

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**Buněčná a vývojová biologie  
Vývojová biologie**



Bc. Pavla Dostálová

**Vliv estrogenů na kapacitaci a akrosomální reakci kančích  
spermií *in vitro***

The effect of estrogens on capacitation and acrosome reaction of boar  
spermatozoa *in vitro*

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Školitelka: doc. RNDr. Jana Pěknicová, CSc.

Praha, 2011

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 4.5.2011

.....

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. Janě Pěkníkové, CSc. za vedení při zpracovávání mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Lukáši Dědovi za pomoc při zpracovávání výsledků a spolupráci na řešeném tématu, Mgr. Aleně Kubátové a Mgr. Hasmik Margaryan za pomoc při uchopení metod. V neposlední řadě bych chtěla vyjádřit své díky celému kolektivu laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí a své rodině a přátelům za morální podporu v průběhu mého studia.

## Abstrakt

Oplození je jedinečný proces, při kterém dochází k fúzi samčí a samičí pohlavní buňky a vzniku nového organismu. Dříve než jsou pohlavní buňky schopné fúzovat, musí projít řadou regulovaných dějů. Mezi takové děje patří v případě samčí pohlavní buňky i kapacitace a akrosomální reakce (AR), které spermie podstupují v samičím reprodukčním traktu. Ačkoli je proces kapacitace studován již více než půl století, stále nejsou zcela známy jeho molekulární mechanismy a složky, které ho ovlivňují. V poslední době přibývá důkazů o vlivu estrogenů, původně považovaných za samičí pohlavní hormony, na mužskou reprodukci. Spermie při své cestě za vajíčkem přichází do kontaktu s estrogeny jak v samčím, tak samičím reprodukčním traktu a je tedy možné, že estrogeny hrají roli i v procesech zrání spermie. Tato studie se zabývá vlivem tří endogenních estrogenů (E1 – estron, E2 - 17 $\beta$  estradiol, E3 – estriol) a jednoho syntetického estrogenu (EE2 - 17 $\alpha$  etynylestradiol), hojně používaného jako složka orální antikoncepce, na samčí reprodukci na úrovni dvou zracích dějů spermie – kapacitace a AR. Byl prokázán stimulační vliv všech testovaných estrogenů na kapacitaci i AR indukovanou zona pellucida. Prokapacitační vliv estrogenů závisel na estrogenu, jeho koncentraci a čase kapacitace. Rovněž byly zjištěny rozdíly ve vnímavosti k estrogenům mezi jednotlivými zvířaty. Dále se tato studie zabývá detekcí estrogenních receptorů (ERs) ve spermiích a případného vztahu ERs k estrogenním vlivům. Bylo prokázáno, že alespoň z části ERs zprostředkovávají estrogenní působení na spermie, i když estrogenní vlivy na spermie jsou pravděpodobně způsobeny také nerekceptorovými mechanismy.

**Klíčová slova:** kapacitace, akrosomální reakce, estrogeny, estrogenní receptory

## **Abstract**

Fertilization is a unique biological event where male and female gametes fuse together to produce a new organism. Before the gametes are able to fuse, however, they must undergo a series of controlled changes. For the male gamete, capacitation and acrosome reaction (AR) must occur, which take place during the sperm migration through the female genital tract. Unfortunately, while the process of capacitation has been known for over half a century, the molecular basis and influential factors behind it are not fully understood. Although estrogens have been considered mainly female reproductive hormones, there is increasing evidence suggesting that these steroids have an important role also in regulation of male reproductive functions. Sperm come into the contact with estrogens during their formation in the male and female genital tract, indicating that the hormone may play an important role in sperm maturation. In this study, we examined the importance of three endogenous estrogens (E1 -estron, E2 - 17 $\beta$  estradiol, E3 - estriol) and one synthetic estrogen (EE2 - 17 $\alpha$  ethinylestradiol) on sperm maturation during capacitation and AR. Stimulatory effect were observed with all tested estrogens on both capacitation and zona pellucida induced AR. Moreover, we have determined that the stimulatory effect on capacitation depends on both estrogen concentration as well as capacitation time, and that these effects can vary amongst individual animals. This study also dealt with the detection of estrogen receptors (ERs) in sperm and their link to these estrogenic effects. We determined that while these ERs partially mediate estrogenic effects on sperm, these effects are likely caused by non-receptor mechanisms as well.

**Key words:** capacitation, acrosomal reaction, estrogens, estrogen receptor

# Obsah

Abstrakt, klíčová slova .....	4
Abstract, key words .....	5
Seznam zkratk .....	9
1. Cíle práce .....	11
2. Úvod .....	12
2.1 Reprodukce .....	12
2.1.1 Morfologie spermie .....	13
2.1.1.1 Jádno .....	14
2.1.1.2 Akrosom .....	14
2.1.1.3 Cytoskelet hlavičky .....	14
2.1.1.4 Bičík .....	15
2.1.1.5 Plazmatická membrána .....	16
2.1.2 Spermie v samčím reprodukčním traktu .....	16
2.1.2.1 Vznik spermií .....	16
2.1.2.2 Epididymální maturace .....	17
2.1.3 Spermie v samičím reprodukčním traktu .....	18
2.1.3.1 Kapacitace .....	19
2.1.3.2 Akrosomální reakce .....	22
2.2 Estrogeny .....	25
2.2.1 Syntéza estrogenů .....	25
2.2.2 Zástupce estrogenů .....	25
2.2.3 Zdroje a hladiny endogenních estrogenů .....	26
2.2.4 Působení estrogenů .....	27
2.2.4.1 Vliv estrogenů na spermie .....	28
2.3 Estrogení receptory .....	29
2.3.1 Protein estrogeního receptoru .....	30
2.3.2 Výskyt estrogeníh receptorů .....	31
2.3.3 Estrogení receptor alpha (ER $\alpha$ ) .....	32
2.3.4 Estrogení receptor beta (ER $\beta$ ) .....	33
2.3.5 Estrogení receptory ve spermiích .....	34
2.3.6 Signalizace estrogeního receptoru .....	35
2.3.6.1 Genomická dráha působení ERs .....	35
2.3.6.2 Negenomická dráha působení ERs .....	36
3. Metody .....	38
3.1 Použité roztoky .....	38

3.2 Odstranění steroidů z media .....	39
3.3 Kapacitace kančích spermií .....	39
3.4 Určení koncentrace spermií .....	40
3.5 Test na životnost spermií .....	40
3.6 Chlortetracyklinová analýza .....	40
3.7 Nepřímá imunofluorescence .....	42
3.7.1 Příprava preparátů .....	42
3.7.1.1 Příprava preparátů z kančích spermií pro nepřímou imunofluorescenci s ACR.2 protilátkou proti akrosinu .....	42
3.7.1.2 Příprava preparátů z kančích spermií pro nepřímou imunofluorescenci s protilátkami proti ERs.....	42
3.7.1.3 Příprava preparátů z myších spermií .....	42
3.7.1.4 Příprava preparátů z lidských spermií .....	42
3.7.2 Nepřímá imunofluorescence s protilátkou ACR.2 proti kančímu akrosinu .....	43
3.7.3 Nepřímá imunofluorescence s protilátkami proti estrogením receptorům .....	44
3.8 Průtoková cytometrie s ACR.2 protilátkou proti akrosinu .....	45
3.9 Nepřímá ELISA s ACR.2 protilátkou proti akrosinu .....	46
3.10 Měření aktivity akrosinu .....	46
3.11 Průtoková cytometrie s ACR.2 protilátkou proti akrosinu a protilátkami proti ERs .....	47
3.12 Izolace proteinů .....	48
3.12.1 SDS extrakce .....	48
3.12.2 Urea extrakce .....	49
3.12.3 Triton-X 100 extrakce .....	49
3.12.4 Extrakce v rehydratačním pufru .....	49
3.12.5 Extrakce s inhibitory proteáz .....	49
3.13 Elektroforetická separace proteinů na polyakrylamidovém gelu .....	50
3.14 Izoelektrická fokusace a elektroforetická separace proteinů .....	50
3.15 Přenos proteinů na PVDF membránu (Western blotting) .....	51
3.16 Imunodetekce estrogeních receptorů .....	51
3.17 Barvení gelů pomocí Coomassie blue .....	52
3.18 Barvení PVDF membrány pomocí Coomassie blue .....	52
3.19 Statistická analýza .....	52
4. Výsledky .....	54
4.1 Vliv estrogenů na kapacitaci kančích spermií .....	54
4.1.1 Vliv 1μM koncentrace E2 na kapacitaci kančích spermií <i>in vitro</i> .....	54
4.1.2 Vliv 1μM koncentrace E2 na kapacitaci kančích spermií <i>in vitro</i> – rozdíly ve vzorcích z různých kanců .....	55

4.1.3 Vliv vybraných koncentrací 4 estrogenů na kapacitaci kančích spermií <i>in vitro</i> .....	57
4.1.4 Vliv 1μM koncentrace E2 na akrosomální reakci kančích spermií indukovanou zona pellucida <i>in vitro</i> .....	59
4.1.4.1 Vliv 1μM koncentrace E2 na akrosomální reakci kančích spermií indukovanou zona pellucida <i>in vitro</i> – hodnoceno pomocí imunocytochemie s ACR.2 protilátkou proti akrosinu.....	60
4.1.4.2 Vliv 1μM koncentrace E2 na akrosomální reakci kančích spermií indukovanou zona pellucida <i>in vitro</i> –hodnoceno pomocí ELISA metody s ACR.2 protilátkou proti akrosinu a metody na stanovení aktivity akrosinu .....	60
4.2 Detekce estrogenních receptorů .....	61
4.2.1 Imunolokalizace ERs ve spermiích .....	61
4.2.2 Imunodetekce ERs .....	63
4.3 Vliv estrogenních receptorů a estrogenního prostředí na kapacitaci <i>in vitro</i> .....	68
5. Diskuse .....	70
6. Závěr .....	77
7. Literatura .....	79
8. Příloha .....	85



## Seznam zkratek

- 5'AMP - adenosin monofosfát s fosfátovou skupinou na 5.uhlíku
- AC - adenylát cykláza
- ACR.2 - protilátka proti kančímu akrosinu
- AF1,2 - aktivační funkce 1,2
- AR- akrosomální reakce
- ATP - adenosintrifosfát
- BAPA - N-alpha benzoyl-L-arginin P-nitroanilid hydrochlorid
- BHB3 – kančí spermadhezin
- BSA - hovězí sérový albumin
- cAMP - cyklický adenosin monofosfát
- cDNA - komplementární DNA
- cGMP - cyklický guanosin monofosfát
- C-konec – proteinový konec nesoucí COOH skupinu
- CTC roztok - chlortetracyklinový roztok
- CYP11A1 - Cytochrome P450, rodina 11, podrodina A, polypeptid 1
- DAG - diacylglycerol
- DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole, fluorescenční barvička pro barvení jádra
- DNA - deoxyribonukleová kyselina
- DTT - dithiotreitol
- E1 - estron
- E2 - 17 $\beta$ -estradiol
- E2-BSA - 17 $\beta$ -estradiol konjugovaný s hovězím sérovým albuminem
- E3 - estriol
- EE2 - 17 $\alpha$ -etinylestradiol
- ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- ERK - Extracellular signal-regulated kinases
- ERs - estrogenní receptory
- ER $\alpha$  - estrogenní receptor alfa
- ER $\beta$  - estrogenní receptor beta
- ERKO myši – myši nesoucí inaktivační mutaci v genu pro estrogenní receptor
- $\alpha$ ERKO – inaktivační mutace v genu pro estrogenní receptor alfa
- F-aktin - filamentous, aktin ve vláknité formě

FITC - fluorescein isothiokyanát  
FSH - folikul stimulující hormon  
G-aktin - globular, aktin v monomerní formě  
GPCR - G protein-coupled receptor  
GPR30 - G-protein coupled receptor 30  
G-protein - protein vázající guanosin trifosfát  
HDL - high-density lipoprotein  
CHAPS - phenylmethylsulfonyl fluorid, serin proteasový inhibitor  
IP3 - inositol-3-fosfát  
KW-ANOVA - Kruskal-Wallis one-way analysis of variance  
MAPK - mitogen-activated protein kinase  
MCF7 buňky - buněčná linie rakoviny prsu  
mRNA - mediátorová ribonukleová kyselina  
N-konec – proteinový konec nesoucí NH<sub>3</sub> skupinu  
P - Pearsonův koeficient  
PBS - fosfátový pufr  
PBS-Tw - fosfátový pufr obsahující Tween20  
PI3K - phosphatidylinositol 3-kináza  
PAK - protein kináza A  
PKC - protein kináza C  
PLA2 - fosfolipáza A2  
PLC - fosfolipáza C  
PVDF membrána - membrána z polyvinyliden fluoridu  
RNA - ribonukleová kyselina  
SDS - sodium dodecyl sulfát  
SDS-PAGE - polyacrylamidová gelová elektroforéza se sodium dodecyl sulfátem  
SUS medium - uchovávací medium  
SWAM-Px - Swine anti-mouse peroxidase conjugate  
TBS - tris pufrovaný fyziologický roztok  
Tx-100 - Triton-X 100  
ZP - zona pellucida  
ZP3 protein - protein 3 na povrchu zona pellucida vajíčka

## 1. Cíle práce

Oplození je jedinečný děj, který může být na všech jeho úrovních poškozen mnoha faktory (genetickými, okolního prostředí). Po svém vzniku musí samčí i samičí pohlavní buňky podstoupit řadu regulovaných dějů než se stanou kompetentní a dají vznik novému jedinci. Mezi procesy, kterými prochází samčí pohlavní buňka patří i kapacitace a AR, ke kterým dochází v samičím reprodukčním traktu. Přestože proces kapacitace je znám již více než půl století, jeho přesné mechanismy a faktory, které ho ovlivňují, stále nejsou zcela známy.

**Cílem** této studie je zhodnotit vliv čtyř vybraných estrogenů (E1, E2, E3, EE2) na proces kapacitace a AR na modelu kančích spermií.

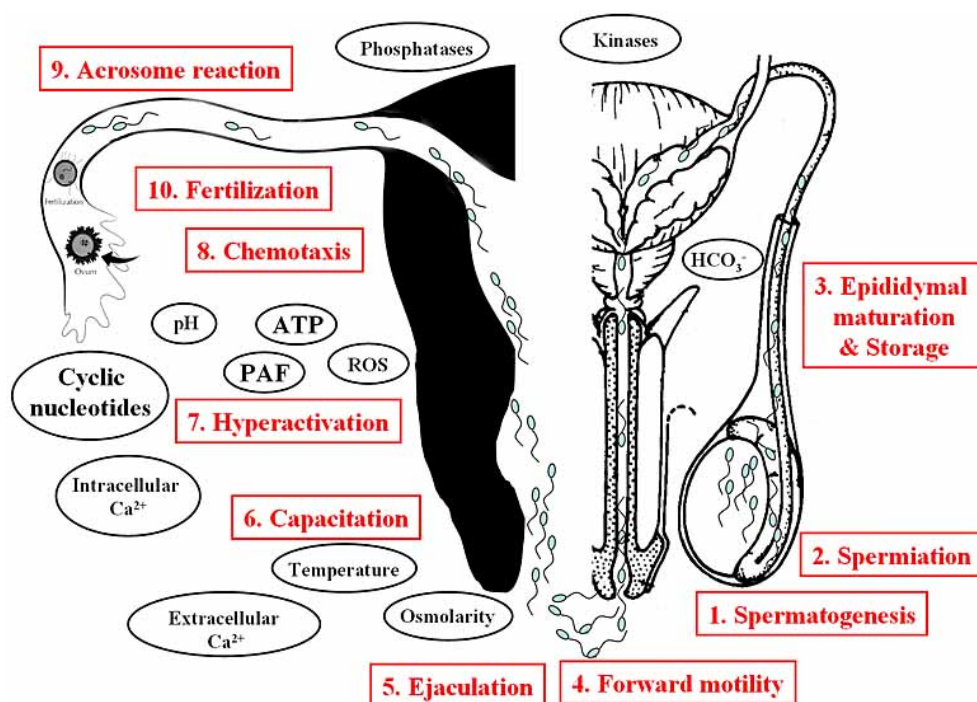
Dalším **cílem** této práce je detekce ERs ve spermiích, protože případná detekce ERs by mohla pomoci objasnit mechanismus působení estrogenů na spermie.

## 2. Úvod

### 2.1 Reprodukce

Oplození je jedinečný proces, při kterém dochází ke splynutí samčí a samičí pohlavní buňky (gamety) téhož druhu za vzniku diploidní buňky zygoty, která dále prochází jednotlivými vývojovými stádii a vyvíjí se v nového jedince. Tento proces může být poškozen genetickými, ale i vnějšími faktory. V poslední době přibývá neplodných párů, přičemž mužský faktor přispívá k neplodnosti přinejmenším 50% (WHO, 2010). Pochopení regulace jednotlivých dějů týkajících se mužské reprodukce a studie příčin neplodnosti jsou proto nezbytné pro stanovení léčby, případně pro vyvarování se škodlivým vlivům.

Samčí pohlavní buňka se nazývá spermie a vzniká procesem spermatogeneze ve varlatech. Testikulární spermie jsou nepohyblivé a nemají schopnost oplození, tu získávají až během jejich dalšího zrání jak v samčím (epididymální maturace), tak v samičím (kapacitace, hyperaktivace, akrosomální reakce) reprodukčním traktu (Yanagimachi, 1994).



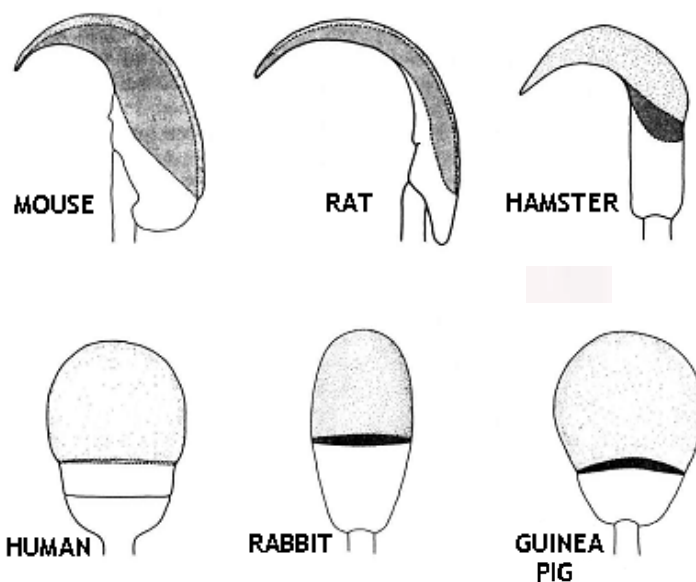
**Obr.1** Schematické znázornění procesů, které spermie podstupuje během své cesty za vajíčkem. V pravé části je znázorněn samčí reprodukční trakt, v levé pak samičí (Luconi et al., 2006).

### 2.1.1 Morfologie spermie

Samčí pohlavní buňka se nazývá spermie a vzniká procesem spermatogeneze ve spermatogenních kanálcích varlat. Je to vysoce specializovaná buňka uzpůsobená pro doručení genetického materiálu do vajíčka a aktivaci vajíčka. Ve vajíčku následně dochází k fúzi samčího a samičího prvojádra a vytvoření zygoty.

Spermie se skládá ze dvou hlavních částí – hlavičky a bičíku. V hlavičce je uchovávaná genetická informace a proteiny, které jsou nezbytné pro rozpoznání a navázání spermie na obaly vajíčka. Dále obsahuje enzymy, které pomáhají spermii proniknout vaječnými obaly. Bičík je pohybový aparát sloužící spermii k dosažení místa oplození a rovněž pomáhá při průniku vaječnými obaly (Yanagimachi, 1994; Gilbert, 2006).

Hlavička spermie obsahuje jádro, akrosom a pouze malé množství cytoplazmy a cytoskeletu. Většina cytoplazmy je odvržena při spermatogenezi spolu s dalšími pro spermii nepotřebnými organelami jako jsou ribozomy nebo endoplasmatické retikulum. Tvar a velikost hlavičky se druhově liší. Pro hlodavce je typický srpkovitý tvar hlavičky, zatímco pro ostatní savčí druhy je typický kulatý (člověk) nebo oválný (kanec) tvar hlavičky (obr.2), (Yanagimachi, 1994; Gilbert, 2006).



**Obr.2** Morfologické typy hlaviček savčích spermií (Yanagimachi; 1994).

### *2.1.1.1 Jádro*

Jádro spermie se od jádra somatických buněk značně liší. Jednak obsahuje pouze jednu sadu chromozomů a je tedy haploidní, jednak má vysoce kondenzovaný chromatin a jeho objem je tedy menší než u somatických buněk. K vysoké kondenzaci chromatinu přispívají relativně malé specializované proteiny tzv. protaminy, jejichž mRNA je syntetizována ve spermatidách a je tedy produktem haploidního genomu. Vysoce kondenzovaný komplex DNA a protaminů je dále stabilizován disulfidickými můstky vytvořenými mezi protaminy (Yanagimachi, 1994).

### *2.1.1.2 Akrosom*

Akrosom je specializovaná organela pokrývající přední část jádra spermie. Velikost a tvar akrosomu se druhově liší, ale u všech savců se skládá z ekvatoriálního segmentu tvořící spodní část akrosomu a hrající roli při fúzi spermie a vajíčka a akrosomální čepičky tvořící přední část akrosomu. Akrosom je formován v průběhu spermatogeneze z Golgiho aparátu a je tvořen vnitřní a vnější akrosomální membránou. Vnitřní akrosomální membrána překrývá přední část vnější jaderné membrány a vnější akrosomální membrána leží těsně pod plazmatickou membránou v přední části hlavičky. Tato membránová organela obsahuje lytické enzymy, jak běžné hydrolázy nacházející se v lysozomech, tak enzymy specifické pro spermatogenní buňky jako je proakrosin nebo hyaluronidáza (glukosidáza), která se však od běžné lysozomální formy liší. Syntéza akrosomálních enzymů začíná již v pachytenním stádiu meiozy v průběhu spermatogeneze, kdy akrosomální váček ještě není vytvořen. Proakrosin je neaktivní forma enzymu, který je syntetizován převážně v kruhových spermatidách, a patří do serin-proteázové superrodiny. V průběhu akrosomální reakce (AR) je proakrosin štěpen a vzniká jeho aktivní forma – akrosin (Yanagimachi, 1994).

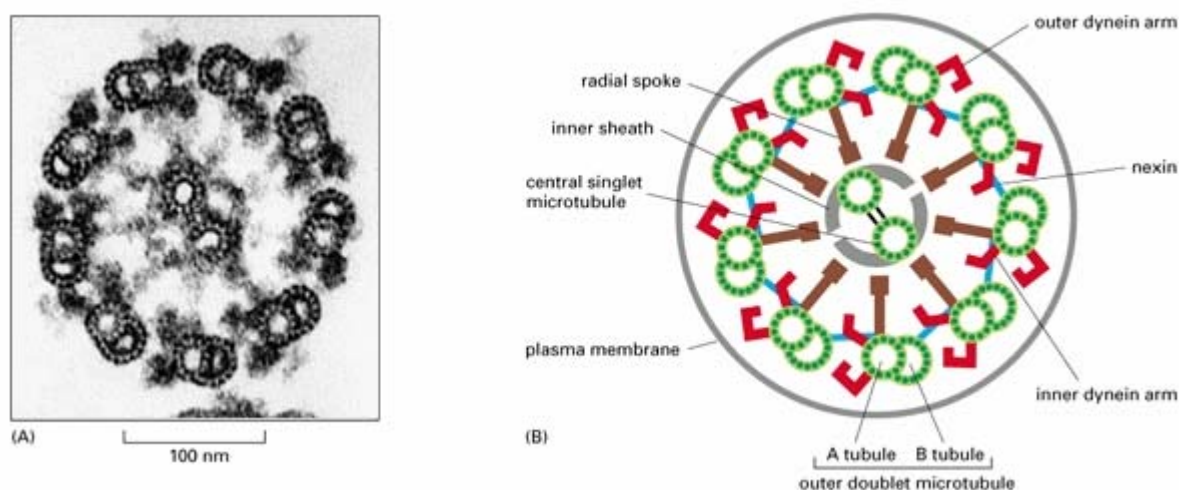
### *2.1.1.3 Cytoskelet hlavičky*

Cytoskelet hlavičky spermie jednak určuje tvar hlavičky, jednak hraje roli při průniku spermie vaječnými obaly. Podle výskytu lze cytoskelet rozdělit na tři části. Subakrosomální cytoskelet se nachází mezi jádrem a akrosomem a je velmi nápadný u spermií hlodavců, zatímco u spermií s oválným a kruhovým tvarem hlavičky je nepatrný. Postakrosomální cytoskelet se nachází mezi jádrem a plazmatickou membránou posteriorně od akrosomu a

paraakrosomální cytoskelet se nachází mezi akrosomem a plazmatickou membránou (Yanagimachi, 1994).

#### 2.1.1.4 Bičík

Bičík spermie se skládá ze čtyřech odlišných částí – krček spojující hlavičku a bičík, mitochondriální část (middle piece), hlavní část (principal piece) a koncovou část (end piece). Celková délka bičíku i poměry jeho jednotlivých částí se druhově liší (Yanagimachi, 1994). Jak již bylo řečeno, bičík slouží k pohybu a tedy k dosažení místa oplození. Pohybu napomáhá cytoskelet. Celou délkou bičíku probíhá axonema, struktura skládající se ze dvou centrálních mikrotubulů, které jsou obklopeny devíti dvojicemi mikrotubulů (A + B) (obr.3). Z mikrotubulu A vybíhají dvě dyneinová ramínka směřující k následující dvojici mikrotubulů, tato struktura je nezbytná pro pohyb. Axonema vychází z centrioly, která leží u posteriorního konce jádra. Téměř v celé délce bičíku je axonema obalena vnějšími hustými vlákny (outer dense fibers), ve střední části pak navíc ještě mitochondriemi. Mitochondrie jsou nezbytné pro zajištění energie v podobě ATP nutné pro pohyb bičíku. ATP pocházející z mitochondrií je dyneinovými ramínky hydrolyzováno a uvolněná energie poté umožňuje klouzání vnějších dvojic mikrotubulů, což vede k ohybu bičíku a tedy pohybu spermie (Alberts et al., 2002).



**Obr.3** Uspořádání mikrotubulů v bičíku: příčný řez bičíkem pod elektronovým mikroskopem (A); schematické znázornění (B) (Alberts et al., 2002).

### *2.1.1.5 Plazmatická membrána*

Plazmatická membrána spermií nemá jednotné složení a je rozdělena do funkčních domén. Molekuly zahrnuté v akrosomální reakci jsou přítomny v membráně v místě akrosomální čepičky, zatímco membrána ekvatoriálního segmentu obsahuje molekuly nezbytné pro fúzi spermií s vajíčkem. Plazmatická membrána v oblasti bičíku obsahuje pak molekuly zahrnuté v aktivitě bičíku. Hlavní složku plazmatické membrány spermií tvoří fosfolipidy, nezastupitelnou roli však hrají steroly, především cholesterol, který určuje tekutost membrány (Yanagimachi, 1994).

### *2.1.2 Spermie v samčím reprodukčním traktu*

Spermie vznikají ve varlatech procesem spermatogeneze. Z varlat jsou pak odváděny řadou kanálků, ve kterých dochází k jejich zakoncentrování a v nadvarlatech podstupují první maturační proces tzv. epididymální maturaci. V koncové části nadvarlat (cauda epididymis) jsou poté skladovány až do ejakulace, během níž se dostávají do styku se semennou plazmou.

