforylovaných proteinů v post-akrozomální oblasti a ve střední části bičíku, což může navrhovat klíčovou roli těchto proteinů v dalších krocích interakce spermie s vajíčkem.

Bureau *et al.* (2002) provedli experiment u prasečích buněk, který ukázal, že po inkubaci progesteronu s epiteliálními buňkami vejcovodu se následně po přidání spermií zesílí vazba spermie na buňky vejcovodu, zatímco při inkubaci se 17- $\beta$ -estradiolem k tomuto zesílení nedochází, stejně jako u kontrolního vzorku. Počet buněk po AR se nezvýší ani po inkubaci s progesteronem, ani se 17- $\beta$ -estradiolem, ani u kontrolních vzorků.

CaI působí na zvýšení hladiny intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ . Dřívější experimenty (Fraser 1982) ukázaly, že působení CaI signifikantně stimuluje oplození v podmínkách *in vitro* a výsledky se shodují se změnami podporovanými kapacitací. Bureau *et al.* (2002) prováděli experimenty s látkami působícími na získání fertility u prasečích spermií (s CaI, s prasečí folikulární tekutinou, DMSO a kofeinem) a pro lepší porozumění regulace uvolňování spermií z buněk vejcovodu. Je známo, že tento postup usnadňuje kapacitaci i akrozomální reakci, spermie mohou být uvolněny samovolně. Inkubace buněk vejcovodu v přítomnosti CaI zvýšila odvázaní spermií od vajíčka, ale neměla vliv na procenta spermií, u kterých

proběhla AR. U ostatních přidávaných látek nebyl signifikantní rozdíl v rychlosti AR ani v oddělení spermie od vajíčka. Žádná z těchto substancí neměla vliv na integritu spermie.

Dále u Bureau *et al.* (2002) vyhodnocení spermii, které prošly AR, ukazuje, že působení progesteronu a CaI není způsobeno mechanickým narušením navázané spermie následující po ztrátě akrozómu.

Průběh AR se u spermii myšního kmene BALB/c ovlivněných 17- $\beta$ -estradiolem shodoval s výsledkem Johnson *et al.* (2007) v prvním testovaném čase (kap0 bez CaI) a druhém testovaném čase (kap30 + CaI5\*). V průběhu času se procenta spermii, u kterých proběhla AR zvyšovala, ale u našich výsledků byl nárůst AR intenzivnější než u Johnson *et al.* (2007), kdy již v čase kap30 + CaI60 byla téměř polovina spermii po akrozomální reakci, oproti výsledkům Johnson *et al.* (2007) ve stejném čase, kdy AR proběhla pouze u čtvrtiny spermii. V průběhu času rozdíl mezi našimi výsledky a výsledkem Johnson *et al.* (2007) narůstá. Tyto odlišnosti mohly vzniknout rozdílnou dobou působení CaI, který jsme my nechávali působit jednu hodinu.

Clift *et al.* (2009) demonstrovali, že myšice druhu *A. agrarius* má signifikantně rychlejší spontánní AR než *A. sylvaticus*, myš domácí (*Mus musculus*) nebo laboratorní myš kmene BALB/c. Uplatnění této strategie zvyšuje soutěživost u individuálních spermii a vede k rychlejšímu oplození v tomto velmi různorodém kmeni.

Experiment ukázal, že inkubace 17- $\beta$ -estradiolu s epiteliálními buňkami oviduktu nezesiluje vazbu spermie na buňky oviduktu. Inkubace buněk oviduktu v přítomnosti CaI zvýšila odvázaní spermii od vajíčka, ale neměla vliv na procenta spermii, u kterých proběhla AR (Bureau *et al.* 2002).



## 6. Závěr

K nejčtenějším statisticky významným rozdílům docházelo u estriolu a u syntetického 17- $\alpha$ -ethinylestradiolu, u kterého jsme zaznamenali i nejvíce signifikantní nárůst počtu buněk s p-Tyr u dvou nejvyšších (20 a 200  $\mu\text{g/l}$ ) koncentrací estrogenů.

Z konečných statistických výsledků jsou nicméně patrné odchylky od průměrných hodnot, což může naznačovat, že spermie z *cauda epididymis* reagují na estrogeny a kapacitují i u jednotlivých myších samců BALB/c individuálně.

