

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Vliv nízkých dávek fytoestrogenů a zearalenonu na
expanzi kumulárních buněk oocytů prasete**

Diplomová práce

Autor práce: Michaela Kollerová

Vedoucí práce: doc. MVDr. Radko Rajmon, Ph.D.

© 2013 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "**Vliv nízkých dávek fytoestrogenů a zearalenonu na expanzi kumulárních buněk oocytů prasete**" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Doc. MVDr. Radku Rajmonovi, PhD. za milý přístup a za trpělivost a ochotu kdykoliv pomoci, a to nejen při psaní diplomové práce, ale při řešení problémů i během celého magisterského studia.

Velké dík patří i doktorandce Ing. Kristýně Hoškové z Katedry veterinárních disciplín za její podporu a pomoc při práci v laboratoři a vyhodnocování výsledků, a především za její cenné připomínky, náměty a též za trpělivost a ochotu kdykoliv pomoci během psaní celé diplomové práce.

Velkou měrou se na sepsání této práce podílela i celá má rodina, která mi byla celou dobu oporou. Velmi vděčná jsem i blízkému okruhu přátel, zejména pak Janě Fučíkové a Ladislavu Staňkovi a to nejen za poskytnutý azyl při vypracovávání diplomové práce ale i za psychickou podporu.

Souhrn

Cílem této práce bylo ověřit hypotézu, že expanze kumulárních buněk savčích oocytů je citlivější indikátor působení genisteinu, daidzeinu a zearalenonu, než hodnocení dosaženého stupně jaderného zrání.

Genistein a daidzein se řadí do podskupiny fytoestrogenů, tzv. isoflavonoidů, která obecně zahrnuje nejvýznamnější fytoestrogeny. Zearalenon spadá do skupiny mykotoxinů, látek produkovaných houbami a je označován jako mykoestrogen. Běžně se vyskytují v potravinách i krmivech a svou strukturou se velmi podobají endogenním estrogenům.

Mechanismy, kterými tyto látky v organismu působí, nejsou doposud zcela objasněny. Předpokládá se však, že v mnoha případech se tak děje prostřednictvím vazby na estrogenové receptory v buňkách, které se rozlišují na dva typy α a β . Svým efektem se podílejí na významných změnách v celém organismu. Vzhledem k jejich působení skrze estrogenové receptory, ovlivňují zejména morfologii a funkce celé reprodukční soustavy, včetně vývoje a zrání samičích pohlavních buněk – oocytů.

Tato práce je zaměřena na vývoj prasečích oocytů, především pak na míru inhibice expanze kumulárních buněk. Správný průběh expanze kumulo – oocytárního komplexu je důležitý pro úspěšný proces oplození oocyty spermií. Jakékoliv negativní narušení vývoje v této fázi, tak může být příčinou snížené plodnosti samic.

Oocyty pro naše experimenty byly získávány aspirací z dozrálých folikulů na vaječnicích prasniček dovážených z jatek a následně vybírány dle předem stanovených kritérií vhodných pro kultivaci. Oocyty byly posléze kultivovány v 1ml kultivačního média po dobu 24h do stádia metafáze I. Kultivační médium bylo obohaceno o růstové proteiny, humánní gonadotropin a čisté DMSO v případě kontrolních skupin, nebo o příslušný kontaminant rozpuštěný v DMSO v případě pokusných skupin. Po 24 hodinové kultivaci byly skupiny oocytů, vhodných pro statistické hodnocení, nasnímány digitální kamerou. Plochy kumulo – oocytárních komplexů byly posléze měřeny z nasnímaných fotografií pomocí programu Niss Elements, verze 4.0 a vyhodnoceny v programu STATISTIKA. Souběžně s našimi experimenty probíhalo i hodnocení jaderného zrání, které však bylo součástí jiné studie. Nicméně pro interpretaci vlivu námi studovaných látek na expanzi kumulárních buněk oocytů jsou tyto údaje nezbytné a zařazené do našich výsledků.

Výsledky našich pokusů potvrdili účinky na úrovni kumulárních buněk všech testovaných látek ve všech použitých koncentracích. Podobně tomu bylo i v případě dílčích experimentů hodnotících účinky na úrovni jaderného zrání.

Námi testované dávky vybraných kontaminantů se sice neprojevili bez efektu na jaderné zrání. Inhibiční účinky nejnižších koncentrací všech tří látek se však na expanzi kumulárních buněk, ve srovnání s jaderným zráním, projevily podstatně výrazněji. Vyšší citlivost expanze kumulo – oocytárního komplexu, ve srovnání s jaderným zráním tedy nebyla zcela prokázána. Zdá se však vhodné, použití hodnocení míry expanze jako paralelního indikátoru efektu námi testovaných látek na celkový vývoj prasečích oocytů.

Klíčová slova: oogeneze, genistein, daidzein, zearalenon, prase

Summary

The aim of this study was to test the hypothesis that the expansion of cumulus cells in mammalian oocytes is a more sensitive indicator of genistein, daidzein and zearalenone than assessing the degree of nuclear maturation.

Genistein and daidzein belong to a subgroup of phytoestrogens called isoflavones, which generally includes the most important phytoestrogens. Zearalenone falls to a group of mycotoxins produced by fungi and is known as mykoestrogen. It is commonly found in food and feed and its structure is very similar to endogenous estrogens.

The mechanisms by which these substances function in the body have not yet been fully clarified. It is assumed, however, that in many cases this is done by binding to estrogen receptors in cells, which are distinguished into two types of α and β . Its effects contribute to significant changes in the whole organism. Due to their effects through estrogen receptors, they affect especially the morphology and function of the entire reproductive system, including the development and maturation of female sex cells - oocytes.

This work focuses on the development of porcine oocytes, especially on the level of inhibition of cumulus cell expansion. The correct progress of the expansion of cumulus - oocyte complex is important for the successful process of oocyte fertilization by sperm. Any negative disruption of the development at this stage can thus be identified as a cause of reduced fertility females.

Oocytes for our experiments were obtained by aspiration from matured follicles in the ovaries of gilts imported from slaughterhouses and subsequently selected according to predetermined criteria suitable for cultivation. The oocytes were then cultured in 1 ml culture medium for 24 hours to the metaphase stage I. The medium was enriched with growth proteins, human gonadotropin and clear DMSO for controls, or a corresponding contaminant dissolved in DMSO in the case of the experimental groups. After 24 hours of cultivation were the groups of oocytes suitable for statistical evaluation scanned by a digital camera. Areas of cumulus - oocyte complexes were then measured from the images using Niss Elements, version 4.0 and evaluated in the programme STATISTIKA. In parallel with our experiments an evaluation of nuclear maturation was conducted, but this was a part of another study. However, for the interpretation of the influence of the studied compounds on the expansion of cumulus oocyte cells are these data necessary and included in our results.

The results of our experiments confirmed the effects on the level of cumulus cells of all compounds tested at all the concentrations used. The situation was similar in the case of the partial experiments evaluating the effects on the level of nuclear maturation.

The tested doses of selected contaminants have shown some effect on nuclear maturation. Nevertheless, the inhibitory effects of the lowest concentration of all three compounds on the expansion of cumulus cells in comparison with the nuclear maturation showed to be significantly stronger. Higher sensitivity of the expansion of cumulus - oocyte complex, compared to nuclear maturation was therefore not fully established. It seems appropriate, however, to use assessment of the rate of expansion as a parallel indicator of the effect of the tested substances on the overall development of porcine oocytes.

Key words: oocyte maturation, genistein, daidzein, zearalenon, pig

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce.....	2
3	Literární přehled	3
3.1	Environmentální estrogény	3
3.2	Přírodní xenoestrogény	4
3.2.1	Fytoestrogény	4
3.2.2	Mykotoxiny	9
3.3	Mechanismus působení xenoestrogenů.....	11
3.3.1	Vazba na estrogenové receptory.....	11
3.3.2	Rozmístění estrogenových receptorů v organismu	12
3.3.3	Afinita přírodních xenoestrogenů k estrogenovým receptorům.....	13
3.4	Metabolismus přírodních xenoestrogenů	15
3.4.1	Metabolismus isoflavonů	15
3.4.2	Metabolismus zearalenonu	17
3.5	Účinky přírodních xenoestrogenů	18
3.5.1	Účinky na reprodukční soustavu zvířat	19
3.5.2	Vliv na úrovni samičích gamet.....	22
4	Metodika.....	28
5	Výsledky.....	31
6	Diskuze	38
7	Závěr.....	41
8	Seznam použité literatury	42

1 Úvod

Lidé i zvířata se setkávají s velkým množstvím látek, které v organismu působí podobným účinkem jako endogenní estrogény. Velmi důležitou skupinou těchto environmentálních estrogenů, jsou tzv. přírodní xenoestrogeny – fytoestrogeny a mykotoxiny. Látky tvořící se v rostlinách a houbách a vyskytující se tak v mnoha potravinách a zvířecích krmivech rostlinného původu.

Hormonální působení přírodních xenoestrogenů v organismu ovlivňuje širokou škálu fyziologických funkcí. I když fytoestrogeny, především v lidském organismu, mohou působit i pozitivními účinky, jejich vliv v oblasti reprodukce zvířat je především negativní. V případě mykotoxinů působících jako environmentální estrogény, byl zaznamenán pouze negativní efekt. Tyto negativní vlivy jak fytoestrogenů tak zearalenonu na všech úrovních reprodukční soustavy jsou potvrzeny značným množstvím *in vivo* i *in vitro* studií.

Mnoho studií prokazují inhibiční účinky námi studovaných látek i na zrání savčích oocytů, a to zejména na úrovni jaderného zrání. Souvislosti mezi vlivem na jednotlivé stupně vývoje a zrání oocytů a inhibičními účinky na expanzi kumulo – oocytárního komplexu však nejsou doposud příliš objasněny.

2 Cíl práce

Cílem této práce je zjistit a zhodnotit míru expanze kumulárních buněk prasečích oocytů kultivovaných v *in vitro* podmínkách při působení vybraných fytoestrogenů (genisteinu, daidzeinu) a zearalenonu v nízkých dávkách, které již nemají prokazatelný účinek na jaderné zrání a ověřit tak hypotézu, že expanze kumulárních buněk je citlivější indikátor působení uvedených látek než hodnocení dosaženého stupně jaderného zrání.

3 Literární přehled

3.1 Environmentální estrogény

V přírodě se vyskytuje mnoho látek, které více či méně negativně působí na zdraví živých organismů. Mezi ně se řadí i endokrinní disruptory: environmentální látky, které narušují hormonální rovnováhu organismů a svou účinností již při extrémně nízkých dávkách negativně ovlivňují celkovou homeostázu, reprodukční, vývojové a behaviorální funkce (Hilscherová et Bláha, 2009; Sucharda et Kotecký, 2003). Jsou to chemické látky vyskytující se v životním prostředí: přírodní i syntetické hormony, přírodní součásti rostlin, pesticidy, látky používané při výrobě plastických hmot a různých konzumních výrobků, další průmyslově využívané látky a odpady (Hrubá, 2009). Vzhledem k dynamičnosti a rychlosti výzkumu endokrinních disruptorů se seznam těchto látek neustále rozšiřuje. (Sucharda et Kotecký, 2003).

Jednou ze skupin látek, které se řadí mezi endokrinní disruptory jsou i tzv. „environmentální estrogény“, které se svým účinkem velmi podobají přirozeným estrogenům (Sucharda et Kotecký, 2003). Dle původů můžeme environmentální estrogény rozdělit na syntetické xenoestrogény, které vznikají lidskou činností (pesticidy, detergenty apod.) a na přírodní xenoestrogény (Holoubek et Čadová, 2000; Kujalová et al., 2007).

Syntetické xenoestrogény se řadí mezi průmyslově vyráběné produkty nebo jejich metabolity: pesticidy (DDT, endosulfan, atrazin); deriváty stilbenu; nízkochlorované polychlorované bifenyly, dioxiny, furany nebo polyaromatické uhlovodíky. Dále některé acidobazické indikátory, např. fenolftalein; některé ftaláty a bisfenol A, které se louhují z obalů potravin, nebo alkylfenoly (oktylfenol, nonylfenol), což jsou zástupci biodegradčních produktů obsažených v mnohých detergentech, nátěrových hmotách, pesticidech nebo kosmetických přípravcích (Holoubek et Čadová, 2000; Kujalová et al., 2007).

3.2 Přírodní xenoestrogeny

Přírodní xenoestrogeny mohou mít svůj původ v rostlinách, kdy se jedná o tzv. fytoestrogeny, či jsou to produkty vláknitých hub (plísňí), označované jako mykoestrogeny (Kalač et Míka, 1997; Holoubek et Čadová, 2000; Kujalová et al., 2007).

3.2.1 Fytoestrogeny

Fytoestrogeny jsou látky vyskytující se v mnohých potravinách, jako jsou obiloviny, luštěniny, listová zelenina, ovoce nebo také traviny. Hlavním zdrojem fytoestrogenů jsou však jeteloviny a především sója (Knight et Eden, 1995; Kujalová et al., 2007). Poprvé byly izolovány z rostlin na konci 20. let 20. století a byly identifikovány ve více než 300 druzích rostlin (Kalač et Míka, 1997). Svou strukturou a funkcí jsou podobné endogennímu hormonu 17β – estradiolu (Boué et al, 2000; Pilšáková et al., 2010) nebo syntetickému hormonu diethylstilboestrolu (Boué et al, 2000).

Biologická aktivita fytoestrogenů, přesněji jejich účinek na reprodukci, je prokázána díky mnoha studiím. Jednou z nejvýznamnějších je studie syndromu neplodnosti u ovcí (Bennetts et al, 1946), později označovaném jako „jetelová choroba“ (angl. clover disease) (Kalač et Míka, 1997). Ta byla zaznamenána již v roce 1940 a týkala se ovcí v západní Austrálii spásajících porosty bohaté na jetel podzemní (*Trifolium subterraneum*). U zvířat po požití jetele docházelo ke zhoršenému zabřezávání – počet zabřeznutých ovcí klesal, častěji se vyskytovaly aborty a porodní komplikace (Alpert, 1976; Kalač et Míka, 1997). Následné studie prokázaly vyšší koncentrace formononetinu a biochaninu, látek řadících se tak mezi první objevené fytoestrogeny (Rossiter et Beck, 1996).

