

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Detekce estrogenních receptorů ve spermatických buňkách prasete během jejich vývoje

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Veronika Sommerová

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

Vedoucí práce: RNDr. Pavla Postlerová, Ph.D.

Konzultant: MVDr. Romana Krejčířová

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Detekce estrogenních receptorů ve spermatických buňkách prasete během jejich vývoje " 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 10.4.2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Pavle Postlerové, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení a vynaložený čas při zpracování této diplomové práce. Ráda bych také poděkovala MVDr. Romaně Krejčířové za konzultace při řešení praktické části diplomové práce.

Detekce estrogenních receptorů ve spermatických buňkách prasete během jejich vývoje

Souhrn

Vliv estrogenních látek na samčí reprodukční tkáň a vývoj gamet prostřednictvím specifických receptorů je zásadní pro úspěšnou reprodukci. Cílem této diplomové práce je pomocí specifických protilátek lokalizovat formy estrogenních receptorů ve spermatických buňkách během spermatogeneze a ve spermích během post-testikulární maturace v epididymu. Obsahem této práce je rešerše zabývající se popisem pohlavních orgánů prasete, fyziologickou podstatou hormonálního působení a konkrétním popisem estrogenních receptorů, včetně jejich funkce a výskytu v samčím reprodukčním traktu a spermích různých druhů savců. Experimentální část se zabývá konkrétními metodickými postupy detekce estrogenních receptorů pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie.

Samčí pohlavní trakt se dělí na primární a sekundární orgány. Mezi primární orgány patří varlata, která jsou uložena v šourku spolu s nadvarlaty. Ve varleti dochází k produkci spermíí pod vlivem hormonů. Spermie se přesouvají do nadvarlete, kde finálně dozrávají. Funkci pohlavních orgánů zajišťuje neurohumorální řízení prostřednictvím hormonů, které se vytvářejí ve specifických orgánech. Hormony, které ovlivňují pohlavní orgány, jsou steroidní látky hlavně testosteron a estrogen, který vzniká přeměnou z testosteronu. K působení estrogenu přes estrogenní receptory (ERs) na cílové buňky může docházet jak genomickou, tak negenomickou cestou. Mezi ERs působící genomicky patří klasické receptory ER α a ER β , které se nachází v jádře či cytosolu a fungují jako transkripční faktory. Negenomickým mechanismem ovlivňuje buňky transmembránový receptor GPER zanořený v plazmatické membráně těchto buněk. GPER je zřejmě mediátorem rychlých negenomických odpovědí estrogenu. ERs byly objeveny u mnohých druhů savců včetně člověka. U prasat byly v současné době objeveny receptory ER α i ER β ve tkáních varlat, nadvarlat a ve spermích. GPER nebyl v reprodukčních tkáních prasat zatím detekován. Jeho přítomnost je u prasat prokázána jen v ejakulovaných spermích. Současně chybí i informace o jeho přesném působení na organismus prasete.

Výsledky diplomové práce popisují jednotlivé imunolokalizace ERs ve tkáních varlat, nadvarlat a v epididymálních spermích. Součástí imunolokalizace je detekce GPER ve tkáních, jež do té doby nebyla popsána. Ve varleti byly pomocí specifických protilátek lokalizovány

ER α ve spermatických buňkách uvnitř lumen semenotvorného kanálku a ve tkáni. ER β byl lokalizován ve spermatických buňkách a v bazální membráně semenotvorného kanálku. GPER byl detekován v Leydigových buňkách a ve spermatických buňkách. V nadvarleti je zastoupení ERs různé. ER α byl detekován v bazální buňkách kanálku, sekrečním epitelu a také ve tkáni nadvarlete. Pozitivní reakce protilátky byla viditelná také na spermiích v lumen epididymálního kanálku. Výsledky detekce ER β byly negativní v hlavě nadvarlete, zatímco v těle nadvarlete byl v sekrečním epitelu a v ocasu nadvarlete nalezen v bazální membráně. Imunolokalizace GPER byl jako první detekován v celém nadvarleti ve spermiích a v sekrečním epitelu. Podrobná detekce ERs v epididymálních spermiích prokázala ER α ve střední části bičíku. ER β detekován nebyl, zatímco GPER byl nalezen v bičíku a také v akrozomu.

Z výsledků je patrné, že jednotlivé zastoupení estrogenních receptorů má zřejmě zásadní vliv na vývoj a maturaci spermií, které jsou zajištěny správným fungováním orgánů varlat a nadvarlat kance.