U našich výsledků působení vybraných přírodních estrogenů (17- $\beta$ -estradiolu, estronu a estriolu) a syntetického estrogenu (17- $\alpha$ -ethinylestradiolu) na AR *in vitro* indukovanou CaI u myších spermií kmene BALB/c jsme u dvou estrogenů 17- $\beta$ -estradiolu a estronu zjistili statisticky významně nižší procenta spermií po AR v různých časech a koncentracích. Dále jsme našli signifikantní rozdíly v porovnání s kontrolou u estriolu a 17- $\alpha$ -ethinylestradiolu, kdy docházelo převážně ke statisticky významným zvýšením počtu buněk, u kterých proběhla AR. K těmto navýšením docházelo po 30 minutách kapacitace. Naopak v prvních pěti minutách kapacitace se vyskytly signifikantně nižší hodnoty reagovaných spermií. Procenta spermií, která prošla AR se zvyšovala s časem kapacitace.

Výsledky z každé použité metody mohou být užitečné pro hledání specifických mechanismů, které zprostředkovávají estrogenní efekt v savcích spermiích. Změny ve fosforylaci proteinů během kapacitace a akrozomální reakce u myších spermií mohou mít fyziologické významy spojující jisté fosforylované proteiny k specifickým oblastem spermie, které jsou zapojeny do akrozomální exocytózy, rozpoznání, vazby a penetrace *zona pelucida*.

Z našich výsledků lze usuzovat, že rostoucí koncentrace estrogenů v životním prostředí může představovat možné riziko v pozměňování několika mechanismů přispívajících ke schopnosti spermie oplodnit vajíčko.

## 7. Seznam použité literatury

Abou-Haila A., Tulsiani D. R. P. (2000): Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys.* 379(2): 173-82.

Abou-Haila A., Tulsiani D. R. P. (2009): Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 485(1): 72-81.

Adeoya-Osiguwa S. A., Markoulaki S., Pocock V., Milligan S. R., Fraser L. R. (2003): 17beta-Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. *Hum Reprod.* 18(1): 100-107.

Agrawal R. C., Kumar S. (1999): Hepato-toxic effect of diuron in albino rats. *Indian J Exp Biol.* 37(5): 503-4.

Aherne G. W., Briggs R. (1989): The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. *J Pharm Pharmacol.* 41(10) :735-6.

Aitken R. J., Harkiss D., Knox W., Paterson M., Irvine D. S. (1998): A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci.* 5: 645-56.

Andersson A. M., Skakkebaek N. E. (1999): Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *European Journal of Endocrinology.* 6: 477-485.

Aquila S., Sisci D., Gentile M., Middea E., Catalano S., Carpino A., Rago V., Andò S. (2004): Estrogen receptor (ER) alpha and ER beta are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(3): 1443-51.

Asquith K. L., Baleato R. M., McLaughlin E. A., Nixon B., Aitken R. J. (2004): Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *J Cell Sci.* 117: 3645-3657.

Baba T., Azuma S., Kashiwabara S. I., Toyoda Y. (1994a): Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem.* 269: 31845-31849.

Baldi E., Luconi M., Bonaccorsi L., Krausz C., Forti G. (1996): Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci.* 1: 189-205.

Baldi E., Luconi M., Bonaccorsi L., Muratori M., Forti G. (2000): Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci.* 5: E110-23.