Koncentrace fytoestrogenů v rostlině je závislá na několika faktorech, kterými jsou například: druh rostliny (polyploidní odrůdy mívají fytoestrogenů více než diploidní), část rostliny (listy často obsahují podstatně více estrogenu než lodyhy), vegetační fáze, kdy např. Smetánka lékařská vykazuje slabou estrogenní aktivitu ve fázi listové růžice a silnou estrogenní aktivitu v době květu, a to díky květnímu stvolu (Kalač et Míka, 1997). Ze studií, ve kterých bylo prokázáno zvýšení koncentrace fytoestrogenů při napadení rostliny patogenními organismy (a to až patnáctinásobně), se dá usuzovat, že fytoestrogeny slouží v rostlině i jako obranný mechanismus. Tento fakt může být důležitý při šlechtění rostlin na

vyšší odolnost proti škůdcům a chorobám, a je zároveň možností, jak v rostlině obsah fytoestrogenů zvyšovat (Kalač et Míka, 1997).

Rozdělení fytoestrogenů

Fytoestrogeny jsou skupina látek, která se dá dělit do několika tříd. Obvykle se ovšem dělí pouze do dvou základních skupin s nejvýznamnějšími zástupci a to: kumestany a isoflanoidy, které zahrnují lignany a isoflavony (Sharma et al., 2005). V některé literatuře jsou mezi fytoestrogeny řazeny ještě skupiny tzv. fytoestrolů a stilbenů (Knight et Eden, 1995).

Fytoestroly, β -sitosterol, kampesterol a stigmasterol, jsou součástí běžné rostlinné stravy a jejich výskyt byl zaznamenán i ve dřevě (Cantrill, 2008; Rousková et al., 2010). Vzhledem k jejich schopnosti snižovat hladinu cholesterolu se běžně přidávají do potravin ve volné nebo esterifikované formě. Fytoestroly dále významně ovlivňují imunitní systém, působí preventivně proti některým typům nádorových onemocnění a jsou známy i jejich antioxidační účinky (Rousková et al., 2010).

Z derivátů **stilbenů** je nejdůležitější zástupce resveratrol, který je nejvíce obsažen ve slupkách červené vinné révy, a tedy i v červeném víně (Pěkníková, 2007), v arašidech a v nižších koncentracích i ve slupkách vinné révy bílé (Moravcová et Kleinová, 2002; Cornwell et al., 2004). V přírodě se vyskytují dva isomery resveratrolu, cis a trans a v rostlinách se většinou vyskytuje směs obou izomerů (Šmidrkal et al., 2001). Estrogenní aktivita však byla zjištěna pouze u isoformy trans (Cornwell et al., 2004).

Kumestanů se v přírodě vyskytuje velký počet, ale pouze některé z nich vykazují estrogenní aktivitu (Cornwell, 2004). Z hlediska estrogenní aktivity a obsahu v rostlinném materiálu je nejdůležitějším představitelem této skupiny kumestrol, který je základním fytoestrogenem ve vojtěšce (Moravcová et Kleinová, 2002). Jeho afinita k estrogenním receptorům je asi 100 – 200x nižší než v případě 17β – estradiolu a má i podstatně nižší účinky než syntetický diethylstilbestrol (Burton et Wells, 2002). Ve srovnání s účinky isoflavonů je 30 – 40 x účinnější (Kalač et Míka, 1997).

Isoflavonoidy jsou skupinou látek zahrnující nejen podskupinu lignanů, ale především nejznámější podskupinu fytoestrogenů, tzv. isoflavony, mezi které se řadí nejsledovanější fytoestrogeny – biochanin A, genistein a daidzein.

Isoflavonoidy

Isoflavonoidy patří mezi rostlinné fytoalexiny. Jejich typickými producenty jsou rostliny z čeledi bobovitých, ale byly nalezeny i v mnoha dalších jak jednoděložných, tak dvouděložných rostlinách (Vítková et al., 2004). Tuto širokou skupinu fytoestrogenů lze rozdělit do dvou podskupin: Lignany a **Isoflavony**.

Lignany jsou třída fenyylpropanoidů, dimerů a oligomerů (Cornwell et al., 2004). Z dřívějších studií se předpokládalo, že lignany jsou metabolity pouze vyšších rostlin (Moravcová et Kleinová, 2002). Později však byly objeveny v biologických tekutinách savců v období menstruačního cyklu přirozené savčí lignany (enterodiol a enterolakton), a proto byly dány do souvislosti s estrogením účinkem a označeny za ojedinělou skupinu endogenních hormonů (Opletal et Šimerda, 2010; Moravcová et Kleinová, 2002). Do organismu se mohou dostat i rostlinnou stravou (Opletal et Šimerda, 2010), která však není na lignany příliš bohatá, a to z důvodu technologického zpracování, kdy je obvykle frakce lignanů oddělena společně se slupkami a vlákninou (Moravcová et Kleinová, 2002).

Existují dva hlavní dimery lignanů, sekoisolariciresinol (SECO) a matairesinol, které však samy o sobě estrogení činnost nevykazují, nicméně jsou snadno přeměněny na výše zmíněné tzv. savčí lignany - enterodiol a enterolakton, které již jsou estrogeně aktivní (Cornwell et al., 2004).

Nejdůležitějším zdrojem lignanů jsou rostlinné oleje. Zvláště bohatý na SECO je lněný olej. Matairesinol je ve lněném semínku zastoupen pouze v minoritním množství (Moravcová et Kleinová, 2002; Opletal et Šimerda, 2010).

Isoflavony jsou podskupinou flavonoidů, které se v rostlinných tkáních vyskytují zejména jako cukerné deriváty glykosidů (Barret, 1996): 7 – O – glykosidy s cukernou složkou, kterou tvoří malonát –, či methylmalonát – hemiestery (Kalač et Míka, 1997) a u

kterých došlo ke změně chemické struktury přesunem fenolového jádra v heterocyklickém uhlovodíku z pozice C3 do pozice C2 (Cornwell et al., 2004). Estrogenní aktivita samotných isoflavonů je v poměrně nízká, po strukturálních přeměnách v průběhu metabolismu se však výrazně zvyšuje (Kalač et Míka, 1997).

Isoflavony jsou syntetizovány hlavně ve vegetačním vrcholu rostliny, vyskytují se tedy především v chloroplastech nadzemních orgánů rostlin a ve stopovém množství jsou zastoupeny i v kořenech. Určitá část obsahu isoflavonů je v listu přítomna již na počátku jeho růstu, zbytek se vytváří během růstu. K jejich přeměně dochází až při plném rozvinutí listu (Kalač et Míka, 1997).

Přítomnost isoflavonů byla zjištěna v některých léčivých rostlinách, jako je kručinka barvířská (*Genista tinctoria*) nebo janovec metlatý (*Sarothamnus scoparius*). V malé míře jsou zastoupeny v žitě a žitných výrobcích, objevují se i v pivu nebo bourbonu a nově byly objeveny i v rybízu a dalším drobném ovoci (Moravcová et Kleinová, 2002).

Hojně se vyskytují v jeteli (Moravcová et Kleinová, 2002; Burton et Wells, 2002; Pilšáková et al., 2010), kde nejvíce zastoupeným fytoestrogenem je biochanin A (Moravcová et Kleinová, 2002) a formononetin (Kalač et Míka, 1997). Jejich nejbohatším zdrojem je však sója luštěinatá (Moravcová et Kleinová, 2002; Cederroth et al., 2012; Pilšáková et al., 2010) bohatá na daidzein, genistein a glycitein (Moravcová et Kleinová, 2002). Stejně jako u jiných fytoestrogenů je koncentrace isoflavonů v sóje závislá na mnoha faktorech. Jedním z důležitých faktorů je úroveň zpracování. Obecně platí, že vyšší stupeň zpracování je spojen s jejich nižším obsahem. Druhá generace sójových výrobků (např. tofu) obsahuje pouze 6 – 20% z celkového množství isoflavonů v nezpracované sóji (Pilšáková et al., 2010).

Mezi nejznámější isoflavony se slabší estrogenní aktivitou patří výše zmíněné látky formononetin a biochanin A. Během metabolických procesů však mohou být, díky činnosti střevních bakterií, přeměněny na biologicky aktivnější a především více sledované látky, genistein a daidzein (Tolleson et al., 2002).

Formononetin je nejdůležitějším fytoestrogenem v jeteli lučním (1 – 30g/kg suš.) a hlavním estrogenem vyvolávajícím již zmíněnou „jetelovou chorobu“. Jeho biologicky aktivnějším metabolitem je equol, přičemž formononetin sám o sobě estrogenní aktivitu nevykazuje (Kalač et Míka, 1997).

Nejbohatším zdrojem **biochaninu A** je jetel červený (*Trifolium pratense*) (Kalač et Míka, 1997; Czerpak et al., 2003), který obsahuje 0,8% biochaninu A z hmotnosti sušiny listů (Czerpak et al., 2003). Dále byla jeho přítomnost zjištěna, kromě sóji také ve vojtěšce (Kalač et Míka, 1997) a ve švestkách (Czerpak et al., 2003).

Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavon)

Genistein se kromě již zmíněné sóji, vyskytuje i v několika druzích jetelů - jeteli lučným, v jeteli plazivém, jeteli perském a ve vojtěšce (Kalač et Míka, 1997). Hlavním potravinovým zdrojem genisteinu je biologicky aktivní glukosid genistin, který se tvoří při fermentačních procesech během zpracování rostlin nebo jejich trávení (Barlow et al., 2007).

Genistein působí jako inhibitor tyrosin kináz, DNA topoisomerázy I a II, a ribosomální S6 kinázy. Jelikož tyrosin kinázy jsou skupinou enzymů zapojených do kontroly mitogeneze, regulace buněčného cyklu a buněčné transformace, je genistein jeden z nejvíce sledovaných isoflavonů (Knight et Eden, 1995).

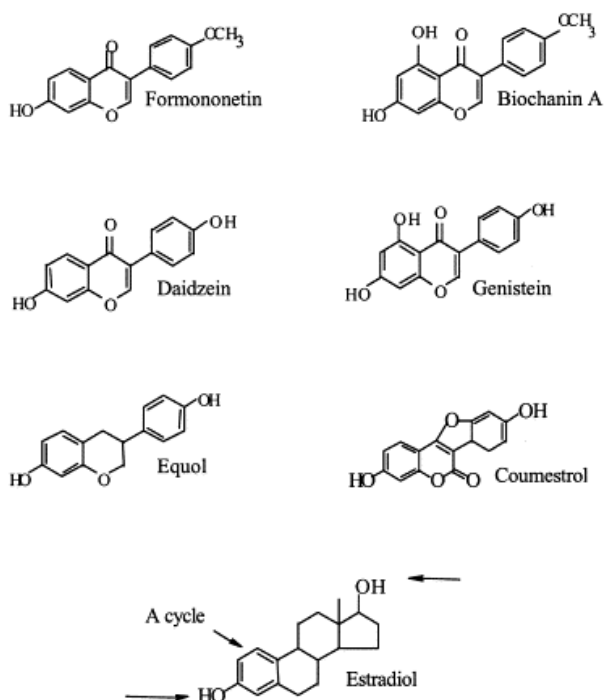
Daidzein (4',7-dihydroxyisoflavon)

Daidzen se v mladých listech neobjevuje. Narozdíl od ostatních isoflavonů, které se vyskytují v listech už v době, kdy se list objeví (Kalač et Míka, 1997). Vyskytuje se v semenech sóji, v malém množství v pici jetele plazivého a vojtěšky a ve stopovém množství v jeteli lučným a svou strukturou je velmi podobný genisteinu (Kalač et Míka, 1997).

Podobně, jako v případě genisteinu, je hlavním potravinovým zdrojem daidzeinu jeho aktivní glukosid a metabolický prekurzor daidzin. Ten pak může být vstřebáván do krve nebo dalšími metabolickými procesy přeměněn na equol a 0 – desmethylangolensin (Barlow et al., 2007). Účinnost daidzeinu je vysoce závislá na stupni metabolického rozkladu. Jeho metabolity equol a 0 – desmethylangolensin (0 – DMA) vykazují větší afinitu vůči estrogenovým receptorům než samotný daidzein, a equol působí silnějším estrogením účinkem než 0 – DMA (Knight et Eden, 1995; Barlow et al., 2007).

Metabolické přeměny genisteinu a daidzeinu jsou blíže popsány v kapitole 4.3 Metabolismus přírodních xenoestrogenů.

Chemické struktury vybraných fytoestrogenů jsou znázorněny na obr. č. 1.



Obr. č. 1: Struktura vybraných FE a endogenního estradiolu.

3.2.2 Mykotoxiny

Některé mykotoxiny mohou působit jako přírodní xenoestrogeny. Vznikají jako toxické produkty metabolismu vláknitých hub, vyskytujících se nejen na objemných krmivech ale i na obilovinách, olejninách apod. (Kanora et Maes, 2009). Tvoří se jak v období růstu plodin, tak v průběhu sklizně nebo během skladování (D'Mello, 1997). Jedná se o organické látky mimořádně stabilní, jejichž toxicita nebývá běžnou úpravou krmiv a stravy snížena, a proto jsou nebezpečné nejen pro zvířata, ale i pro člověka (Kalač et Míka, 1997).

Tvorba mykotoxinů v krmivu závisí na mnoha faktorech, jako jsou vlhkost substrátu, relativní vlhkost, dostupnost kyslíku, a v závislosti na druhu houby produkující toxiny i teplota. Důležitými aspekty stupně intoxikace je množství dávky a doba jejího působení. V důsledku zkrmování mikrobiálně závadných krmiv, dochází u zvířat k mnoha zdravotním komplikacím, které se mohou projevit na celkovém zdravotním stavu jedince, kdy dochází k potlačení imunity, průjmům, krvácení nebo snížení výkonnosti a produkce. Nejvíce, se však negativní vliv mykotoxinů odráží v oblasti reprodukce u samců i samic (Kanora et Maes, 2009).