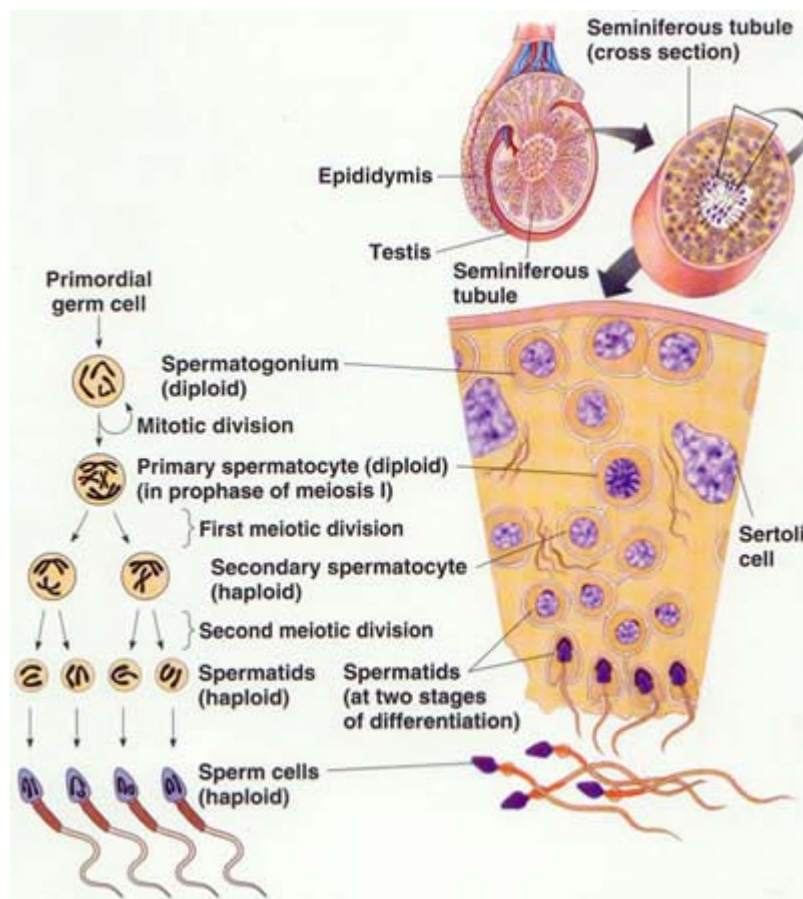
#### *2.1.2.1 Vznik spermií*

Pro vznik spermií je nezbytná nižší teplota než je teplota tělní, proto při embryonálním vývoji dochází k sestoupení varlat do šourku. Nesestouplá varlata vedou k vážnému poškození spermatogeneze a následně k neplodnosti. Spermie nevznikají v celém varleti najednou, ale spíše ve vlnách podél semenotvorných kanálků.

Spermie vznikají procesem spermatogeneze, na který navazuje spermiogeneze (obr.4). Při spermatogenezi dochází nejprve k mitotickému dělení spermatogonií A, které leží při basální membráně semenotvorných kanálků. Tím je zajištěno jednak zachování početního stavu a jednak vznik spermatogonie B, která již nemá kontakt s basální membránou a dává vznik primárnímu spermatocyту. Primární spermatocyty mají stejně jako somatické buňky dvě sady chromozomů a jsou tedy označovány jako diploidní. Primární spermatocyt se dále meioticky dělí, což vede ke vzniku čtyř spermatid. Během prvního meiotického dělení dochází k redukci počtu chromozomů, vzniklé sekundární spermatocyty mají tedy již jen jednu sadu chromozomů, nicméně ještě stále mají zdvojené chromatidy. Sekundární spermatocyty podstupují druhé meiotické dělení, během kterého dochází k rozestoupení



chromatid a vzniklé spermatidy již jsou plně haploidní a dále se nedělí. Spermioogeneze je děj, při kterém dochází k morfologickým změnám vedoucích ke konečné podobě spermie. Tyto změny zahrnují odvržení nadbytečné cytoplazmy v podobě reziduálních tělísek, které jsou fagocytovány Sertoliho buňkami, tvorbu akrosomu z Golgiho aparátu, formování bičíku, kondenzaci chromatinu, kdy dochází k částečnému nahrazení histonů protaminem, a koncentrování mitochondrií při bázi bičíku (Yanagimachi, 1994; Gilbert, 2006).



**Obr.4 Spermatoogeneze.** Popis viz text.

(<https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/hum&ev/index.htm>)

#### 2.1.2.2 Epididymální maturace

Testikulární spermie je již morfologicky zralá, nicméně stále není schopná úspěšně oplodnit vajíčko. Proto, aby získala vlastnosti nezbytné pro úspěšné oplození musí nejprve podstoupit řadu regulovaných dějů. První takový zrací děj spermie podstupují ještě v samčím organismu. Ze semenotvorných kanálků putují spermie skrz tubuli recti, rete testis a ductuli efferents, ve kterých dochází ke vstřebávání až 90% tekutiny, do hlavy nadvarlete (caput

epididymis). Teprve při průchodu nadvarlaty spermie začínají získávat schopnost oplození. Tomuto ději se říká epididymální maturace.

U kanců se „plodné“ spermie objevují už v hlavě nadvarlete (caput), zatímco u lidí se objevují až v těle nadvarlete (corpus). Obecně je však přijímáno, že většina spermií získá schopnost oplození až po dosažení proximální části ocasu nadvarlete (cauda), kde jsou spermie skladovány (Yanagimachi, 1994). Testikulární spermie nejsou schopné pohybu buď vůbec, nebo jen velmi omezeně. Schopnost pohybu získávají právě až procesem epididymální maturace, při kterém dochází především ke změnám v plazmatické membráně. Epididymální tekutina má velkou absorpční a sekretující aktivitu. Během průchodu spermií nadvarlaty jsou mnohé molekuly (proteiny, lipidy, peptidy) na plazmatické membráně spermií měněny (př. glykosylovány), maskovány, nebo odstraňovány a zároveň jsou adsorbovány a včleňovány molekuly nové, syntetizované v nadvarlatech. Například cholesterol je ve značné míře sekretován v epididymis a včleňován do plazmatické membrány spermií, čímž přispívá k její stabilizaci (Yanagimachi, 1994). Jiné molekuly epididymálního původu mohou přispívat k přežívání spermií v prostředí ženského reprodukčního traktu, nebo se mohou účastnit vazby spermie na zona pellucida, popř. plasmatickou membránu vajíčka. Během epididymální maturace rovněž dochází ke změnám ve vnější akrosomální membráně, což může představovat přípravu membrány na splnutí s plasmatickou membránou během akrosomální reakce (Yanagimachi, 1994).

V průběhu epididymální maturace tedy dochází k mnoha změnám, které „připravují“ spermii na její další cestu. Ačkoli jsou tyto spermie již schopné pohybu a *in vitro* jsou schopné oplodnit vajíčko, pro úspěšné oplození *in vivo* musí ještě dosáhnout vajíčka, navázat se na zona pellucida, podstoupit akrosomální reakci, proniknout vaječnými obaly a sfúzovat s vajíčkem (Baldi et al., 2002). Potřebují tedy minimálně přežít nějaký čas v „nehostinném“ prostředí ženského reprodukčního traktu. Během této periody spermie získávají schopnosti nezbytné pro úspěšné oplození vajíčka procesem zvaným kapacitace.

### **2.1.3 Spermie v samičím reprodukčním traktu**

Po kopulaci se spermie dostávají do ženského reprodukčního traktu, kde podstupují další maturační děje, jako je kapacitace a akrosomální reakce. Tyto maturační děje jsou nezbytnou prerekvizitou pro úspěšné oplození vajíčka a jakákoli jejich disregulace může vést k selhání oplození.

### 2.1.3.1 Kapacitace

Jako kapacitace je označován děj, při kterém dochází k řadě regulovaných biochemických a biofyzikálních změn, které nastávají u spermií v samičím reprodukčním traktu. První, kdo v roce 1951 doložil potřebu kapacitace pro úspěšné oplození vajíčka, byli nezávisle na sobě Chang a Austin (1951). Dodnes však nejsou zcela známy její molekulární mechanismy. V průběhu kapacitace dochází k odstraňování a změnám stabilizátorů nebo ochranných plášťů plazmatické membrány spermií, což ji činí citlivější ke specifickému prostředí fertilizace (Yanagimachi 1994).

Rychlost kapacitace není pouze druhově specifická a určena kvalitou spermatu, ale je rovněž dána hormonálním stavem samice. Páří-li se samice před ovulací, spermie jsou skladovány v isthmu vejcovodu, kde dochází k jejich navázání na epitel a vytvoření oviduktálního rezervoáru spermií (Smith et al., 1987; Yanagimachi and Chang, 1963). Vazba spermií na epitel vejcovodu pomáhá udržet plazmatickou membránu spermií stabilní, čímž je sice zpomalena kapacitace, zato prodloužena jejich životnost. Páří-li se však samice až po ovulaci, kapacitace spermií je urychlena a spermie opouští isthmus dříve, aby „stihly“ dosáhnout vajíčka ve správný čas.

Po kopulaci jsou spermie skladovány v závislosti na druhu buď ve spodní části isthmus, kde dochází k navázání spermií na epitel vejcovodu a vytvoření oviduktálního rezervoáru, nebo u jiných druhů včetně člověka, jsou spermie nejprve skladovány v cervikálním mukusu a teprve později dochází k vytvoření oviduktálního rezervoáru (Yanagimachi, 1994). Cervikální mukus chrání spermie před „nehostinným“ prostředím vagíny a fagocytózou vaginálními leukocyty, rovněž brání vstupu semenné plasmy do dělohy a odstraňuje morfologicky abnormální spermie (Chretien, 1977). Později, v době ovulace, jsou spermie z oviduktálního rezervoáru uvolňovány a tvoří subpopulaci, která oplodní vajíčko. Spodní část isthmus je bohatá na adrenergní receptory a krevní výživa je zprostředkována utero-tubální arterií, která přináší krev bohatou na vaječnickové hormony, což naznačuje, že tato část vejcovodu může být velice citlivá k sebemenším změnám v profilu ovariálních hormonů (Hunter et al., 1983). K uvolnění z isthmus přispívají změny v plazmatické membráně v hlavičce spermií, ke kterým dochází v průběhu kapacitace, a hyperaktivace motility (Yanagimachi, 1994). Poté spermie putují skrz lumen vejcovodu do ampuly vejcovodu, kde se v ideálním případě setkávají s vajíčkem a dochází k oplození.

V prvním případě kapacitace spermií probíhá ve spodní části isthmus (Yanagimachi, 1994). Kapacitaci nedokončují všechny spermie najednou, ale spíše postupně a jsou tedy i

postupně uvolňovány z epitelu isthmu. U druhů, u kterých jsou spermie skladovány během páření nejprve ve vagině, kapacitace může začít již při průchodu spermii cervikálním mukusem (Yanagimachi, 1994). Není však jisté, zda se takovéto spermie účastní oplození. Například u křečků, plně kapacitované spermie nejsou schopné migrovat z dělohy do vejcovodu a vajíčko tedy nemohou oplodnit (Shalgi et al., 1992).

Během kapacitace dochází ke změnám v intracelulárních koncentracích iontů a změnám ve složení a distribuci lipidů a fosfolipidů, v důsledku čehož dochází ke zvýšení fluidity membrány (Lamirande et al., 1997). Dále dochází k odstraňování integrovaných proteinů pocházejících z nadvarlat (akrosom stabilizující protein) a semenné plazmy (dekapacitační faktor, caltrin) (Yanagimachi, 1994). Další složky semenné plazmy jako je adenosin, „fertilization promoting peptid“, kalcitonin a angiotensin II jsou v *in vivo* systému nezbytné pro správné načasování kapacitace a akrosomální reakce (Fraser et al., 2006a). Tyto látky se váží na specifické receptory v membráně spermie a spouští signální kaskády vedoucí k produkci c-AMP. Protože zvyšující se hladina c-AMP je spojována s kapacitací i akrosomální reakcí a předčasná akrosomální reakce je nežádoucí, je třeba hladinu c-AMP regulovat. S výjimkou angiotensinu II předčasně akrosomální reakci tyto látky zabraňují následným snížením produkce c-AMP v kapacitovaných spermiiích. Dalším regulátorem kapacitace je fosfodiesteráza, enzym, který štěpí c-AMP na jeho neaktivní metabolit 5'AMP a jehož hladina se s postupující kapacitací snižuje (Fraser et al., 2006a).

Vedle odstraňování některých složek membrány, jiné složky mohou být dále maskovány či naopak odmaskovány a zpřístupněny tak okolnímu prostředí. Výsledkem takovýchto změn je odhalení receptorů na povrchu spermie nezbytných pro rozpoznání a vazbu spermie na zona pellucida vajíčka (Abou-haila and Tulsiani, 2009).

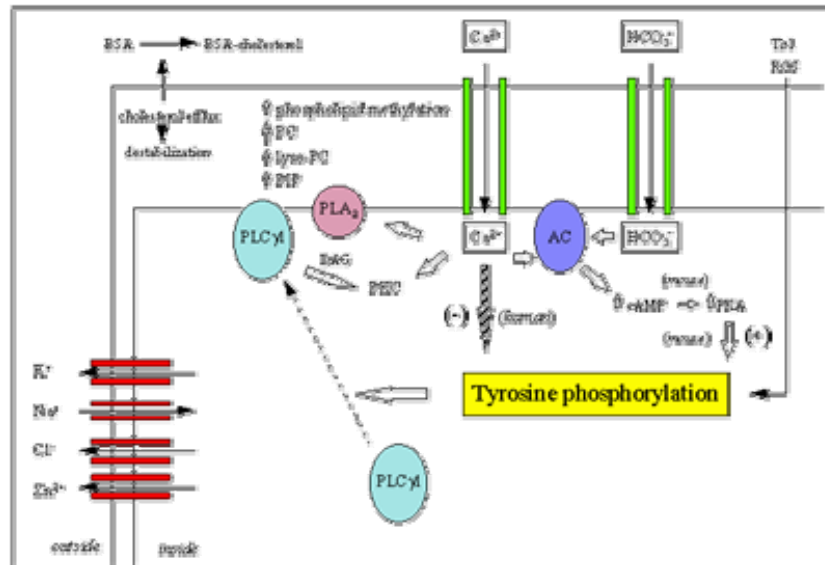
Ejakulované spermie mají díky navázání některých složek ze semenné plazmy (glykoproteiny, polypeptidy včetně tzv. dekapacitačního faktoru) stabilizovanější plazmatickou membránu a jsou tedy rezistentnější ke kapacitaci v porovnání s epididymálními spermiiemi (Yanagimachi, 1994). Kapacitace je rovněž spojována se zvýšením fosforylace proteinů na tyrosinových, serinových a threoninových zbytcích, zvýšením metabolismu a hyperaktivací motility (Baldi et al., 2002).

Stejně jako jiné buňky i spermie musí udržovat iontový gradient napříč plazmatickou membránou, proto u epididymálních spermii je intracelulární koncentrace draselných iontů zpočátku vysoká (120 mM), zatímco intracelulární koncentrace sodných iontů je nízká (14 mM). V průběhu kapacitace se však toto iontové prostředí mění, zvyšuje se intracelulární koncentrace sodíku, vápníku a bikarbonátu, v důsledku čehož se zvyšuje i intracelulární pH,

a naopak intracelulární koncentrace draselných, zinečnatých a chloridových iontů se snižuje (Yanagimachi, 1994).

Zvýšená koncentrace bikarbonátu a vápníku vede k aktivaci adenylát cyklázy (Baldi et al., 1996). Aktivovaná adenylát cykláza produkuje c-AMP, což vede k aktivaci c-AMP dependentní protein kinázy A (PKA), která způsobuje aktivaci skramblázy (Harrison and Gadella, 2005). Skrambláza je enzym zodpovědný za přemísťování fosfolipidů v rámci vnitřního a vnějšího listu membrány. V důsledku porušení asymetrie vnějšího a vnitřního listu membrány dochází k usnadnění odstraňování cholesterolu z plazmatické membrány. Albumin a HDL (high-density lipoproteins) vyskytující se v samičím reprodukčním traktu napomáhají odstraňování cholesterolu z membrány spermií, která se tak stává přístupnější pro lipid vázající komponenty ovidukální tekutiny (Abou-haila and Tulsiani, 2009). Tyto změny vedou ke zvýšení fluidity membrány jak v oblasti hlavičky, tak v oblasti bičíku (především v principal piece). V plazmatické membráně v oblasti akrosomu je u nekapacitovaných spermií vysoká koncentrace sterolů (především cholesterolu). Po kapacitaci je tato koncentrace značně snížena, což spolu s produkcí fúzogenních složek připravuje spermii na akrosomální reakci (Yanagimachi, 1994).

Aktivovaná PKA rovněž fosforyluje tyrosin kinázu na serinových a threoninových zbytcích, čímž dochází k její aktivaci. Fosforylovaná tyrosin kináza pak fosforyluje další proteiny na tyrosinových zbytcích (Baldi et al., 1996). Protein tyrosinová fosforylace je posttranslační modifikace proteinů typická pro kapacitaci a AR spermií. Vzhledem k vysoce kondenzované DNA a tedy nemožnosti ovlivňovat buněčné děje na úrovni syntézy nových proteinů, je postranslační modifikace velice důležitou součástí signalizačních dějů ve spermatické buňce. Během kapacitace jsou na tyrosinových zbytcích fosforylovány proteiny o molekulové váze 95, 51 a 75 kDa (Baldi et al., 1996). Předpokládá se, že protein tyrosinová fosforylace hraje důležitou roli v regulaci draselných a vápenatých kanálů. 95-100 kDa protein lokalizovaný v akrosomu je možný tyrosin kinázový receptor spermie pro vazbu na ZP3 protein vajíčka, který je během kapacitace a následné akrosomální reakce fosforylován (Baldi et al., 2002).



**Obr.5 Schematické znázornění hlavních dějů spojovaných s průběhem kapacitace.** Popis viz text. (Baldi et al., 1996).

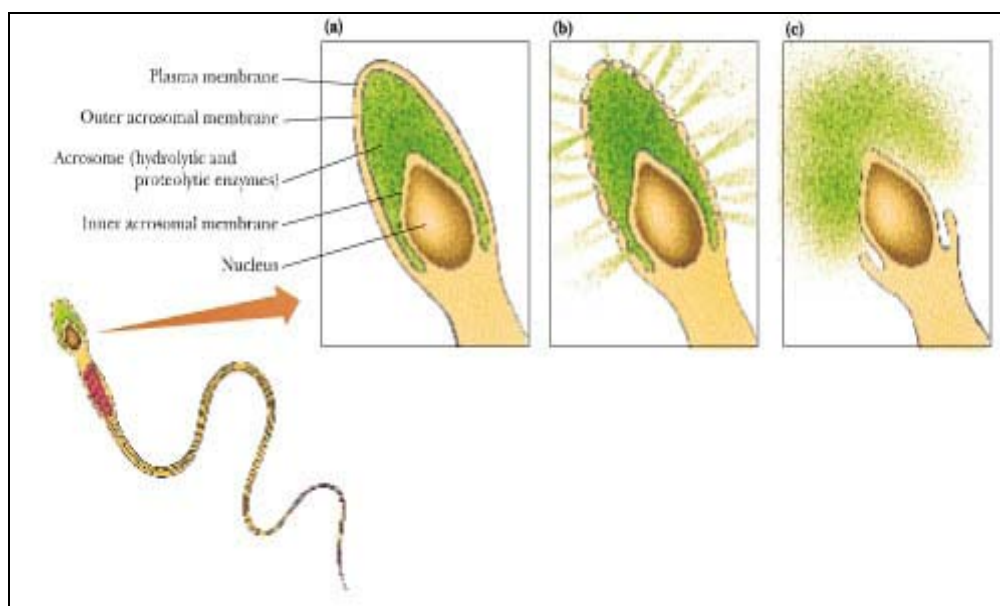
Proces kapacitace je možné navodit v *in vitro* podmínkách. Kapacitační medium se druh od druhu může lišit. Běžné kapacitační medium obsahuje energetický substrát (pyruvát, laktát, glukosa), cholesterolový akceptor (BSA),  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , nízkou koncentraci  $\text{K}^+$  a fyziologickou koncentraci  $\text{Na}^+$  (Visconti et al., 2002). Běžně používaná kapacitační media jsou upravené Tyrodovo a Krebs-Ringerovo medium. Komerčně dostupné je rovněž Ham F10 medium doplněné o krevní serum, které je používáno především pro *in vitro* fertilizaci.

### 2.1.3.2 Akrosomální reakce

Vajíčka savců jsou obklopena glykoproteinovým pláštěm zvaným zona pellucida a po ovulaci navíc ještě kumulárními buňkami a jejich matrix, jehož hlavní složkou je polymerizovaná hyaluronová kyselina. Skrz tuto bariéru musí spermie proniknout dříve než může sfúzovat s plazmatickou membránou vajíčka. Je prokázáno, že pouze spermie, která podstoupila akrosomální reakci po navázání na ZP vajíčka, je schopná proniknout skrz tento obal a sfúzovat s plazmatickou membránou vajíčka. Dále je známo, že spermie není schopná podstoupit akrosomální reakci spontánně ani po indukci ligandem, pokud neprošla procesem kapacitace (Yanagimachi, 1994).

Při akrosomální reakci dochází k mnohonásobnému splynutí vnější akrosomální membrány a nad ní ležící plazmatické membrány, což umožní vyelití akrosomálního obsahu a tedy uvolnění hydrolytických enzymů (Abou-haila and Tulsiani, 2009). Této fúze se

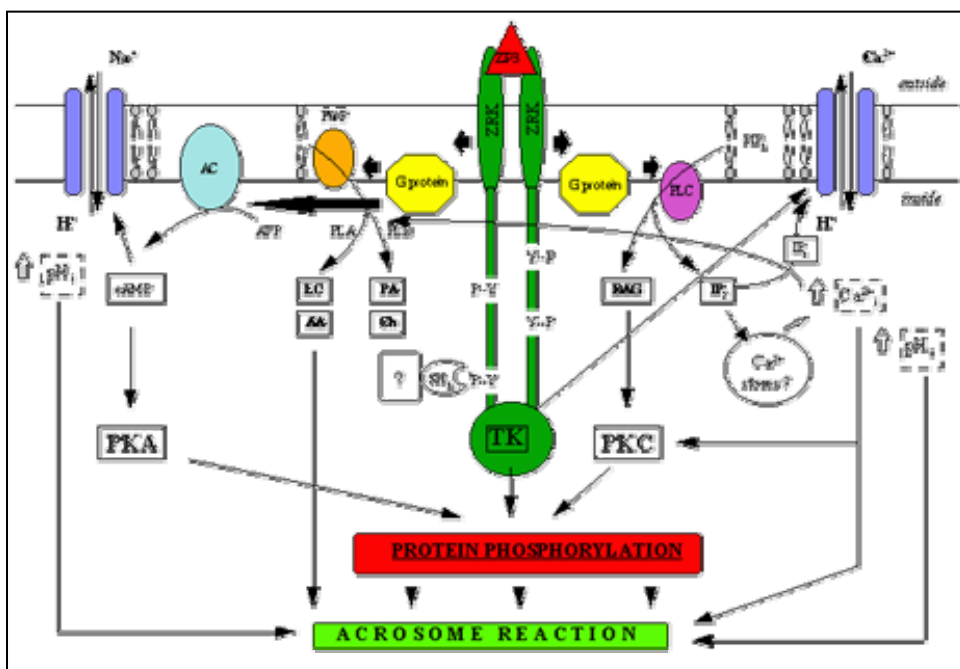
neúčastní vnější akrosomální membrána v oblasti ekvatoriálního segmentu, která je potřebná pro fúzi plazmatické membrány spermie a vajíčka (Yanagimachi, 1994).



**Obr.6 Akrosomální reakce:** Fúze vnější akrosomální membrány a nad ní ležící plazmatické membrány (b), které je následováno uvolněním akrosomálního obsahu (c). Obrázek (a) znázorňuje intaktní akrosom (<http://web.virginia.edu/Heidi/chapter34/chp34.htm>).

Fyziologická akrosomální reakce je vyvolána po navázání receptorů spermie na protein zona pellucida vajíčka (ZP3), který usnadňuje agregaci povrchových receptorů spermie (Yanagimachi, 1994). Akrosomální reakce může být vyvolána také po indukcii progesteronem, který je přítomný v kumulární matrix, nicméně o progesteronu jako o fyziologickém aktivátoru akrosomální reakce se spekuluje (Baldi et al., 2002). Vazba na protein ZP3 vede ke vtoku vápníku skrz napětově řízené vápenaté kanály. Zvýšení intracelulární koncentrace vápníku pak vede k aktivaci adenylát cyklázy (AC), fosfolipázy C (PLC) a fosfolipázy A2 (PLA2). Aktivovaná AC produkuje c-AMP, který následně aktivuje protein kinázu A (PKA). Aktivovaná PLC produkuje inositol-3-fosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG), což je fyziologický aktivátor protein kinázy C (PKC). Jak PKA, tak PKC následně fosforylují různé proteiny nezbytné pro akrosomální reakci, čímž mohou měnit jejich aktivitu. Aktivní PLA2 štěpí fosfatidylcholin na fúzogenní látky lysofosfatidylcholin a arachidonovou kyselinu (Baldi et al., 2002). Současně se zvyšující se koncentrací vápníku a pH dochází k depolymerizaci F-aktinu (filamentous) na monomerní G-aktin (globular). F-aktin tvoří u kapacitovaných spermii fyzikální bariéru mezi vnější akrosomální a

plazmatickou membránou. Po jeho depolymerizaci se obě membrány přiblíží, což spolu s produkcí fúzogenních látek vede k akrosomální reakci (Abou-haila and Tulsiani, 2009).



**Obr.7** Schematické znázornění dějů vedoucích k indukci akrosomální reakce (Baldi et al., 1996). Popis viz text.

Vedle fyziologické akrosomální reakce spermie mohou podstoupit také spontánní akrosomální reakci, která je vyvolána bez vnějšího stimulu. Mnoho spermií umírá na cestě za vajíčkem v ženském reprodukčním traktu, jiné podstupují spontánní akrosomální reakci. Protože po akrosomální reakci spermie ztrácí své povrchové receptory pro rozpoznání a vazbu na ZP vajíčka a není schopná proniknout vaječnými obaly, i takovéto spermie jsou v *in vivo* systému neschopné oplodnit vajíčko. Je zřejmé, že akrosomální reakce slouží pouze k proniknutí vaječnými obaly, protože spermie, které prodělaly akrosomální reakci předčasně, jsou schopné oplodnit vajíčko zbavené ZP a dát vznik normálním potomkům (Yanagimachi, 1994).



## 2.2 Estrogeny

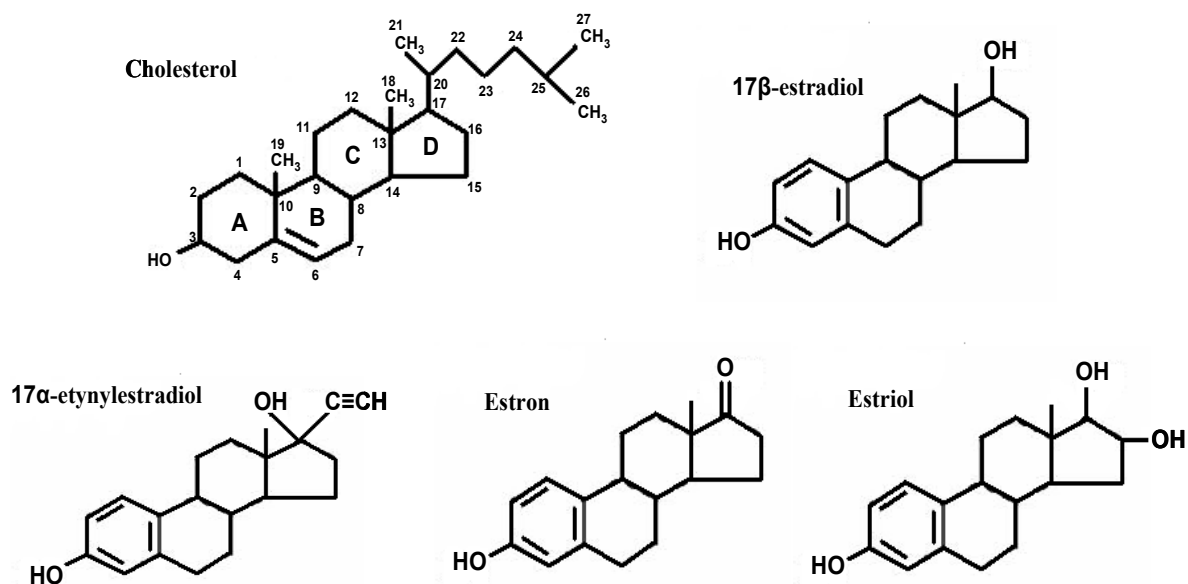
### 2.2.1 Syntéza estrogenů

Estrogeny jsou hydrofobní sloučeniny s osmnácti uhlíkovými atomy a aromatickým jádrem, které patří do skupiny tzv. steroidních hormonů. Steroidní hormony jsou syntetizovány ze společného prekursoru-cholesterolu. Jeho postranní řetězec je štěpen enzymem CYP11A1, který tak katalyzuje přeměnu 27-uhlíkové sloučeniny na 21-uhlíkový pregnenolon. Pregnenolon je poté přeměňován buď přes delta5 dráhu skrz dehydroepiandrosteron nebo přes delta4 dráhu skrz androstenedion na testosteron. Jak androstenedion, tak testosteron jsou prekurzory estrogenů, které z nich vznikají oxidativním odstraněním metylové skupiny na uhlíku 19 a následné aromatizace kruhu A ([http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5757&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5757&loc=ec_rcs)). Cirkulující estrogeny existují v dynamické rovnováze metabolické přeměny. Ta nastává především v játrech, kde při katabolismu estradiolu vzniká oxidací estron (tento proces je vratný) a následnou hydratací estriol.