- Baldi E., Luconi M., Muratori M., Marchiani S., Tamburrino L., Forti G. (2009): Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Mol Cell Endocrinol.* 308(1-2): 39-46.
- Bathla H., Guraya S. S., Sangha G. K. (1999): Role of estradiol in the capacitation and acrosome reaction of hamster epididymal spermatozoa in the isolated uterus of mice incubated *in vitro*. *Indian J Physiol Pharmacol.* 43(2): 211-217.
- Beato M., Herlich P., Schutz G. (1995): Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell.* 83: 851-857.
- Benoff S. (1997): Carbohydrates and fertilization: an overview. *Mol Hum Reprod.* 3(7): 599-637.
- Bergman M. D., Schachter B. S., Karelus K., Combastriaris E. P., Garcia T., Nelson J. F. (1992): Up-regulation of the uterine estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid during the mouse estron cycle: the role of estradiol. *Endocrinology* 130: 1923-1930.
- Blair R. M., Fang H., Branham W. S., Hass B. S., Dial S. L., Moland C. L., Tong W., Shi L., Perkins R., Sheehan D. M. (2000): The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol Sci.* 138-153.
- De Blas G., Michaut M., Treviño C L., Tomes C. N., Yunes R., Darszon A., Mayorga L. S. (2002): The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J Biol Chem.* 277(51): 49326-31.
- Breitbart H., Spungin B. (1997): The biochemistry of the acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction.* 3: 195–202.
- Breitbart H., Naor Z. (1999): Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Rev Reprod.* 4(3): 151-9.
- Brener E., Rubinstein S., Cohen G., Shternall K., Rivlin J., Breitbart H. (2003): Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod.* 68(3): 837-45.
- Briggs M. H. (1973): Steroid hormones and the fertilizing capacity of spermatozoa. *Steroids.* 22(4): 547-553.
- Brown T. R. (1999): Steroid Hormones, Overview. In: Knobil E., Neill J. D. (eds.): *Encyclopedia of Reproduction.* Academic Press. 634-644.
- Brzozowski A. M., Pike A. C., Dauter Z., Hubbard R. E., Bonn T., Engström O., Ohman L., Greene G. L., Gustafsson J. A., Carlquist M. (1997): Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature.* 389(6652): 753-8.
- Buffone M. G., Foster J. A., Gerton G. L. (2008): The role of the acrosomal matrix in fertilization. *Int J Dev Biol.* 52(5-6): 511-22.

- Bureau M., Bailey J. L., Sirard M. A. (2002): Binding regulation of porcine spermatozoa to oviductal vesicles *in vitro*. *J Androl.* 23(2): 188-93.
- Carlsen E., Giwercman A., Keiding N., Skakkebaek N. E. (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J.* 305: 609–613.
- Carreau S., Hess R. A. (2010): Oestrogens and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365(1546): 1517-35.
- Clift L. E., Andriikova P., Frolikova M., Stopka P., Bryja J., Flanagan B. F., Johnson P. M., Dvorakova-Hortova K. (2009): Absence of spermatozoal CD46 protein expression and associated rapid acrosome reaction rate in striped field mice (*Apodemus agrarius*). *Reprod Biol Endocrinol.* 7: 29.
- Ded L., Dostalova P., Dorosh A., Dvorakova-Hortova K., Peknicova J. (2010): Effect of estrogens on boar sperm capacitation *in vitro*. *Reprod Biol Endocrinol.* 8(1): 87.
- Delbès G., Levacher C., Habert R. (2006): Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction.* 132(4):527-38.
- Delclos K. B., Bucci T. J., Lomax L. G., Latendresse J. R., Warbritton A., Weis C. C., Newbold R. R. (2001): Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod Toxicol.* 15: 647-63.
- Demarco I. A., Espinosa F., Edwards J., Sosnik J., De La Vega-Beltran J. L., Hockensmith J. W., Kopf G. S., Darszon A., Visconti P. E. (2003): Involvement of a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem.* 278: 7001-7009.
- Dow M. P., Bavister B. D. (1989): Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation *in vitro*. *Gamete Res.* 23(2): 171-80.
- Dvořáková-Hortová K, Šandera M, Jursová M, Vašinová J, Pěkníková J. (2008): The influence of fluorides on mouse sperm capacitation. *Anim Reprod Sci.* 108(1-2): 157-70.
- Eddy E. M., O'Brien D. O. (1994): The Spermatozoon. In: Knobil E., Neill J. D. (eds.): *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 29-77.
- Eddy E. M., Washburn T. F., Bunch D. O., Goulding E. H., Gladen B. C., Lubahn D. B., Korach K. S. (1996): Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology.* 137: 4796-4805.
- Filardo E. J., Thomas P. (2005): GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF repase. *Trends Endocrinol Metab.* 16(8): 362-7.
- Francavilla F., Romano R., Pandolfi C., Macerola B., Santucci R., Necozone S., Francavilla S. (2003): Evaluation of the effect of 17alphaOH-progesterone and 17beta-oestradiol on human sperm ability to fuse with oocytes: comparison and possible interference with the effect of progesterone. *Int J Androl.* 26(6): 342-347.