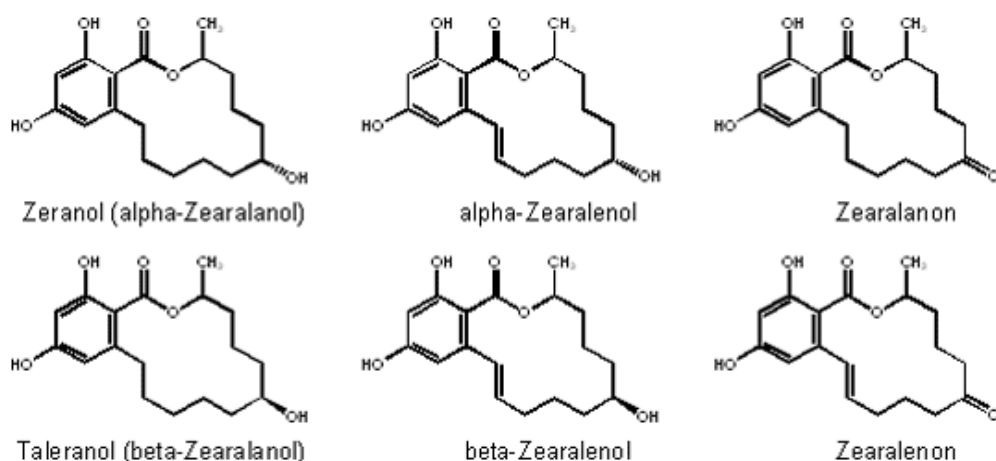
Důležitými producenty těchto látek jsou především fytopatogenní houby rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Claviceps* a *Fusarium* produkující celou řadu mykotoxinů s estrogenními účinky.

Zearalenon

Zearalenon je vzhledem ke své vysoké účinnosti a rozšířenému výskytu důležitým zástupcem skupiny mykotoxinů. Společně s jeho deriváty α a β zearalenolem jsou řazeny do rodiny fenolových sloučenin produkovaných houbami rodu *Fusarium spp.*, a to především *F. graminearum* a *F. culmorum* (Desjardins, 2006; D'Mello, 1997). Pravidelně se vyskytuje zejména v kukuřici, čiroku, pšenici a žitu (Zinedine et al., 2007) a bývá nejčastějším mykotoxinem v krmivech živočišného původu, zvláště masové a rybí moučky (Kalač et Míka, 1997).

K nejvyšší produkci zearalenonu dochází během skladování, pokud je vysoká teplota a vlhkost a jsou tak vytvořeny vhodné podmínky pro zaplísnění krmiva, zatímco v období růstu plodin je jeho tvorba minimální (Cheek, 1998).

Nejcitlivějším živočišným druhem na zearalenon jsou prasata, zejména prasnice a prasničky, u kterých je negativní vliv na plodnost a reprodukci nejvýraznější (Kanora et Maes, 2009). Oproti tomu drůbež se řadí mezi extrémně odolné druhy (Osweiler, 1986). Tyto rozdíly v citlivosti, pravděpodobně souvisí a odlišnostmi v metabolických přeměnách u jednotlivých druhů hospodářských zvířat (Olsen, 1989).



Obr. č. 2.: Chemická struktura zearalenonu a jeho derivátů.

3.3 Mechanismus působení xenoestrogenů

Přestože účinků xenoestrogenů na organismus je známo mnoho, mechanismus jejich působení není stále zcela objasněn (Benassayag et al., 2002).

Xenoestrogeny mohou obecně působit prostřednictvím interakce s transportními proteiny, membránovými a estrogenovými receptory a jinými mechanismy působení (Cederroth, 2012; Benassayag et al., 2002). Mohou tak ovlivňovat různé biologické funkce, jako je syntéza proteinů, transport vápníku (Ca), oxidaci lipidů, diferenciaci buněk, proliferaci nebo účinky růstových faktorů (Moravcová et Kleinová, 2002).

Je nutno dodat, že přírodní xenoestrogeny nemají pouze estrogení efekt, ale v určitém případě působí i antiestrogenně. (Ososki et Kennelly, 2003).

3.3.1 Vazba na estrogenové receptory

Ze všech známých mechanismů působení xenoestrogenů, je nejvíce prozkoumaná jejich schopnost vazby na estrogenové receptory (Kuiper et al., 1998).

Estrogenové receptory byly poprvé objeveny a izolovány v padesátých letech 20. století z několika druhů savců, včetně člověka. V osmdesátých letech byl naklonován první estrogenový receptor, dnes označovaný jako ER α . O pár let později však byl objeven další typ - ER β . (Herynk and Fuqua, 2004). Tyto subtypy estrogenních receptorů se od sebe liší distribucí ve tkáních a afinitou k ligandu (Gruber et al., 2002). V organismu se vyskytují v několika isoformách (Herynk et Fuqua, 2004; Singleton et Khan, 2003; Barone et al., 2010).

Estrogení receptory patří do skupiny tzv. nukleárních receptorů a skládají se z několika funkčních domén označovaných A – F, které svými funkcemi ovlivňují celkovou afinitu receptoru (Drummond et Fuller, 2010; Herynk et Fuqua, 2004).

Amino - koncová A/B doména souvisí s transaktivací genové exprese. C – doména, též označovaná jako E/F doména, zastává důležitou roli při dimerizaci receptoru a jeho interakci s DNA. Důležitou součástí je též karboxyl - koncová ligand – vázající doména, která je zásadní pro vazbu specifických ligandů na receptor, jadernou translokaci, dimerizaci a modulaci cílové exprese. Estrogenové receptory se liší v obou koncových doménách, a ačkoliv jsou kódovány odlišnými geny, jejich DNA vázající domény jsou vysoce homologní (Benassayag et al., 2002).

Účinky xenoestrogenů přes estrogenové receptory probíhají pomocí dvou základních mechanismů účinku, **genomického a nengenomického** (Björnström et Sjöberg, 2005; Singleton et Khan, 2003, Hall et al., 2001).

Genomický účinek xenoestrogenů je vyvoláván vazbou hormonu na receptor lokalizovaný v jádře, který interaguje se specifickými palindromickými sekvencemi DNA, nazývanými estrogen responsive elements (ERE). Tato interakce je spouštěcím mechanismem pro RNA – dependentní proteosyntézu (Benassayag et al., 2002). Estrogenový receptor tak působí jako transkripční faktor a pozitivně či negativně ovlivňuje genovou expresi cílových genů (Benassayag et al., 2002; Singleton et Khan, 2003).

Další, méně častou cestou působení xenoestrogenů v organismu je tzv. **nengenomická** cesta. V tomto případě se xenoestrogeny vážou na příslušné membránové receptory a dochází k aktivaci transdukčních signálních drah (Benassayag et al., 2002; Björnström and Sjöberg, 2005) a produkci druhých posílů (např. cAMP) (Benassayag et al., 2002). Tímto působením na cílové transkripční faktory může nengenomický účinek nepřímo ovlivnit i genovou expresi. Nengenomické účinky jsou charakteristické svou rychlostí, což je spojováno s aktivací řadou protein - kinázových kaskád (Björnström and Sjöberg, 2005). Xenoestrogeny se mohou tímto mechanismem uplatňovat díky vysoké citlivosti při relativně nízkých koncentracích estrogenů (Singleton et Khan, 2003; Björnström and Sjöberg, 2005). Nengenomická cesta působení je typická převážně pro zearalenon, na rozdíl od fytoestrogenů (Minervini et Dell'Aquila, 2008).

3.3.2 Rozmístění estrogenových receptorů v organismu

Distribuce a množství estrogenových receptorů v jednotlivých tkáních je odlišné v závislosti na konkrétním cílovém orgánu (Gruber et al., 2002) a jeho fyziologickém a patologickém stavu (Benassayag et al., 2002). Oba subtypy byly společně identifikovány v mléčné žláze, děloze, vaječnicích a v cévách (Benassayag et al., 2002).

Výskyt receptorů **ER α** je ve vysoké koncentraci zaznamenán především v mléčné žláze, děloze a varlatech. Dále se nachází i v hypofýze a ledvinách (Singleton et Khan, 2003; Gruber et al, 2002).

Rozmístění **ER β** je obecně širší. Na rozdíl od ER α jsou tyto receptory zastoupeny v podstatě ve všech tělních soustavách. Vyskytují se převážně v kardiovaskulární soustavě,

trávicím traktu, hypotalamu, plicích a ledvinách, prostatě a v granulózních buňkách ovárií (Singelton et Khan, 2003; Gruber et al., 2002).

3.3.3 Afinita přírodních xenoestrogenů k estrogenovým receptorům

Obecně lze říci, že ve srovnání s endogenním estradiolem musí být přírodní xenoestrogeny v organismu ve 100 – 1000x vyšší koncentraci, aby se projevil podobný biologický účinek (Singelton et Khan, 2003; Moravcová et Kleinová, 2002). Vyšší koncentrace (100nM) fytoestrogenů jsou schopné vyvolat reakce stejného rozsahu jako fyziologické hladiny endogenních estrogenů. Estrogenní účinek genisteinu je při koncentraci 100nM dokonce vyšší než estrogenní síla 17β – estradiolu (Benassayag et al., 2002).

Nicméně jejich potenciál pro vyvolání těchto biologických účinků je velmi složitý a závisí na řadě faktorů. Důležitým faktorem je míra schopnosti xenoestrogenů vázat se na estrogenové receptory (Singelton et Khan, 2003). Afinita xenoestrogenů k estrogenovým receptorům společně s konformačními změnami po vazbě ligand – estrogenový receptor, jsou důležitými parametry pro účinnost transkripce a agonistického či antagonistického působení xenoestrogenů (Benassayag et al., 2002).

Fytoestrogeny mají ve srovnání s 17β estradiolem nižší vazebnou schopnost k oběma typům estrogenních receptorů. Při čemž afinita k ER β je až 5x vyšší než k ER α (Vrzáňová et Heresová, 2003).

Důležitou roli pro afinitu fytoestrogenů, konkrétně isoflavonů, hraje pozice a množství OH – skupin ve struktuře jednotlivých látek. Obecně se dá říci, že afinita k estrogenovým receptorům roste společně s rostoucím počtem OH skupin. Genistein obsahující 3 OH – skupiny má vysokou vazebnou afinitu, oproti tomu afinita daidzeinu a biochaninu A, které mají pouze jednu OH – skupinu, je značně snížena (Benassayag et al., 2002).

Při vazbě fytoestrogenů na estrogenové receptory, jsou jednoznačně preferovány ER β , na rozdíl od zearalenonu, který při své aktivaci upřednostňuje vazbu s ER α (Herynk et Fuqua, 2004). Afinita jednotlivých fytoestrogenů k ER β je v následujícím sestupném pořadí: estradiol >> kumestrol > genistein > daidzein > biochanin A > formonentin. Afinita k ER α je

řazena podobně: estradiol >> genistein \approx kumestrol > daidzein > biochanin A > formonentin (Moravcová et Kleinová, 2002; Benassayag et al., 2002).

Oproti fytoestrogenům se však zearalenon vyznačuje svou vysokou afinitou vůči oběma estrogenovým receptorům (Kanora et Maes, 2009). Obecně je tedy považován za xenoestrogen s největšími estrogeními účinky (Mueller et al., 2004) a jeho afinita k ER β je srovnatelná s kumestolem (Benassayag et al., 2002). Důležitým krokem ke zvýšení toxicity zearalenonu, a tím i jeho afinity, je jeho redukce na α – zearalenol. A to z důvodu poklesu estrogení potence derivátů zearalenonu tímto směrem: α – zearalenol > zearalenon > β – zearalenol (Minervini et al., 2001). Problematika přeměny zearalenonu na aktivnější látky je přiblížena v podkapitole 3.4.2 Metabolismus zearalenonu.

3.4 Metabolismus přírodních xenoestrogenů

Přírodní xenoestrogeny se na rozdíl od jiných endokrinních disruptorů v těle neakumulují, ale procházejí poměrně rychlými metabolickými procesy. Ty jim napomáhají vyvolávat v těle specifické účinky dle příslušné látky.

Ze skupiny fytoestrogenů jsou isoflavony, lignany i stilbeny látky, které procházejí katabolismem podobným jak u lidí, tak u zvířat. Zatímco metabolismus např. kumestanů nebyl doposud popsán (Moravcová et Kleinová, 2002).

3.4.1 Metabolismus isoflavonů

Hlavním zdrojem isoflavonů je potrava, kde se nejčastěji vyskytují jako neaktivní cukerné deriváty, β – glykosidy (Murkies et al., 1998). Aby byly v organismu biologicky aktivní a vstřebatelné, je zapotřebí několika konjugačních a dekonjugačních kroků (Murkies et al., 1998; Knight et Eden, 1995). Při metabolických přeměnách, pravděpodobně dochází k hydrolytickému štěpení žaludeční kyselinou, střevními β – glukosidázami nebo β – glukosidázami přítomnými v potravě (Moravcová et Kleinová, 2002; Mazur, 2000). Při tomto štěpení se odstraní cukerné složky a neaktivní glykosidová forma se přemění na biologicky aktivní a vstřebatelné aglykony (Knight et Eden, 1996; Mazur, 2000).

Volné aglykony jsou absorbovány v tenkém střevě. Dále jsou transformovány v játrech, kde dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou, a v menší míře se sulfáty za vzniku glukuronidů a sulfoglukuronidů. Tyto konjugáty jsou poté podobně jako endogenní estrogény vylučovány močí, v menší míře stolicí. Rovněž přecházejí do žluče a dostávají se do krevního řečiště (Moravcová et Kleinová, 2002; Mazur, 2000; Knight et Eden, 1996).

Absorbované metabolity fytoestrogenů se krevním oběhem dostávají zpět do jater, kde procházejí tzv. enterohepatální cirkulací (Murkies et al., 1998; Lampe, 2003).