### 2.2.2 Zástupce estrogenů

Mezi endogenní estrogeny patří 17- $\beta$  estradiol (E2), estriol (E3) a estron (E1). 17- $\beta$  estradiol je 18ti uhlíkový steroidní hormon s hydroxylovou skupinou na 3-beta a 17-beta pozici. Estriol má oproti 17- $\beta$  estradiolu navíc hydroxylovou skupinu na 16-alfa pozici a estron se od 17- $\beta$  estradiolu liší ve skupině navázané na 17-beta pozici, kde místo hydroxilové skupiny nese ketonovou skupinu (obr.8). Nejsilnější z těchto estrogenů je estradiol, asi 10x slabší je estron a nejslabší účinky vykazuje estriol. Estradiol je převažujícím estrogenem u žen od první menstruace po menopauzu, poté začne převažovat estron.

Mezi průmyslově vyráběné estrogeny patří syntetický alkylovaný 17- $\alpha$  etynylestradiol (EE2), který vzniká alfa-substitucí etynylové skupiny na 17. uhlíku estradiolu (obr.8). Je-li podáván orálně, má vysokou estrogení aktivitu a často se používá jako složka orální antikoncepce.



Obr.8 Strukturní vzorce estrogenů a jejich společného prekursoru cholesterolu.

### 2.2.3 Zdroje a hladiny endogenních estrogenů

Estrogeny byly původně považovány za samičí hormony, nicméně nacházejí se v menší míře i v tělech samců.

U samic jsou estrogeny produkovány především v Graafových folikulech ve vaječnicích, v menší míře pak v kůře nadledvin a tukové tkáni a v době pregnace také placentou. Jejich hladina není konstantní, ale periodicky se mění v průběhu ovariálního cyklu. Během první části cyklu dochází k progresivnímu zvýšení koncentrace estradiolu, nejvyšší hladina je dosažena těsně před ovulací. Po ovulaci, pokud nedojde k oplození vajíčka, dochází k opětovnému snížení jeho hladiny.

U mužů jsou estrogeny produkovány tkání varlat (Hess, 2000) a stejně jako u žen v kůře nadledvin a tukové tkáni. Za produkci estrogenů ve varlatech je zodpovědný enzym aromatáza, který přeměňuje androgeny na estrogeny (Carreau et al., 1999). Hlavním zdrojem estrogenů ve varlatech jsou zřejmě Sertolihovy a Leydigovy buňky, nicméně aromatáza byla rovněž prokázána v zárodečných buňkách a spermích (Rochira et al., 2005) a je tedy možné, že malé množství estrogenů jsou schopny produkovat i samotné spermatické buňky.

**Tabulka1 Očekávané hodnoty E2 u žen a mužů.**

Ženy	folikulární fáze	110 - 330 pmol/l
Ženy	ovulační peak	480 - 1170 pmol/l
Ženy	luteální fáze	260 - 730 pmol/l
Ženy	menopauza	40 -150 pmol/l
Muži	muži	40 -180 pmol/l

<http://www.jergym.hiedu.cz/~canovm/alkaloid/prirlatk/h3.html>

### **2.2.4 Působení estrogenů**

Působení estrogenů je velice rozmanité a závisí rovněž na typu tkáně. V jedné tkáni mohou působit jako agonisté, zatímco u jiných buněk stejný estrogen působí jako antagonist. Není tedy důležitá pouze přítomnost a koncentrace estrogenů, ale rovněž i buněčný kontext (Hammes and Levin, 2007). Estrogeny hrají roli v mineralizaci kostí, kardiovaskulárním systému, nervovém systému, imunitním systému a především v reprodukčním systému (Luconi et al., 2002). Cirkulující estrogeny rovněž díky negativní zpětné vazbě ovlivňují sekreci hormonů hypofýzy (gonadotropinů, luteinizačního hormonu a folikul stimulujícího hormonu), (Luconi et al., 2002).

U žen jsou estrogeny zodpovědné za vývoj ženských sekundárních pohlavních znaků a v reprodukčním věku hrají důležitou roli v estrálním cyklu, kde odpovídají za periodický vývoj děložní sliznice. Z jejich role v estrálním cyklu je také odvozen jejich název.

U mužů estrogeny mají vliv na průchod spermií mužským reprodukčním traktem (Hess, 2003) a zřejmě hrají roli i v dalších zračních dějích, které spermie prodělává v ženském reprodukčním traktu, tedy na kapacitaci a akrosomální reakci (Fraser et al., 2006b; Adeoya-Osiguwa et al., 2003). Dále mají estrogeny vliv na vývoj varlat. Abnormálně vysoká koncentrace estrogenu může poškodit vývoj Leydigových buněk, což vede ke snížení produkce testosteronu (Sharpe and Skakkebaek, 1993). Ve vyvíjejících se varlatech má estrogen nepřímý vliv na ustanovení počtu Sertoliho buněk (Sharpe and Skakkebaek, 1993). Ustanovení počtu Sertoliho buněk nastává ve fetální, neonatální a prepubertální fázi života a je pod kontrolou folikul stimulujícího hormonu (FSH). Protože estrogen inhibuje sekreci FSH, vystavení samčího plodu estrogenu vede ke snížení počtu Sertoliho buněk a protože každá Sertoliho buňka může podporovat pouze omezený počet zárodečných buněk

vyvíjejících se ve spermie, estrogen nepřímo ovlivňuje produkci spermií, nicméně jejich kvalita zůstává nezměněná.

#### *2.2.4 .1 Vliv estrogenů na spermie*

Je zřejmé, že spermie jsou vystaveny působení estrogenu jak v průběhu svého vzniku, tak později při průchodu a skladování v samičím reprodukčním traktu. Není proto překvapivé, že vliv estrogenu na tyto vysoce specializované buňky je studován již několik desetiletí. Bylo prokázáno, že estradiol stimuluje motilitu, zvyšuje oxidativní metabolismus a intracelulární koncentraci ATP (Idaomar et al., 1987). Naopak antiestrogen tamoxifen tyto vlivy inhibuje s výjimkou oxidativního metabolismu. O rok později Calzada a spol. (1988) prokázal zvýšení membránového potenciálu u spermií inkubovaných v přítomnosti estrogenu.

Další studie byly prováděny především na lidských spermiích a bylo prokázáno, že E2 zvyšuje intracelulární koncentraci vápníku a fosforylaci proteinů na tyrosinových zbytcích, nicméně tyto změny nevedou k indukci akrosomální reakce (Luconi et al., 1999; He et al., 2005). Naopak vliv E2 spíše interferuje s vlivy vyvolanými u spermií po inkubaci s progesteronem (Luconi et al., 2001). Progesteron u spermií vyvolává dvojfázový vtok vápníku a akrosomální reakci. V první fázi stimuluje rychlý vtok vápníku a ve druhé fázi nastává fáze plató, která je spojována s indukcí akrosomální reakce (Baldi et al., 1996). Protože E2 tuto fázi snižuje, předpokládá se, že inhibice progesteronem stimulované akrosomální reakce je způsobena právě inhibicí plató fáze (Luconi et al., 2001). Podle studie, kterou provedl Luconi a spol. (1999) se vliv E2 zdá být specifický, protože 17 $\alpha$ -estradiol nevyvolává vzrůst intracelulární koncentrace vápníku ani neinterferuje s progesteronovými vlivy. Inhibiční vliv E2 na akrosomální reakci vyvolanou progesteronem potvrdila i pozdější studie (Vigil et al., 2008). Možným vysvětlením inhibičního vlivu E2 na vlivy vyvolané progesteronem by mohla být interference jejich signálních drah nebo přímá kompetice o stejný receptor (Luconi et al., 2001), což podporují i dřívější kompetiční pokusy, kdy byla pozorována silná kompetice ve vazbě na membránu spermie mezi E2 a progesteronem (Cheng et al., 1981b) a navíc progesteron nebyl účinný ve snížení vazby E2 na spermie (Hernández-Pérez et al., 1979). Podobný vliv jako E2 mají také dva estrogení antagonisté Tamoxifen a ICI 164 384, narozdíl od E2 však jejich působení nevede k inhibici akrosomální reakce stimulované progesteronem (Luconi et al., 2001).

Inhibiční vliv E2 na progesteronové působení byl rovněž prokázán na úrovni vazby spermie na vajíčko u hovězího dobytka (Lukoseviciute et al., 2007), jiná skupina tento inhibiční vliv u lidí nepotvrdila (Francavilla et al., 2003). E2 rovněž inhibuje zvýšení hyperaktivace vyvolané progesteronem. Zde však tato inhibice byla způsobena inhibicí tyrosinové fosforylace a opět  $17\alpha$ -estradiol neměl vliv na účinky progesteronu (Fujinoki, 2010).

Odlišné výsledky vlivu E2 na spermie publikovaly další skupiny. U nekapacitovaných myších spermií byl prokázán stimulační vliv E2 jak na kapacitaci, tak oproti dřívějším studiím na akrosomální reakci (Fraser et al., 2006b; Adeoya-Osiguwa et al., 2003), zatímco na kapacitované spermie E2 vliv neměl (Adeoya-Osiguwa et al., 2003). Protichůdné výsledky získala jiná laboratoř, která u nekapacitovaných lidských spermií žádný vliv nepozorovala, naopak u kapacitovaných spermií po stimulaci E2 prokázala zvýšení akrosomální reakce a intracelulární koncentrace vápníku (He et al., 2005). Odlišné výsledky těchto skupin mohou být odrazem různých savčích modelů, rovněž vliv by mohl mít i fakt, že myší spermie byly epididymální, zatímco lidské ejakulované. Tyto skupiny dále inkubovaly spermie s konjugátem E2-BSA, který není schopný procházet plazmatickou membránou, a pozorovaly stejné vlivy jako u jeho nekonjugovaného protějšku, což naznačuje zahrnutí membránového receptoru ve zprostředkování E2 odpovědi.

Stimulační vliv E2 na kapacitaci a akrosomální reakci byl prokázán také u křeččích spermií inkubovaných v izolované děloze v přítomnosti E2 (Bathla et al., 1999). Zde autoři předpokládají, že by E2 mohl ovlivňovat syntézu proteinů dělohy, které jsou důležité pro kapacitaci a akrosomální reakci.

Předešlé studie prokázaly, že E2 může být nezbytný pro zrání a funkci spermií, nicméně mechanismus, kterým E2 vyvolává své vlivy stále není zcela objasněn, proto se různé skupiny snaží o detekci estrogenních receptorů.

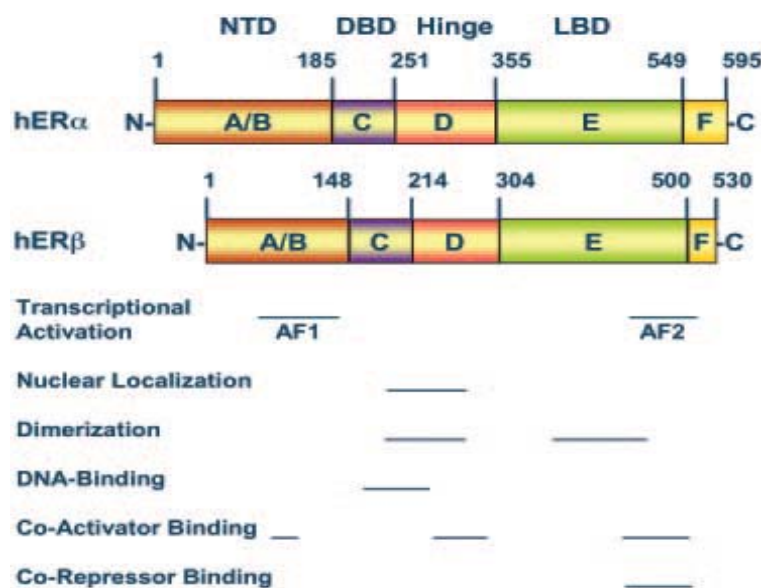
## 2.3 Estrogenní receptory

Estrogenní receptory (ERs) jsou skupinou jaderných receptorů typu I, které jsou aktivovány hormonem E2. Do současnosti byly identifikovány dva jaderné estrogenní receptory, které jsou kódovány různými geny. Estrogenní receptor alfa ( $ER\alpha$ ) byl identifikován už v roce 1950 a o téměř půlstoletí později (1996) byl identifikován také

estrogenní receptor beta (ER $\beta$ ), (Mueller, 2004). Díky alternativnímu sestřihu neexistuje pouze jedna forma ER $\alpha$  a jedna ER $\beta$ , ale je známo více izoformem.

### ***2.3.1 Protein estrogenního receptoru***

Protein ER se skládá z pěti domén: na N-konci je to A/B doména, která sdílí mezi klasickými ER (ER $\alpha$  a ER $\beta$ ) pouze 17% homologii. Tato doména obsahuje transaktivační doménu AF1 (activation function), která vyvolává slabou transaktivaci i v nepřítomnosti navázaného ligandu. AF-1 doména obsahuje rovněž fosforylační místa, která jsou cílem řady kináz, které tak mohou ovlivňovat aktivitu této domény. Další doménou je vysoce konzervovaná (97% homologie) C-doména, označovaná jako DNA-vázající doména, která má schopnost vázat se na DNA v místě ERE (estrogen response element) promotoru příslušného genu. D-doména tvoří pantovou oblast, která spojuje C- a E-doménu, a obsahuje signál pro jadernou lokalizaci. E doména je tzv. ligand-vázající doména, která sdílí mezi dvěma ERs 60% homologii, což vede k podobně vysoké afinitě k E2, nicméně je zodpovědná za odlišnou afinitu k různým syntetickým a přírodním ligandům, stejně tak k různým agonistům a antagonistům ERs. Je rovněž druhou doménou, která nese transaktivační místo AF2. Na rozdíl od AF1 však vyžaduje přítomnost navázaného ligandu a vede k mnohonásobně větší transaktivaci. E doména rovněž obsahuje vazebná místa pro koaktivátory a korepresory, které po navázání regulují transaktivační aktivitu. Poslední doménou je C-koncová F doména, která sdílí pouze 18% homologii (Luconi et al., 2002), (obr.9). Její funkce zatím není zcela známa a v rámci jednotlivých izoform ERs se může lišit v délce (Ho and Liao, 2003).



**Obr.9** Strukturní domény lidského ER $\alpha$  a ER $\beta$ . 1D aminokyselinová sekvence je znázorněna barevnými obdélníky; čísla nad obdélníky označují první a poslední aminokyselinový zbytek každé domény. Oblasti receptorů zodpovědné za specifické funkce jsou naznačeny pod obdélníky. NTD: N-koncová doména; DBD: DNA-vázající doména; (Koehler et al., 2005).

### 2.3.2 Výskyt estrogenních receptorů

ERs se mohou v buňkách vyskytovat jak v cytoplazmě, tak v membráně, případně jsou k membráně připojeny přes jiný protein. Předpokládá se, že membránové a jaderné ERs jsou tentýž protein, který byl přenesen do membrány neznámým mechanismem. Tuto teorii podporují výsledky z imunodetekce membránových ERs pomocí protilátek proti jaderným ERs. Další výsledky podporující tuto teorii byly získány ze studií na myších, které nesly inaktivační mutaci v genu pro ER (ERKO myši). U ERKO myši nebyly detekovány proteiny jaderných ani membránových ERs. Rovněž došlo ke ztrátě detekce proteinů membránových ERs po transfekci buněk jaderným ER $\alpha$  antisense oligonukleotidem. Naopak po expresi cDNA pro jaderné ERs v ER null buňkách byla zaznamenána kodetekce membránových a jaderných ERs (Levin, 2005). A konečně sekvenací bylo prokázáno, že membránové ERs izolované z rakovinných buněk jsou identické s klasickým ER $\alpha$  (Hammes and Levin, 2007).

Ačkoli oba klasické ERs mají podobně vysokou afinitu k E2, jejich odlišná tkáňová distribuce vede k odlišným účinkům stejného hormonu v různých tkáních (Luconi et al., 2002).

### 2.3.3 Estrogenní receptor alpha (ER $\alpha$ )

U lidí se gen pro ER $\alpha$  nachází na dlouhém raménku 6. chromosomu (lokus 6q25.1), u myši na 10. chromosomu (lokus 10 12.0 cM) a u kanců na 1. chromosomu (NCBI). Gen pro ER $\alpha$  obsahuje 8 exonů a 7 intronů. Protein ER $\alpha$  má velikost 67 kDa a u kanců a lidí obsahuje 595 aminokyselin, u myši pak o 4 aminokyseliny více (NCBI).

67 kDa forma ER $\alpha$  byla nalezena v endoteliálních buňkách (Hammes and Levin, 2007), děloze, MCF7 buňkách, v rámci mužského reprodukčního traktu pak v Leydigových buňkách, Sertolihových buňkách, spermatocytech, spermatidách, spermích, ductules efferent a epididymis (Hess, 2003; Carreau et al., 2008). U MCF7 buněk byl ER $\alpha$  lokalizován v mitochondriální matrix (Hammes and Levin, 2007). U potkanů je ER $\alpha$  vysoce exprimován v proximální části reprodukčního systému (ductus efferent, rete testis, proximal epididymis), distálně se jeho exprese snižuje (corpus a cauda epididymis, vas deferens), (Rochira et al., 2005).

ER $\alpha$  nemá kinázovou ani fosfatázovou aktivitu, neobsahuje hydrofobní část, která by mohla představovat transmembránovou doménu a ani není myristoylován či palmitoylován a nemůže tedy být kotven do membrány (Ho and Liao, 2002). Nicméně jiné práce našly ER $\alpha$  o velikosti 66 kDa v kaveolárních a nekaveolárních membránových raftech endoteliálních buněk, kde jeho stimulace vede k rychlé aktivaci endoteliální syntázy oxidu dusnatého a následné produkci oxidu dusnatého (Hammes and Levin, 2007).

Zkrácená forma ER $\alpha$  o velikosti 46 kDa byla identifikována v MCF7 buňkách, lidských embryonálních kmenových buňkách (Hammes and Levin, 2007), lidských zárodečných buňkách a zralých spermích (Lambard et al., 2004). Tato varianta odpovídá exon 1 deletované variantě ER $\alpha$  (Carreau et al., 2007).

Další izoformou ER $\alpha$  je 36 kDa forma, která byla nalezena v membráně rakovinných buněk, kde přenáší estrogenní i antiestrogenní aktivaci MAPK/ERK dráhy a stimuluje buněčný růst. Tato zkrácená forma postrádá transaktivační doménu a na N-konci nese tři různá potencionální myristoylační místa (Wang et al., 2006).

Cenné poznatky o roli ER $\alpha$  v mužské reprodukci byly získány ze studií na „knock out“ myších, kde se ukázalo, že  $\alpha$ ERKO myši jsou neplodné. S věkem se u těchto myší snižovala motilita a počet spermíí, rovněž byla poškozená morfologie spermíí a jejich schopnost oplození. Nicméně po přenosu zárodečných buněk z  $\alpha$ ERKO myší do varlat „wild type“ myší se schopnost oplození obnovila, což naznačuje, že pozorovaná snížená schopnost oplození u spermíí je spíše výsledkem poškození reprodukčního traktu než samotného



procesu spermatogeneze (Luconi et al., 2002). Skutečně, bylo prokázáno, že u  $\alpha$ ERKO myši nejprve dochází k dočasnému zvětšení varlat v důsledku zadržování vody, které je následováno jejich atrofií. Zpočátku spermatogeneze probíhá normálně, nicméně nedochází k zakoncentrovávání spermií ve vývodných kanálcích, kde v důsledku chybějících ERs dochází k inhibici transportu sodíku a následnému vstřebávání tekutiny, která se tak hromadí a vede k roztažení lumen a zpětnému tlaku na varlata, což ve výsledku vede k jejich atrofii a poškození spermatogeneze (Hess, 2003).

#### **2.3.4 Estrogenní receptor beta (ER $\beta$ )**

U lidí se gen ER $\beta$  nachází na 14. chromosomu (lokus 14q23.2), u myši na 12. chromosomu (lokus 12 33.0 cM), a u kanců, stejně jako v případě ER $\alpha$ , na 1. chromosomu (NCBI). Gen ER $\beta$  obsahuje 8 exonů a 7 intronů a jeho nezkrácený proteinový produkt má u lidí a kanců molekulovou váhu 59 kDa (Rago et al., 2006; Rago et al., 2007). U myši jsou známy minimálně dvě varianty tohoto receptoru, větší obsahuje 567 aminokyselin a má molekulovou váhu 63 kDa, menší forma o velikosti 48 kDa obsahuje 433 aminokyselin.

ER $\beta$  byl prokázán ve slinných žlázách, vaječnicích, hladké svalovině, nervovém a imunitním systému (Koehler et al., 2005) a s ohledem na samčí reprodukční systém pak v Leydigových a Sertolihových buňkách, spermatogoniích, spermatocytech, spermatidách, spermiích (Carreau et al., 2008), semenotvorných kanálcích, prostatě, nadvarlatech a vas deferens (Hess, 2003).

Izoforny ER $\beta$  se liší v posledním kódujícím exonu (exonu 8), který kóduje C-konec receptoru. Plně funkční ER $\beta$  je ER $\beta$ 1 o velikosti 59 kDa, který obsahuje jako jediný helix 11 a 12 v celé jejich délce. Helix 12 je nezbytný pro navázání koaktivátorů a transaktivaci. ER $\beta$ 2 má zkrácený C-konec, což vede k dizorientaci helixu 12 a značnému zmenšení vazebného místa pro koaktivátory. ER $\beta$ 4 a ER $\beta$ 5 helix 12 zcela postrádají. Tyto izoforny nejsou schopné tvořit homodimery a nemají tedy vlastní aktivitu, nicméně mohou tvořit heterodimer s ER $\beta$ 1 a zvyšovat tak jeho transaktivaci v přítomnosti fyziologické koncentrace E2. Vysoká hladina proteinu ER $\beta$ 3 byla prokázána ve varlatech (Leung et al., 2006).

Stejně jako u ER $\alpha$  i u ER $\beta$  byla prokázána membránová lokalizace v endoteliálních buňkách a mitochondriální matrix MCF7 buněk (Hammes and Levin, 2007).

### **2.3.5 Estrogenní receptory ve spermích**

Několik laboratoří se snažilo o detekci ERs ve spermích, aby objasnily možnou dráhu působení estrogenu na spermie, jejich výsledky nejsou jednotné.

První studie, která potvrdila vazbu steroidních hormonů na membránu spermií pochází z roku 1979 (Hernández-Pérez et al., 1979). O dva roky později byla tato studie potvrzena a bylo prokázáno, že steroidní hormony se váží v mitochondriální oblasti bičíku, méně pak v oblasti hlavičky a krčku a slabá reaktivita byla zaznamenána také v oblasti principal- a end- piece bičíku (Cheng et al., 1981b). Skupina Chenga se rovněž snažila o detekci ERs, nicméně jejich přítomnost v lidských spermích neprokázala (Cheng et al., 1981a). Nedávná studie prokázala vazbu E2 na křeččí spermie v oblasti akrosomu (Fujinoki, 2010).

První, kdo prokázal přítomnost ERs ve spermích byl Durkee a spol. (1998). Pomocí imunofluorescence prokázali přítomnost ERs v bičíku lidských spermií a na western blotu detekovali protein o velikosti 65 kDa, což odpovídá velikosti lidského ER $\alpha$ . Rovněž ve spermích prokázali přítomnost mRNA pro ER.

Detekce ER $\alpha$  ve spermích se zcela neshodují. Na lidských spermích jedna skupina prokázala výskyt pouze zkrácené formy proteinu ER $\alpha$  (46 kDa) ve zralých spermích, ačkoli v nezralých zárodečných buňkách detekovali jak zkrácenou tak nezkrácenou (66 kDa) formu proteinu ER $\alpha$  (Lambard et al., 2004), jiná skupina detekovala v ejakulovaných spermích obě izoformy (66 a 45 kDa) ER $\alpha$  (Solakidi et al., 2005). Odlišné výsledky získala také další skupina, která detekovala ve zralých a nezralých spermích opět pouze jednu formu ER $\alpha$ , ale oproti Lambardovi a spol. (2004) nedetekovali zkrácenou, ale plnou formu (67 kDa) proteinu ER $\alpha$  (Rago et al., 2006). Nezkrácená forma proteinu ER $\alpha$  byla nalezena také v kančích spermích (Rago et al., 2007).

Různé skupiny se zcela neshodují, v možné lokalizaci ER $\alpha$  ve spermích. Zatímco jedni, zaznamenali imunoreaktivitu u lidských spermií především v ekvatoriálním segmentu horní části postakrosomální oblasti hlavičky a v bičíku (Solakidi et al., 2005), druzí, při pokusech s lidskými a kančími spermii našli imunoreaktivitu v mitochondriální části bičíku u zralých spermií a u nezralých spermií v reziduální cytoplazmě (Rago et al., 2006; Rago et al., 2007). Tato lokalizace odpovídá vazebnému místu pro estrogen, které našel Cheng a spol. (1981b). Přítomnost ER $\alpha$  v mitochondriální části bičíku lidských spermií byla též nalezena další skupinou (Aquila et al., 2004).

Podobná situace je u ER $\beta$ . Lambard a spol. (2004) se snažili o detekci proteinu ER $\beta$  v lidských ejakulovaných spermích, ale výskyt tohoto proteinu neprokázali. Nicméně byli schopní amplifikovat jeho mRNA pocházející ze spermíí a pomocí protilátky proti ER $\beta$  našli 50 a 60 kDa protein v zárodečných buňkách. Tento objev podporují výsledky další skupiny, která detekovala oba proteiny v nezralých spermích, kde protein o velikosti 50 kDa byl více zastoupen oproti 59 kDa proteinu (Rago et al., 2006). 59 kDa protein byl rovněž detekován v lidských abnormálních spermích v reziduální cytoplazmě, což pravděpodobně značí pozůstatek tohoto proteinu z nezralých spermíí, kde se tato forma vyskytuje. Imunoreaktivita byla zaznamenána v bičíku nezralých a normálních spermíí, přičemž nezralé spermie vykazovaly imunoreaktivitu rovněž v reziduální cytoplazmě (Rago et al., 2006). Aquila a spol. (2004) detekoval imunoreaktivitu při použití protilátky proti ER $\beta$  po celé délce bičíku. Proteiny ER $\beta$  o stejné velikosti, jako byly nalezeny v nezralých lidských spermích (50 a 59 kDa), byly detekovány také v kančích spermích, ale na rozdíl od lidských spermíí, imunolokalizace byla zaznamenána v akrosomální oblasti (Rago et al., 2007). Další výsledek je v rozporu s těmito objevy. Solakidi a spol. (2005) v lidských spermích detekoval protein o velikosti 64 kDa a zaznamenal detekci proteinu ER $\beta$  pouze v mitochondriální části bičíku.