Fraser L. R. (1982):  $\text{Ca}^{2+}$  is required for mouse sperm capacitation and fertilization *in vitro*. J Androl. 3: 412–419.

Gehm B. D., McAndrews J. M., Chien P. Y., Jameson J. L. (1997): Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 94: 14138-14143.

Gilbert S. F. (2006): Developmental Biology. 8th ed. Sunderland (MA), Sinauer Associates, Inc.

Gomes R. L., Scrimshaw M. D., Lester J. N. (2009): Fate of conjugated natural and synthetic steroid estrogens in crude sewage and activated sewage sludge batch studies. Environ Sci Technol. 43(10): 3612-3618.

Graham-Lorence S., Khalil M. W., Lorence M. C., Mendelson C. R., Simpson E. R. (1991): Structure-function relationships of human aromatase cytochrome P-450 using molecular modeling and site-directed mutagenesis. The Journal of Biological Chemistry, 266: 11939-11946.

Grasa P., Colas C., Gallego M., Monteagudo L., Muin˜o-Blanco T., Cebrián-Pérez J. A. (2009): Changes in content and localization of proteins phosphorylated at tyrosine, serine and threonine residues during ram sperm capacitation and acrosome reaction. Reproduction. 137(4): 655-67.

Gustafsson J. A. (1999): Estrogen receptor beta – a new dimension in estrogen mechanism of action. J Endocrinol. 163: 379-383.

Gwatkin R. B., Williams D. T. (1970): Inhibition of Sperm Capacitation *in vitro* by Contraceptive Steroids. Nature. 227(5254): 182-183.

Hardy D. M., Oda M. N., Friend D. S., Huang T. T. (1991): A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction. Biochem J. 275 (3): 759-66.

Hess R. A. (2000): Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. Rev Reprod. 5(2): 84-92.

Hess R. A. (2003): Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. Reprod Biol Endocrinol. 1: 52.

Hess R. A., Bunick D., Lee K. H., Bahr J., Taylor J. A., Korach K. S., Lubahn D. B. (1997): A role for oestrogens in the male reproductive system. Nature. 390: 509-512.

Hess R. A., Bunick D., Bahr J. (2001): Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract - a review. Mol Cell Endocrinol. 178(1-2): 29-38.

Hewitt S. C., Deroo B. J., Korach K. S. (2005): Signal transduction. A new mediator for an old hormone? Science. 307(5715): 1572-3.

Holt W. V., Harrison R. A. (2002): Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway: between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation. *J Androl.* 23(4): 557-65.

Hornung M. W., Zabel E. W., Peterson R. E. (1996): Toxic equivalency factors of polybrominated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and polyhalogenated diphenyl ether congeners based on rainbow trout early life stage mortality. *Toxicol Appl Pharmacol.* 140(2): 227-34.

<http://e.hormone.tulane.edu/learning/docking-receptor-binding.html>

<http://www.scienceblog.com/community/older/1997/B/199701564.html>

<http://cs.wikipedia.org/wiki/Spermie>

<http://en.wikipedia.org>

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

Janulis L., Hess R. A., Bunick D., Nitta H., Janssen S., Asawa Y. Bahr J. M. (1996): Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase which decreases as sperm traverse the epididymis. *J Androl.* 17(2): 111-116.

Johnson R. D. a 10 dalších. (1998): Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to early life stage brook trout (*Salvelinus fontinalis*) following parental dietary exposure. *Environ.Toxicol. Chem.* 17: 2408-2421.

Johnson P. M., Clift L. E., Andrlíkova P., Jursova M., Flanagan B. F., Cummerson J. A., Stopka P., Dvorakova-Hortova K. (2007): Rapid sperm acrosome reaction in the absence of acrosomal CD46 expression in promiscuous field mice (*Apodemus*). *Reproduction.* 134(6): 739-47.

Jones R. (1998): Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl.* 53: 73-84.

Jones M. E., Simpson E. R. (2000): Oestrogens in male reproduction. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 14(3): 505-16.

Khanal S. K., Xie B., Thompson M. L., Sung S., Ong S. K., Van Leeuwen J. (2006): Fate, transport, and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems. *Environ Sci Technol.* 40(21):6537-46.