Tyto konjugáty tedy mohou být vyloučeny močí z těla ven, nebo se žlučí dostávají zpět do střeva, kde po opětovné hydrolyzaci střevními bakteriemi, mohou znovu vstoupit do enterohepatálního cyklu, nebo být absorbovány a degradovány (Moravcová et Kleinová, 2002; Lampe, 2003).

Metabolismus genisteinu a daidzeinu

Důležitou roli v metabolismu genisteinu a daidzeinu hrají jejich biologické prekurzory biochanin A a formonentin (Murkies et al., 1998). Ty jsou po vstoupení do organismu rychle demethylovány. Ke zvýšení rozsahu vazby vzniklých aglykonů na estrogenové receptory tak dochází odstraněním 4'-OH skupiny (Tolleson et al., 2002).

Biochanin A je ve střevě přeměněn na **genistein**. Ten je dále metabolizován pomocí střevních bakterií na dihydrogenistein a následně na 6'-hydroxy – ODMA (O – demethylangolensin). Konečným produktem metabolismu genisteinu je estrogeně aktivní p – ethylfenol (Moravcová et Kleinová, 2002; Lampe, 2003; Knight et Eden, 1995).

Formonentin, biologický prekurzor **daidzeinu** v organismu přechází na dihydrodaidzein a ten je poté transformován na equol nebo O- DMA (Tolleson, 2002; Moravcová et Kleinová, 2002; Knight et Eden, 1995). Schopnost produkovat oba tyto metabolity daidzeinu je velmi individuální. Pouze 30 – 40% populace prokazatelně vylučuje equol, jako konečný produkt metabolismu. Děti v neonatálním věku pak equol neprodukují vůbec, a to díky nepřítomnosti odpovídající střevní mikroflóry (Moravcová et Kleinová, 2002).

Protože se isoflavony v rostlinách vyskytují převážně ve formě glykosidů, je nutné připomenout glykosidy genistin a daidzin. Ty se po vstupu do organismu metabolizují na genistein a daidzein a následně procházejí výše zmíněnými metabolickými procesy (Wang et al., 1998).

Obecně má na metabolismus isoflavonů a jejich biologickou dostupnost vliv nejen variabilita mezi jedinci různých druhů, ale i pohlaví, stáří nebo výrazné individuální rozdíly. Dalšími důležitými faktory jsou funkční stav střevního epitelu, složení střevní mikroflóry, aktivita enzymů, střevní onemocnění, používání antibiotik nebo doba působení fytoestrogenů (Moravcová et Kleinová, 2002; Murkies et al., 1998)

3.4.2 Metabolismus zearalenonu

Ke vstřebávání zearalenonu v organismu dochází poměrně snadno, a to především v gastrointestinálním traktu, podobně jako u fytoestrogenů (Minervini et al., 2001). Na základě prováděných studií, byly u zvířat popsány dvě hlavní biotransformační cesty zearalenonu (Minervini et Dell'Aquila, 2008).

V prvním případě dochází k hydroxylaci zearalenonu, katalyzované 3α - a 3β -hydroxysteroidní dehydrogenázou za vzniku α - a β -zearalenolu (Minervini et al., 2001; Minervini et Dell'Aquila, 2008). Druhou metabolickou cestou je konjugace zearalenonu a jeho metabolitů s kyselinou glukoronovou v játrech. To je katalyzováno uridin – difosfát – glukuronyltransferázou. Vzniklé glukuronidy mohou být vyloučeny močí (5%), v menší míře stolicí nebo mohou podstoupit již zmíněný tzv. enterohepatický cyklus (Minervini et al., 2001; Minervini et Dell'Aquila, 2008).

Rozdíly v metabolických drahách zearalenonu u jednotlivých hospodářských zvířat jsou tak příčinou jejich rozdílné citlivosti a rozdílů v projevu následných účinků (Minervini et al., 2001). Převládajícím metabolitem zearalenonu u prasat je jeho estrogeně neaktivnější derivát α - zearalenol, což je také jeden z důvodů, proč jsou k účinkům zearalenonu prasata řazena mezi nejcitlivější hospodářská zvířata (Minervini et al., 2001). Dalším důvodem je nízká glukuronidázová kapacita (Kanora et Maes, 2009) nebo enterohepatický cyklus, který má za následek prodloužené zadržení zearalenonu a jeho derivátů v oběhovém systému, zpomaluje jejich vylučování a zvyšuje negativní efekt zearalenonu na organismus (Minervini et Dell'Aquila, 2008).

U odolnějších zvířat jako jsou krávy, ovce nebo brojeři se naopak vyskytuje podstatně méně aktivní metabolit β – zearalenol (Minervini et al., 2001).

3.5 Účinky přírodních xenoestrogenů

Účinkům přírodních xenoestrogenů je již delší dobu věnována značná pozornost. A to nejen v oblasti živočišné říše, ale i v mnoha oborech humánní medicíny. Přírodní xenoestrogeny jsou v dnešní době předmětem mnoha *in vivo* i *in vitro* studií, jelikož ovlivňují celkovou homeostázu organismu prostřednictvím svých účinků na úrovni buněk, tkání i celých soustav (Burton et Wells, 2002). Vzhledem k působení xenoestrogenů zejména prostřednictvím vazby s estrogenovými receptory, se projevují jejich účinky především v reprodukční soustavě.

Konečný efekt přírodních xenoestrogenů je zapotřebí brát komplexně a to s ohledem na řadu vnějších faktorů, jako je jejich koncentrace, stejně jako koncentrace endogenních estrogenů, typ receptoru v konkrétní tkáni (buňce), a dále také individuální charakteristiky daného organismu, jako je druh, pohlaví, věk, zdravotní stav (Moravcová et Kleinová, 2002), a v případě samic také fázi estrálního cyklu (Minervini et Dell'Aquila, 2008).

V souvislosti s účinky xenoestrogenů je vhodné připomenout jejich schopnost vyvolat v organismu estrogenní, ale i antiestrogenní aktivitu, která je závislá především na poměru koncentrací endogenních a exogenních estrogenů (Moravcová et Kleinová, 2002). Pokud je v těle endogenních estrogenů dostatečné množství, mají xenoestrogeny antiestrogenní účinek (Romero et al., 2008; Burton et Wells, 2002). A to v důsledku soupeření o vazebné místo na estrogenových receptorech ve prospěch exogenních estrogenů a následné blokaci účinků estrogenů fyziologických (Romero et al., 2008; Vrzáňová et Heresová, 2004). V opačném případě, je-li koncentrace endogenních estrogenů nízká, mají přírodní xenoestrogeny slabý estrogenní efekt (Romero et al., 2008; Burton et Wells, 2002). K tomu může docházet např. u žen v menopauze, kdy dochází k fyziologickému poklesu přirozených estrogenů. Fytoestrogeny jsou tak často volenou alternativou hormonální substituční terapie (Vrzáňová et Heresová, 2004; Romero et al., 2008).

Biologická aktivita přírodních xenoestrogenů se může projevovat jak negativně, tak pozitivně. Ačkoliv u zvířat je zaznamenáváno především negativní působení na organismus, v humánní medicíně již byly naopak prokázány významné pozitivní účinky, týkající se fytoestrogenů.

Fytoestrogeny na lidský organismus mohou působit antivirovými, bakteriocidními, antimykotickými a protizánětlivými účinky. Pozorovány byly i antimutagenní (Knight et Eden, 1995), antioxidační (Murkies et al., 1998) nebo antiproliferační vlastnosti, které jsou obecně považované jako antikarcinogenní (Knight et Eden, 1995; Cornwel et al., 2004). To je dokázáno především ve studiích z asijských zemí, kde je ve srovnání se západní civilizací nižší výskyt nádorových onemocnění prsů, vaječníků, dělohy a prostaty, spojovaný s vyšší konzumací isoflavonů z luštěnin a sóji (Moravcová et Kleinová, 2002; Knight et Eden, 1995). Rovněž je potvrzeno snížení výskytu kardiovaskulárních onemocnění, osteoporózy, či zmírnění příznaků menopausy (Moravcová et Kleinová, 2002; Sharma et al., 2005).

3.5.1 Účinky na reprodukční soustavu zvířat

Vzhledem k výskytu fytoestrogenů a zearalenonu především v jetelovinách a luštěninách je jejich účinkům vystavena značná část hospodářských zvířat, a to nejen pasoucí se přežvýkavci, ale i prasata krmena sójovou dietou.

Je mnoho studií dokazujících negativní dopady přírodních xenoestrogenů na reprodukční funkce zvířat. Kromě již zmíněné prvotní studie syndromu neplodnosti ovcí (viz. kapitola 3.2.1 Fytoestrogeny), byly zkoumány negativní účinky fytoestrogenů u krav, prasat, některých laboratorních zvířat (Burton et Wells, 2002; Benassayag et al., 2002) i křepelek (Knight et Eden, 1995). Podobně je tomu i u zearalenonu, jehož negativní účinky byly prokázány u většiny hospodářských a některých laboratorních zvířat.

Biologické účinky fytoestrogenů, stejně jako zearalenonu, prokazatelně ovlivňují jak reprodukční soustavu samic tak i samců. Problematice spojené s účinky na samčí pohlavní ústrojí je však věnována menší pozornost ve srovnání se samicemi. U býků způsobuje vysoký obsah kumestrolu infekční metaplazii v prostatě a v bulbouretrálních žlázách nebo k feminizaci a s tím spojeným výtokem mléčného sekretu z mléčné žlázy. Genistein může negativně ovlivňovat průběh kapacitace a akrozomové reakce spermie, čímž je narušen proces oplození (Márquez et al., 2012). Ke snížení plodnosti související se zhoršenou kvalitou spermií a jejich životaschopností dochází i vlivem zearalenonu, např. u kanců. Taktéž se u nich vyskytují příznaky feminizace, snížení libida a s tím spojená redukce hmotnosti varlat až o 30% (Minervini et Dell'Aquila, 2008).

U většiny samic hospodářských zvířat dochází vlivem isoflavonů a zearalenonu k dočasné či trvalé neplodnosti. Isoflavony pravděpodobně způsobují inhibici luteinizačního hormonu, stimulujícího sekreci progesteronu a v důsledku toho se samicím nepodaří ovulovat a následně zabřeznout (Márquez et al., 2012). Pokud fytoestrogeny působí krátkodobě, jedná se o neplodnost pouze dočasnou. Jestliže je však organismus vystaven působení fytoestrogenů dlouhodobě, dochází pak k neplodnosti trvalé (Márquez et al., 2012). V případě zearalenonu je sterilita zapříčiněna poruchami vaječnicků, kdy dochází k odumření oocyty již v Graafově folikulu, a i přes následné projevy říje nedojde k ovulaci (Minervini et Dell'Aquila, 2008; Minervini et al., 2001).

Fytoestrogeny negativně ovlivňují i průběh březosti, jak bylo ukázáno např. na potkaních samicích, kterým byly v březosti podávány různé dávky isoflavonů (od 10 do 100 mg/kg). V závislosti na dávce, došlo k prokazatelnému snížení počtu živě narozených jedinců a naopak zvýšení počtu resorbovaných a rozložených plodů v děloze. Vliv na matku nebyl zaznamenán (Romero et al., 2008). U klisen jsou opakované aborty popisované v souvislosti s účinky kumestrolu (Márquez et al., 2012).

V otázkách působení zearalenonu na březost prasnic a na samotné embryo, hraje důležitou roli fáze březosti, ve kterém byl zearalenon samici podáván. Prahová úroveň zearalenonu (1mg/kg tělesné hmotnosti) nenarušuje průběh březosti v případě, že byl podáván 7 – 10 den po páření. Za kritické se považují první dva dny, kdy účinky zearalenonu mohou způsobit degenerativní změny embryí, které jsou dobře patrné již třináctý den po páření (Minervini et Dell'Aquila, 2008). Při podání zearalenonu během březosti v koncentraci 200mg/kg tělesné hmotnosti, se pak zvyšuje embryonální a fetální mortalita, může docházet ke snížení hmotnosti plodů (Kanora et Maes, 2009) nebo může dojít k placentárnímu přenosu zearalenonu do plodu (Minervini et Dell'Aquila, 2008). Častým dopadem zearalenonu na prasnice je také zvýšený výskyt falešných březostí (Minervini et Dell'Aquila, 2008; Minervini et al., 2001).

Fytoestrogeny i zearalenon mohou mít dopad i na narozená mláďata, kterým se tyto látky dostávají do těla transplacentárně, kdy následně dochází ke vzniku abnormalit na genitáliích, nebo prostřednictvím kontaminovaného mateřského mléka (Minervini et Dell'Aquila, 2008). V souvislostech s dopady účinků isoflavonů na mláďata, byly provedeny mnohé experimenty na laboratorních krysách. U mláďat samčího pohlaví docházelo ke

zhoršení kvality semene či ke zvýšenému výskytu vrozených malformací jako je např. kryptorchismus nebo rakovina varlat (Benassayag et al., 2002). U samicích mláďat měly isoflavony negativní vliv nejen na vývoj reprodukčního ústrojí, ale i na vývoj neuroendokrinní kontroly ovulace a puberty (Benassayag et al., 2002).

Biologický účinek jak fytoestrogenů, tak zearalenonu se prokazatelně projevuje i na mléčných žlázách samic. Konkrétně např. formonentin má negativní vliv na změnu délky struků, což bylo pozorováno u ovcí po spásání jetele lučního (Burton et Wells, 2002). Zearalenon ovlivňuje nejen vývoj a funkčnost mléčné žlázy u prasnic (Minervini et Dell'Aquila, 2008; Minervini et al., 2001), ale může také výrazně snižovat produkci mléka u krav (Minervini et Dell'Aquila, 2008). V dřívějších letech proběhla studie (Zdunczyk et al., 2003) poukazující také na možné spojení zvýšeného příjmu fytoestrogenů s výskytem onemocnění vemene dojnic, převážně mastitid. Nutno však podotknout, že mastitidy jsou obecný chovatelský problém, a spojování tohoto problému s obsahem fytoestrogenů je proto velmi těžko interpretovatelné (Opletal et Šimerda, 2010).