Luconi a spol. (1999) předpokládali, že doména pro vazbu ligandu by měla být konzervovaná mezi genomickými a negenomickými receptory. Proto pro detekci negenomického estrogenního receptoru v lidských spermích použili protilátku připravenou proti doméně genomického ER vázající estradiol a detekovali protein o velikosti 29 kDa. Při použití protilátky proti DNA vázající doméně 29 kDa protein nedetekovali, což svědčí o možné sestřihové variantě ER postrádající pro spermie nepotřebnou DNA vázající doménu. Přítomnost klasických ERs neprokázali ani s jednou z protilátek. Zdá se tedy, že E2 by mohl působit na spermie právě přes vazbu na tento 29 kDa membránový negenomický receptor, protože při preinkubaci spermíí s protilátkou proti ligand vázající doméně je potlačen vliv E2 na spermie. Membránový ER o velikosti 29 kDa byl nalezen také v děloze a játrech (Luconi et al., 2002).

### ***2.3.6 Signalizace estrogenního receptoru***

#### *2.3.6.1 Genomická dráha působení ERs*

Stejně jako jiné steroidní hormony i estrogény mohou pronikat plazmatickou membránou, vázat se na intracelulární receptory a ovlivňovat tak transkripci DNA. Tento

způsob působení estrogenů se vyznačuje pomalejším nástupem jejich účinku (řádově jde až o dny) a dlouhodobým trváním jejich vlivů. Po průniku estrogení látky plazmatickou membránou dochází k navázání této látky na intracelulární jaderné estrogení receptory, tím dochází ke změně konformace receptorů a disociaci navázaných „heat shock“ proteinů. Receptory poté tvoří homo- ( $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$ ) či hetero- ( $\alpha\beta$ ) dimery, které se přesouvají do jádra, kde nasedají na DNA v místě „estrogen response element“ (ERE) promotoru cílového genu a mohou tak regulovat přepis DNA do RNA a následně proteinů, což vede ke specifickým buněčných odpovědím. Tato dráha se označuje jako genomická a receptory jako genomické či jaderné. Rovněž receptory bývají označovány jako klasické, protože „klasická“ genomická dráha působení estrogenů na buňky byla objevena jako první (Ho and Liao., 2002).

#### *2.3.6.2 Negenomická dráha působení ERs*

V poslední době přibývá důkazů, jež naznačují, že estrogeny jsou schopné vyvolávat rychlé buněčné odpovědi. Tyto odpovědi jsou vyvolány mimojadernou/negenomickou cestou, kdy signál je předáván pomocí druhých posílů (Kelly et al., 2001). V mnoha buněčných typech estradiol vyvolává rychlou aktivaci protein kináz (MAPK, PI3K, PKC) a fosfatáz, uvolnění cyklických nukleotidů (cAMP, cGMP) a vzrůst intracelulární koncentrace vápníku. Tyto signální molekuly dále zprostředkují postranlační modifikace proteinů, převážně fosforylaci, což vede k rychlé aktivaci enzymů a buněčné odpovědi (Hammes and Levin, 2007).

Tyto vlivy E2 na buňku by mohly být zprostředkovány vazbou estrogenu na klasické či jiné ERs, které se vyskytují blízko nebo přímo v plazmatické membráně (Luconi et al., 2001). Pro zahrnutí klasických ERs, případně jejich izoform ve zprostředkování rychlých E2 vlivů svědčí studie s ER $\alpha$ . Tyto studie prokázaly, že po stimulaci ER $\alpha$  E2 dochází přes produkci druhých posílů k vyvolání rychlé buněčné odpovědi (Ho and Liao, 2002).

Naopak pro zahrnutí jiných než klasických ERs, případně jejich izoform svědčí fakt, že rychlé vlivy E2 nejsou inhibovány antagonisty klasických ERs (Kelly and Levin, 2001). Takovýmto neklasickým ER by mohl být „orphan G protein-coupled“ receptor (GPR30), který po stimulaci estradiolem zprostředkovává aktivaci G-proteinu. GPR30 je 7 transmembránový receptor, pro který v době jeho objevu nebyl znám ligand, proto dostal označení „orphan“. Expres mRNA pro GPR30 byla nalezena v mnoha tkáních, např. placentě, prostatě, vaječnicích, plicích a játrech (Prossnitz et al., 2007). Thomas et al. (2005)

identifikoval GPR30 jako nízkokapacitní receptor pro E2 schopný vytvářet malé množství cAMP. Další studie potvrdily, že E2 pomocí tohoto receptoru zprostředkovává v mnoha tkáních rychlé nengenomické působení (Hammes and Levin, 2007; Prossnitz et al., 2007). Aktivní GPR30 jednak stimuluje adenylát cyklázu, což vede k produkci c-AMP, jednak způsobuje zvýšení intracelulární koncentrace vápníku a aktivaci kináz. Tyto signální molekuly hrají důležitou roli jak v procesu kapacitace, tak v procesu akrosomální reakce. Dodnes neexistují důkazy o přítomnosti GPR30 ve spermiích.

Zda je E2 skutečně schopný působit nejen po průniku plazmatickou membránou a navázání na intracelulární ERs, ale rovněž na úrovni membránových ERs bylo zkoumáno za využití konjugátu estradiolu s BSA a bylo prokázáno, že jak E2 samotný, tak jeho konjugovaný protějšek vedou k vyvolání rychlých buněčných odpovědí (Luconi et al., 2002; Ho and Liao, 2002). Konjugát E2-BSA není schopný procházet membránou a pozorované vlivy by tedy měly být vyvolány membránovými receptory. Nicméně konjugát E2-BSA se může rozpadat, je tedy třeba s ním opatrně zacházet a rovněž BSA se může stát součástí kaveoly a zpřístupnit tak vazbu E2 s nemembránovými ERs, čímž by opět bylo dosaženo falešně pozitivního výsledku (Levin, 2005). Jiným přístupem je detekovat membránové ERs za použití protilátek proti ERs. Budeme-li předpokládat, že protilátka není schopná procházet plazmatickou membránou, pokud není porušena, pak její detekce nám značí funkční extracelulární doménu ERs (Levin, 2005).

Ačkoli výsledky různých skupin jsou rozporuplné, je jasné, že estrogen hraje roli nejen ve spermatogenezi, ale také při dalším zrání spermií během jejich průchodu ženským reprodukčním traktem. Rovněž se zdá, že spermie nesou určitou formu ERs a právě vazbou na ně by mohl E2 zprostředkovávat své vlivy. Spermie je však vysoce specializovaná buňka, její DNA je vysoce kondenzovaná, postrádá translační aparát a je biogeneticky neaktivní (Gilbert, 2006). Je tedy nepravděpodobné, aby estrogen působil na spermie skrz genomickou cestu. Navíc, prokázané působení estrogenu na spermie nastává příliš rychle na to, aby mohlo být vyvoláno aktivací genové exprese. Pravděpodobnější je tedy verze, kdy estrogen působí ve spermiích přes produkci druhých posílů.

### 3. Metody

#### 3.1 Použité roztoky

**2x koncentrovaný SDS vzorkový pufr** – 20% glycerol, 40 ml 10% SDS, 16 ml 1M Tris pH 6.8, 5 mg bromfenolová modř

**BAPA roztok** - 1 mg Na-Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilid hydrochlorid/1 ml dimethylformamide

**CTC roztok** - 750  $\mu$ M CTC, 130 mM NaCl, 5 mM cystein, 20 mM Tris-HCl, pH 7.8

**Ekvilibrační pufr** – 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 6M urea, 30% glycerol, 2% SDS

**Kapacitační medium** – 11.31 mM NaCl, 0.3 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM Tris, 1.1 mM glukóza, 0.5 mM pyruvát, v dH<sub>2</sub>O, pH 7.4

**Lyzační pufr** – 62.5 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2% SDS, 1% Tx-100, 10% glycerol

**Odbarvovací roztok pro odbarvení gelů** – 35% etanol, 10% CH<sub>3</sub>COOH, v dH<sub>2</sub>O

**Odbarvovací roztok pro odbarvení PVDF membrány** – 50% metanol, 10% CH<sub>3</sub>COOH, v dH<sub>2</sub>O

**PBS roztok** – 17.54g NaCl, 5.52g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O do 2l dH<sub>2</sub>O

**PBS-Tw** – 0.05% Tween20 v PBS

**Reakční pufr** – 0.2 M Tris-HCl, 0.02 M CaCl<sub>2</sub>, pH 8

**Rehydratační pufr** - 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 1% Triton X-100, 20 mM Tris

**Roztok Coomassie blue pro barvení gelů** – 1.25 g CBB, 35 ml CH<sub>3</sub>COOH, 250 ml EtOH, 215 ml vody

**Roztok Coomassie blue pro barvení PVDF membrány** – 0.1% CBB v 50% metanolu

**Roztok Hoechstu 33342** - 200 mg Hoechst 33342 v citrátovém pufru – 0.9 g NaCl, 0.44 g citrátu sodného ve 100 ml dH<sub>2</sub>O, pH 7.4

**Sušicí roztok** – 5% glycerol, 40% etanol, v dH<sub>2</sub>O

**TBS roztok** – 130 mM NaCl, 20 mM Tris, do 500 ml dH<sub>2</sub>O, pH 7.4

**Transferový pufr** – 28.8g glycin, 6g Tris, 400 ml CH<sub>3</sub>OH, do 2l dH<sub>2</sub>O

**Tris-glycinový SDS pufr** – 60.6g Tris, 288g glycin, 20g SDS, do 2l destilované H<sub>2</sub>O

**Urea extrakční pufr** – 9.5 M urea v 1.5% Tx-100

### 3.2 Odstranění steroidů z media

Pro odstranění steroidů z kapacitačního media bylo medium vysyceno pomocí aktivního uhlí Charcoal, Dextran coated (Sigma). Po 30 minutách inkubace při teplotě 55°C bylo medium centrifugováno při 4500g po dobu 20 minut při teplotě 4°C. Steroidů zbavené medium bylo sterilně zfiltrováno a do použití skladováno při teplotě -20°C.

### 3.3 Kapacitace kančích spermií

Kančí ejakulované spermie byly získávány z inseminační stanice Nová Ves firmy Proagro Nymburk, kde byly naředěny do uchovávacího media SUS (Solusem, Eurovet Animal Health BV). Všechny vzorky byly po odběru zkontrolovány a hodnocena jejich motilita. Kontrola motility proběhla také vždy před vlastním zpracováním vzorků v laboratoři. Vzorky byly centrifugovány po dobu 10 minut při 200g a teplotě 25°C a SUS medium bylo odstraněno. Buněčná peleta byla následně 2x promyta v TBS roztoku vytemperovaném na 37°C (200g, 10 minut). Buněčná suspenze byla nanesena na Percollový hustotní gradient (80, 70, 55, 40%) (Percoll, Sigma) a centrifugována po dobu 1 hodiny při 200g. Frakce spermií z 80% Percollu byla odebrána a následně 2x promyta v kapacitačním mediu bez bovinního sérum albuminu (BSA) (10 minut, 200g). Po promytí byla peleta resuspendována v kapacitačním mediu s BSA o koncentraci 1 mg/ml. Výsledná koncentrace spermií v mediu byla  $5 \times 10^7$  spermií/ml. Do experimentálních vzorků byly přidány jednotlivé estrogény (E1, E2, E3, EE2) do výsledné koncentrace 1nM – 100 μM. Z důvodu rozpouštění estrogenů v etanolu bylo do kontrolních vzorků přidáno stejné množství etanolu jako do experimentálních vzorků. Poté byly spermie kapacitovány při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Spermie byly odebírány v časech 0, 30, 60, 90, 120, 180 a 240 minut inkubace a dále zpracovávány. V průběhu kapacitace byly spermie každých 30 minut resuspendovány. Pro vyvolání akrosomální reakce byla k vybraným vzorkům v čase 240 minut kapacitace přidána solubilizovaná ZP (5 μg/ml kapacitačního media) a vzorky byly inkubovány po dalších 30 minut při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Solubilizovaná ZP byla získána ze Zemědělské univerzity v Praze.

### **3.4 Určení koncentrace spermií**

Před naředěním do kapacitačního media byla část spermií odebrána na stanovení koncentrace spermií. Koncentrace spermií byla počítána ve 100x ředěné suspenzi pomocí světelného mikroskopu (Meopta) v Bürkerově hemocytometrické komůrce.

### **3.5 Test na životnost spermií**

V průběhu kapacitace byla část spermií odebírána na test životnosti. 20  $\mu$ l suspenze spermií bylo smícháno s 20  $\mu$ l 0,2% glutaraldehydu (Sigma) v PBS. Po 5 minutách inkubace bylo přidáno 60  $\mu$ l PBS a do hodnocení byla suspenze skladována při 4°C. Stanovení životnosti bylo provedeno do 5 dnů. Při vlastním stanovení životnosti bylo 10  $\mu$ l buněčné suspenze smícháno s 10  $\mu$ l roztoku Hoechstu 33342 a inkubováno 5 minut v temnu při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo nanášeno 10  $\mu$ l suspenze spermií na podložní sklo, překryto krycím sklem a hodnoceno pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E400 s použitím objektivu Nikon Plan 40/0.75. Pozitivní fluorescence v oblasti hlavičky značí mrtvé buňky. V každém vzorku bylo hodnoceno 200 buněk.

### **3.6 Chlortetracyklinová analýza**

Pro hodnocení stavu spermie byla použita chlortetracyklinová analýza, pomocí které je možno rozlišit spermie nekapacitované, kapacitované a po akrosomální reakci.

V jednotlivých časech odběru v průběhu kapacitace byly spermie stočeny (200g, 10 minut), kapacitační medium bylo odstraněno a spermie byly resuspendovány v PBS. 45  $\mu$ l připravené suspenze spermií bylo přidáno do 45  $\mu$ l chlortetracyklinového (CTC) roztoku a resuspendováno v mikrozkuhavce obalené alobalem. CTC roztok byl připravován čerstvý a do použití skladován při 4°C v kádince obalené alobalem. Po 30 vteřinách inkubace byly spermie fixovány 8  $\mu$ l 12,5% paraformaldehydu v 0,5 M Tris-HCl (pH 7,4). Na podložní sklo bylo nanášeno 10  $\mu$ l suspenze spermií a pro zpomalení slábnutí fluorescence byla přidána kapka Vectashieldu (Vector Laboratories, Inc.). Po rozetření a přiložení krycího skla byla skla až do hodnocení skladována ve vlhké komoře při 4°C. Vzorky byly hodnoceny na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse E400 vybaveném objektivem Nikon Plan Apo VC



60/1.4 a fotografovány pomocí CCD kamery VDS1300 (Voskühler) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements AR (Laboratory Imaging Ltd.).

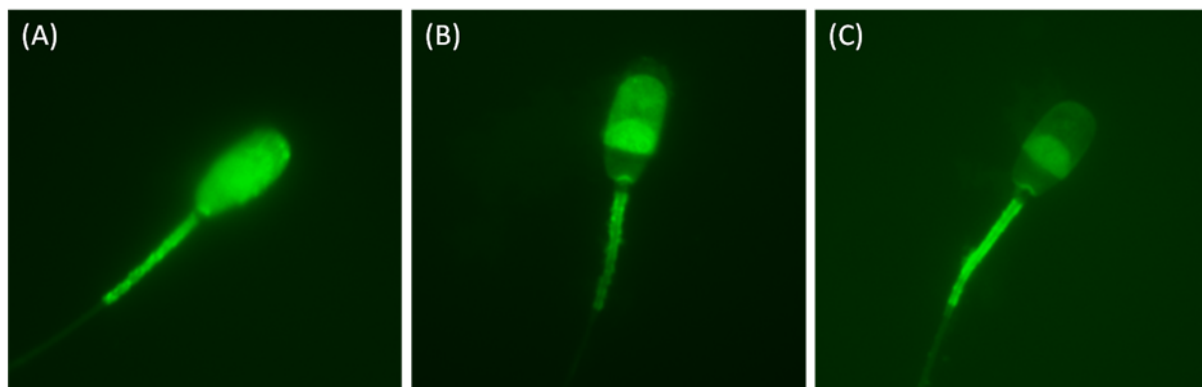
Spermie byly hodnoceny podle jejich specifického barvení hlavičky:

(A) Jasná fluorescence po celé hlavičce a pozitivní mitochondriální část bičíku (mid-piece) značí nekapacitované spermie s neporušeným akrosomem.

(B) Nápadná fluorescence v ekvatoriální části hlavičky a mitochondriální části bičíku (mid-piece), zatímco v postakrosomální oblasti fluorescence chybí. Toto fluorescenční značení je charakteristické pro kapacitované spermie s neporušeným akrosomem.

(C) Slabá fluorescence v celé hlavičce s přetrvávajícím pozitivním značením v ekvatoriálním segmentu a mitochondriální části bičíku (mid-piece) značí spermie po akrosomální reakci.

Spermie s nespecifickým fluorescenčním signálem nebyly započítávány. V každém vzorku bylo hodnoceno 200 buněk a minimální počet hodnocených vzorků byl 5 pro každou skupinu.



**Obr.10** Fluorescenční značení spermie pomocí chlortetracyklinu. Obrázek znázorňuje reprezentativní vzorky 3 charakteristických značení hlavičky spermie pomocí chlortetracyklinu. (A) nekapacitovaná spermie, (B) kapacitovaná spermie, (C) spermie po akrosomální reakci.

## 3.7 Nepřímá imunofluorescence

### 3.7.1 Příprava preparátů

#### 3.7.1.1 Příprava preparátů z kančích spermií pro nepřímou imunofluorescenci s ACR.2 protilátkou proti akrosinu

V jednotlivých časech odběru v průběhu kapacitace byly spermie stočeny (200g, 10 minut), kapacitační medium bylo odstraněno a spermie byly 2x promyty v PBS (200g, 10 minut). Po druhém promytí byly spermie resuspendovány v PBS do finální koncentrace  $1.10^6$  spermií/ml, 10  $\mu$ l suspenze bylo nanášeno na podložní sklo, usušeno při pokojové teplotě na vzduchu a do zpracování skladováno při 4°C.

#### 3.7.1.2 Příprava preparátů z kančích spermií pro nepřímou imunofluorescenci s protilátkou proti ERs

Spermie byly stočeny (200g, 10 minut), SUS medium bylo odstraněno a pelety buněk byly následně 2x promyty v PBS (200g, 10 minut). Po druhém promytí byly spermie resuspendovány v PBS do finální koncentrace  $1.10^6$  spermií/ml, 10  $\mu$ l suspenze bylo nanášeno na podložní sklo, usušeno při pokojové teplotě na vzduchu a do zpracování skladováno při 4°C.

#### 3.7.1.3 Příprava preparátů z myších spermií

Myši byly usmrceny a byly jim odebrány koncové části nadvarlat (cauda epididymis), které byly přeneseny do mikrozskumavky s PBS vytemperovaném na 37°C, rozstříhána a nechána 10 - 15 minut při 37°C, aby bylo dosaženo vyplavení spermií do PBS. Po inkubaci byly spermie odsáty, stočeny (200g, 10 minut) a buněčná peleta byla 2x promyta v PBS vytemperovaném na 37°C. Po druhém promytí byly spermie resuspendovány v PBS do finální koncentrace  $1.10^6$  spermií/ml, 10  $\mu$ l suspenze bylo nanášeno na podložní sklo, usušeno při pokojové teplotě na vzduchu a do zpracování skladováno při 4°C.

#### 3.7.1.4 Příprava preparátů z lidských spermií

Ejakulované lidské spermie byly získávány ze Sexuologického ústavu (Všeobecná fakultní nemocnice, Praha). Spermie byly stočeny (200g, 10 minut), semenné plazma

odstraněna a pelety buněk 2x promyty v PBS (200g, 10 minut). Po druhém promytí byly spermie resuspendovány v PBS do finální koncentrace  $1 \cdot 10^6$  spermii/ml, 10  $\mu$ l suspenze bylo naneseno na podložní sklo, usušeno při pokojové teplotě na vzduchu a do zpracování skladováno při 4°C.

### **3.7.2 Nepřímá imunofluorescence s protilátkou ACR.2 proti kančímu akrosinu**

Pro hodnocení stavu akrosomu bylo použito značení pomocí myší monoklonální protilátky ACR.2 proti kančímu akrosinu připravené v naší laboratoři (Peknicova et al., 1990; Peknicova et al., 1994).

Před vlastním imunofluorescenčním značením byly spermie permeabilizovány 10 minut v acetonu při pokojové teplotě a následně důkladně promyty v PBS. Nespecifická vazebná místa byla blokována pomocí 2% BSA v PBS po dobu 1 hodiny ve vlhké komoře. Po blokaci byly preparáty inkubovány 1 hodinu s protilátkou ACR.2 proti kančímu akrosinu (koncentrace imunoglobulinu byla 20  $\mu$ g/ml) při teplotě 37°C ve vlhké komoře. Po inkubaci byly spermie důkladně promyty v PBS a inkubovány při teplotě 37°C ve vlhké komoře po dobu 1 hodiny s FITC-značenou sekundární protilátkou (Goat-Anti-Mouse IgG conjugated FITC, Sigma) ředěnou 1:64 v PBS. Po inkubaci byly preparáty důkladně promyty v PBS a následně v destilované vodě. Pro zpomalení slábnutí fluorescence a zároveň označení jaderné DNA bylo na preparáty aplikováno montovací medium s DAPI (Vectashield with DAPI, Vector Lab.).

Preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E400 vybaveném objektivem Nikon Plan Apo VC 60/1.4 a fotografovány pomocí CCD kamery VDS1300 (Voskühler) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements AR (Laboratory Imaging Ltd.).

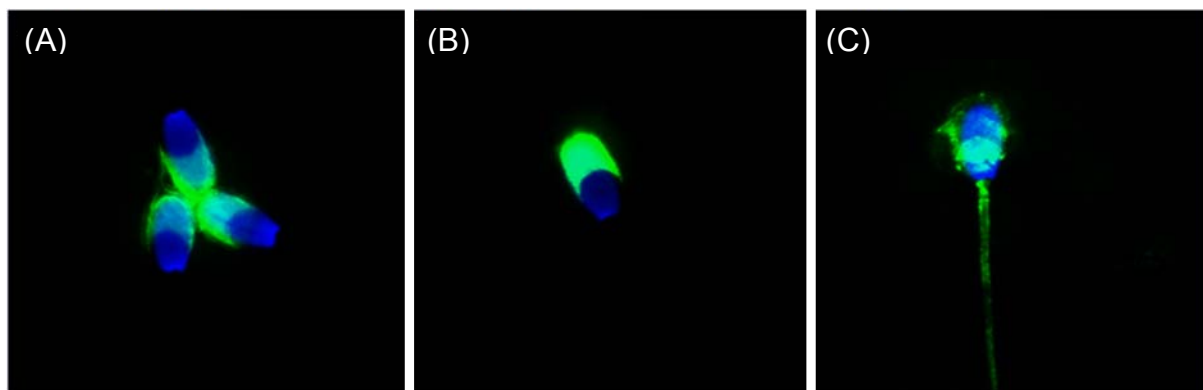
Spermie byly hodnoceny podle jejich charakteristického značení akrosomu.

(A) Slabá fluorescence v oblasti akrosomu značí nekapacitované spermie s neporušeným akrosomem.

(B) Jasná fluorescence v oblasti akrosomu značí kapacitované spermie s neporušeným akrosomem.

(C) Velmi slabá, případně žádná fluorescence v oblasti hlavičky s přetrvávajícím značením v ekvatoriálním segmentu značí spermie po akrosomální reakci. Preparáty inkubované bez primární protilátky byly použity jako negativní kontrola. V každém vzorku

bylo hodnoceno 200 buněk a minimální počet hodnocených vzorků byl 5 pro každou skupinu.



**Obr.11 Charakteristické značení akrosomu pomocí ACR.2 protilátky proti akrosinu.** Obrázek znázorňuje reprezentativní vzorky 3 charakteristických značení hlavičky spermie pomocí imunocytochemie s ACR.2 protilátkou. (A) nekapacitovaná spermie s neporušeným akrosomem, (B) kapacitovaná spermie s neporušeným akrosomem, (C) spermie po akrosomální reakci. Jádra jsou barvena pomocí DAPI – modře.

### ***3.7.3 Nepřímá imunofluorescence s protilátkami proti estrogenním receptorům***

Pro detekci estrogenních receptorů a jejich lokalizaci bylo použito značení pomocí monoklonálních a polyklonálních komerčně dostupných protilátek proti estrogenním receptorům.

Před vlastním imunofluorescenčním značením byly spermie permeabilizovány 7 minut v metanolu při  $-20^{\circ}\text{C}$  nebo 10 minut v acetonu při pokojové teplotě a následně důkladně promyty v PBS. Nespecifická vazebná místa byla blokována inkubací s 2% BSA v PBS po dobu 1 hodiny ve vlhké komoře. Po blokaci byly preparáty inkubovány s primárními protilátkami proti estrogenním receptorům po dobu 1 hodiny při teplotě  $37^{\circ}\text{C}$  ve vlhké komoře. Pro testy byly použity tyto protilátky:

ER $\alpha$  (Mouse monoclonal to Estrogen Receptor alpha, F10, sc-8002, Santa Cruz Biotechnology); ředěna v poměru 1:50

ER $\beta$  (Rabbit polyclonal to Estrogen Receptor beta, H-150 sc-8974, Santa Cruz Biotechnology); ředěna v poměru 1:50

ER $\beta$  (Mouse monoclonal to Estrogen Receptor beta, 1531, sc-53494, Santa Cruz Biotechnology); ředěna v poměru 1:50

Po inkubaci byly preparáty důkladně promyty v PBS a inkubovány při teplotě 37°C ve vlhké komoře po dobu 1 hodiny s FITC-značenými sekundárními protilátkami pro myši monoklonální protilátky (Goat-Anti-Mouse IgG conjugated FITC, Sigma, ředěna v PBS v poměru 1:64 a pro králičí polyklonální protilátku (Goat-Anti-Rabbit IgG conjugated FITC, Sigma, ředěna v PBS v poměru 1:164). Po inkubaci byly preparáty důkladně promyty v PBS a následně v destilované vodě. Pro zpomalení slábnutí fluorescence a zároveň pro označení jaderné DNA bylo na preparáty aplikováno montovací medium s DAPI (Vectashield with DAPI, Vector Lab.).

Preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E400 vybaveném objektivem Nikon Plan Apo VC 60/1.4 a fotografovány pomocí CCD kamery VDS1300 (Voskühler) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements AR (Laboratory Imaging Ltd.).

### **3.8 Průtoková cytometrie s ACR.2 protilátkou proti akrosinu**

V jednotlivých časech odběru v průběhu kapacitace byly vzorky spermií stočeny (200g, 10 minut), kapacitační medium bylo odstraněno a pelety buněk byly resuspendovány v PBS. Spermie byly fixovány nejprve 60 minut v 96% etanolu při 4°C a následně 30 minut ve směsi etanolu a acetonu v poměru 1:1 při 4°C. Po fixaci byly spermie 3x promyty v PBS (200g, 10 minut, 4°C) a inkubovány 1 h při 37°C s primární protilátkou ACR.2 proti kančímu akrosinu (finální koncentrace imunoglobulinu byla 20  $\mu$ g/ml). Po inkubaci s primární protilátkou byly spermie 3x promyty ve vychlazeném PBS (centrifugace 10 minut, 200g, při 4°C) a inkubovány 1 hodinu při 37°C se sekundární protilátkou (Alexa Fluor 488 Goat-Anti-Mouse IgG, Invitrogen) ředěnou v PBS v poměru 1:1000. Po inkubaci byly spermie 5x promyty ve vychlazeném PBS (200g, 10 minut, 4°C) a přeneseny do 96-jamkové destičky. Vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru BD LSR II instrument (BectonDickinson). K identifikaci buněk bylo použito jaderné barvení Hoechst 33342 (Invitrogen) (10  $\mu$ g/ml; excitace 405 nm, emisní filtr 450/50). Měření fluorescenční intenzity bylo prováděno s použitím FITC kanálu (excitační laser 488 nm, emisní filtr 530/30). Analýza dat byla provedena pomocí softwaru FloJo 7.5.4 (TreeStar Inc.). Byly hodnoceny rozdíly

v aritmetickém průměru fluorescenční intenzity mezi kontrolními a experimentálními vzorky. Minimální počet hodnocených vzorků byl 5 pro každou skupinu.