Kolch W. (2000): Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* (351)2: 289-305. Review.

Korach K. S. (2000): Estrogen receptor knock-out mice: molecular and endocrine phenotypes. *J Soc Gynecol Invest.* 7: 16-17.

Křesinová Z., Svobodová K., Cajthaml T. (2009): Mikrobiální degradace endokrinně disruptivních látek. *Chemické listy.* 103: 200-207.

Kuiper G. G., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Häggblad J., Nilsson S., Gustafsson J. A. (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 138(3): 863-70.

Kumi-Diaka J., Townsend J. (2003): Toxic potential of dietary genistein isoflavone and beta-lapachone on capacitation and acrosome reaction of epididymal spermatozoa. *J Med Food*. 6(3): 201-8.

Landcack P., Price R. J. (1976): The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol Plant Pathol*. 9: 77-86.

Leclerc P., de Lamirande E., Gagnon C. (1996): Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod*. 55(3): 684-92.

Levin E. R. (2008): Rapid signaling by steroid receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 295(5): 1425-30.

Loeser C. R., Tulsiani D. R. (1999): The role of carbohydrates in the induction of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Biol Reprod*. 60(1): 94-101.

Luconi M., Porazzi I., Ferruzzi P., Marchiani S., Forti G., Baldi E. (2005): Tyrosine Phosphorylation of the A Kinase Anchoring Protein 3 (AKAP3) and Soluble Adenylate Cyclase Are Involved in the Increase of Human Sperm Motility by Bicarbonate. *Biol Reprod*. 72(1): 22-32.

Luconi M., Francavilla F., Porazzi I., Macerola B., Forti G., Baldi E. (2004): Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids*. 69(8-9): 553-559.

Luconi M., Forti G., Baldi E. (2002): Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 80: 369-381.

Luconi M., Muratori M., Forti G., Baldi E. (1999): Identification and Characterization of a Novel Functional Estrogen Receptor on Human Sperm Membrane That Interferes with Progesterone Effects *J Clin Endocrinol Metab*. 84(5): 1670-1678.

Mayor S. (2005): ACEing GPI release. *Nat Struct Mol Biol*. 12(2): 107-8.

Mayorga L. S., Tomes C. N., Belmonte S. A. (2007): Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life* 59(4-5):286-92.

Melzoch K., Filip V., Buckiova D., Hanzlikova I., Smidrkal J. (2000): Resveratrol – occurrence in wine originating from Czech vineyard regions and effect on human health. *Czech J Food Sci*. 18: 35-40.

Meyers S. A., Rosenberger A. E. (1999): A plasma membrane-associated hyaluronidase is localized to the posterior acrosomal region of stallion sperm and is associated with spermatozoal function. *Biol Reprod*. 61(2): 444-51.

Nagao T., Yoshimura S., Saito Y., Nakagomi M., Usmi K., Ono H. (2001): Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reprod Toxicol.* 15: 399-411.

Nawata H., Chong M. T., Bronzert D., Lippman M. E. (1981): Estradiol-independent growth of a subline of MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Biol Chem.* 256(13): 6895-902.

Naz R. K., Ahmad K., Kaplan P. (1992): Expression and function of ras proto-oncogene proteins in human sperm cells. *J Cell Sci.* 3: 487-94.

Naz R. K., Rajesh P. B. (2004): Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2: 75.

Nebert D. W., Nelson D. R., Adesnik M., Coon M. J., Estabrook R. W., Gonzalez F. J., Guengerich F. P., Gunsalus I. C., Johnson E. F., Kemper B., et al. (1989): The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. *DNA.* 8(1): 1-13.

Nelson L. R., Bulun S. E. (2001): Estrogen production and action. *J. Am. Acad. Dermatol.* 45: 116–24.

Nishimura I., Ui-Tei K., Saigo K., Ishii H., Sakuma Y., Kato M. (2008): 17- $\beta$ -Estradiol at physiological concentrations augments  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  currents via estrogen receptor  $\beta$  in the gonadotropin-releasing hormone neutral cell line GT1-7. *Endocrinology.* 149: 774-782.

Nixon B., MacIntyre D. A., Mitchell L. A., Gibbs G. M., O'Bryan M., Aitken R. J. (2006): The identification of mouse sperm-surface-associated proteins and characterization of their ability to act as decapacitation factors. *Biol Reprod.* 74(2): 275-87.