Klíčová slova: estrogenní receptor, spermatogeneze, kančí spermie, testes, epididymis, imunohistochemie

Detection of estrogen receptors in boar spermatic cells during their development

Summary

Effect of estrogenic substances on the male reproductive tissue and gamete development via specific receptors is an essential for the reproductive success. The aim of this Master's thesis is to localize forms of estrogen receptors in spermatic cells during spermatogenesis and in spermatozoa during their post-testicular maturation in the epididymis by specific antibodies. Content of this work is a bibliographic search that deals with explanation of the genital tract of pigs, physiological base of hormonal function, and the description of estrogen receptors, including their function and location in the male reproductive tract and sperm in different species of mammals. The experimental part describes the methodical procedures for detection of estrogen receptors by indirect immunofluorescent microscopy.

The male reproductive tract is divided into the primary and secondary organs. Primary organs are testes, which are placed in the scrotum together with the epididymis. The production of sperm controlled by hormones takes place in the seminiferous channels of testes. Then, sperm are transferred to the epididymis where they mature. Function of the reproductive tract is controlled by neurohumoral directed hormones that are produced by specific organs. Hormones that influence the reproductive organs are steroid substances, mainly testosterone and estrogen that originates from the change of testosterone conformation. The effect of estrogen through estrogen receptors (ERs) on target cells can be accomplished in two ways, genomic and nongenomic. In ERs of the genomic way we enclose classic receptors like ER α and ER β . Those receptors are located in the nucleus or the cytosol, and works as a transcription factor. In nongenomic ways the cells are affected by the transmembrane receptor GPER immersed in the plazmatic membrane of those cells. GPER is supposed to be a mediator of quick nongenomic answers of estrogen. ERs were discovered in many species of mammals including humans. In pigs the ER α and ER β were recently detected in testicular and epidydimal tissue, as well as in sperm. GPER has not been found in the reproductive tract of pigs yet. Its presence has been found only in ejaculated sperm. Currently the information about its exact effect on the organism has yet to be discovered.

Results of this Master's thesis show individual immunolocation of ERs in testicular and epidydimal tissue, as well as in epididymal sperm. Part of immunolocation is detection of

GPER in tissues that has not been described yet. The ER α was localized in the testes, in spermatogenic cells inside the lumen of seminiferous tubules, and in tissues by specific antibodies. ER β was detected in spermatogenic cells and in the basal membrane of seminiferous tubules. GPER was found in Leydig cells as well as spermatogenic cells. The amount of ERs in the epididymis differs. ER α was detected in basal cells of tubule, secretory cells and also in the tissue of the epididymis tail. A positive answer of antibodies was visible in sperm within the lumen in the epididymal tube. Results of ER β detection were negative in the head of the epididymis, while in the body it was found in the secretory epithelium, as well as in the tail was in the basal membrane. GPER was immunolocalized in the whole epididymis, sperm, and also in the secretory epithelium. Similar detection of ERs in the epididymal sperm proved ER α in the midpiece of the flagellum. ER β was not detected, whereas GPER was found in the sperm acrosome and tail.

From the results it is apparent that individual representation of estrogen receptors affects the maturation and development of sperm that is obtained by correct functioning of testes and epididymis within the boar.

Keywords: estrogen receptor, spermatogenesis, boar sperm, testes, epididymis, immunohistochemistry

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce.....	1
3 Literární rešerše.....	2
3.1 Pohlavní soustava samců	2
3.1.1 Varlata (testes)	2
3.1.1.1 Vývoj spermií.....	2
3.1.1.2 Stavba spermie	6
3.1.2 Nadvarle (<i>epididymis</i>).....	9
3.2 Hormonální řízení pohlavní soustavy samců.....	9
3.2.1 Hypotalamo-hypofyzární hormony.....	10
3.2.2 Působení gonadotropinů na samčí pohlavní trakt	10
3.2.3 Samčí steroidní hormony	11
3.2.3.1 Hlavní samčí steroidní hormony	11
3.2.3.2 Estrogeny v samčím reprodukčním traktu a jejich syntéza	12
3.3 Mechanismus účinku hormonů.....	13
3.3.1 Působení hormonů proteinové povahy	14
3.3.2 Působení hormonů steroidní povahy.....	14
3.3.3 Estrogenní receptory u samců.....	14
3.3.3.1 Jaderné ERs v samčím reprodukčním traktu u různých druhů savců.....	16
3.3.3.2 GPER u jednotlivých savčích druhů včetně člověka.....	19
3.3.4 Funkce estrogenních receptorů	20
4 Materiál a metodika.....	22
4.1 Zpracování reprodukčních orgánů a epididymálních spermií	22
4.2 Seznam použitých protilátek	22
4.2.1 Primární protilátky	22
4.2.2 Sekundární protilátky.....	23
4.3 Příprava parafinových řezů - histologické preparáty.....	23
4.3.1 Parafinové bločky odvodnění a prosycení vzorku intermédiem.....	23
4.3.2 Krájení	24
4.3.3 Barvení hematoxylin-eosin	25
4.4 Příprava kryořezů	25
4.4.1 Barvení kryořezů hematoxylin-eosin.....	26
4.5 Nepřímá imunofluorescence na kryořezech, detekce ERs	26
4.5.1 Lokalizace ERs v tkáni varlete a nadvarlete.....	26
4.5.2 Detekce jednotlivých typů testikulárních buněk.....	27
4.5.3 Lokalizace ERs spolu s detekcí jednotlivých typů testikulárních buněk..	28
4.6 Nepřímá fluorescenční mikroskopie na epididymálních spermiích	29