### **3.9 Nepřímá ELISA s ACR.2 protilátkou proti akrosinu**

V průběhu kapacitace byly vzorky spermií v daných časech odebírány, centrifugovány (200g, 10 minut) a spermií zbavené kapacitační medium bylo odebíráno a zamraženo pro následnou biochemickou analýzu.

Kapacitační medium bylo lyofilizováno a následně rozpuštěno ve 100 µl destilované vody. 100 µl rozpuštěného lyofilizátu bylo nanášeno na mikrotitrační destičku a inkubováno 24 hodin při 4°C pro dosažení navázání akrosinu na povrch destičky. Po inkubaci byla destička 3x promyta v PBS a 3x v PBS-Tw. Destička byla poté inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě s protilátkou ACR.2 proti akrosinu (finální koncentrace imunoglobulinu byla 20 µg/ml) a následně promyta 3x v PBS a 3x v PBS-Tw. Po posledním promytí byla destička 30 minut inkubována s 500x ředěnou sekundární protilátkou konjugovanou s křenuvou peroxidázou (SWAM-Px, Sevapharma) a následně opět promyta 3x v PBS a 3x v PBS-Tw. Po promytí byl na destičku aplikován *o*-phenylenediamine (Sigma). Po 3 minutách byla reakce zastavena 4N kyselinou sírovou. Absorbance byla měřena na Biotrak II Plate Reader (Amersham Biociences) při 492 nm. Hodnoceny byly rozdíly v aritmetickém průměru absorbance mezi kontrolními a experimentálními vzorky. Minimální počet hodnocených vzorků byl 5 pro každou skupinu.

### **3.10 Měření aktivity akrosinu**

Metoda měření aktivity akrosinu pro detekci AR je založena na měření enzymatické aktivity akrosinu uvolněného při AR do kapacitačního media.

V průběhu kapacitace byly vzorky spermií v daných časech odebírány, centrifugovány (200g, 10 minut) a spermií zbavené kapacitační medium bylo zamraženo a do hodnocení uchováváno při -20°C. Rozmražené kapacitační medium bylo lyofilizováno a následně rozpuštěno ve 100 µl reakčního pufru. Rozpuštěný lyofilizát byl poté nanášen na mikrotitrační destičku, po 10 minutách inkubace byl přidán BAPA roztok a inkubován dalších 20 minut. Po druhé inkubaci byla reakce zastavena přidáním 30% kyseliny mravenčí. Absorbance byla měřena na Biotrak II Plate Reader (Amersham Biociences) při 405 nm.

Hodnoceny byly rozdíly v aritmetickém průměru absorbance mezi kontrolními a experimentálními vzorky. Minimální počet hodnocených vzorků byl 5 pro každou skupinu.

### **3.11 Průtoková cytometrie s ACR.2 protilátkou proti akrosinu a protilátkami proti ERs**

Pro zjištění možné role ERs v působení estrogenů na proces kapacitace byly spermie 120 minut kapacitovány v přítomnosti či nepřítomnosti 1  $\mu\text{M}$  koncentrace E2. Pomocí průtokové cytometrie byla analyzována korelace mezi abundancí receptorů (detekce pomocí protilátek proti ERs) a kapacitačním progresem (detekce pomocí protilátky proti kančímu akrosinu) v estrogením a neestrogením prostředí.

V čase odběru byly spermie stočeny od kapacitačního media (200g, 10 minut), které bylo zamrazeno pro další použití. Spermie byly permeabilizovány nejprve 30 minut v etanolu při  $-20^{\circ}\text{C}$  a následně 15 minut ve směsi metanolu s acetonem v poměru 1:1 při  $4^{\circ}\text{C}$ . Po fixaci byly spermie 2x promyty v PBS (200g, 10 minut,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Spermie byly poté resuspendovány v PBS a inkubovány 1 h při  $37^{\circ}\text{C}$  s primární protilátkou ACR.2 (koncentrace imunoglobulinu byla  $20\mu\text{g/ml}$ ) a proti estrogenímu receptoru. Pro testy byly použity tyto protilátky:

ER $\alpha$  (Rabbit polyclonal to Estrogen Receptor alpha, ab37438, Abcam); ředěna v PBS v poměru 1:100

ER $\beta$  (Rabbit polyclonal to Estrogen Receptor beta, H-150 sc-8974, Santa Cruz Biotechnology); ředěna v PBS v poměru 1:50

GPR30 (Rabbit polyclonal to GPCR GPR30, ab39742, Abcam); ředěna v PBS v poměru 1:100

Dále byla použita protilátka proti aromatáze (ab18995, Abcam); ředěna v PBS v poměru 1:100

Po inkubaci s primární protilátkou byly spermie 2x promyty ve vychlazeném PBS (200g, 10 minut,  $4^{\circ}\text{C}$ ) a inkubovány 1 hodinu při  $37^{\circ}\text{C}$  se sekundární protilátkou Alexa Fluor 488 (pro ACR.2) a Alexa Fluor 647 (pro ERs); obě ředěné v poměru 1:1000. Po inkubaci byly spermie 2x promyty ve vychlazeném PBS (200g, 10 minut,  $4^{\circ}\text{C}$ ), naneseny na 96-jamkovou destičku a měřeny na průtokovém cytometru BD LSR II instrument (BectonDickinson). K identifikaci buněk bylo použito jaderné barvení Hoechst 33342 (Invitrogen) ( $10\mu\text{g/ml}$ ; excitace 405 nm, emisní filtr 450/50). Měření fluorescenční intenzity bylo prováděno s použitím FITC (excitační laser 488 nm, emisní filtr 530/30) a Cy5 kanálu

(excitační laser 633 nm, emisní filtr 660/20). Analýza dat byla provedena pomocí softwaru FloJo 7.5.4 (TreeStar Inc.). Hodnocena byla korelace mezi fluorescenční intenzitou sekundární protilátky navázané na primární protilátku proti akrosinu a ER. Minimální počet hodnocených vzorků byl 3 pro každou skupinu.

### **3.12 Izolace proteinů**

Vzorky spermií určené pro izolaci proteinů byly centrifugovány po dobu 10 minut při 200g a teplotě 25°C. Supernatant (SUS médium či kapacitační médium) byl odstraněn a peleta buněk byla 2x promyta v PBS (200g, 10 minut při pokojové teplotě). Po druhém promytí byla buněčná peleta resuspendována v PBS a rozdělena na 5 dílů pro následné izolace proteinů pomocí různých extrakčních činidel. Jednotlivé vzorky byly centrifugovány po dobu 10 minut při 400g a teplotě 4°C. Supernatant byl odstraněn a k peletě byl přidán extrakční pufr (100 µl pufru/100 x 10<sup>6</sup> spermií). Dále se protokol liší v závislosti na typu použité extrakce.

MCF7 buňky kultivované na Petriho misce byly 4x propláchnuty v PBS, uvolněny škrabkou do PBS a centrifugovány při 200g po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn a k peletě byl přidán extrakční pufr (150 µl pufru/Petriho misku). Dále se protokol liší v závislosti na typu použité extrakce.

Myši byly usmrceny a byly jim odebrány varlata a nadvarlata. Tkáně byly následně rozstříhány a homogenizovány v extrakčním pufru. Dále se protokol liší v závislosti na typu použité extrakce. Extrakce proteinů z tkáně probíhala za stejných podmínek, jako extrakce proteinů ze spermií s výjimkou prvního kroku (resuspendování pelety).

#### **3.12.1 SDS extrakce**

Peleta spermií/MCF7 buněk byla resuspendována v SDS extrakčním pufru. Vzorky byly denaturovány po dobu 3 minut při 99°C, následně byly zchlazeny na ledu a stáčeny 5 minut při 20 000g a 4°C. Odebraný supernatant byl zamražen a do použití skladován při -20°C.



### **3.12.2 Urea extrakce**

Peleta spermií/MCF7 buněk byla resuspendována v Urea extrakčním pufru a ponechána 1 hodinu při pokojové teplotě, v průběhu inkubace byla suspenze několikrát resuspendována. Poté byly vzorky centrifugovány 5 minut při 20 000g a pokojové teplotě. Odebraný supernatant byl zamražen a do použití skladován při -20°C.

### **3.12.3 Triton-X 100 extrakce**

Peleta spermií byla resuspendována v 1,5% Tx-100 a ponechána 1 hodinu na ledu. Během inkubace byla suspenze několikrát resuspendována. Poté byly vzorky stáčeny 5 minut při 20 000g a 4°C. Odebraný supernatant byl zamražen a do použití skladován při -20°C.

### **3.12.4 Extrakce v rehydratačním pufru**

Peleta spermií byla resuspendována v rehydratačním pufru a ponechána 1 hodinu při pokojové teplotě, v průběhu inkubace byla suspenze několikrát resuspendována. Poté byly vzorky stáčeny 5 minut při 20 000g a 4°C. Odebraný supernatant byl zamražen a do použití skladován při -20°C.

### **3.12.5 Extrakce s inhibitory proteáz**

Peleta spermií/MCF7 buněk byla resuspendována v lyzačním pufru s inhibitory proteáz:

1-vlastní inhibitory: 1 mM PMSF, 0,2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM benzamidin hydrochlorid

2-komerční směs inhibitorů: Protease inhibitor cocktail tablets, Roche

a ponechána 15 minut při pokojové teplotě. Poté byly vzorky stáčeny při pokojové teplotě a 20 000g. Odebraný supernatant byl zamražen a do použití skladován při -20°C.

Koncentrace izolovaných proteinů byla měřena na přístroji Qubit Fluorometer (Invitrogen) pomocí kitu Quant-iT protein assay. Měření bylo prováděno dle instrukcí výrobce.

### 3.13 Elektroforetická separace proteinů na polyakrylamidovém gelu

Pro separaci proteinů podle jejich molekulové hmotnosti byla použita vertikální elektroforéza Mini-Protean 4 (Biorad) a 15% SDS-polyakrylamidový gel. Před nanesením vzorků na gel byly vzorky smíchány s 2x koncentrovaným SDS vzorkovým pufrem s 5%  $\beta$ -merkaptoetanolem a denaturovány 5 minut při 99°C. Na jamku bylo nanášeno celkové množství 20  $\mu$ g proteinu. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad). Elektroforéza byla prováděna v Tris-glycinovém SDS pufru při konstantním proudu 16 mA/gel při 4°C.

Po skončení elektroforetické separace byly gely barveny nebo použity k přenosu proteinů na PVDF membránu (Western blotting).

### 3.14 Izoelektrická fokusace a elektroforetická separace proteinů

Pro separaci proteinů podle jejich izoelektrického bodu a molekulové hmotnosti byla použita izoelektrická fokusace a vertikální elektroforéza.

Vzorky pro 2D proteinovou elektroforézu byly smíchány s rehydratačním pufrem obsahujícím 1% dithiotreitol (DTT) a 2% IPG Buffer, pH 3-10 (GE Healthcare) a inkubovány 30 minut při pokojové teplotě. Poté byly inkubovány se stripem (Immobiline DryStrip pH 3-10, délka 7 cm, GE Healthcare) přes noc při pokojové teplotě, aby bylo dosaženo nasáknutí vzorku do stripu. Pro zamezení vypařování vzorku byly stripy překryty minerálním olejem (PlusOne DryStrip Cover fluid, GE Healthcare). Na 1 strip bylo nanášeno 76  $\mu$ g celkového množství proteinů. Druhý den byly stripy umístěny do přístroje na izoelektrickou fokusaci (Ettan IPGphor 3, GE Healthcare) a překryty minerálním olejem. Izoelektrická fokusace probíhala za následujících podmínek:

1. krok:	150V	50 minut
2. krok:	300V	1 hodina
3. krok:	1000V	30 minut
4. krok:	1000V	20 minut
5. krok:	5000V	1 hodina a více

Při izoelektrické fokusaci bylo vždy dosaženo rozmezí 6000-6500 Vh. Po skončení izoelektrické fokusace byly stripy zamrazeny a do dalšího použití skladovány při teplotě -20°C. Před elektroforetickou separací proteinů byly stripy inkubovány nejprve 15 minut v ekvilibračním pufru s 1% dithiotreitem, poté 15 minut v ekvilibračním pufru s 2%

iodoacetamidem. Po inkubaci byly stripy přeneseny na 15% SDS-polyakrylamidový gel. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad). Elektroforéza byla prováděna v Tris-glycinovém SDS pufru při konstantním proudu 16 mA/gel při 4°C.

### **3.15 Přenos proteinů na PVDF membránu (Western blotting)**

Pro přenos separovaných proteinů z gelu na PVDF membránu (Immobilon P, Millipore) byly gely nejprve 15 minut ekvilibrovány v transferovém pufru. PVDF membrána byla smočena ve 100% metanolu a poté rovněž 15 minut ekvilibrována v transferovém pufru. Po ekvilibraci byla sestavena souprava v uspořádání: houbička, 3x chromatografický papír (Whatman, Schleicher&Schuell), PVDF membrána, gel, 3x chromatografický papír a houbička. Souprava byla vložena do transferového zařízení Biorad Mini-transblot modul s transferovým pufrem a proteiny byly přenášeny při konstantním proudu 500 mA po dobu 1 hodiny a 40 minut při 4°C.

### **3.16 Imunodetekce estrogenních receptorů**

K detekci proteinů estrogenních receptorů přenesených na PVDF membránu byly použity monoklonální a polyklonální komerčně dostupné protilátky proti estrogenním receptorům.

Po přenosu proteinů na membránu byla membrána opláchnuta v PBS-Tw. Nespecifická vazebná místa byla blokována inkubací membrány v roztoku PBS-Tw s 2,5% želatinou (Gelatin from cold water fish skin, Sigma) při pokojové teplotě po dobu 2 hodin za současného třepání. Po blokaci byly membrány inkubovány za současného třepání přes noc při 4°C s primární protilátkou proti estrogennímu receptoru:

ER $\alpha$  (Mouse monoclonal to Estrogen Receptor alpha, F10, sc-8002, Santa Cruz Biotechnology); ředěna v poměru 1:500

ER $\beta$  (Rabbit polyclonal to Estrogen Receptor beta, H-150 sc-8974, Santa Cruz Biotechnology); ředěna v poměru 1:500

ER $\beta$  (Mouse monoclonal to Estrogen Receptor beta, 1531, sc-53494, Santa Cruz Biotechnology); ředěna v poměru 1:500

Jako pozitivní kontrola byla použita protilátka proti  $\alpha$ -tubulinu (Mouse monoclonal anti- $\alpha$  tubulin, clone DM1A, Sigma; ředěna v poměru 1:5000) a proti kančímu spermadhezinu (Rabbit polyclonal anti-BHB3; připravena v naší laboratoři - Jonakova, Peknicova, nepublikováno; ředěna v poměru 1:20 000). Po inkubaci byly membrány 6x promyty v PBS-Tw a následně inkubovány 1 hodinu za současného třepání při pokojové teplotě se sekundární protilátkou značenou křenovou peroxidázou (Goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate, Bio-Rad, ředěna v poměru 1:3000; a Swine anti-rabbit peroxidase conjugate (Sevapharma), ředěna v poměru 1:5000). Po inkubaci byly membrány opět 6x promyty v PBS-Tw. Po promytí byly membrány 3 minuty inkubovány s chemiluminiscenčním substrátem SuperSignal (Pierce). Následně byl signál vyvolán na rentgenografický film (Medix XBU, Foma Bohemia) za použití reagenčních chemikálií firmy Eastman Kodak (Sigma).

### **3.17 Barvení gelů pomocí Coomassie blue**

Po elektroforetické separaci byly gely promyty v destilované vodě a barveny 1 hodinu v barvicím roztoku Coomassie blue pro barvení gelů. Následně byly až do odbarvení pozadí promývány v odbarvovacím roztoku pro odbarvení gelů a po odbarvení promývány 30 minut v sušicím roztoku a usušeny mezi vrstvami celofánu (Cellophane Dry Sheet, GE Healthcare).

### **3.18 Barvení PVDF membrány pomocí Coomassie blue**

Po imunodetekci estrogenních receptorů byly PVDF membrány promyty v destilované vodě a následně barveny 1 hodinu v barvicím roztoku Coomassie blue pro barvení membrán. Poté byly až do odbarvení pozadí promývány v odbarvovacím roztoku pro PVDF membrány a následně usušeny na vzduchu.

### **3.19 Statistická analýza**

Statistická analýza získaných dat byla provedena v programu STATISTICA 7.0 (Statsoft CR). Statistické rozdíly v počtu spermií se specifickým akrosomálním stavem mezi kontrolními a experimentálními vzorky byly analyzovány pomocí Kruskal-Wallis one-way

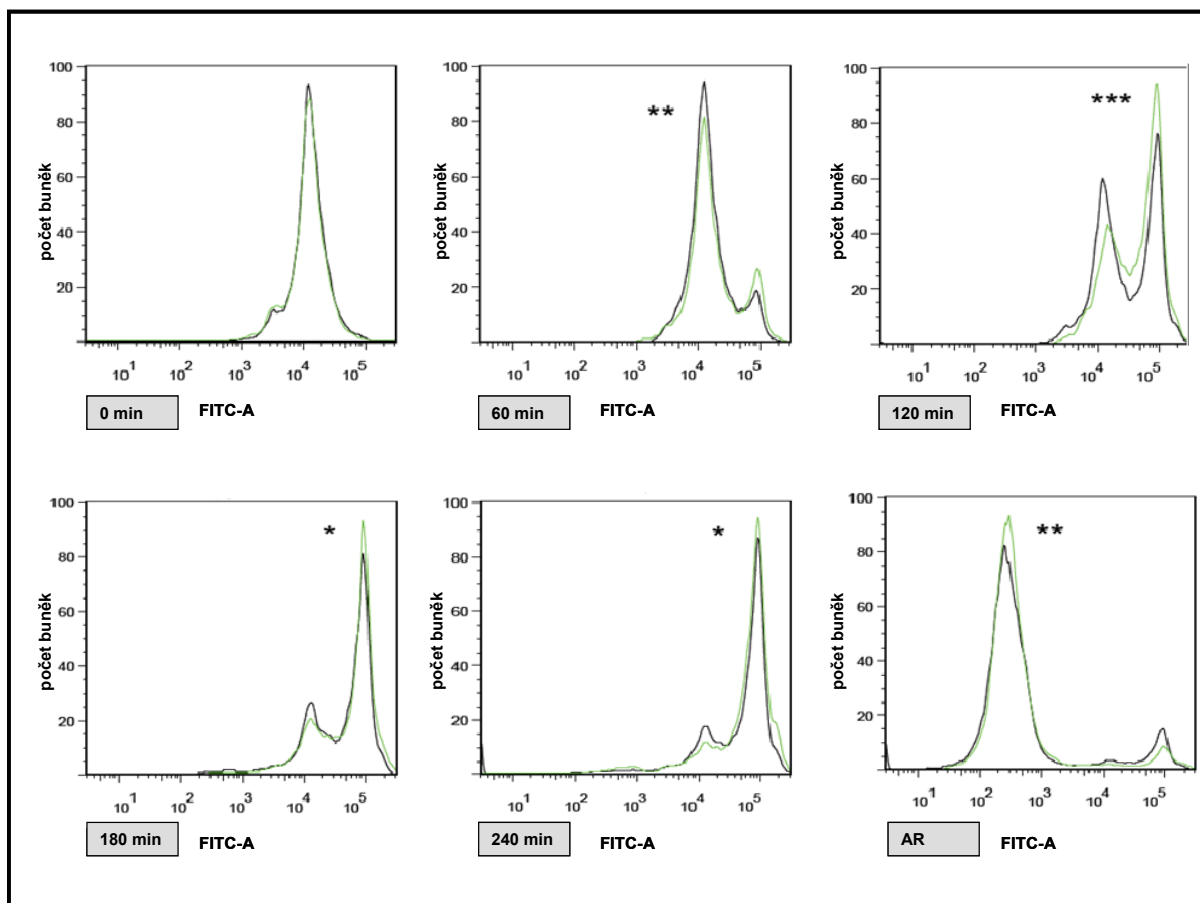
analysis of variance (KW-ANOVA). Statistické rozdíly mezi spojitými hodnotami (aritmetický průměr fluorescenční intenzity ve FITC kanálu v průtokové cytometrii, absorbance v nepřímé ELISA s ACR.2 protilátkou a metodě na stanovení aktivity akrosinu) byly hodnoceny one-way analysis of variance ANOVA. Post hoc analýza byla provedena za použití Newman-Keuls testu. Pro zjištění korelace mezi jednotlivými sety dat byl počítán Pearsonův korelační koeficient (r). Hodnota P menší než 0,05 byla považována za statisticky signifikantní; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001.

## 4. Výsledky

### 4.1 Vliv estrogenů na kapacitaci kančích spermií

#### 4.1.1 Vliv 1 $\mu$ M koncentrace E2 na kapacitaci kančích spermií *in vitro*

Pro zjištění možného vlivu E2 na průběh kapacitace byly spermie inkubovány v kapacitačním mediu s 1  $\mu$ M koncentrací E2 nebo v případě kontrolních vzorků s etanolem o stejném množství jako v experimentálních vzorcích (E2 byl rozpouštěn v etanolu). 1  $\mu$ M koncentrace byla vybrána na základě předešlé studie na myších spermiích, kde tato koncentrace byla nejnižší koncentrací, jež významně ovlivňovala kapacitaci (Adeoya-Osiguwa et al., 2003). Vzorky byly ve vybraných časech kapacitace (0, 30, 60, 120, 180, 240 minut kapacitace a po vyvolání akrosomální reakce) analyzovány pomocí průtokové cytometrie s ACR.2 protilátkou proti akrosinu. Byl prokázán významně větší počet kapacitovaných spermií v experimentálním vzorku oproti kontrolnímu. První významný rozdíl v průběhu kapacitace byl pozorován v čase 60 minut kapacitace, silný významný rozdíl v čase 120 minut kapacitace (viz obr.12). Po indukci akrosomální reakce v experimentálním vzorku podstoupilo významně více spermií akrosomální reakci v porovnání s kontrolním vzorkem.

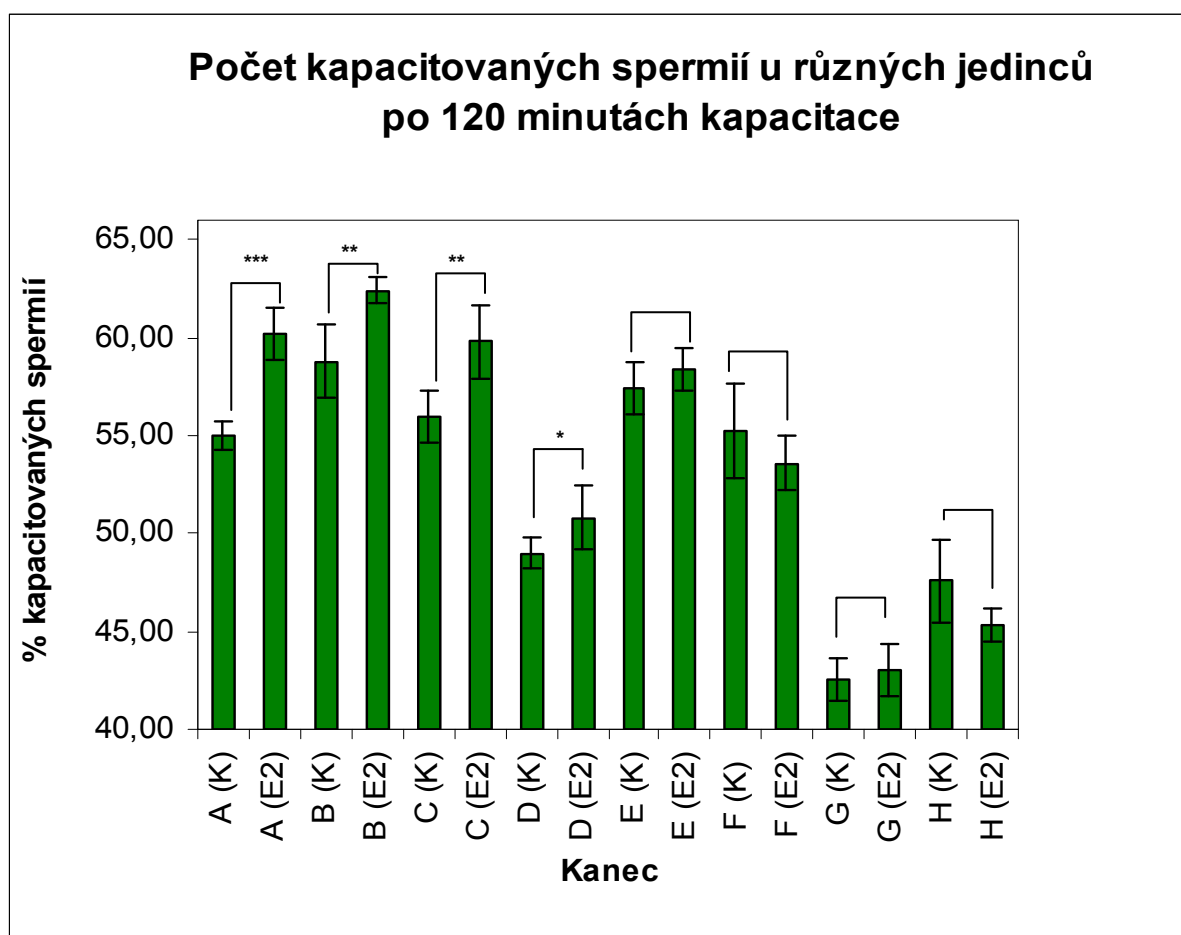


**Obr.12** Rozdíly v průběhu kapacitace a v indukci akrosomální reakce mezi kontrolními a experimentálními vzorky. Experimentální vzorky byly ovlivňovány 1  $\mu$ M koncentrací E2. Reprezentativní histogramy znázorňují průběh kapacitace u kontrolních (černě) a experimentálních (zeleně) vzorků hodnocený pomocí průtokové cytometrie s ACR.2 protilátkou. V průběhu kapacitace dochází ke vzrůstu fluorescenční intenzity, v histogramu znázorněno objevujícím se pravým peakem. Po indukci akrosomální reakce dochází k poklesu fluorescenční intenzity, což se v histogramu projeví posunem peaku doleva. Rozdíly v aritmetickém průměru fluorescenční intenzity ve FITC kanálu mezi kontrolními a experimentálními vzorky byly hodnoceny pomocí ANOVA. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Největší rozdíl mezi kontrolními a experimentálními vzorky byl pozorován v čase 120 minut kapacitace.

#### 4.1.2 Vliv 1 $\mu$ M koncentrace E2 na kapacitaci kančích spermií *in vitro* – rozdíly ve vzorcích z různých kanců

Abychom zjistili možné rozdíly v kapacitačním procesu a vnímavosti k E2 mezi jednotlivými zvířaty, spermie z 8 různých kanců byly kapacitovány 120 minut v přítomnosti 1  $\mu$ M E2 nebo etanolu (kontrola) a vzorky z každého zvířete byly analyzovány zvlášť. Čas 120 minut kapacitace byl vybrán na základě předchozích výsledků, kde v tomto čase byly

pozorovány největší rozdíly mezi kontrolní a experimentální skupinou. Průběh kapacitace byl hodnocen pomocí CTC analýzy a pomocí fluorescenčního značení s ACR.2 protilátkou proti akrosinu. V každé skupině bylo analyzováno minimálně 5 vzorků a pouze vzorky s vysokou korelací mezi oběma metodami (rozdíl < 5%) byly použity pro následnou statistickou analýzu. Rozdíly v kapacitačním procesu byly analyzovány pomocí KW-ANOVA. Byly zjištěny statisticky významné rozdíly v kapacitačním procesu a vnímavosti k E2 mezi vzorky z jednotlivých zvířat (obr.13). U 4 vzorků byl pozorován prokapacitační vliv E2 na průběh kapacitace, zatímco u zbylých 4 vzorků nebyl pozorován žádný signifikantní vliv E2 na průběh kapacitace.