O'Toole C. M., Arnoult C., Darszon A., Steinhardt R. A., Florman H. M. (2000):  $Ca^{2+}$  entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell.* 11(5): 1571-84.

Ouellette Y., Price C. A., Carrière P. D. (2005): Follicular fluid concentration of transforming growth factor-beta1 is negatively correlated with estradiol and follicle size at the early stage of development of the firstwave cohort of bovine ovarian follicles. *Domest Anim Endocrinol.* 29(4): 623-633.

Pauwels B., Wille K., Noppe H., De Brabander H., Van de Wiele T., Verstraete W., Boon N. (2008): 17- $\alpha$ -estradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17- $\beta$ -estradiol and estriol. *Biodegradation.* 19(5): 683-93.

Pačes T. (2002): Estrogeny – ženské hormony ve vltavské a pitné vodě v Praze. Česká geologická služba, Praha.

Pedram A., Razandi M., Sainson R. C. A., Kim J. K., Hughes C. C., Levin E. R. (2007): A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 282: 22278–22288.



- Peknicova J., Kyselova V., Buckiova D., Boubelik M. (2002): Effect of an endocrine disruptor on mammalian fertility. Application of monoclonal antibodies against sperm proteins as markers for testing sperm damage. *Amer J Reprod Immunol.* 47: 311-318.
- Prossnitz E. R., Arterburn J. B., Sklar L. A. (2007): GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol.* 265-266:138-42.
- Quinn B., Gagné F., Costello M., McKenzie C., Wilson J., Mothersill C. (2004): The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquat Toxicol.* 66(3): 279-92.
- Raven G., de Jong F. H., Kaufman J. M., de Ronde W. (2006): In Men, Peripheral Estradiol Levels Directly Reflect the Action of Estrogens at the Hypothalamo-Pituitary Level to Inhibit Gonadotropin Secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 91(9): 3324-8.
- Revankar C. M., Cimino D. F., Sklar L. A., Arterburn J. B., Prossnitz E. R. (2005): A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science.* 307(5715): 1625-1630.
- Rosenfeld C. S., Ganjam V. K., Taylor J. A., Yuan X., Stiehr J. R., Hardy M. P., Lubahn D. B. (1998): Transcription and Translation of Estrogen Receptor- $\beta$  in the Male Reproductive Tract of Estrogen Receptor- $\alpha$  Knock-Out and Wild-Type Mice. *Endocrinology.* 139(6): 2982-2987.
- Saberwal G. S., Sharma M. K., Balasinor N., Choudhary J., Juneja H. S. (2002): Estrogen receptor, calcium mobilization and rat sperm motility. *Mol Cell Biochem.* 237(1-2): 11-20.
- Savouret J. F., Quesne M. (2002): Resveratrol and cancer: a review *Biomed Pharmacother.* 56: 84-87.
- Siemann G. J., Creasy L. L. (1992): Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Ecology and Viticulture.* 43: 49-52.
- Smith C. L. (1999): Estrogens, Overview. In: Knobil E., Neill J. D. (eds.): *Encyclopedia of Reproduction.* Academic Press. 119-126.
- Snyder M. J., Mulder E. P. (2001): Environmental endocrine disruption in decapod crustacean larvae: hormone titers, cytochrome P450, and stress protein responses to heptachlor exposure. *Aquat Toxicol.* 55(3-4): 177-90.
- Solakidi S., Psarra A-M. G., Nikolaropoulos S., Sekeris C. E. (2005): Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ER $\beta$  and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum Reprod.* 20(12): 3481-7.
- Son J. H., Meizel S. (2003): Evidence Suggesting That the Mouse Sperm Acrosome Reaction Initiated by the Zona Pellucida Involves an  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor1. *Biology of reproduction.* 68: 1348-1353.