K patologickým změnám vlivem xenoestrogenů může docházet i v oblasti pochvy a vulvy, kde vlivem např. formonentinu a zearalenonu, dochází k výraznému prokrvení a otokům. V případě zearalenonu může u prasnic docházet k vaginálním či dokonce rektálním výhřezům (Minervini et Dell'Aquila, 2008; Minervini et al., 2001). Negativně se xenoestrogeny projevují i na stavbě a funkci dělohy. Vysoký obsah isoflavonů způsobuje hyperplazii děložní sliznice, což bylo prokázáno u ovcí a morčat (Benassayag et al., 2002). Některé *in vivo* studie potvrzují aktivitu genisteinu, daidzeinu a equolu v oblasti regulace kontraktilní aktivity dělohy u krys (Benassayag et al., 2002). U bahnic se vlivem isoflavonů mohou vyskytovat cysty v endometriu a ekchymózy v děložní sliznici. U ovcí spásajících větší množství jetele lučního byly sledovány i subakutní endometritidy (Burton et Wells, 2002). U prasniček se vlivem zearalenonu vyskytují edémy a deformity dělohy (Minervini et Dell'Aquila, 2008, Minervini et al., 2001).

Fytoestrogeny mohou způsobovat i patologické změny na vaječnicích. Obecně se dá říci, že svými účinky aktivitu vaječníků snižují (Opletal et Šimerda, 2010). U některých ovcí, stejně jako u krav (Márquez et al., 2012), se vlivem především isoflavonů vyskytují paraovariální cysty (Burton et Wells, 2002). U prasniček zearalenon způsobuje zvýšený výskyt atrofie vaječníků (Minervini et al., 2001; Kanora et Maes, 2009). Vzhledem k účinkům xenoestrogenů na vaječníky, je ovlivňována i samotná tvorba folikulů. U samic

hospodářských zvířat, především u ovcí, dochází pod vlivem isoflavonů k nadměrné tvorbě středních a malých folikulů s nedostatečně vyvinutou dutinou, a k atrezii folikulů, u myší navíc doprovázenou hypertrofií granulózních buněk (Burton et Wells, 2002). Na myších ováriích byl také pozorován snížený výskyt Graafových folikulů a absence žlutých tělísek (Burton et Wells, 2002).

Jelikož fytoestrogeny i zearalenon zasahují do hladiny endogenních estrogenů v těle samic, mohou ovlivňovat i jejich říjové cykly. Po zkrmování nadměrného množství fytoestrogenů dochází u přežvýkavců k nepravidelným intervalům mezi říjemi, k výskytu nepravé říje či anestru, k nymfomanii nebo sníženému počtu ovulací (Márquez et al., 2012; Opletal et Šimerda, 2010). Vlivem zearalenonu může u prasnic docházet k neustále se opakujícím říjím (Minervini et Dell'Aquila, 2008, Minervini et al., 2001).

3.5.2 Vliv na úrovni samičích gamet

Existuje řada prací v *in vitro* podmínkách zabývajících se vlivem fytoestrogenů a zearalenonu na jednotlivé fáze meiotického zrání savčích oocytů. Pro správné pochopení této problematiky je nezbytné přiblížit samotný vznik a vývoj oocytů.

Vývoj samičích zárodečných buněk, tzv. **oogeneze**, začíná u savců již v raném embryonálním vývoji a přetrvává až do doby ukončení pohlavní aktivity samice (Wassarman et Albertini, 1994). Převážná většina samičích pohlavních buněk se diferencuje již v prenatalním období. V nedávné době však byla provedena pozorování, která připouští diferenciaci samičích zárodečných buněk i postnatálně. A to nejen z přetrvávajících primordiálních kmenových buněk ve vaječnicích, ale také z buněk kostní dřevě (Johnson et al., 2005).

Oocyty se vytvářejí z malého počtu primordiálních zárodečných buněk, tzv. primordial germ cells (PGC). Začátek oogeneze je typický seskupením PGCs, které proliferují a migrují až do místa budoucího vaječníku (genitální lišty). Tam ztrácejí schopnost motility a mění se na tzv. oogonie. Následně dochází k intenzivnímu mitotickému dělení, oddělení oogonií z genitální lišty a vstupu do profáze prvního meiotického dělení, během kterého vznikají primární oocyty. V tomto období současně s oogenezí probíhá proces folikulogeneze – vývoj folikulů, který zahrnuje obalení oocytů vrstvou pregranulózních buněk, intaktní bazální

membránou (*lamina basilaris*) a vznik tzv. primordiálních folikulů (Wassarman et Albertini, 1994).

Profáze prvního meiotického dělení je členěna do 5 fází – leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze. Během těchto fází postupně dochází ke kondenzaci a oddělení homologních chromozomů, překřížení nesesterských chromatid (crossing – over) a k rekombinaci chromozomů. Ve stádiu diakineze se rekombinované chromozomy oddalují a dochází k zastavení meiozy v prvním meiotickém bloku. V tomto stádiu oocyty přetrvávají až do období pohlavní dospělosti, kdy před ovulací dostávají impuls ke znovuzahájení procesu meiozy (Wassarman et Albertini, 1994).

Další průběh oogeneze probíhá ve dvou na sebe navazujících fázích - fáze růstu a zrání.

Do **fáze růstu** se oocyty dostávají v pubertálním období samice, kdy u oocytů dochází k intenzivní transkripci, translaci a vytvoření nových organel. U některých primordiálních folikulů opět dochází k intenzivní proliferaci, během které jsou ploché granulózní buňky přeměňovány na kubické a vznikají tak primární folikuly.

Oocyty dále podstupují intenzivní růst a zvyšuje se i počet granulózních buněk obalených vazivovou a epitelovou vrstvou. V tomto stádiu jsou oocyty označovány jako sekundární. Zároveň se začínají obalovat glykoproteinovou vrstvou, tzv. *zona pellucida*.

Folikul se následně naplní tekutinou a vytvoří se dutina (*antrum*), kde se nachází oocyt již obalený vrstvou kumulárních buněk. Přesunutím oocytu z centrální pozice ke kraji folikulu dojde ke vzniku vejconosného hrbolku (*cumulus oophorus*). V této fázi je folikul označován jako Graafův folikul, který je připraven k ovulaci (Wassarman et Albertini, 1994; Picton et al., 2008)

Fáze zrání u oocytů nastupuje s opětovným zahájením meiozy, která byla zastavena ve stádiu diakineze, čili v poslední fázi profáze I, a pokračuje až do stádia metafáze II. Dokončení vývoje oplození schopného oocytu se však účastní pouze zlomek původních primárních oocytů. Prolomení meiotického bloku jsou schopné pouze oocyty meioticky kompetentní, pocházející z antrálních folikulů a dosahující druhově specifické velikosti (Wassarman et Albertini, 1994). Velikost zralého folikulu u prasnic se pohybuje od 3.0 do 10 mm (Picton et al., 2008), meioticky kompetentní oocyt pak dosahuje velikosti 120 μ m (Petr et al., 1994).

Při zrání oocyty současně dochází ke zrání cytoplazmatickému i jadernému. Během **cytoplazmatického zrání** dochází v oocyty k mnoha biochemickým i morfologickým změnám, které připravují buňku na následné oplození a na časný embryonální vývoj (Wassarman et Albertini, 1994).

Při **jaderném zrání** pak dochází k redukci původního diploidního počtu chromozomů na haploidní. Jádro meioticky kompetentního oocyty je pod mikroskopem dobře viditelné, má jasně ohraničenou jadernou membránu a je označováno jako zárodečný váček – germinal vesicle (GV). K jeho rozpadu dochází na začátku opětovného zahájení meiozy. Tento proces je v angličtině označován jako germinal vesicle breakdown (GVBD) a dochází při něm ke kondenzaci chromatinu a chromozomy se stávají barvitelnými. Následně se začne rozpouštět jaderná membrána a dojde k zániku jádérka.

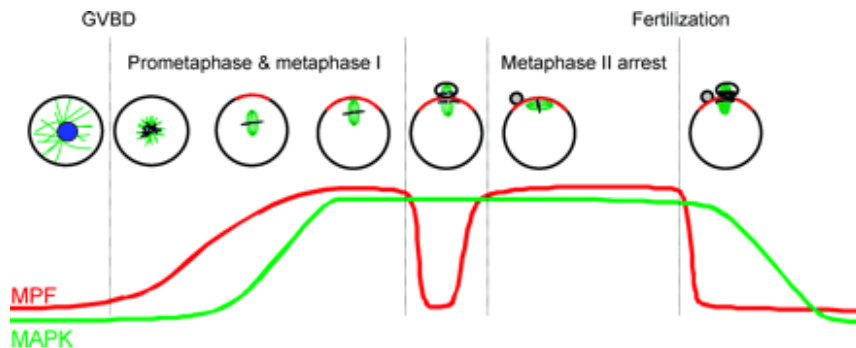
Během metafáze I (MI), se vytváří dělicí vřeténko a chromozomy se seskupují do tzv. metafázní figury. V anafázi I (AI) se homologní chromozomy rozcházejí a v poslední fázi prvního meiotického dělení – v telofázi I (TI) dojde k vytvoření prvního pólového tělíska. Podruhé se meiotické dělení zastavuje v metafázi II (MII), v tzv. druhém meiotickém bloku, který je *in vivo* podmínkách prolomen impulsem v podobě spermie (Alberts et al., 1998; Wassarman et Albertini, 1994).

Velmi důležité role v regulaci meiotického zrání savčích oocytů hrají především cyklin dependentní kinázy (CDK) a mitogeny-aktivované protein kinázy (MAPK).

Ke znovuzahájení meiozy ve fázi MI, je zapotřebí navázání cyklinu B na CDK 1 a vytvoření CDK1/cyklin B komplexu označovaného také jako **M-phase promoting factor** (MPF), který dosahuje maximální aktivity v MI fázi. Pro pokračování meiozy je však nezbytný pokles této aktivity, který umožňuje přechod oocyty z fáze MI do AI. Svého druhého vrcholu dosahuje ve fázi MII a to pod vlivem CSF (cytostatic factor), který ho udržuje aktivní až do doby oplození. Mechanismus oplození pak vyvolává inhibici CSF a tím i pokles aktivity CDK 1. Pokles aktivity CDK 1 je tedy nutný pro dokončení meiozy a vydělení druhého pólového tělíska (Alberts et al., 1998; Wassarman et Albertini, 1994; Brunet et Maro, 2005). **MAP kinázová** činnost je aktivována v době počátku GVBD pomocí fosforylace, podobně jako MPF a je též zapotřebí v období přechodu z MI do MII, kdy její aktivita na rozdíl od MPF neklesá. Dále je MAP kinázová aktivita potřebná např. k tvorbě

mikrotubulů a přenosu signálů pro zahájení meiosis z cytoplasmy do jádra (Chaube, 2001; Hengyu et al., 2002).

Aktivita kináz (MAPK a MPF) během meiotického zrání je znázorněna na Obr. č. 3



Obr. č. 3. Aktivita MPF a MAPK během meiotického zrání myších oocytů (Brunet and Maro, 2005)

V souvislosti s regulací meiosis je nutné zmínit i důležitou roli kumulárních buněk, které společně s oocytem tvoří tzv. kumulo – oocytární komplex (COC – cumulus – oocyte complexes).

Klíčové funkce kumulárních buněk jsou zajištěny tzv. mezerovými spoji (gap junctions), které umožňují dodávat oocytu živiny a specifické signály ovlivňující jeho růst a zrání (Tanghe et al., 2002). Touto cestou dochází ke komunikaci i mezi oocytem a granulózními buňkami. Důležitou funkcí kumulárních buněk je vedle podpory cytoplazmatického zrání i udržení oocytu ve stádiu GV a prostřednictvím vylučování látek aktivujících meiozu se také podílí na jejím znovuzahájení. V případě znovuzahájení meiosis kumulární buňky produkují kyselinu hyaluronovou a dojde tak k tzv. **expanzi kumulu**. Během tohoto procesu se zvětšuje prostor mezi buňkami, dochází k tvorbě mukózní látky a k obalení glykosaminoglykanovou matrix. Takto expandované buňky zůstávají v komplexu s oocytem až do oplození (Tanghe et al., 2002). Kumulární buňky tak mají důležitou funkci i krátce po ovulaci, kdy se podílí na komplexním mechanismu kontroly přístupu spermií do oocytu (Tanghe et al., 2002). Účinky některých látek negativně ovlivňujících expanzi kumulárních buněk, tak mohou narušit celý proces oplození.

Vliv fytoestrogenů a zearalenonu na meiotické zrání

In vitro zrání prasečích oocytů do fáze TI a MII velmi negativně ovlivňují deriváty zearalenonu, α - a β -zearalenol, v závislosti na dávce. Kultivace oocytů po dobu 48h v přítomnosti α -zearalenolu vedla k výraznému poklesu oocytů, které úspěšně dokončily jaderné zrání při podstatně nižší koncentraci než v případě β -zearalenol (Alm et al., 2002). Neschopnost oocytů dozrát do stádia MII je způsobeno chromozomálními abnormalitami jádra, kdy pod vlivem zearalenonu dochází ke změnám při tvorbě dělicího vřeténka během MI fáze (Malekinejad et al., 2007).

Důležitým fytoestrogenem, nejčastěji používaným pro *in vitro* studie, který významně ovlivňuje zrání savčích oocytů a časnou embryogenezi, je genistein (Makarevich et al., 1997). V závislosti na dávce, je genistein schopen blokovat rozpad zárodečného váčku (GVBD) oocytů prasete (Jung et al., 1993; Vodková et al., 2008) i myši (Makarevich et al., 1997). U genistinu, glykosidické formy genisteinu, byl zaznamenán podobný efekt, ale s nižší účinností (Vodková et al., 2008). Tatemoto a Terada (1996) nezjistili statisticky prokazatelný vliv na úrovni GVBD u oocytů skotu, které byly kultivované s genisteinem. Přesto se však účinky projeví. V závislosti na dávce docházelo ke zvýšenému výskytu oocytů, u kterých bylo zastaveno meiotické zrání ve stádiu pozdní diakineze či premetafáze I. Genistein nemusí působit striktně inhibičně. Tým Makarevich et al. (1997) zaznamenal dokonce stimulační efekt na zrání prasečích oocytů, a to při nízkých dávkách genisteinu.