**Obr.13** Rozdíly v kapacitačním procesu a citlivosti k estrogenům po 120 minutách kapacitace mezi jednotlivými zvířaty (A – H). Kontrolní vzorky: A (K) – H (K); experimentální vzorky (kapacitované v přítomnosti 1  $\mu$ M koncentrace E2): A (E2) – H (E2). U vzorků ze zvířat A – D je patrný sigifikantní prokapacitační vliv E2, zatímco ve vzorcích ze zvířat E – H E2 nemá signifikantní vliv na průběh kapacitace. Rozdíly v kapacitačním procesu byly analyzovány pomocí KW-ANOVA, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.



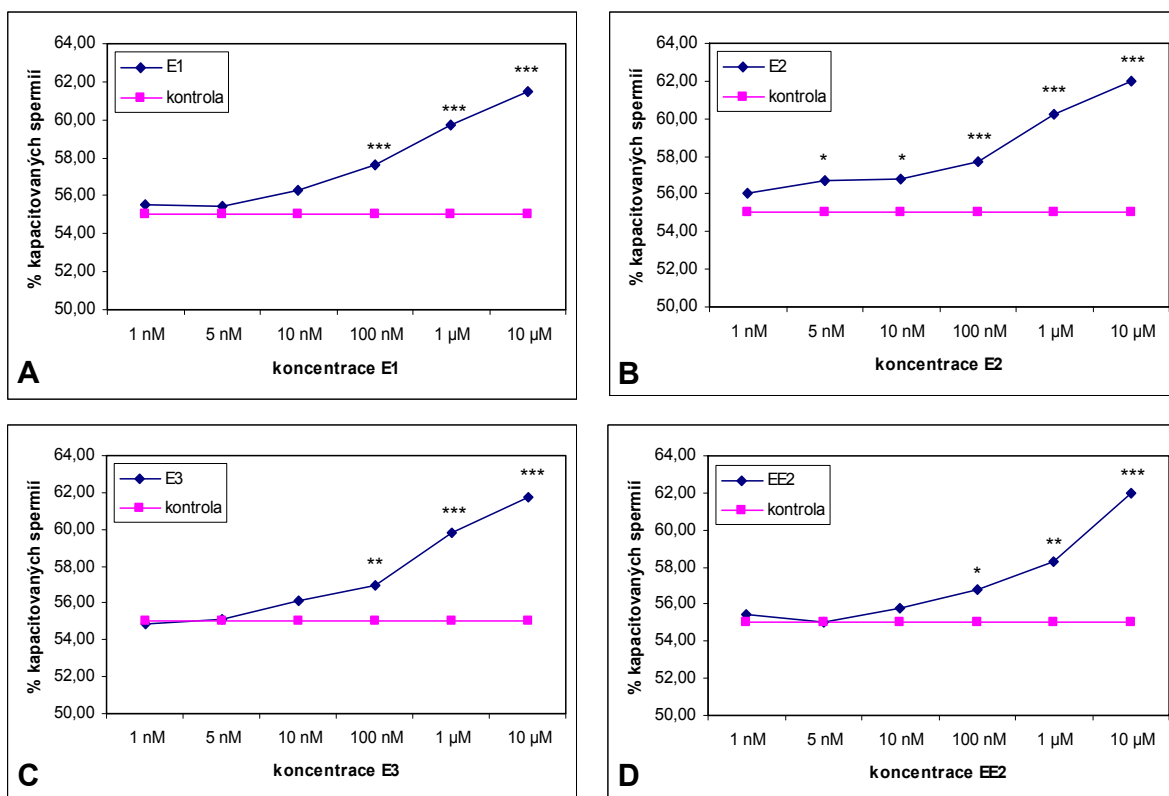
### 4.1.3 Vliv vybraných koncentrací 4 estrogenů na kapacitaci kančích spermií *in vitro*

Pro testování vlivu 4 estrogenů (estron (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3), 17 $\alpha$ -etynyl estradiol (EE2)) na kapacitační proces byl vybrán kanec A, u jehož spermií byl pozorován prokapacitační vliv 1  $\mu$ M koncentrace E2 a kanec E, u jehož spermií nebyl pozorován žádný signifikantní vliv 1  $\mu$ M koncentrace E2 na kapacitační proces. Protože statisticky nejvíce signifikantní rozdíly mezi kontrolní a experimentální skupinou byly pozorovány v čase 120 minut kapacitace, pro další pokusy byly spermie kapacitovány v přítomnosti či nepřítomnosti 6 vybraných koncentrací (1 nM – 100  $\mu$ M) 4 vybraných estrogenů právě po dobu 120 minut. Vzorky byly analyzovány pomocí CTC analýzy a pomocí imunocytochemie s ACR.2 protilátkou proti akrosinu. V každé skupině bylo analyzováno minimálně 5 vzorků a pouze vzorky s vysokou korelací mezi oběma metodami (rozdíl < 5%) byly použity pro následnou statistickou analýzu. Rozdíly v kapacitačním procesu byly analyzovány pomocí KW-ANOVA; Post hoc analýza byla provedena pomocí Newman-Keuls testu. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001

**Tabulka 2. Kanec A (odpovídající na ovlivnění E2): Počet kapacitovaných spermií (%) v kontrolních a experimentálních vzorcích po 120 minutách kapacitace.**

Skupina/ koncentrace	Kontrola	1 nM	5 nM	10 nM	100 nM	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M
E1	55.00 $\pm$ 1.56	55.50 $\pm$ 0.93	55,45 $\pm$ 1,79	56.25 $\pm$ 1.28	<b>57.60 <math>\pm</math> 1.26***</b>	<b>59.75 <math>\pm</math> 1.58***</b>	<b>61.50 <math>\pm</math> 0.93***</b>
E2	55.00 $\pm$ 1.56	56.00 $\pm$ 1.41	<b>56,74 <math>\pm</math> 1,21*</b>	<b>56.80 <math>\pm</math> 1.62*</b>	<b>57.73 <math>\pm</math> 1.27***</b>	<b>60.20 <math>\pm</math> 1.93***</b>	<b>62.00 <math>\pm</math> 1.41***</b>
E3	55.00 $\pm$ 1.56	54.88 $\pm$ 1.36	55,14 $\pm$ 1,75	56.14 $\pm$ 1.35	<b>57.00 <math>\pm</math> 0.89**</b>	<b>59.78 <math>\pm</math> 1.48***</b>	<b>61.71 <math>\pm</math> 0.76***</b>
EE2	55.00 $\pm$ 1.56	55.44 $\pm$ 1.81	54,99 $\pm$ 2,25	55.80 $\pm$ 1.93	<b>56.82 <math>\pm</math> 2.04*</b>	<b>58.30 <math>\pm</math> 2.91**</b>	<b>62.00 <math>\pm</math> 1.41***</b>

U spermií kance A bylo prokázáno signifikantní ovlivnění procesu kapacitace 1  $\mu$ M koncentrací E2 (viz předešlé výsledky). Ve studii vlivu vybraných estrogenů na kapacitaci byl prokázán prokapacitační vliv všech čtyřech testovaných estrogenů. Nejsilnější prokapacitační vliv měl E2, který urychloval kapacitaci již při 5 nM koncentraci v kapacitačním mediu. U zbylých třech testovaných estrogenů se prokapacitační vliv poprvé projevil při 100 nM koncentraci estrogenů v kapacitačním mediu. U všech čtyřech estrogenů s jejich vzrůstající koncentrací v kapacitačním mediu docházelo k urychlení průběhu kapacitace. E1 – estron, E2 – 17 $\beta$ -estradiol, E3 – estriol, EE2 - 17 $\alpha$ -etynyl estradiol. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001

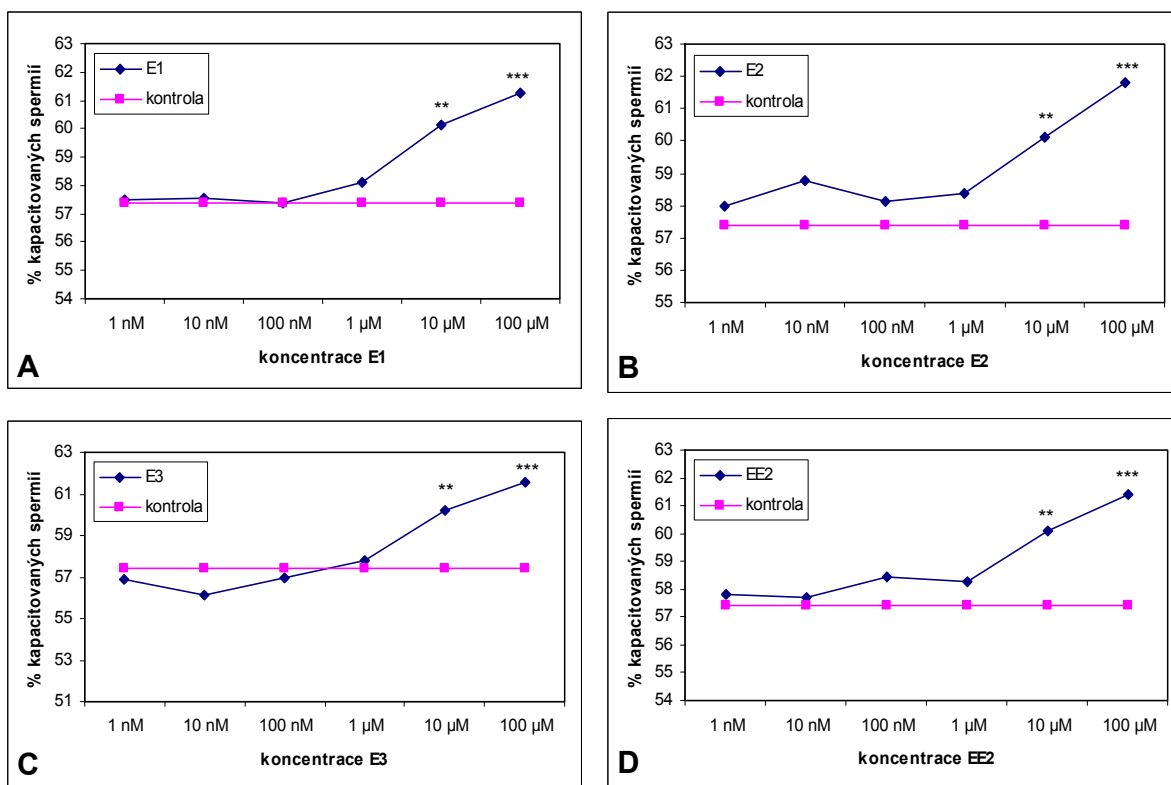


**Obr.14 Kanec A: Grafické znázornění počtu kapacitovaných spermii v kontrolních a experimentálních vzorcích po 120 minutách kapacitace.** Popis viz tabulka 2. E1 – estron, E2 – 17β-estradiol, E3 – estriol, EE2 - 17α-etynylestradiol. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001

**Tabulka 3. Kanec E (neodpovídající na ovlivnění E2): Počet kapacitovaných spermii v kontrolních a experimentálních vzorcích po 120 minutách kapacitace.**

Skupina/ koncentrace	Kontrola	1 nM	10 nM	100 nM	1 μM	10 μM	100 μM
E1	57.4 ± 1.14	57.5 ± 1.89	57.55 ± 1.78	57.37 ± 2.62	58.11 ± 1.58	60.12 ± 1.12**	61.25 ± 1.56***
E2	57.4 ± 1.14	58.00 ± 1.61	58.80 ± 1.62	58.11 ± 2.11	58.40 ± 0.89	60.10 ± 1.22**	61.81 ± 1.22***
E3	57.4 ± 1.14	56.89 ± 1.75	56.14 ± 1.35	57.00 ± 1.76	57.78 ± 2.45	60.22 ± 1.56**	61.54 ± 1.67***
EE2	57.4 ± 1.14	57.84 ± 2.09	57.70 ± 1.93	58.42 ± 1.36	58.30 ± 1.98	60.10 ± 2.31**	61.43 ± 1.37***

U spermii kance E nebyl prokázán signifikantní vliv 1 μM koncentrace E2 na kapacitaci (viz předešlé výsledky). Ve vzorcích z tohoto kance docházelo k urychlení kapacitačního procesu pouze při kapacitaci spermii s vysokými koncentracemi estrogenů (10-100 μM). Opět se tento prokapacitační vliv se zvyšující se koncentrací zvyšoval. E1 – estron, E2 – 17β-estradiol, E3 – estriol, EE2 - 17α-etynylestradiol \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001



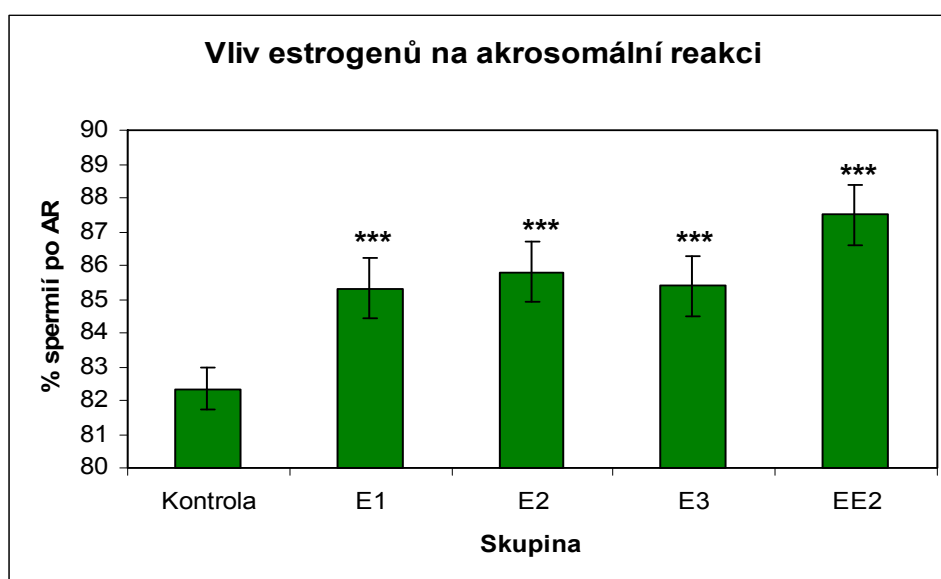
**Obr.15 Kanec E: Grafické znázornění počtu kapacitovaných spermatických buněk v kontrolních a experimentálních vzorcích po 120 minutách kapacity. Popis viz tabulka 3. E1 – estron, E2 – 17β-estradiol, E3 – estriol, EE2 - 17α-etynylestradiol. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001**

#### **4.1.4 Vliv 1μM koncentrace E2 na akrosomální reakci kančích spermií indukovanou zona pellucida in vitro**

Pro zjištění vlivu estrogenů na AR byly vzorky spermií kapacitovány v přítomnosti 1 μM koncentrace čtyřech různých estrogenů (E1, E2, E3 a EE2) nebo v případě kontrolních vzorků se stejným množstvím etanolu jako v experimentálních vzorcích. Po 240 minutách kapacity byla indukována akrosomální reakce přidáním solubilizované zona pellucida. Hodnocení spermií po AR, bylo provedeno pomocí několika různých metod. Imunocytochemie s ACR.2 protilátkou proti akrosinu je v naší laboratoři běžně používanou metodou na detekci spermií, které podstoupily AR. Pro získání vyššího počtu dat byla použita také imunochemická (ELISA) a enzymatická metoda (stanovení aktivity akrosinu v mediu).

#### 4.1.4.1 Vliv 1 $\mu$ M koncentrace E2 na akrosomální reakci kančích spermií indukovanou zona pellucida in vitro – hodnoceno pomocí imunocytochemie s ACR.2 protilátkou proti akrosinu

Imunocytochemie s ACR.2 protilátkou umožňuje detekovat spermie nekapacitované, kapacitované a po AR. V každé skupině bylo analyzováno minimálně 5 vzorků a v každém vzorku bylo počítáno 200 spermií. Ve všech experimentálních vzorcích došlo k nárůstu počtu spermií, které podstoupily akrosomální reakci po indukci ZP v porovnání s kontrolní skupinou. Největší vliv na indukci akrosomální reakce měl syntetický estrogen EE2. Statistická analýza byla provedena pomocí KW-ANOVA.



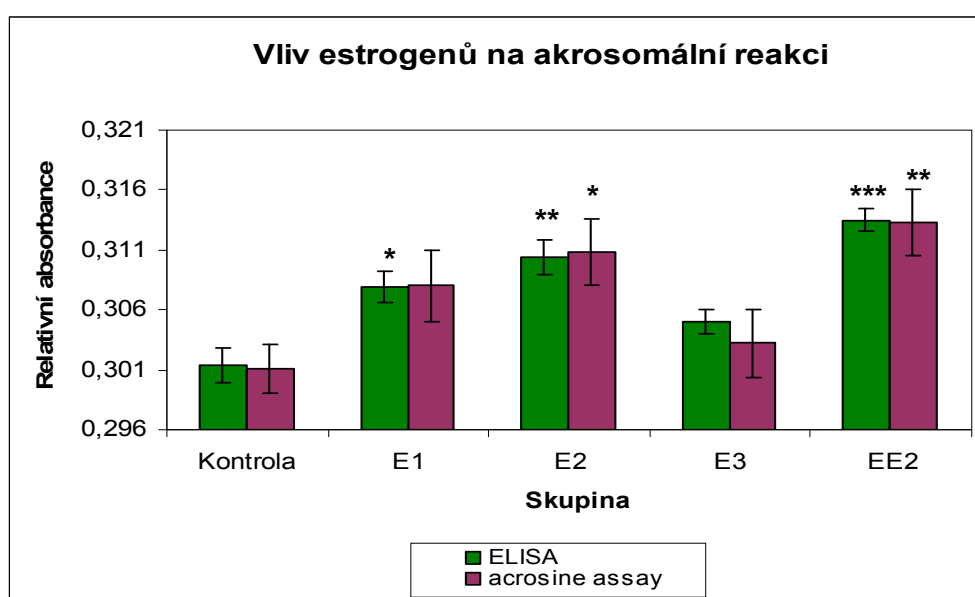
**Obr.16** Vliv estrogenů na akrosomální reakci indukovanou zona pellucida. Graf znázorňuje vliv 1  $\mu$ M koncentrace vybraných estrogenů (E1 – estron, E2 – 17 $\beta$ -estradiol, E3 – estriol, EE2 - 17 $\alpha$ -etylnylestradiol) na akrosomální reakci. Ve všech čtyřech experimentálních skupinách došlo k nárůstu počtu spermií, které podstoupily AR. Rozdíly byly analyzovány pomocí KW-ANOVA. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001

#### 4.1.4.2 Vliv 1 $\mu$ M koncentrace E2 na akrosomální reakci kančích spermií indukovanou zona pellucida in vitro – hodnoceno pomocí ELISA metody s ACR.2 protilátkou proti akrosinu a metody na stanovení aktivity akrosinu

Data získaná z imunocytochemické studie byla dále ověřena pomocí imunochemické metody na stanovení množství akrosinu v mediu (ELISA s ACR.2 protilátkou) a metody na

stanovení aktivity akrosinu v mediu (acrosine assay). Protože při *in vitro* pokusech je po podstoupení AR akrosin uvolněn do kapacitačního media, lze pomocí těchto metod stanovit relativní množství spermií, které podstoupily AR. Oběmi metodami bylo v každé skupině analyzováno minimálně 5 vzorků. Statistická analýza byla provedena pomocí ANOVA.

Stejně jako v imunocytochemické studii i zde byl prokázán vliv estrogenů na akrosomální reakci. Největší vliv měl EE2, menší ale signifikantní vliv měl také E2. Signifikantní vliv na AR byl prokázán rovněž u E1 při detekci pomocí ELISA metody, ne však již při použití metody na stanovení aktivity akrosinu. V případě E3 nebyl prokázán žádný signifikantní vliv na AR.



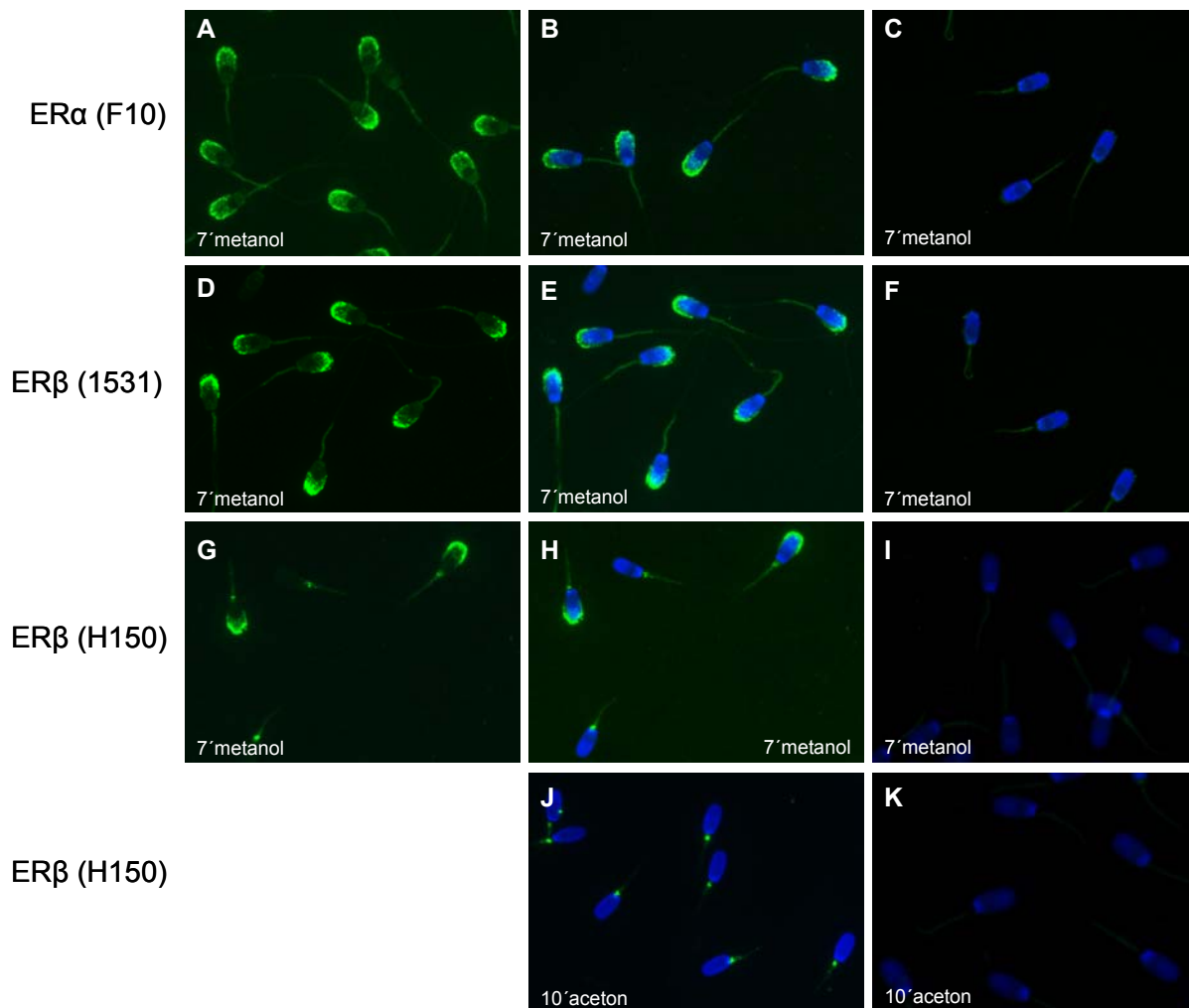
**Obr.17 Koncentrace akrosinu v kapacitačním mediu po indukci akrosomální reakce.** Graf znázorňuje porovnání dvou metod na stanovení množství akrosinu v kapacitačním mediu. Pomocí obou metod bylo u skupin ovlivňovaných E2 a EE2 zjištěno signifikantně větší množství akrosinu v mediu oproti kontrolnímu mediu. U skupiny ovlivňované E1 byl signifikantní nárůst akrosinu v mediu detekován pouze metodou ELISA. U skupiny ovlivňované E3 nebyl detekován žádný signifikantní nárůst akrosinu v mediu oproti kontrolnímu mediu.

## 4.2 Detekce estrogenních receptorů

### 4.2.1 Imunolokalizace ERs ve spermích

Pomocí imunofluorescenčního značení na kančích spermích byla prokázána podobná lokalizace obou ERs. Oba ERs byly imunodetekovány v hlavičce kančích spermií v oblasti

akrosomu (obr.18). V případě protilátky proti ER $\beta$  (H150) byl pozitivní signál detekován také v oblasti krčku. Fluorescenční signál z oblasti krčku však nebyl detekován při použití druhé protilátky proti ER $\beta$  (1531).

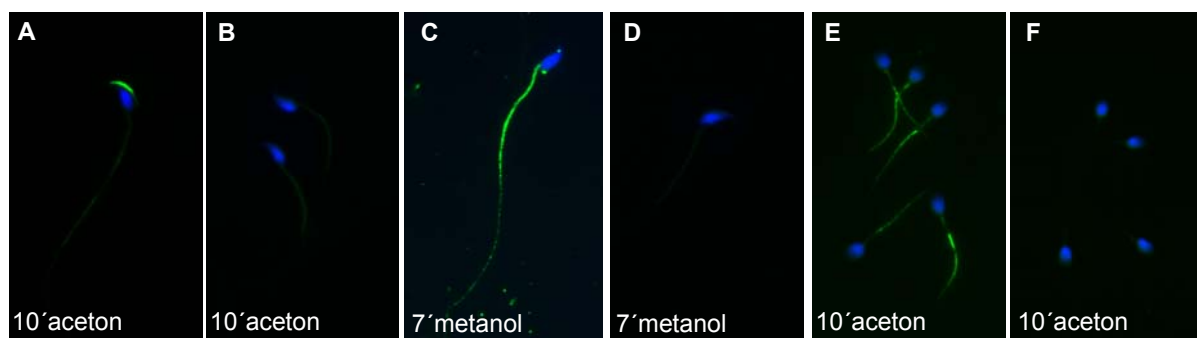


**Obr.18** Imunofluorescenční značení ERs v kančích spermích. Spermie byly permeabilizovány 7 minut v metanolu případně 10 minut v acetonu, inkubovány s primární protilátkou proti ERs a následně se sekundární protilátkou značenou FITC. Modře jsou značena jádra pomocí DAPI. Obrázky c, f, i, k představují negativní kontrolu.

Pro porovnání lokalizace ERs mezi různými savčími druhy byla imunolokalizace provedena také na lidských a myších spermích.

U lidských spermíí byla fluorescence detekována pomocí protilátky proti ER $\beta$  (H150) v bičíku (obr.19 E). Druhá protilátka proti ER $\beta$  (1531) ani protilátka proti ER $\alpha$  na lidských spermích neznačila.

U myších spermií byla fluorescence detekována opět pouze pomocí protilátky proti ER $\beta$  (H150). Tato protilátka značila dvě odlišné části spermie v závislosti na typu použitého permeabilizačního činidla. Při permeabilizaci 10 minut v acetonu při pokojové teplotě byla fluorescence detekována v oblasti akrosomu, při permeabilizaci 7 minut v metanolu při -20°C byla fluorescence detekována v bičíku (obr 19 A a C).