- D'Souza R., Pathak S., Upadhyay R., Gaonkar R., D'Souza S., Sonawane S., Gill-Sharma M., Balasinor N. H. (2009): Disruption of tubulobulbar complex by high intratesticular estrogens leading to failed spermiation. *Endocrinology*. 150(4): 1861-9.
- Spearow J. L., Doemeny P., Sera R., Leffler R., Barkley M. (1999): Genetic variation in susceptibility to endocrine disruption by estrogen in mice. *Science*. 285(5431): 1259-61.
- Spungin B., Margalit I., Breitbart H. (1995): Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J Cell Sci*. 108 (6): 2525-35.
- Stefankiewicz J., Kurzawa R., Drozdziak M. (2006): Environmental factors disturbing fertility of men. *Ginekol Pol*. 77(2): 163-9.
- Storgaard L., Bonde J. P., Olsen J. (2006): Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure. A review of published epidemiological studies. *Reprod Toxicol*. 21(1): 4-15.
- Suarez S. S., Ho H. C. (2003): Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 49(3): 351-6.
- Swan S. H., Elkin E. P., Fenster L. (1997): Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect*. 105(11): 1228-32.
- Tarín J. J., Trounson A. O. (1993): Zona-free sperm penetration assay and inducers of the acrosome reaction: a model for sperm microinjection under the zona pellucida. *Mol Reprod Dev*. 35(1): 95-104.
- Tarlatzis B. C., Pazaitou K., Bili H., Bontis J., Papadimas J., Lagos S., Spanos E., Mantalenakis S. (1993): Growth hormone, oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid after ovarian stimulation with various regimes for assisted reproduction. *Hum Reprod*. 8(10): 1612-1616.
- Tash J. S., Means A. R. (1983): Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. *Biol Reprod*. 28(1): 75-104.
- Thomas P., Dong J. (2006): Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 102(1-5): 175-9.
- Thompson E. A., Siiteri P. K. (1974): The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization. *J Biol Chem*. 249(17): 5373-8.
- Thundathil J., de Lamirande E., Gagnon C. (2002): Different signal transduction pathways are involved during human sperm capacitation induced by biological and pharmacological agents. *Mol Hum Reprod*. 8(9): 811-6.
- Tulsiani D. R., Yoshida-Komiya H., Araki Y. (1997): Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod*. 57(3): 487-94.

- Tulsiani D. R., Abou-Haila A., Loeser C. R., Pereira B. M. (1998): The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res.* 240(2): 151-64.
- Tulsiani D. R., Zeng H. T., Abou-Haila A. (2007): Biology of sperm capacitation: evidence for multiple signalling pathways. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 63: 257-72.
- Tyler C. R., Jobling S., Sumpter J. P. (1998): Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit Rev Toxicol.* 28(4): 319-61.
- Urner F., Leppens-Luisier G., Sakkas D. (2001): Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose. *Biol Reprod.* 64(5): 1350-7.
- Van den Belt K., Verheyen R., Witters H. (2003): Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicol Environ Saf.* 56(2): 271-81.
- Visconti P. E., Bailey J. L., Moore G. D., Pan D., Olds-Clarke P., Kopf G. S. (1995): Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development.* 121(4): 1129-37.
- Visconti P. E., Moore G. D., Bailey J. L., Leclerc P., Connors S. A., Pan D., Olds-Clarke P., Kopf G. S. (1995): Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development.* 121(4): 1139-50.
- Visconti P. E., Galantino-Homer H., Ning X., Moore G. D., Valenzuela J. P., Jorgez C. J., Alvarez J. G., Kopf G. S. (1999): Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem.* 274(5): 3235-42.
- Visconti P. E., Ning X., Fornés M. W., Alvarez J. G., Stein P., Connors S. A., Kopf G. S. (1999): Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol.* 214(2): 429-43.
- Yanagimachi R. (1994): Mammalian fertilization. In: Knobil E., Neill J. D. (eds.): *The Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press, 189-317.
- Yang H. J. (2006): Feminization and reduction of testicular weight in mouse sparganosis. *Korean J Parasitol.* 44(2): 167-9.
- Zabel E. W., Peterson R. E. (1996): TCDD-like activity of 2,3,6,7-tetrachloroxanthene in rainbow trout early life stages and in a rainbow trout gonadal cell line (RTG-2) *Environ Toxicol Chem.* 15: 2305-2309.

Zeng Y., Clark E. N., Florman H. M. (1995): Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol.* 171(2): 554-63.

Zhou Q., Nie R., Prins G. S., Saunders P. T., Katzenellenbogen B. S., Hess R. A. (2002): Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl.* 23(6): 870-81