Účinky daidzeinu na samičí gamety jsou ve srovnání s genisteinem méně prozkoumané. Existují však práce (např. Galeati et al, 2010) zabývající se vlivem nízkých koncentrací na jaderné zrání prasečích oocytů a na schopnost jejich následného oplození, kdy negativní vliv genisteinu na tyto procesy nebyl potvrzen.

Fytoestrogeny i zearalenon působí v *in vitro* podmínkách rovněž na úrovni kumulárních buněk oocytu. V posledních letech byly prováděny studie potvrzující inhibiční účinky daidzeinu na produkci steroidních látek (progesteronu a estradiolu) kumulárními buňkami oocytů prasete (Galeati et al., 2010; Tiemann, 2007). Tyto inhibiční účinky byly prokázány i v případě zearalenonu (Sambuu et al., 2011). Jiné studie zaznamenaly kompletní blokaci stimulačního efektu folikulo - stimulačního hormonu i EGF během expanze kumulů myších oocytů, a to pod vlivem vysokých koncentrací genisteinu (Tirone et al., 1997).

Inhibiční účinky fytoestrogenů a zearalenonu přímo na expanzi kumulárních buněk tak prozatím nejsou zcela objasněny. Předpokládá se však, že existují jisté souvislosti mezi mírou expanze a blokadí jaderného zrání. Při použití velmi nízkých koncentrací námi studovaných látek, by se již účinky neměly projevit na jaderném zrání, ale zároveň by mělo docházet k výrazné blokaci expanze kumulo – oocytárního komplexu.

4 Metodika

Získávání vaječnicků

Vaječníky byly získávány z prasniček poražených na jatkách, odkud byly ve fyziologickém roztoku a při konstantní teplotě 39°C transportovány do laboratoře KVD (katedry veterinárních disciplín).

Izolace oocytů

Z ovariálních folikulů o velikosti 2 – 5mm byla aspirací pomocí injekční stříkačky (20G) získávána folikulární tekutina. Ta byla posléze přenesena na Petriho misku pod binokulární lupu, kde byly pomocí skleněné kapiláry vybírány oocyty splňující příslušné parametry:

- velikost přibližně 120 μ m
- homogenní neporušená cytoplasma
- kompaktní vrstva kumulárních buněk

Kultivace oocytů

Tyto oocyty byly poté 24h kultivovány v miskách NUNC se 4 jamkami (Nunc, Roskilde, Denmark) v 1 ml kultivačního média M199 (složení níže v Tab. č.1) v termostatu při konstantních podmínkách – teplotě 39°C a směsi 5% CO₂ se vzduchem.

Tab. č. 1.: Složení zásobního média M199

Složka	g/100 ml média M199
HEPES	0,15
laktát sodný	0,06
pyruvát sodný	0,025
Gentamicin	0,0025

Před samotnou kultivací bylo medium obohaceno o:

- 13.4 IU eCG : 6.6 IU cg/ml (P.G. 600 Intervet Boxmeer, Holandsko)
- 20 μ l růstových proteinů fetálního bovinního séra (Biopharm)/ml zásobního media

Experimentální schéma

V experimentu byl sledován vliv zearalenonu (ZEA), genisteinu (GEN) a daidzeinu (DAI) na expanzi kumulo – oocytárního komplexu (COC) v následujících koncentracích:

- ZEA - 2.4; 4.8; 9.4 μ M
- GEN - 3; 6; 10 μ M
- DAI - 40; 60; 80 μ M

Kontaminanty byly rozpuštěny v DMSO (dimethylsulfoxid) a byly vytvořeny pracovní roztoky o příslušných koncentracích kontaminantů. Do experimentálních skupin bylo přidáno vždy stejné množství pracovních roztoků - 4 μ l. Stejně množství čistého DMSO bylo přidáno také do kontrolní skupiny.

Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení

Po 24 hodinové kultivaci byly komplexy oocytů a jejich kumulárních buněk (COC) nasnímány digitální kamerou. Z nasnímaných fotografií byly plochy jednotlivých COC manuálně ohraničeny a změřeny v programu Niss Elements, verze 4.0 (Laboratory Imaging, Praha). Tyto výsledky (v μm^2) byly u každé experimentální, resp. kontrolní skupiny, přepočítány na průměrnou plochu COC. Průměrné plochy COC jsou vypočítávány minimálně ze 100 oocytů v každé hodnocené skupině. Konečné výsledky jsou vyjádřeny v procentech, přičemž experimentální skupiny jsou vztaženy ke kontrolní skupině, která je považována za 100%. Statistické vyhodnocení plochy COC bylo provedeno v programu STATISTICA (verze 10, STATSOFT, CZ), metodou Kruskal-Wallisova ANOVA.

Souběžně s hodnocením expanze kumulo – oocytárního komplexu probíhaly experimenty zabývající se blokadou jaderného zrání též pod vlivem stejných koncentrací genisteinu, daidzeinu a zearalenonu, jako v naší studii.

Do výsledků experimentu byly zahrnuty pouze oocyty, u kterých minimálně 85% oocytů z kontrolní skupiny dosáhlo stádia MI. Fáze jaderného zrání byla určena po fixaci oocytů v roztoku kyseliny octové a ethanolu (1 : 3), obarvením 1% vodným roztokem orceinu a následným vyhodnocením na světelném mikroskopu za použití fázového kontrastu. Kontrola jaderného zrání probíhala paralelně s hodnocením expanze COC. Výsledky jaderného zrání jsou rovněž uvedeny v této práci (kapitola 5. Výsledky), jsou však součástí jiné části experimentu a v této práci byly použity k celkovému posouzení účinků. Jaderné zrání bylo vyhodnoceno pomocí χ^2 – testu.

5 Výsledky

Vliv jednotlivých kontaminantů (zearalenonu, genisteinu a daidzeinu) na expanzi kumulárních buněk prasečích oocytů je vyjádřen jako dosažená plocha (%) expanze kumulo – oocytárního komplexu (COC), ve srovnání s kontrolou, a znázorněn v následujících tabulkách Tab. č. 2 - 4. Rozdíl expanze kumulu u pokusné skupiny a kontrolní skupiny je znázorněn na Obr. č. 4 a 5.

Vliv zearalenonu na plochu kumulo – oocytárního komplexu

Zearalenon působil na expanzi kumulárních buněk ve všech koncentracích. S rostoucí koncentrací docházelo ke snížení expanze COC. Pokusné skupiny se statisticky významně lišily od kontrolních skupin. Již nejnižší koncentrace zearalenonu snižovala průměrnou plochu COC. Efekt koncentrací 2.4 a 4.8 μM byl však téměř totožný. Obě tyto koncentrace snižovali průměrnou plochu COC téměř o 30%. Nejvýraznější efekt byl zaznamenán při použití nejvyšší koncentrace (9.4 μM), kdy se plocha COC snížila o více než 40% ve srovnání s kontrolní skupinou.

Tab. č. 2: Vliv zearalenonu na plochu kumulo – oocytárního komplexu po 24 hodinové kultivaci.

Koncentrace zearalenonu (μM)	Průměrná plocha COC (%)
0	100 ^A
2.4	71 ^B
4.8	72 ^B
9.4	58 ^C

^{A,B,C} – hodnoty ve sloupcích, označené různými indexy se od sebe statisticky významně liší ($P < 0,05$).

Vliv genisteinu na plochu kumulo – oocytárního komplexu

V případě působení genisteinu byl trend účinků obdobný jako u zearalenonu. Míra expanze se s rostoucí dávkou snižovala. Již nejnižší koncentrace 3 μM statisticky významně inhibovala expanzi kumulo – oocytárního komplexu. Ve srovnání se zearalenonem, byl sice zaznamenán výraznější rozdíl v inhibici expanze mezi nejnižší a střední koncentrací (3 a 6 μM). Tento rozdíl však není statisticky významný. K nejvýraznější blokaci došlo při použití nejvyšší koncentrace (10 μM), kdy plocha COC dosahovala pouze 40% průměrné plochy kontrolní skupiny.

Tab. č. 3: Vliv genisteinu na plochu kumulo – oocytárního komplexu po 24 hodinové kultivaci.

Koncentrace genisteinu (μM)	Průměrná plocha COC (%)
0	100 ^A
3	84 ^B
6	74 ^B
10	41 ^C

^{A,B,C} - hodnoty ve sloupcích, označené různými indexy se od sebe statisticky významně liší ($P < 0,05$).

Vliv daidzeinu na plochu kumulo – oocytárního komplexu

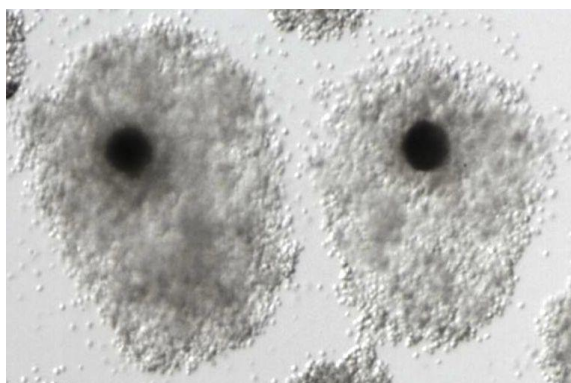
Trend působení daidzeinu je ve srovnání s genisteinem a zearalenonem odlišný. Paradoxně se zde nejnižší koncentrace projevila nejúčinněji a snižovala průměrnou plochu COC téměř o polovinu. Nejvyšší koncentrace naopak inhibovala expanzi nejméně. Podobně jako u genisteinu a zearalenonu, dvě nejnižší použité koncentrace inhibovaly expanzi s obdobným účinkem.

Tab. č. 4: Vliv daidzeinu na plochu kumulo – oocytárního komplexu po 24 hodinové kultivaci.

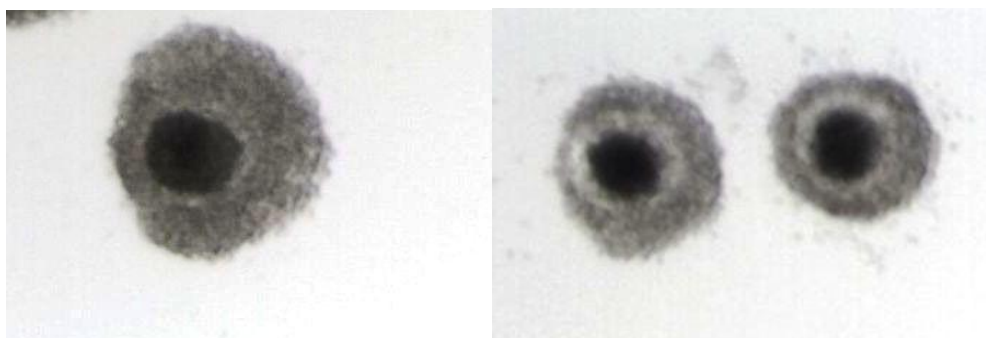
Koncentrace daidzeinu (μM)	Průměrná plocha COC (%)
0	100 ^A
40	52 ^B
60	57 ^B
80	70 ^C

^{A,B,C} - hodnoty ve sloupcích, označené různými indexy se od sebe statisticky významně liší ($P < 0,05$).

Obr. č. 4: Míra expanze kumulárních buněk oocytů z kontrolní skupiny po 24 hodinové kultivaci bez přítomnosti kontaminantů.



Obr. č. 5: Míra expanze kumulárních buněk oocytů v pokusné skupině kultivované 24 hodin s nejnižší koncentrací daidzeinu 40 μM .



Úrovně dosažených fází meiotického zrání oocytů, přebrané z dílčích experimentů hodnotících vliv na jaderné zrání.

Genistein i daidzein působily na meiotické zrání prostřednictvím všech tří testovaných koncentrací. U všech třech látek, při použití nejnižších koncentrací docházelo pouze k částečné inhibici jaderného zrání, kdy nebyl zaznamenán statisticky významný vliv na dozrání oocytů do stádia GV/GVBD.

Inhibiční účinky, na zrání oocytů do stádia MI, se v případě zearalenonu a genisteinu objevily při použití všech testovaných koncentrací a vliv nebyl prokázán v závislosti na dávce. U zearalenonu sice byla zaznamenána tendence snižování počtu oocytů dozrálých do stádia MI se zvyšující se koncentrací. Tento trend však není statisticky průkazný. Genistein, ve srovnání s kontrolou, významně inhiboval dozrání oocytů do stádia MI, ale účinky všech testovaných koncentrací byly téměř stejné. Jinak tomu bylo u daidzeinu, který prokazatelně inhiboval vývoj oocytů do stádia MI pouze v koncentraci nejvyšší.

Statisticky významný vliv na vývoj abnormálních a degenerovaných oocytů měly zearalenon a daidzein, a to pouze při použití jejich nejvyšší koncentrace. V případě genisteinu nebyly zaznamenány žádné abnormální či degenerované oocyty.

Data z těchto experimentů jsou uvedeny v následujících tabulkách - Tab. č. 5 – 7.