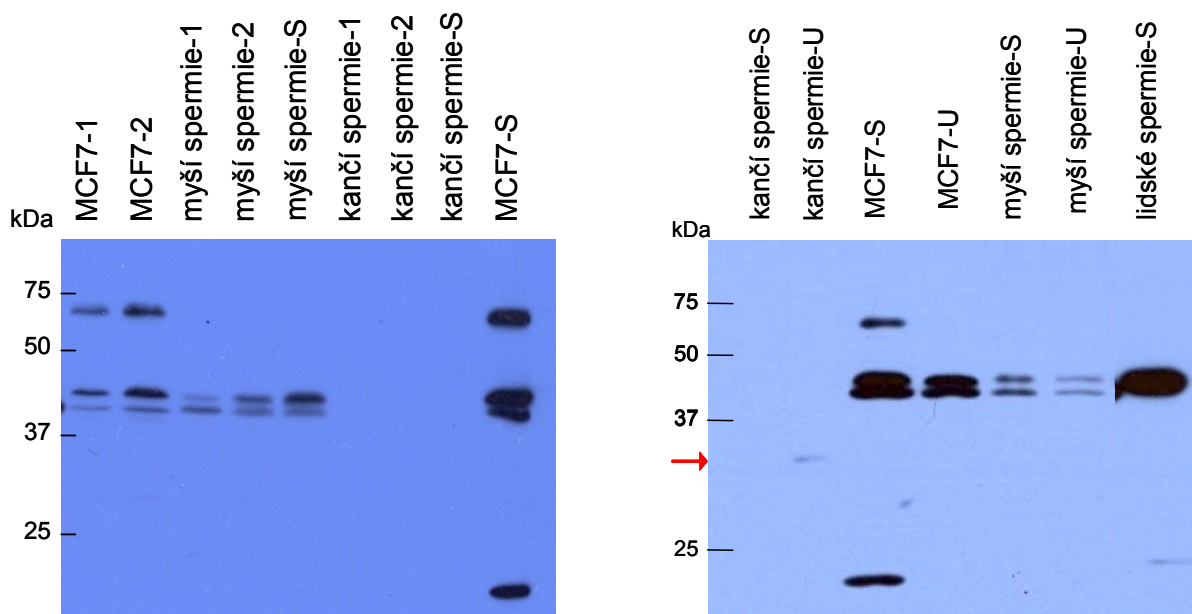


**Obr.19** Imunofluorescenční značení ER $\beta$  v myších a lidských spermiích. Spermie byly permeabilizovány 10 minut v acetonu, případně 7 minut v metanolu, inkubovány s primární protilátkou proti A/B doméně ER $\beta$  a následně se sekundární protilátkou značenou FITC. Na myších spermiích značí tato protilátka akrosom (a), případně bičík (c), na lidských spermiích značí bičík (e). Modře jsou značena jádra pomocí DAPI. Obrázky b, d, f představují negativní kontrolu.

#### 4.2.2 Imunodetekce ERs

Přítomnost proteinů ERs ve spermiích byla analyzována pomocí imunodetekce s protilátkami proti ERs. Protože při použití různých extrakčních metod lze získat jiný proteinový profil, na SDS-PAGE byly nanášeny různě připravené extrakty (SDS extrakce, Urea extrakce, extrakce v 1,5% Tx-100, extrakce s inhibitory proteáz).

Pro imunodetekci proteinu ER $\alpha$  byla použita monoklonální protilátka proti C-koncové doméně lidského ER $\alpha$ . V proteinových extraktech z myších spermií byly detekovány dva proteiny o molekulové hmotnosti 43 a 46 kDa, které komigrovaly s pozitivní kontrolou (lyzát z MCF7 buněk). V případě lidských spermií byl detekován protein o velikosti 46 kDa. Oproti proteinovým extraktům ze spermií, v extraktech z MCF7 buněk byl detekován také protein o velikosti 67 kDa, což odpovídá nezkrácené formě proteinu ER $\alpha$ . V případě kančích spermií byl pomocí protilátky proti ER $\alpha$  detekován protein pouze v urea extraktu. Tento protein o velikosti 34 kDa nebyl detekován v žádném jiném testovaném extraktu.

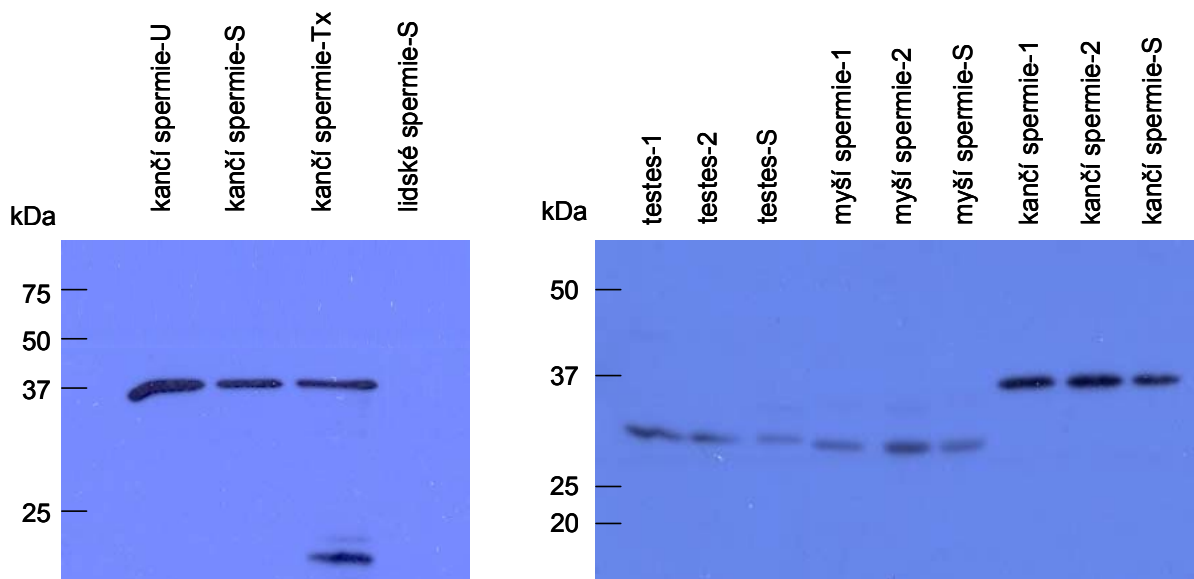


**Obr.20 Detekce proteinu ER $\alpha$ .** Proteiny byly separovány na 15% gelu za použití SDS-PAGE a následně byla provedena imunodetekce s protilátkou proti C-koncové doméně ER $\alpha$ . Červená šipka znázorňuje slabou detekci proteinu v urea extraktu z kančích spermií. Číslo/písmeno v popisících označují metodu použité extrakce proteinů: 1-extrakce s vlastní směsí inhibitorů proteáz, 2-extrakce s komerční směsí inhibitorů proteáz, S-SDS extrakce, U-urea extrakce.

Imunodetekce proteinu ER $\beta$  byla provedena pomocí dvou komerčních protilátek připravených proti odlišným doménám ER $\beta$ . Protilátka proti ER $\beta$  (H150) rozpoznává epitop značící A/B doménu, druhá použitá protilátka proti ER $\beta$  (1531) rozpoznává epitop značící ligand vázající doménu. Oproti očekávání obě protilátky značily odlišné proteiny.

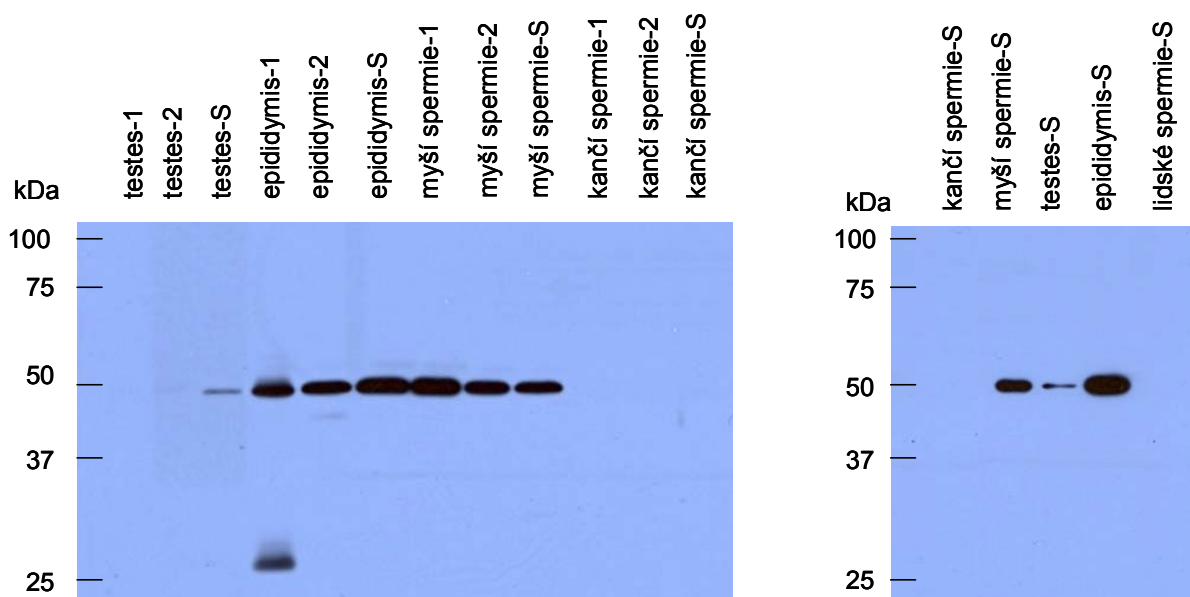
Pomocí protilátky proti A/B doméně byl v různých připravených extraktech z kančích spermií detekován protein o velikosti 37 kDa (obr.21). Pomocí této protilátky byl v extraktech z myších spermií a myších testes detekován menší protein o přibližné molekulové váze 32 kDa, v extraktu z lidských spermií žádný protein detekován nebyl.





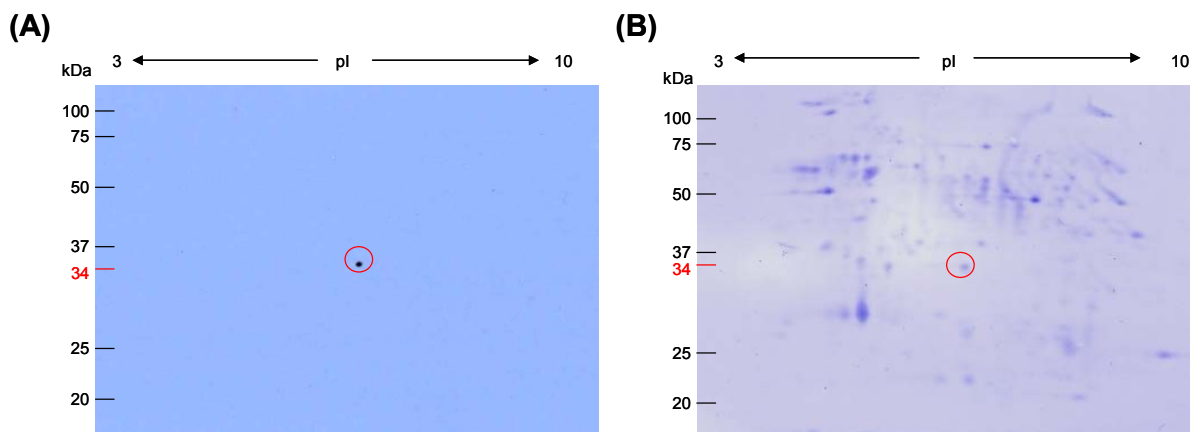
**Obr.21 Imunodetekce ER $\beta$  pomocí protilátky proti A/B doméně ER $\beta$ .** Proteiny byly separovány na 15% gelu za použití SDS-PAGE a následně byla provedena imunodetekce s protilátkou proti A/B doméně ER $\beta$ . Čísla/písmena v popisích označují metodu použité extrakce proteinů: 1-extrakce s vlastní směsí inhibitorů proteáz, 2-extrakce s komerční směsí inhibitorů proteáz, S-SDS extrakce, U-urea extrakce, Tx-extrakce v Tx-100.

Pomocí protilátky proti ligand vázající doméně byl v extraktech z myších a kančích spermií detekován protein o velikosti přibližně 50 kDa. Tento protein je více zastoupen v myších extraktech oproti kančím extraktům. Protein o stejné molekulové váze byl detekován také v extraktech z myších varlat a nadvarlat. V případě lidských spermií byla provedena detekce na SDS extraktech, kde tato protilátka neznačila žádný protein.



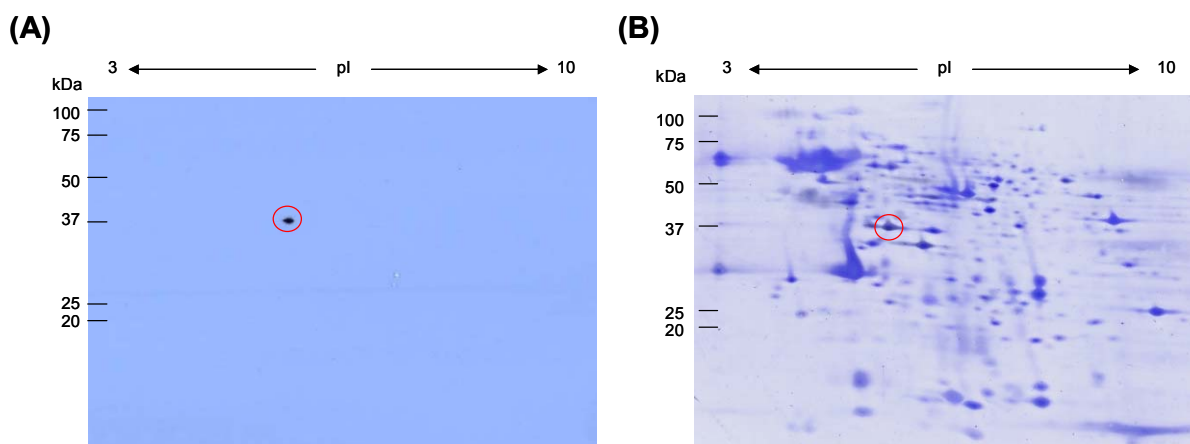
**Obr.22 Imunodetekce ER $\beta$  pomocí protilátky proti ligand vázající doméně ER $\beta$ .** Proteiny byly separovány na 15% gelu za použití SDS-PAGE a následně byla provedena imunodetekce s protilátkou proti ligand vázající doméně ER $\beta$ . Čísla/písmena v popisích označují metodu použité extrakce proteinů: 1-extrakce s vlastní směsí inhibitorů proteáz, 2-extrakce s komerční směsí inhibitorů proteáz, S-SDS extrakce.

V případě imunodetekce proteinu ER $\alpha$  v extraktech z kančích spermií byl zjištěn pouze slabý signál. Při použití imunofluorescenčního značení však protilátka proti ER $\alpha$  značila v oblasti akrosomu. Je proto možné se domnívat, že nanáška proteinů na 1D SDS-PAGE nebyla dostatečná pro detekci zřejmě minoritního proteinu. Kančí spermie byly proto extrahovány v rehydratačním pufru a byla provedena 2D elektroforetická separace proteinů, kde nanáška proteinů byla přibližně 4x větší. Při následné imunodetekci byl opakovaně detekován protein o velikosti přibližně 34 kDa, což odpovídá proteinu nalezeném pomocí 1D elektroforetické separace kančích proteinů extrahovaných v urea extrakčním pufru a následné imunodetekci.



**Obr.23** Imunodetekce s protilátkou proti ER $\alpha$  po 2D elektroforetické separaci proteinů. Protilátka proti ligand vázající doméně ER $\alpha$  na imunodetekci opakovaně v extraktu z kančích spermií značila protein o velikosti přibližně 34 kDa. (A) chemiluminiscenční detekce na filmu, (B) identifikovaný protein na PVDF membráně

2D elektroforetická separace proteinů z kančích spermií a následná imunodetekce byla provedena také za použití protilátky proti ER $\beta$ . Pro detekci byla vybrána protilátka proti A/B doméně (ER $\beta$  H-150), která při imunolokalizaci značila oblast akrosomu a na imunodetekci po 1D elektroforetické separaci značila protein o velikosti 37 kDa.



**Obr.24** Imunodetekce s protilátkou proti ER $\beta$  po 2D elektroforetické separaci proteinů. Protilátka proti A/B doméně ER $\beta$  na imunodetekci opakovaně značila kančí protein o velikosti přibližně 37 kDa, což je ve shodě s imunodetekcí po 1D elektroforetické separaci. (A) chemiluminiscenční detekce na filmu, (B) identifikovaný protein na PVDF membráně

### 4.3 Vliv estrogenních receptorů a estrogenního prostředí na kapacitaci

#### *in vitro*

Pro zhodnocení možné souvislosti mezi přítomností ERs ve spermích a vlivem estrogenů na kapacitaci byly spermie kapacitovány po dobu 120 minut v přítomnosti či nepřítomnosti 1  $\mu$ M koncentrace E2. Pomocí průtokové cytometrie byla analyzována korelace mezi abundancí receptorů (detekce pomocí protilátek proti ERs) a kapacitačním progresem (detekce pomocí protilátky proti kančímu akrosinu) v estrogenním a neestrogenním prostředí.

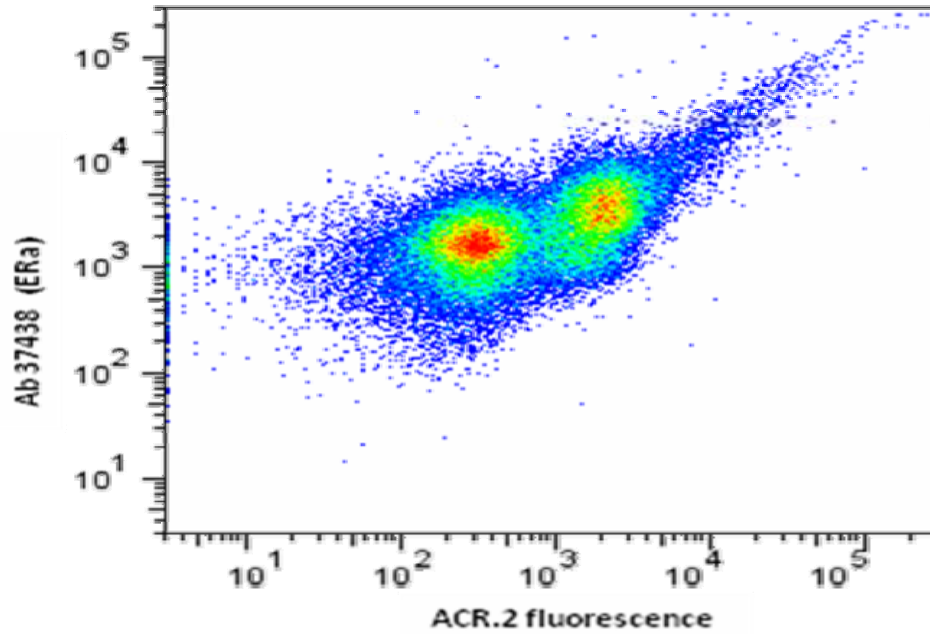
Spermie byly kapacitovány v přítomnosti či nepřítomnosti 1  $\mu$ M koncentrace E2. Po 120 minutách kapacitace byly spermie analyzovány pomocí průtokové cytometrie s ACR.2 protilátkou proti akrosinu (detekující fyziologický stav spermie) a protilátkami proti ER $\alpha$ , ER $\beta$  a GPR30 (detekující přítomnost ERs), dále jako nespecifická kontrola byla použita protilátka proti aromatáze.

Bylo prokázáno, že přítomnost klasických ERs (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ), nebo jejich izoformem pozitivně koreluje s kapacitačním progresem v estrogenním prostředí. Korelace mezi přítomností GPR30 receptoru a kapacitačního progresu v estrogenním prostředí nebyla zjištěna.

**Tabulka 4 Korelace mezi přítomností ERs ve spermích a prokapacitačním vlivem E2.**

	0 min E2	0 min EtC	120 min E	120 min EtOH
ER $\alpha$	0,17	0,21	0,421*	0,282
ER $\beta$	0,18	0,22	0,413*	0,292
Ar	0,09	0,11	0,158	0,167
GPR	0,08	-0,01	0,225	0,109

Hodnoty uvedené v tabulce představují Pearsonův korelační koeficient, který představuje korelaci mezi intenzitou fluorescence fluorescenčně značené sekundární protilátky navázané na primární protilátku proti akrosinu nebo příslušného receptoru. Analýza byla provedena pomocí ANOVA. P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001



**Obr.25 Korelace mezi přítomností ER $\alpha$  ve spermích a kapacitačním stavem spermí.** Dot plot znázorňuje dvě populace buněk – nekapacitované (vlevo) a kapacitované (vpravo) spermie. Posun kapacitované populace spermí směrem nahoru oproti nekapacitované populaci spermí je znakem většího počtu ERs v kapacitované populaci.

## 5. Diskuse

Cílem této studie bylo posoudit vliv estrogenů na funkci savčích spermií na kančím modelovém organismu. Pro testování byly vybrány tři endogenní estrogeny (E1, E2, E3) a jeden syntetický (EE2) estrogen, který je hojně používán jako složka orální antikoncepce. Pro posouzení vlivu těchto estrogenů bylo navrženo několik experimentálních postupů.

V prvním experimentu bylo studováno, zda nejsilnější přirozeně se vyskytující estrogen E2 má vliv na *in vitro* kapacitaci a AR kančích spermií a zda případný vliv je závislý na čase. Spermie byly kapacitovány s 1  $\mu\text{M}$  koncentrací E2 a analyzovány v časech 0, 30, 60, 120, 180, 240 minut kapacitace a po vyvolání AR. Byl prokázán signifikantní prokapacitační vliv E2 na spermie, kdy první signifikantní rozdíl mezi experimentálními a kontrolními vzorky byl pozorován po 60 minutách kapacitace, nejvýraznější pak po 120 minutách kapacitace. Od 120. minuty se s prodlužující dobou kapacitace rozdíly mezi experimentální a kontrolní skupinou snižovaly. Pozorovaná časová závislost vlivu E2 na proces kapacitace je užitečným poznatkem. Přestože je kapacitace studována již více než půl století, její molekulární mechanismy a složky, které ji ovlivňují, stále nejsou zcela známy. Setkáváme se proto v literatuře se spornými výsledky (Gwatkin and Williams, 1970; Bathla et al., 1999; Adeoya-Osiguwa et al., 2003). Rozdílné výsledky mezi jednotlivými skupinami mohou být způsobeny právě odlišným časem kapacitace. Studie vlivu různých látek na kapacitaci by proto měly pečlivě vybírat dobu kapacitace s ohledem na studovaný molekulární proces (vtok vápenatých iontů, cholesterolový eflux, polymerizace aktinu, fosforylace proteinů, změny v akrosomu).

Dále byl prokázán signifikantní vliv E2 na AR. Naše výsledky jsou v souladu s experimenty na myších (Adeoya-Osiguwa et al., 2003) a kančích (Mohamed et al., 2011) spermiích, kde E2 rovněž zvyšoval počet spermií, které podstoupily AR. Kapacitované spermie jsou vnímavější ke stimulům AR. Vliv E2 na AR by proto mohl odrážet prokapacitační vliv E2. Protože však prokapacitační vliv E2 byl nejvyšší v čase 120 minut kapacitace a s postupujícím časem se snižoval, zdá se být zjištěný nárůst spermií po AR způsoben spíše vlivem E2 na samotný proces AR.

Druhý experiment byl zaměřen na detekci možných rozdílů ve vnímavosti spermií z různých kanců k E2. Protože v předchozím experimentu byl největší vliv E2 pozorován v čase 120 minut kapacitace, pro další pokusy byly spermie kapacitovány právě po tuto dobu. Mezi vzorky z jednotlivých kanců byly zjištěny statisticky významné rozdíly v kapacitačním

procesu a vnímavosti k E2. U čtyř vzorků byl zjištěn prokapacitační vliv E2, zatímco u zbylých čtyř vzorků žádný signifikantní vliv E2 prokázán nebyl. Tyto poznatky opět mohou přispět k objasnění sporných výsledků v literatuře, neboť rozdíly mezi jedinci mohou zkreslovat celkové výsledky.

Pro další objasnění role estrogenů v procesu kapacitace byly ve třetím typu experimentu testovány složky s podobnými fyziologickými vlivy. Kančí spermie byly kapacitovány v přítomnosti či nepřítomnosti šesti různých koncentrací (0,001 – 100  $\mu\text{M}$ ) čtyřech vybraných estrogenů (E1, E2, E3, EE2). Protože analýza vzorků s vysokou a nízkou citlivostí k estrogenům by mohla přispět k objasnění mechanismu estrogenního působení na spermie, ve třetím typu experimentu byly používány vzorky spermií, u kterých byla prokázána vysoká, případně nízká citlivost spermií k E2. U spermií s prokázanou citlivostí k E2 byl pozorován prokapacitační vliv všech testovaných estrogenů. Dále bylo prokázáno, že tento vliv se zvyšuje se zvyšující se koncentrací estrogenů v mediu. Nejsilnější vliv měl E2, který urychloval kapacitaci již při 5 nM koncentraci v mediu. U zbylých tří testovaných estrogenů se prokapacitační vliv projevil až od 100 nM koncentrace. Přestože na rozdíl od ostatních testovaných estrogenů u E2 bylo prokázáno signifikantně více kapacitovaných spermií oproti kontrolnímu vzorku již při 5 nM koncentraci, při vyšších koncentracích se prokapacitační vliv mezi jednotlivými estrogeny nelišil. U spermií s nezjištěnou citlivostí k E2 byl v tomto třetím experimentu také prokázán prokapacitační vliv všech testovaných estrogenů, ovšem pouze při jejich vysoké koncentraci v kapacitačním mediu (10 a 100  $\mu\text{M}$ ). Získaná data z obou kanců naznačují, že estrogeny mají obecný prokapacitační vliv, nicméně u jedinců se sníženou vnímavostí k estrogenům se tento vliv projeví až při vystavení spermií vysokým koncentracím estrogenů.

Prokázaný prokapacitační vliv estrogenů je ve shodě s dalšími studiemi s E2 na myších (Adeoya-Osiguwa et al., 2003) a kančích spermiích (Mohamed et al., 2011). Oproti našim výsledkům však skupina Mohameda pozorovala se zvyšující se koncentrací E2 v mediu menší nárůst počtu kapacitovaných spermií, což by mohlo být způsobeno negativní zpětnou vazbou, která by v případě vysokých koncentrací byla indukována dříve. Protichůdné výsledky mohou odrážet odlišný čas kapacitace a několik možných cest působení E2 na fyziologii spermií. Mohamed a spol. (2011) kapacitovali spermie po dobu 15ti a 30ti minut. Signifikantní rozdíl v počtu kapacitovaných spermií mezi kontrolními a experimentálními vzorky v čase 15 minut kapacitace byl po 30 minutách kapacitace smazán. Autoři tento jev dále nevysvětlují, mohlo by se ale jednat o rychlý vliv E2 na kompetentní spermie. Již dříve bylo prokázáno, že E2 působí rychlý vtok vápníku (Baldi et al., 2002).

Tento děj je jednou z hlavních událostí, k nimž dochází v průběhu kapacitace a je ho využíváno pro studii fyziologického stavu spermií pomocí CTC analýzy. Je tedy možné, že použití této metody vedlo v práci Mohamed a spol. (2011) k detekci většího počtu kapacitovaných spermií v čase 15 minut kapacitace v důsledku zahrnutí subpopulace spermií, která reagovala na přítomnost E2 v mediu zvýšením intracelulární koncentrace vápníku. Tato subpopulace spermií by však pravděpodobně byla kapacitována i bez přítomnosti E2 v mediu, nicméně doba potřebná pro dosažení kapacitovaného stavu by se prodloužila, což by se odrazilo ve snižování rozdílů mezi experimentální a kontrolní skupinou s prodlužujícím se časem kapacitace.

Jak již bylo uvedeno výše, v naší studii jsme po 120 minutách kapacitace pozorovali se zvyšující se koncentrací estrogenů v mediu zvyšující se prokapacitační vliv. Ve vzorcích s vysokou citlivostí k estrogenům měly estrogény signifikantní vliv již při koncentraci vyžadované pro aktivaci ERs (Blair et al., 2000; Nawata et al., 1981). Skutečnost, že vysoké koncentrace estrogenů, při kterých již jsou ERs saturovány, dále zvyšují počet kapacitovaných spermií naznačuje, že při vysokých koncentracích estrogenů může jejich vliv být zprostředkován jinou než receptorovou dráhou (např. membránové změny), (Baldi et al., 2009). Tato teorie je podporována i skutečností, kdy u vzorků s nízkou citlivostí k estrogenům měly estrogény signifikantní vliv až při mnohonásobně vyšších koncentracích v mediu (10 – 100  $\mu\text{M}$ ) než jsou koncentrace potřebné pro aktivaci ERs v somatických buňkách. I další skupina získala výsledky podporující nereceptorovou dráhu působení estrogenů na spermie na studii s hydroxytamoxifenem a estrogenními látkami vyskytujícími se v životním prostředí, kdy hydroxytamoxifen, klasický antagonist ERs, neinhiboval prokapacitační vliv E2 a studované estrogenní látky navzdory jejich nízké estrogenní aktivitě měly větší dopad na kapacitaci než E2 (Adeoya-Osiguwa et al., 2003).