Tab. č. 5: Vliv zearalenonu na jaderné zrání prasečích oocytů po 24 hodinové kultivaci

Fáze meiotického zrání (%)	Koncentrace zearalenonu (μM)			
	0	2.4	4.8	9.4
GV + GVBD	6,6 ^A	10,4 ^{AB}	13,2 ^B	12,8 ^B
LD + PM	3,1 ^A	8,5 ^B	15,5 ^C	12,8 ^B
MI	88,8 ^A	74,5 ^B	67,5 ^{BC}	58,5 ^C
AI – TI	0,8 ^A	2,8 ^A	1,9 ^A	1,4 ^A
MII	1,7 ^A	1,9 ^A	1,0 ^A	0,7 ^A
Ab + deg	1,1 ^A	1,9 ^A	1,9 ^A	7,6 ^B

GV – zárodečný váček (*germinal vesicle*), GVBD – rozpad zárodečného váčku (*germinal vesicle breakdown*), LD + PM – pozdní diakineze (*late diakinesis*) + premetafáze, MI – metafáze I, AI + TI – anafáze I + telofáze I, MII – metafáze II, Ab. + deg. – abnormální a degenerované oocyty

^{A,B,C} – hodnoty v řádcích označené různými indexy se od sebe statisticky významně liší ($P < 0,05$)

Tab. č. 6: Vliv genisteinu na jaderné zrání prasečích oocytů po 24 hodinové kultivaci

Fáze meiotického zrání (%)	Koncentrace genisteinu (μM)			
	0	3	6	10
GV + GVBD	4,0 ^A	8,7 ^A	17,2 ^B	13,2 ^B
LD + PM	2,0 ^A	6,5 ^B	6,9 ^B	6,6 ^B
MI	88,8 ^A	73,9 ^B	69,0 ^B	72,4 ^B
AI – TI	2,4 ^A	4,3 ^A	1,7 ^A	1,3 ^A
MII	2,4 ^A	6,5 ^B	5,2 ^B	6,6 ^B
Ab + deg	0,4 ^A	0,0 ^A	0,0 ^A	0,0 ^B

GV – zárodečný váček (*germinal vesicle*), GVBD – rozpad zárodečného váčku (*germinal vesicle breakdown*), LD + PM – pozdní diakineze (*late diakinesis*) + premetafáze, MI – metafáze I, AI + TI – anafáze I + telofáze I, MII – metafáze II, Ab. + deg. – abnormální a degenerované oocyty.

^{A,B,C} – hodnoty v řádcích označené různými indexy se od sebe statisticky významě liší ($P < 0,05$)

Tab. č. 7: Vliv daidzeinu na jaderné zrání prasečích oocytů po 24 hodinové kultivaci

Fáze meiotického zrání (%)	Koncentrace daidzeinu (μM)			
	0	40	60	80
GV + GVBD	3 ^A	4 ^A	7 ^B	14 ^C
LD + PM	1 ^A	10 ^B	4 ^{AB}	4 ^{AB}
MI	90 ^A	85 ^A	85 ^A	72 ^B
AI – TI	1 ^A	0 ^A	2 ^A	2 ^A
MII	4 ^A	0 ^B	2 ^{AB}	3 ^A
Ab + deg	1 ^A	1 ^A	0 ^A	5 ^B

GV – zárodečný váček (*germinal vesicle*), GVBD – rozpad zárodečného váčku (*germinal vesicle breakdown*), LD + PM – pozdní diakineze (*late diakinesis*) + premetafáze, MI – metafáze I, AI + TI – anafáze I + telofáze I, MII – metafáze II, Ab. + deg. – abnormální a degenerované oocyty.

^{A,B,C} – hodnoty v řádcích označené různými indexy se od sebe statisticky významě liší ($P < 0,05$)

6 Diskuze

Cílem této práce bylo zhodnotit míru expanze kumulárních buněk prasečích oocytů a ověřit tak hypotézu, že expanze kumulárních buněk je citlivější indikátor na působení uvedených látek, než hodnocení dosaženého stupně jaderného zrání.

Kumulární buňky jsou při vývoji oocytů důležité z několika důvodů. Včetně podpory meiotického zrání, pomocí produkce vysokých koncentrací steroidních hormonů, zejména progesteronu, který napomáhá rozpadu zárodečného váčku (Yamashita et al., 2003), u nich po znovuzahájení meiosy dochází k expanzi. V podobě kumulo – oocytárního komplexu poté setrvávají s oocytem do prolomení druhého meiotického bloku a podílejí se na kontrole přístupu spermie do oocytu (Tanghe et al., 2002). Je tedy zřejmé, že správný průběh expanze je důležitý pro dokončení vývoje oplození schopného oocytu a pro následný úspěšný proces oplození stejně jako předešlý průběh jaderného zrání.

Zearalenon, genistein i daidzein, v našich experimentech, inhibovaly expanzi kumulárních buněk prostřednictvím všech testovaných koncentrací. K výrazné inhibici tak docházelo při použití již nejnižší koncentrace. V případě zearalenonu a genisteinu docházelo k nejvýraznější blokaci expanze pod vlivem nejvyšší koncentrace. Naopak tomu bylo u daidzeinu, který expanzi nejvíce inhiboval prostřednictvím koncentrace nejnižší. Tendence působit v závislosti na dávce se projevila pouze u genisteinu, rozdíly v účincích jednotlivých koncentrací však nejsou statisticky průkazné. U všech třech látek byl tak zaznamenán trend stagnace vlivu nejnižší a střední koncentrace.

Vzhledem k teoretickým znalostem o afinitě zearalenonu k estrogenovým receptorům, stejně jako o jeho výraznějším efektu na reprodukci, ve srovnání s fytoestrogeny, by se dalo předpokládat, že i v případě vlivu na expanzi kumulárních buněk bude dosahovat nejvýraznějších inhibičních účinků. Zearalenon však působil ve své střední koncentraci (4.8 μM) téměř stejným účinkem jako střední koncentrace genisteinu (6 μM). V porovnání působení nejvyšších koncentrací, genistein (10 μM) inhiboval expanzi kumulárních buněk téměř o 20 % účinněji než zearalenon (9.4 μM) a zároveň byly účinky této koncentrace zearalenonu srovnatelné s vlivem nejnižší a střední použité dávky daidzeinu. Daidzein byl však použit ve značně vyšších koncentracích ve srovnání s ostatními testovanými látkami, a to

vzhledem k jeho nižší afinitě vůči estrogenovým receptorům. Otázkou tak zůstává, do jaké míry jsou účinky daidzeinu v našich experimentech srovnatelné s efektem zearalenonu a genisteinu. Problematice spojené s negativním vlivem přírodních xenoestrogenů na expanzi kumulárních buněk je však věnováno poměrně méně pozornosti než účinkům na samotné jaderné zrání.

Nicméně byly uskutečněny studie prokazující vliv fytoestrogenů a zearalenonu na funkci kumulárních buněk před procesem expanze. Tým Tiemann et al. (2007) ve své studii prokázali inhibiční účinky genisteinu a daidzeinu na produkci steroidních látek (především progesteronu) granulózními buňkami prasečích oocytů. Toto zjištění vedlo některé autory k předpokladu, že by stejného efektu mohlo být dosaženo i v případě produkce steroidních hormonů kumulárními buňkami. To následně bylo potvrzeno například týmem Galeati et al. (2010), kdy byl testován daidzein ve velmi nízkých koncentracích (1 a 10 μM) též na oocytech prasat. Již mnohem dříve, byl inhibiční účinek na produkci steroidních hormonů během meiotického zrání prasečích oocytů prokázán i pod vlivem zearalenonu a jeho derivátů (Olsen, 1989).

Problematikou spojenou právě s vlivem fytoestrogenů na expanzi kumulu se zabývala například studie Vodkové et al. (2008), zkoumající vliv genisteinu. Genistein zde při vyšších koncentracích, než námi testovaných, působil mnohem výraznějšími inhibičními účinky ve srovnání s našimi výsledky. To zároveň potvrzuje trend genisteinu, který měl v našem experimentu tendenci se zvyšující se dávkou snižovat průměrnou plochu kumulo – oocytárního komplexu. Účinky zearalenonu a daidzeinu v oblasti expanze kumulárních buněk nebyly doposud zkoumány žádnými studiemi. Potlačení expanze kumulu oocytů prasat bylo však v dřívějších letech prokázáno i u 17β – estradiolu (Li et al., 2004). V porovnání s těmito poznatky je zřejmé, že námi prokázané účinky testovaných látek nejsou pouze náhodné. A fytoestrogeny i zearalenon se tak na vývoji oocytů podílejí svou estrogení aktivitou.

Pro porovnání účinků zearalenonu, genisteinu a daidzeinu na expanzi kumulárních buněk a na jaderné zrání jsou použita data hodnocení jaderného zrání z dílčího experimentu, probíhajícího zároveň s hodnocením expanze kumulárních buněk. Tyto data jsou uvedeny v kapitole 5. Výsledky.

V hodnocení míry inhibice jaderného zrání byl prokázán vliv všech tří testovaných látek. Inhibiční účinky na dozrání oocytů do stádia MI, se v případě zearalenonu a genisteinu objevili při použití všech testovaných koncentrací a vliv nebyl prokázán v závislosti na dávce. Jinak tomu bylo u daidzeinu, který prokazatelně inhiboval vývoj oocytů do stádia MI pouze v koncentraci nejvyšší.

Inhibiční účinky vysokých dávek genisteinu byly prokázány například ve studiích zaměřených na prasečí oocyty (Vodková et al., 2008) nebo na oocyty myší (Van Cauwenberge et Alexandre, 2000). Van Cauwenberge et Alexandre (2000), souběžně s výzkumem genisteinu, prokázali i inhibiční vliv na jaderné zrání pod vlivem daidzeinu ve srovnatelné koncentraci (50 μM) s námi testovanými dávkami (40 a 60 μM), a to s podobnými výsledky jako v případě námi předložených experimentů. Minervini et al. (2001) zase potvrdili schopnost zearalenonu nejen zvyšovat procento oocytů předčasně zablokovaných ve stádiu MI ale také jeho vliv na tvorbu abnormálních a degenerovaných spermií. To je v souladu s našimi výsledky, kdy se v případě zearalenonu vyskytl nejvyšší počet oocytů s degenerativními změnami.

Naše i ostatní výsledky tedy prokazují vliv jak na úrovni jaderného zrání, tak na úrovni kumulárních buněk. Zda-li je však míra expanze kumulárních buněk citlivějším indikátorem působení fytoestrogenů, než účinky na samotné jaderné zrání, není doposud zcela objasněno. Z porovnání vlivu testovaných látek na expanzi kumulo – oocytárního komplexu a na jaderné zrání, byly zaznamenány následující poznatky.

Zearalenon, genistein i daidzein sice působili prostřednictvím všech testovaných koncentrací jak na expanzi kumulárních buněk, tak na jaderné zrání. Inhibiční účinky na plochu kumulo – oocytárního komplexu se však ve srovnání s jaderným zráním projeví výraznějším efektem, a to především v nejnižších koncentracích, které inhibovaly jaderné zrání pouze částečně.

Z těchto poznatků je patrné, že hodnocení míry inhibice expanze kumulárních buněk je přinejmenším vhodným paralelním měřítkem pro výzkum vlivu fytoestrogenů a zearalenonu na meiotické zrání savčích oocytů. Zároveň se však nabízí otázka, jaké by byly účinky Zearalenonu, genisteinu a daidzeinu na jaderné zrání, při použití ještě nižších koncentrací, než byly námi testované dávky.

7 Závěr

Výsledky našich pokusů potvrdili účinky všech testovaných látek ve všech použitých koncentracích, a to jak na úrovni kumulárních buněk, tak na úrovni jaderného zrání.

Na inhibici expanze kumulo – oocytárního komplexu se podíleli již nejnižší koncentrace všech tří testovaných látek. U všech látek byl však zaznamenán trend stagnace působení nejnižší a střední koncentrace, kdy docházelo k podobným inhibičním účinkům. Tento trend byl zaznamenán i v případě působení na jaderné zrání.

Zearalenon a genistein snižovali průměrnou plochu kumulo – oocytárního komplexu nejvíce prostřednictvím nejvyšších koncentrací. Jinak tomu bylo v případě daidzeinu, který se na expanzi kumulu nejvýrazněji projevil při použití nejnižší koncentrace.

Námi testované dávky vybraných kontaminantů se sice neprojevily bez efektu na jaderné zrání. Inhibiční účinky nejnižších koncentrací všech tří látek se však na expanzi kumulárních buněk, ve srovnání s jaderným zráním, projeví podstatně výrazněji. Vyšší citlivost expanze kumulo – oocytárního komplexu, ve srovnání s jaderným zráním tedy nebyla zcela prokázána. Zdá se však vhodné, použití hodnocení míry expanze jako paralelního indikátoru efektu námi testovaných látek na celkový vývoj prasečích oocytů.

8 Seznam použité literatury

Alberts, B., et al. 1998. Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie buňky. Espero Publishing. Ústí nad Labem 630 s. ISBN 80-902906-0-4.

Alm, H., Greising, T., Brüssow, K.P., Torner, H., Tiemann, U. 2002. The influence of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenol on *in vitro* maturation of pig oocytes and *in vitro* culture of pig zygotes. Toxicol. *In Vitro*. 16. 643 – 648.

Alpert, L. I. 1976. Veno – occlusive disease of the liver associated with oral contraceptives: case report and review of literature. *Hum Pathol*. 7. 709 – 718.

Barlow, J. Johnson, J. A. P., Scofield, L. Fact sheet on the phytoestrogen deidzein [online]. Breast cancer & the environment research centers. 11. Srpna 2007 cit [2012-12-10]. Dostupné z <
http://www.bcerc.org/COTCpubs/BCERC.FactSheet_Phytoestrogen_Daidzein.pdf>

Barret, J. 1996. Phytoestrogens. Friends or fous? *Environ. Health Perspect*. 104. 478 – 482.

Barone, I., Brusco, L., Fuqua, S. A. W. 2010. Estrogen receptor mutations and changes in downstream gene expression and signaling. *Clinical center research*. 16(10). 2702 – 20708.

Benassayag, C., Perrot – Applanat, M., Ferre, F. 2002. *Journal of Chromatography B*. 777. 233 – 248

Bennetts, H. W., Underwood, E. J., Shier, F. L. 1946. A specific breeding problem of sheep on subterranean Dover pastures in western Austria. *Aust J Agric Res*. 22. 131 – 138.

Björnström, L., Sjöberg, M. 2005. Mechanism of estrogen receptor signaling: Convergence of genomic and nongenomic action on target genes. *Molecular endocrinology*. 19(4). 833

Boué, S. M., Carter, C. H., Ehrlich, K. C. et al. 2000. Induction of soybean phytoalexins coumestrol and glyceollin by aspergillus. *J Agric Food Chem*. 48. 2167 – 2172.

- Brunet, S., Maro, B. 2005. Cytoskeleton and cell cycle kontrol during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction*. 130. 801 – 811.
- Burton, J. L., Wells, M. 2002. The effect of phytoestrogens on the fiale genítal tract. *J Clin Pathol*. 55. 401 – 407.
- Cantrill, R., Kawamura, Y. 2008. Phytosterols, phytostanols and their esters. *Chemical and Technical assessment*. 13p.
- Cederroth, Ch. R., Zimmermann, C., Nef, S. 2012. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 355. 192 – 200.
- Chaube, S. K. 2001. Role of meiotic maturation regulátory factors in developmental kompetence of mammalian oocytes. *Health and population*. 24(4). 218 – 231.
- Cheek, P. R. 1998 in: Minervini, F., Dell'Aquila, M. E., Maritato, F., Minoia, P., Visconti, A. 2001. Toxic effects of the mykotoxin zearalenon and its derivates on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 β estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicology in vitro*. 15. 489 – 495.
- Cornwell, T., Cohick, W., Raskin I. 2004. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*. 65. 995 – 1016.
- Czepak, R., Piotrowska, A., Wierzbowska, M. 2003. Biochemical aktivity of biochanin A in the green alga *Chlorella Vulgaris* Beijerinck (*Chlorophyceae*). *Polish journal of environmental studies*. 12. 163 – 169.
- Desjardins, A.E. 2006 in: Kanora, A., Maes, D. 2009. The role of mycotoxins in pig reproduction: a review. *Veterinary medicina*. 54 (12). 565 – 576.
- D'Mello, F. J. P. 1997 in: Minervini, F., Dell'Aquila, M. E., Maritato, F., Minoia, P., Visconti, A. 2001. Toxic effects of the mykotoxin zearalenon and its derivates on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 β estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicology in vitro*. 15. 489 – 495.
- Drummond, A.E., Fuller, P.J. 2010. The importace of ER β signalling in the ovary. *Journal of Endocrinology*. 205. 15 – 23.

- Galeati, G., Vallorani, C., Bucci, D., Bernardiny, CH., Tamanini, C., Parmeggiani, A., Spinaci, M. 2010. Daidzein does affect progesterone secretion by pig cumulus cells but it does not impair oocytes IVM. *Theriogenology*. 74. 451 – 457.
- Gruber, Ch.J., Tschugguel, W., Schneeberger, Ch., Huber, J.C. 2002. Production and actions of estrogens. *The New England Journal of Medicine*. 346(5). 340 – 350.
- Hall, J.M., Couse, J.F., Korach, K.S. 2001. The multifaceted mechanism of estradiol and estrogen receptor signaling. *The journal of biological chemistry*. 276(40). 36869 – 36872.
- Hengyu, F., Chao, T., Dayuan, Ch., Qingyuan, S. 2002. Role of MAP kinase signaling pathway in oocyte meiosis. *Chinese science bulletin*. 47(14). 1157 – 1162.
- Herynk, M. H., Fuqua, S. AW. 2004. Estrogen receptor mutations in human breast. *Endocrine reviews*. 25(6). 869 – 898.
- Hilscherová, K., Bláha, L. Endokrinní disrupce. [on-line]. In: *Schůze Čs. Biologické společnosti. Toxické látky narušující hormonální regulaci (endokrinní disruptory) v ekosystémech: Účinky na organismy a biotesty pro jejich sledování*. Brno. RECETOX - Výzkumné centrum pro chemii životního prostředí a ekotoxikologii přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity. 15. dubna.2009 [cit. 2012-11-24]. Dostupné z <www.recetox.muni.cz/res/file/pdf/.../CBS2009-Hilscherova.pdf>
- Holoubek, I., Čadová, L. 2000. Estrogeny v životním prostředí. *Klinická onkologie. Zvláštní číslo*. 25 – 30.
- Hrubá, D. 2009. Endokrinní disruptory. *Hygiena*. 54. 23 – 26.
- Johnson, J., Bagley, J., Skaznik – Wikel, M., Lee, H. J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Lacomini, J., Scadden, D. T., Tilly, J. L. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by native germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*. 122. 303 – 315.
- Jung, T., Fulka, J. Jr., Lee, C., Moor, R. M. 1993. Effects of the protein phosphorylation inhibitor genistein on maturation of pig oocytes *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*. 98. 529 – 535.

- Kalač, P., Míka, V. 1997. Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech. Ústav zemědělských a potravinářských informací. Praha. 317s.
- Kanora, A., Maes, D. 2009. The role of mycotoxins in pig reproduction. *Veterinari medicina*. 54 (12). 565 – 576.
- Knight, D. C., Eden, J. A. 1995. Phytoestrogens – a short review. *Maturitas*. 22. 167 – 175.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B. O., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P.T., van der Burg, V., Gustafsson, J. A. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytestrogens with estrogen receptor. *Endocrinology*. 139. 4252 – 63.
- Kujalová, H., Sýkora, V., Pitter, P. 2007. Látky s estrogením účinkem ve vodách. *Chemické listy*. 101. 706 – 712.
- Lampe, J.W. 2003. Isoflavone and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. 133(3). 956 – 964.
- Li, Q., Niwa, K., Hunter, M. G. 2004. Effects of 17beta – estradiol on in vitro maturation of pig oocytes in protein - free medium. *J. Reprod Dev*. 50(3). 305 – 313.
- Makarevich, A., Sirotkin, A., Taradajni, T., Chrenek, P. 1997. Effects of genistein and levandustin on reproductive processes in domestic animals *in vitro*. *J. steroid Biochem. Molec. Biol.* 63(4 – 6). 329 – 337.
- Malekinejad, H., Schoevers, E. J., Daemen, I. J. J. M., Zijstra, C., Colenbrander, B., Fink-Gremmels, J., Roelen, B. A. J. 2007. Exposure of oocytes to the Fusarium toxins zearalenone and deoxynivalenol causes aneuploidy and abnormal embryo development in pigs. *Biology of Reproduction*. 77. 840 – 847.
- Márquez, S. R., Hernández, H., Flores, J. A., Muñoz – Gutiérrez, M., Duarte, G., Vielma, J., Fitz – Rodríguez, G., Fernández, I. G., Keller, M., Delgadillo, J. A. 2012. Effects of phytoestrogens on mammalian reproductive physiology. *Tropical and subtropical agroecosystems*. 15. 129 – 145.

- Mazur, W. 2000. Phytoestrogens: occurrence in foods, and metabolism of lignans in man and pigs. Dissertation. University of Helsinki. The Medical faculty. Helsinki. p. 140.
- Minerviny, F., Dell'Aquila, M. E. 2008. Zearalenon and Reproductive Function in Farm Animals. *International Journal of Molecular Sciences*. 9. 2570 – 2584.
- Minervini, F., Dell'Aquila, M. E., Maritato, F., Minoia, P., Visconti, A. 2001. Toxic effects of the mykotoxin zearalenon and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 β – estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicology in Vitro*. 15. 489 – 495.
- Moravcová, J., Kleinová, T. 2002. Fytoestrogeny ve výživě – přinášejí užitek nebo riziko?. *Chemické listy*. 96. 282 – 289.
- Mueller, S.O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M., Korach, K.S. 2004. Phytoestrogens and Their Human Metabolites Show Distinct Agonistic and Antagonistic Properties on Estrogen Receptor α (ER α) and ER β in Human Cells. *Toxicological science*. 80. 14 – 25.
- Murkies, A.L., Wilcox, G., Davis, S.R. 1998. Fytoestrogeny. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 83(2). 297 – 303.
- Olsen, M. 1989 in: Minervini, F., Dell'Aquila, M. E., Maritato, F., Minoia, P., Visconti, A. 2001. Toxic effects of the mykotoxin zearalenon and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17 β estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicology in vitro*. 15. 489 – 495.
- Opletal, L., Šimerda, B. Přírodní látky a jejich biologická aktivita: Fytoestrogeny přírodního původu, výskyt v krmivovém (potravním) řetězci, pozitivní a negativní účinky [on-line]. Výzkumný ústav živočišné výroby, Uhřetěves. Zář 2010 [cit 2012-12-1]. Dostupné z www.vuzv.cz/sites/File/.../Studie%20Opletal%20Fytoestrogeny.pdf
- Ososki, A.L., Kennelly, E.J. 2003. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytotherapy research*. 17. 845 – 869.
- Oswiler, G. D. 1986 in: Minervini, F., Dell'Aquila, M. E., Maritato, F., Minoia, P., Visconti, A. 2001. Toxic effects of the mykotoxin zearalenon and its derivatives on in vitro

maturation of bovine oocytes and 17β estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicology in vitro*. 15. 489 – 495.

Pěkníková, J., 2007. Vliv endokrinních disruptorů na fertilitu saveců. *Urol List*. 5(3). 6 – 10.

Petr J., Rozinek J., Fulka, J. Jr., Jílek, F. 1994. Influence of cytoplasmic microinjection on meiotic competence in growing pig oocytes. *Molecular reproduction and development*. 34(1). 81 – 87.

Picton, H. M., Harris, S. E., Muruvi, W., Chambers, E. L. 2008. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*. 136. 703 – 715.

Pilšáková, L., Riečanský, I., Jagla, F. 2010. The physiological actions of isoflavonephytoestrogens. *Physiol. Res*. 59. 651 – 664.

Romero, V., Cruz, C.D., Pereira, O.C.M. 2008. Reproductive and toxicological effects of isoflavones on female offspring of rats exposed during pregnancy. *Animal reproductive*. 5(3/4). 83 – 89.

Rossiter, R. C., Beck, A. B. 1966. Physiological and ecological studies on the estrogenic isoflavones in subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) I. Effects of temperature. *Aust. J. Agric. Res*. 17. 29 – 37.

Rousková, M., Heyberger, A., Tříška, J., Krtička, M. 2011. Kapalinná extrakce fytosterolů a dalších cenných látek z tálových mýdel. *Chemické listy*. 105. 251 – 255.

Sambuu, R., Takagi, M., Namula, Z., Otoi, T., Shiga, S., Rodrigues Dos Santos, R., Fink – Gremmels, J. 2011. Effects of exposure to zearalenone on porcine oocytes and sperm during maturation and fertilization *in vitro*. *Journal of reproduction and development*. 57(4). 547 – 550.

Sharma, S., tandon, V.R., Mahajan, A. 2005. Phytoestrogens – Natural SERMs. *JK Science*. 7(3). 122 – 123.

- Singelton, D. W., Khan, S. A. 2003. Xenoestrogen exposure and mechanism of endocrine disruption. *Frontiers in Bioscience*. 8. 110 – 118.
- Sucharda, M., Kotecký, V. Rizika pesticidů s endokrinními účinky: Srovnání přístupů a řešení v České republice a v Německu [on-line]. Hnutí DUHA. Leden 2003 [cit 2012-11-24]. Dostupné z < www.wolf.sk/dok/pesticidy/edpesticidy.pdf>
- Šmidrkal, J., Filip, V., Melzoch, K., Hanzlíková, I., Buckiová, D., Křisa, B. 2001. Resveratrol. *Chemické listy*. 95. 602 – 609.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., De Kruif, A. 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. *Molecular reproduction and development*. 61. 414 – 424.
- Tatemoto, H., Terada, T. 1996. Activation of P34(Cdc2) kinase around the meiotic resumption in bovine oocytes cultured *in vitro*. *Theriogenology*. 45. 427 – 437.
- Tiemann, U., Shneider, F., Vanselow, J., Tomek, W. 2007. In vitro exposure of porcine granulosa cells to the phytoestrogens genistein and daidzein: Effects on the biosynthesis of reproductive steroid hormones. *Reproductive Toxicology*. 24. 317 – 325.
- Tirone, E., D'Alessandris, C., Hascall, V. C., Siracusa, G., Salustri, A. 1997. Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle – stimulating hormone (of epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor β_1). *J. Biol. Chemistry*. 272(8). 4787 – 4794.
- Tolleson, W. H., Doerge, D. R., Churchwel, M. I., Marques, M. M., Roberts, D. W. 2002. Metabolism of biochanin A and formononetin by human liver microsomes in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50. 4783 – 4790.
- Van Cauwenberge, A., Alexandre, H. 2000. Effect of genistein alone and in combination with okatic acid on the cell cycle resumption of mouse oocytes. *Int. J. Dev. Biol.* 44. 409 – 420.
- Vítková, M., Macková, Z., Fukal, L., Lapčík, O. 2004. Enzymová imunoanalýza pro stanovení isoflavonoidů. *Chemické listy*. 98. 1135 – 1139.

- Vodková, Z., Rajmon, R., Petr, J., Klabanová, P., Jílek, F. 2008. Effects of genistein and genistin on in vitro maturation of pig oocytes. *Czech J. Anim. Sci.* 53. 1 – 8.
- Vrzáňová, M., Heresová, J. 2004. Fytoestrogeny. *Interní medicína pro praktické lékaře.* 19 – 21.
- Wang, C., Ma, Q., Pagadala, S., Sherrard, M.S., Krishnan, P.G. 1998. Changes of isoflavones during processing of soy protein isolates. *JAOCS.* 75(3). 337 – 345
- Wassarman, P. M., Albertini, D. F. 1994. The mammalian ovum, In: Knobil E., Neil J. et al. (ed): *The physiology of reproduction.* 2. Vydání. Raven Press. New York. 79-114.
- Yamashita, Y., Shimada, M., Okazaki, T., Maeda, T., Terada, T. Production of progesterone from de novo-synthesized cholesterol in cumulus cells and its physiological role during meiotic resumption of porcine oocytes. *Biol Reprod.* 2003. 68. 1193– 1198.
- Zdunczyk, S., Zerbe, H., Hoedemaker, M. 2003. Importance of estrogens and estrogen-aktive compounds for udder health in cattle. A review. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift.* 110(11). 461 – 465.