Specifické mechanismy (např. receptorová signalizace), které jsou zodpovědné za estrogenní působení při nízkých koncentracích nejsou funkční ve vzorcích bez odpovědi na 1-10 nM E2. Vysoké experimentální koncentrace estrogenů (10 – 100  $\mu\text{M}$ ) jsou daleko od fyziologické koncentrace estrogenů v plazmě ( $10^{-10}$  –  $10^{-11}$  M pro E2 u potkanů a myší, (Nishimura et al., 2008)). Na druhou stranu koncentrace estrogenů ve folikulární tekutině jsou vyšší a spermie tedy může být vystavena vysokým koncentracím estrogenů během kapacitace v samičím reprodukčním traktu (Tarlatis et al., 1993; Ouellette et al., 2005).

V prvním experimentu byl prokázán nárůst počtu spermií po AR v experimentální skupině. Pro další studii vlivu estrogenů na AR a vyvození možného zobecnění byly proto spermie ve čtvrté části studie ovlivňovány čtyřmi estrogény. Pro analýzu jejich vlivu bylo



použito několik metod. Standardně se pro hodnocení kapacity a AR používá CTC analýza. V naší laboratoři byla připravena protilátka proti kančímu akrosinu a pomocí jejího specifického značení akrosomu lze také hodnotit stav spermií (Peknicova et al., 1990; Peknicova et al., 1994). Ve všech experimentálních vzorcích byl prokázán signifikantní nárůst počtu spermií, které po indukci zona pellucida podstoupily AR. Mikroskopické hodnocení je do jisté míry subjektivní, proto byla získaná data doplněna biochemickými metodami. Tyto metody potvrdily nárůst počtu spermií po AR ve vzorcích, které byly kapacitovány s E2 a EE2, tedy ve vzorcích s největším vlivem estrogenů detekovaným mikroskopickou metodou. Naopak ve vzorku ovlivňovaném E3 biochemické metody žádný signifikantní vliv neprokázaly, což pravděpodobně svědčí o jejich nižší citlivosti oproti mikroskopické metodě. Největší vliv na AR měl syntetický estrogen EE2, na kapacitaci však endogenní estrogen E2, což pravděpodobně dále svědčí pro zahrnutí různých mechanismů vyvolávajících estrogenní působení na kapacitaci a akrosomální reakci diskutované v prvním experimentu.

Pozorovaný efekt má svou fyziologickou interpretaci. Bylo prokázáno, že doba kapacity se liší mezidruhově, ale také v závislosti na hormonálním stavu samice v době kopulace (Smith et al., 1987; Yanagimachi and Chang, 1963). Po kopulaci jsou spermie skladovány v ovidukálním rezervoáru, kde jsou navázány na ovidukální epitel, který zpomaluje kapacitaci, zato prodlužuje životnost spermií (Yanagimachi, 1994). Kapacitaci nedokončují všechny spermie najednou, ale spíše postupně a jsou tedy i postupně uvolňovány (Yanagimachi, 1994). V průběhu ovulačního cyklu dochází k cyklickým změnám hladin hormonů, mimo jiné i estrogenu (E2), který dosahuje svého vrcholu v době ovulace. Kolísající hladiny estrogenů mohou být příčinou postupného zrání a uvolňování spermií z ovidukálního rezervoáru. Zatímco nízké hladiny estrogenů ovlivňují subpopulaci spermií před ovulací, vysoké hladiny estrogenů zřejmě urychlují kapacitaci v době ovulace. Postupné uvolňování kapacitovaných spermií zvyšuje pravděpodobnost setkání kompetentní samčí a samičí pohlavní buňky a tedy pravděpodobnost oplození. Rozdílná citlivost spermií k estrogenům a možné zahrnutí více mechanismů působení estrogenů (v závislosti na jejich koncentraci) na spermie je tedy možný mechanismus zvyšující pravděpodobnost oplození.

V první části studie jsme prokázali vliv estrogenů na zrání spermií v samičím reprodukčním traktu v závislosti na látce, koncentraci a době vystavení. Mechanismus vlivu estrogenu na spermie stále není znám. V různých somatických buněčných systémech E2 reguluje tok vápenatých iontů, vytváří cyklické nukleotidy a aktivuje různé kinázy (Kelly and Levin, 2001). Všechny tyto mechanismy hrají důležitou roli i v procesech zrání spermií. Byla

diskutována možnost zahrnutí několika mechanismů zprostředkování estrogenních vlivů na spermie. Obecně je přijímáno, že E2 zprostředkovává své působení vazbou na ERs, je tedy možné, že jedním z možných mechanismů zprostředkujících vliv estrogenů na spermie zahrnuje i aktivaci ERs, ať už klasických, jejich izoformou či transmembránového receptoru GPR30. V literatuře se setkáváme s ne zcela jednotnými výsledky týkající se přítomnosti ERs v lidských spermiích. Byly nalezeny literární údaje pouze jedné skupiny, která detekovala ERs na kančím modelu (Rago et al., 2007), proto jsme se detekci snažili zopakovat. Pro zobecnění možné role ERs v savčích spermiích byly detekce ERs prováděny na kančích, myších a lidských spermiích.

Pomocí imunofluorescenčního značení byla u kančích spermií zjištěna podobná lokalizace obou ERs (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ) a to v akrosomální oblasti hlavičky. Při použití protilátky ER $\beta$  (H150) bylo značení detekováno také v oblasti krčku, tuto část však neznačila druhá protilátka proti ER $\beta$  (ER $\beta$  1531). Protože použité protilátky proti ER $\beta$  značí odlišné epitopy, rozdíly ve značení mezi dvěma protilátkami proti ER $\beta$  mohou být způsobeny přítomností různých sestřihových variant. Akrosomální lokalizace ERs svědčí o jejich možné roli v procesu akrosomální reakce a kapacitace. Naše výsledky jsou zčásti ve shodě s dřívějšími studii na kančích spermiích (Rago et al., 2007), která také lokalizovala ER $\beta$  v hlavičce spermií, oproti naší studii však již nedetekovala imunofluorescenci v krčku a ER $\alpha$  lokalizovala v mitochondriální části bičíku. Přestože byly použity stejné protilátky proti ERs a permeabilizační činidlo, naše výsledky se liší a pro objasnění rozdílného značení je třeba experiment zopakovat, případně provést další studie.

Proti kančím spermiím, u myších a lidských spermií nebyla pomocí imunofluorescenčního značení prokázána přítomnost ERs a byly zjištěny rozdíly v lokalizaci ER $\beta$ . Zatímco u kančích spermií byl imunodetekován protein v akrosomální oblasti hlavičky, u lidských spermií byl lokalizován v bičíku a u myších spermií jak v bičíku, tak v akrosomu. Rozdílná lokalizace ERs naznačuje rozdílnou funkci ERs ve spermiích různých savčích druhů. Jak již bylo zmíněno, přítomnost ERs v hlavičce spermií by mohla hrát roli ve zprostředkování vlivu E2 na kapacitaci a akrosomální reakci, zatímco přítomnost ERs v bičíku má zřejmě vztah k motilitě. Myš a křeček jsou druhově příbuzné organismy, jejich spermie mají podobný tvar a mohly by sdílet mechanismy regulující zrání spermií. Prokázaná vazba E2 v akrosomální oblasti křeččích spermií (Fujinoki et al., 2010) by proto mohla být ve shodě s imunolokalizací ER $\beta$  v akrosomální oblasti myších spermií. Lokalizace ER $\beta$  v bičíku lidských spermií je ve shodě s dalšími publikovanými výsledky (Rago et al., 2006; Aquila et al., 2004).

Pomocí imunodetekce s protilátkami proti ERs nebyly u spermií prokázány proteiny o velikosti odpovídající klasickým ERs. Nicméně byly detekovány proteiny menší a mohlo by se tedy jednat o sestříhové varianty klasických ERs.

Pomocí protilátky proti ER $\alpha$  byl u lidských a myších spermií detekován protein o přibližné velikosti 46 kDa, v myších spermiích také menší protein o přibližné velikosti 43 kDa. Oba tyto proteiny byly detekovány také v pozitivní kontrole (extrakt z MCF7 buněk), kde byl dále detekován protein o velikosti nezkrácené formy ER $\alpha$ . Detekce 46 kDa formy ER $\alpha$  byla již dříve prokázána ve zralých lidských spermiích (Lambard et al., 2004; Solakidi et al., 2005). U kančích spermií byl již dříve nalezen protein ER $\alpha$  o velikosti 67 kDa (Rago et al., 2007). V naší studii jsme však detekovali pomocí protilátky proti ER $\alpha$  pouze protein o velikosti přibližně 34 kDa a to jak při použití 1D, tak 2D elektroforetické separace proteinů. V případě 1D elektroforetické separace proteinů byl detekovaný signál velmi slabý a pouze v jednom typu extrakce. Je tedy možné, že Rago a spol. (2007) tento protein nezachytil. Proč jsme však nebyli schopni detekovat nezkrácenou formu ER $\alpha$ , přestože byla použita stejná protilátka proti ER $\alpha$ , zůstává otázkou. Protein detekovaný v kančích spermiích by mohl odpovídat 36 kDa izoformě ER $\alpha$ , která byla nalezena v membráně rakovinných buněk, kde přenáší estrogenní i antiestrogenní aktivaci MAPK/ERK dráhy. Tato forma postrádá transaktivační doménu a na N-konci nese tři různá potencionální místa myristoylace (Wang et al., 2006).

Imunodetekce proteinu ER $\beta$  byla provedena pomocí dvou protilátek proti odlišným epitopům lidského ER $\beta$ . Stejně jako v případě imunolokalizace i zde byly získány odlišné výsledky za použití těchto protilátek. Pomocí protilátky proti ligand vázající doméně byl ve spermiích detekován protein o velikosti 50 kDa pouze u myší. Tento protein byl detekován také v extraktech z myších varlat a nadvarlat. 50 kDa forma ER $\beta$  byla již dříve prokázána v zárodečných buňkách (Lambard et al., 2004). Detekovaný protein by mohl odpovídat izoformě myšího ER $\beta$  o velikosti 48 kDa.

Neprokázaný výskyt proteinu ER $\beta$  v lidských ejakulovaných spermiích je ve shodě s dřívějšími publikovanými výsledky (Lambard et al., 2004).

Při použití protilátky proti A/B doméně lidského ER $\beta$  byl v kančích spermiích detekován protein o přibližné velikosti 37 kDa a to jak za použití 1D, tak 2D elektroforetické separace. Mohlo by se jednat o další izoformu ER. Protože tento protein nebyl detekován pomocí druhé protilátky proti ER $\beta$ , která na imunolokalizaci značila pouze oblast akrosomu, je možné že tento protein je lokalizován v krčku.

V závěrečném experimentu, který obě části studie spojoval, jsme prokázali, že přítomnost ERs ve spermích pozitivně koreluje s kapacitačním progresem v estrogenním prostředí. Zdá se tedy, že prokapacitační vliv estrogenů na spermie je z části zprostředkován vazbou estrogenů na ERs.

## 6. Závěr

Oplození je jedinečný děj, který může být na všech jeho úrovních poškozen mnoha faktory (genetickými, okolního prostředí). Po svém vzniku musí samčí i samičí pohlavní buňky podstoupit řadu regulovaných dějů než se stanou kompetentní a dají vznik novému jedinci. Mezi procesy, kterými prochází samčí pohlavní buňka patří i kapacitace a akrosomální reakce (AR), ke kterým dochází v samičím reprodukčním traktu. Pouze kapacitované spermie jsou schopné vazby na zona pellucida vajíčka, podstoupit AR a oplodnit vajíčko. Spermie, které podstoupí AR předčasně, ztrácí schopnost vazby na vajíčko, což ve svém důsledku vede k neplodnosti (Yanagimachi, 1994). Přesné načasování kapacitace a AR je tedy nezbytné pro vznik nového jedince a jakákoli disregulace může vést k selhání oplození.

Bylo prokázáno, že vysoké hladiny estrogenů v prenatalním období jsou u samčích potomků jednou z příčin podílejících se na vzniku „testicular dysgenesis syndrom-u“, který se projevuje řadou patologických stavů jako je kryptorchismus, zvýšený výskyt rakoviny varlat a hypospadiie (Vidaeff and Sever, 2005). Naopak nízké hladiny či úplná ztráta estrogenů v dospělosti vedou ke zhoršení kvality spermií, či úplnému zastavení spermatogeneze (Rochira et al., 2005). Estrogeny, původně považované za výhradně samičí hormony, hrají tedy důležitou roli i v mužské reprodukci.

V této studii byl prokázán vliv tří endogenních estrogenů (E1, E2, E3) a jednoho syntetického estrogenu na kapacitaci kančích spermií a to jak v závislosti na látce a její koncentraci, tak na čase kapacitace. Dále byl prokázán vliv těchto látek na akrosomální reakci. Pomocí protilátek proti estrogenním receptorům (ERs) byly ve spermiích detekovány proteiny o menší velikosti než jsou klasické ERs a mohlo by se tedy jednat o jejich setřihové varianty, které byly již dříve detekovány (Lambard et al., 2004; Solakidi et al., 2005; Rago et al., 2007; Wang et al., 2006). V závěrečném experimentu této studie bylo prokázáno, že přítomnost ERs ve spermiích pozitivně koreluje s kapacitačním progresem v estrogenním prostředí a zdá se tedy, že ERs (alespoň zčásti) zprostředkovávají estrogenní působení na spermie.

Studované endogenní estrogeny jsou přirozenými hormony, které zprostředkovávají svůj specifický fyziologický účinek pomocí ERs (Ho and Liao., 2002). Mnoho látek, kterým jsme v současné době každodenně vystaveni má schopnost vázat se na ERs a působit jako agonisté či antagonisté přirozených estrogenů. Výzkum vlivu estrogenů na spermie a detekce

ERs má tedy dvě stránky. Jednak, jde o zjištění fyziologického vlivu přirozených estrogenů na spermie, tento vědecký poznatek má možnou praktickou aplikaci při léčbě neplodnosti. Jednak, s ohledem na skutečnost, kdy estrogení látky v životním prostředí mohou negativně ovlivňovat činnost endogenních hormonů, mohou se poznatky z této studie využít při studii možného negativního vlivu estrogeních látek na reprodukci na hladině dvou zracích dějů spermií (kapacitace a AR).

## 7. Literatura

Abou-haila, A. and D. R. Tulsiani. 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., S. Markoulaki, V. Pocock, S. R. Milligan, and L. R. Fraser. 2003. **“17beta-Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function.”** Human reproduction 18(1): 100-7.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002 **“Molecular Biology of the cell”** 4 th, New York and London, Garland Science

Aquila, S., D. Sisci, M. Gentile, E. Middea, S. Catalano, A. Carpino, V. Rago, and S. Ando. 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.”** The Journal of clinical endocrinology and metabolism 89(3): 1443-51.

Austin, C. R. 1951. **“Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg.”** Australian journal of scientific research. Ser. B: Biological sciences 4(4): 581-96.

Baldi, E., M. Luconi, L. Bonaccorsi, and G. Forti. 2002. **“Signal transduction pathways in human spermatozoa.”** Journal of reproductive immunology 53(1-2): 121-31.

Baldi, E., M. Luconi, L. Bonaccorsi, C. Krausz, and G. Forti. 1996. **“Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways.”** Frontiers in bioscience : a journal and virtual library 1: d189-205.

Baldi, E., M. Luconi, M. Muratori, S. Marchiani, L. Tamburrino, and G. Forti. 2009. **“Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions.”** Molecular and cellular endocrinology 308(1-2): 39-46.

Bathla, H., S. S. Guraya, and G. K. Sangha. 1999. **“Role of estradiol in the capacitation and acrosome reaction of hamster epididymal spermatozoa in the isolated uterus of mice incubated in vitro.”** Indian journal of physiology and pharmacology 43(2): 211-7.

Blair, R. M., H. Fang, W. S. Branham, B. S. Hass, S. L. Dial, C. L. Moland, W. Tong, L. Shi, R. Perkins, and D. M. Sheehan. 2000. **“The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands.”** Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology 54(1): 138-53.

Calzada, L., A. Bernal, and E. Loustaunau. 1988. **“Effect of steroid hormones and capacitation on membrane potential of human spermatozoa.”** Archives of andrology 21(2): 121-8.

Carreau, S., C. de Vienne, and I. Galeraud-Denis. 2008. **“Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances.”** Advances in medical sciences 53(2): 139-44.

- Carreau, S., C. Genissel, B. Bilinska, and J. Levallet. 1999. **“Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male.”** International journal of andrology 22(4): 211-23.
- Carreau, S., D. Silandre, S. Bourguiba, K. Hamden, L. Said, S. Lambard, I. Galeraud-Denis, and C. Delalande. 2007. **“Estrogens and male reproduction: a new concept.”** Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.] 40(6): 761-8.
- Durkee, T. J., M. Mueller, and M. Zinaman. 1998. **“Identification of estrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid in human spermatozoa.”** American journal of obstetrics and gynecology 178(6): 1288-97.
- Francavilla, F., R. Romano, C. Pandolfi, B. Macerola, R. Santucci, S. Necozone, and S. Francavilla. 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.”** International journal of andrology 26(6): 342-7.
- Fraser, L. R., S. A. Adeoya-Osiguwa, R. W. Baxendale, and R. Gibbons. 2006a. **“Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules.”** Frontiers in bioscience : a journal and virtual library 11: 1636-45.
- Fraser, L. R., E. Beyret, S. R. Milligan, and S. A. Adeoya-Osiguwa. 2006b. **“Effects of estrogenic xenobiotics on human and mouse spermatozoa.”** Human reproduction 21(5): 1184-93.
- Fujinoki, M. 2010. **“Suppression of progesterone-enhanced hyperactivation in hamster spermatozoa by estrogen.”** Reproduction 140(3): 453-64.
- Gilbert F. S. 2006 **“Developmental Biology”** eighth edition, Sinauer Associates Inc.
- Gwatkin, R. B. and D. T. Williams. 1970. **“Inhibition of sperm capacitation in vitro by contraceptive steroids.”** Nature 227(5254): 182-3.
- Hammes, S. R. and E. R. Levin. 2007. **“Extranuclear steroid receptors: nature and actions.”** Endocrine reviews 28(7): 726-41.
- Harrison, R. A. and B. M. Gadella. 2005. **“Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation.”** Theriogenology 63(2): 342-51.
- He, Y. F., L. M. Yue, Y. P. He, J. H. Zhang, J. Zheng, and X. P. Gao. 2005. **“[Effects of estrogen on acrosome reaction and intracellular calcium in human spermatozoa and the possible mechanism concerned].”** Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Sichuan University. Medical science edition 36(4): 500-2.
- Hernández-Peréz O., Ballesteros L. M., Rosado A. 1979 **“Binding of 17-beta-estradiol to the outer surface and nucleus of human spermatozoa.”** Arch Androl 3 (1):23-9.



- Hess, R. A. 2000. **“Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract.”** *Reviews of reproduction* 5(2): 84-92.
- Hess, R. A. 2003. **“Estrogen in the adult male reproductive tract: a review.”** *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 1: 52.
- Ho, K. J. and J. K. Liao. 2002. **“Nonnuclear actions of estrogen.”** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 22(12): 1952-61.
- Hunter, R. H., B. Cook, and N. L. Poyser. 1983. **“Regulation of oviduct function in pigs by local transfer of ovarian steroids and prostaglandins: a mechanism to influence sperm transport.”** *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 14(4): 225-32.
- Chang, M. C. 1951. **“Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes.”** *Nature* 168(4277): 697-8.
- Cheng, C. Y., B. Boettcher, and R. J. Rose. 1981a. **“Lack of cytosol and nuclear estrogen receptors in human spermatozoa.”** *Biochemical and biophysical research communications* 100(2): 840-6.
- Cheng, C. Y., B. Boettcher, R. J. Rose, D. J. Kay, and H. R. Tinneberg. 1981b. **“The binding of sex steroids to human spermatozoa. An autoradiographic study.”** *International journal of andrology* 4(1): 1-17.
- Chretien, F. C. 1977. **“[Cervical mucus. III. Physiological roles].”** *Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction* 6(4): 451-88.
- Idaomar, M., J. F. Guerin, J. Lornage, P. Moncharmont, and J. C. Czyba. 1987. **“Effects of estradiol and its antagonist tamoxifen on motility and metabolism of human spermatozoa.”** *Advances in contraceptive delivery systems : CDS* 3(4): 337-45.
- Kelly, M. J. and E. R. Levin. 2001. **“Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors.”** *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 12(4): 152-6.
- Koehler, K. F., L. A. Helguero, L. A. Haldosen, M. Warner, and J. A. Gustafsson. 2005. **“Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta.”** *Endocrine reviews* 26(3): 465-78.
- Lambard, S., I. Galeraud-Denis, P. T. Saunders, and S. Carreau. 2004. **“Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors.”** *Journal of molecular endocrinology* 32(1): 279-89.
- Lamirande, E., P. Leclerc, and C. Gagnon. 1997. **“Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization.”** *Molecular human reproduction* 3(3): 175-94.
- Leung, Y. K., P. Mak, S. Hassan, and S. M. Ho. 2006. **“Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling.”** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(35): 13162-7.

- Levin, E. R. 2005. **“Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen.”** *Molecular endocrinology* 19(8): 1951-9.
- Luconi, M., L. Bonaccorsi, G. Forti, and E. Baldi. 2001. **“Effects of estrogenic compounds on human spermatozoa: evidence for interaction with a nongenomic receptor for estrogen on human sperm membrane.”** *Molecular and cellular endocrinology* 178(1-2): 39-45.
- Luconi, M., G. Forti, and E. Baldi. 2002. **“Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction.”** *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 80(4-5): 369-81.
- Luconi, M., G. Forti, and E. Baldi. 2006. **“Pathophysiology of sperm motility.”** *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 11: 1433-47.
- Luconi, M., M. Muratori, G. Forti, and E. Baldi. 1999. **“Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects.”** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84(5): 1670-8.
- Lukoseviciute, K., V. Bizokas, H. Zilinskas, and A. Januskauskas. 2007. **“Effect of progesterone and oestradiol on sperm-zona binding and acrosome reaction in bovine spermatozoa after thawing.”** *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 42(3): 320-5.
- Mohamed S. A., Park Y. J., Song W. H., Shin D. H., You Y. A., Ryu B. Y., Pang M. G. 2011. **“Xenoestrogenic compounds promote capacitation and an acrosome reaction in porcine sperm.”** *Theriogenology* 75(6): 1161-9
- Mueller, S. O. 2004. **“Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods.”** *Analytical and bioanalytical chemistry* 378(3): 582-7.
- Nawata, H., M. T. Chong, D. Bronzert, and M. E. Lippman. 1981. **“Estradiol-independent growth of a subline of MCF-7 human breast cancer cells in culture.”** *The Journal of biological chemistry* 256(13): 6895-902.
- Nishimura, I., K. Ui-Tei, K. Saigo, H. Ishii, Y. Sakuma, and M. Kato. 2008. **“17beta-estradiol at physiological concentrations augments Ca(2+) -activated K+ currents via estrogen receptor beta in the gonadotropin-releasing hormone neuronal cell line GT1-7.”** *Endocrinology* 149(2): 774-82.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI); search: gene ESR1/2
- Ouellette, Y., C. A. Price, and P. D. Carriere. 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 first-wave cohort of bovine ovarian follicles.”** *Domestic animal endocrinology* 29(4): 623-33.
- Peknicova, J. and J. Moos. 1990. **“Monoclonal antibodies against boar acrosomal antigens labelling undamaged acrosomes of spermatozoa in immunofluorescence test.”** *Andrologia* 22(5): 427-35.

- Pekicova J., Moos J., Mollova M., Srsen V., Capkova J. 1994 **“Changes in immunochemical localisation of acrosomal and sperm proteins in boar spermatozoa during capacitation and acrosome reaction.”** Anim Repr Sci 35:255-71
- Prossnitz, E. R., J. B. Arterburn, and L. A. Sklar. 2007. **“GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen.”** Molecular and cellular endocrinology 265-266: 138-42.
- Rago, V., S. Aquila, R. Panza, and A. Carpino. 2007. **“Cytochrome P450arom, androgen and estrogen receptors in pig sperm.”** Reproductive biology and endocrinology : RB&E 5: 23.
- Rago, V., L. Siciliano, S. Aquila, and A. Carpino. 2006. **“Detection of estrogen receptors ER-alpha and ER-beta in human ejaculated immature spermatozoa with excess residual cytoplasm.”** Reproductive biology and endocrinology : RB&E 4: 36.
- Rochira, V., A. R. Granata, B. Madeo, L. Zirilli, G. Rossi, and C. Carani. 2005. **“Estrogens in males: what have we learned in the last 10 years?”** Asian journal of andrology 7(1): 3-20.
- Shalgi, R., T. T. Smith, and R. Yanagimachi. 1992. **“A quantitative comparison of the passage of capacitated and uncapacitated hamster spermatozoa through the uterotubal junction.”** Biology of reproduction 46(3): 419-24.
- Sharpe, R. M. and N. E. Skakkebaek. 1993. **“Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?”** Lancet 341(8857): 1392-5.
- Smith, T. T., F. Koyanagi, and R. Yanagimachi. 1987. **“Distribution and number of spermatozoa in the oviduct of the golden hamster after natural mating and artificial insemination.”** Biology of reproduction 37(1): 225-34.
- Solakidi, S., A. M. Psarra, S. Nikolaropoulos, and C. E. Sekeris. 2005. **“Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece.”** Human reproduction 20(12): 3481-7.
- Tarlatzis, B. C., K. Pazaitou, H. Bili, J. Bontis, J. Papadimas, S. Lagos, E. Spanos, and S. Mantalenakis. 1993. **“Growth hormone, oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid after ovarian stimulation with various regimes for assisted reproduction.”** Human reproduction 8(10): 1612-6.
- Thomas, P., Y. Pang, E. J. Filardo, and J. Dong. 2005. **“Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells.”** Endocrinology 146(2): 624-32.
- Vidaeff, A. C. and L. E. Sever. 2005. **“In utero exposure to environmental estrogens and male reproductive health: a systematic review of biological and epidemiologic evidence.”** Reproductive toxicology 20(1): 5-20.

Vigil, P., A. Toro, and A. Godoy. 2008. **“Physiological action of oestradiol on the acrosome reaction in human spermatozoa.”** *Andrologia* 40(3): 146-51.

Visconti, P. E., V. A. Westbrook, O. Chertihin, I. Demarco, S. Sleight, and A. B. Diekman. 2002. **“Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity.”** *Journal of reproductive immunology* 53(1-2): 133-50.

Wang, Z., X. Zhang, P. Shen, B. W. Loggie, Y. Chang, and T. F. Deuel. 2006. **“A variant of estrogen receptor- $\alpha$ , hER- $\alpha$ 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling.”** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(24): 9063-8.

World Health Organization (WHO) 2010. **“Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human semen.”** 5th edition, Geneva, Switzerland. (ISBN 978 9241547789)

Yanagimachi, R. and M. C. Chang. 1963. **“Sperm Ascent through the Oviduct of the Hamster and Rabbit in Relation to the Time of Ovulation.”** *Journal of reproduction and fertility* 6: 413-20.

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

<https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/hum&ev/index.htm>

<http://web.virginia.edu/Heidi/chapter34/chp34.htm>

[http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5757&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5757&loc=ec_rcs)

<http://www.jergym.hiedu.cz/~canovm/alkaloid/prirlatk/h3.html>

## **8. Příloha**

V příloze mé diplomové práce uvádím publikaci, na které jsem se spolupodílela a která obsahuje část výsledků, které zde uvádím.