4.6.1	Zpracování preparátů spermií vlhkou fixací.....	29
4.6.2	Lokalizace estrogenních receptorů v epididymálních spermích.....	29
5	Výsledky.....	31
5.1	Morfologie tkání.....	31
5.2	Lokalizace estrogenních receptorů v tkáni varlete.....	33
5.3	Lokalizace estrogenních receptorů v tkáni nadvarlete.....	34
5.3.1	Lokalizace ERs spolu s detekcí jednotlivých typů testikulárních buněk..	38
5.4	Lokalizace estrogenních receptorů v epididymálních spermích.....	38
6	Diskuze.....	41
7	Závěr.....	47
8	Seznam použité literatury.....	48

1 Úvod

Estrogenní receptory (ERs) jsou známy bezmála 30 let. Jsou nedílnou součástí správného fungování samčího i samičího organismu. Klasické estrogenní receptory jsou proteiny patřící do rodiny jaderných receptorů. Nachází se proto buď v cytosolu nebo v jádře. Mezi tyto ERs patří estrogenní receptor α (ER α) a estrogenní receptor β (ER β). Estrogeny (steroidní hormony) jsou látky, které působí na cílové orgány právě prostřednictvím ERs. Výsledkem působení estrogenů na cílové buňky s těmito receptory je změna transkripce genů v těchto buňkách. Dalším popsáním receptorem je GPR 30, transmembránový intracelulární estrogenní receptor, známý také jako G-protein coupled estrogen receptor (GPER). Funkce ERs je i nadále zkoumána. Avšak již dnes je známo, že díky jejich přítomnosti je zajištěna správná funkce pohlavních orgánů a také vývoj spermií. Tato práce se bude zabývat detekcí ER α , ER β a GPER ve tkáních varlat, nadvarlat a v epididymálních spermiích prasete.

2 Cíl práce

Cílem práce je pomocí specifických protilátek detekovat formy estrogenních receptorů ve spermatických buňkách během spermatogeneze, ve spermiích během post-testikulární maturace v epididymu a ve tkáních varlat a nadvarlat.

Cíle této práce vychází z hypotézy, že různé formy estrogenních receptorů budou detekovány v odlišných fázích vývoje spermatické buňky.

3 Literární rešerše

3.1 Pohlavní soustava samců

Samčí pohlavní trakt lze rozdělit na primární a sekundární orgány. K primárním orgánům jsou obvykle řazena varlata. V této pohlavní párové žláze dochází k tvorbě spermií. Mezi sekundární orgány patří párová nadvarlata a chámovody, přídatné pohlavní žlázy a penis (Weiss a kol, 2010; Jones a Lopez, 2013).

3.1.1 Varlata (testes)

Varlata jsou párový orgán uložený v šourku. Mají elipsoidní tvar a ze stran jsou mírně zploštělá. Na horní část varlete přiléhá nadvarle, které se nachází na celé zadní straně varlete. První obal, který chrání z vnější strany tento orgán je *tunica vaginalis*. Samotná varlata překrývá tenká vrstva *tunica albuginea*. Je to dvojrstevná membrána přirostlá k první vnější vrstvě. Uvnitř varlat se nachází několik vazivových přepážek (*septula testis*), které rozdělují varle na 200-300 lalůček (*lobuli testis*). V jednotlivých lalůčkách se nacházejí stočené semenotvorné kanálky (*tubuli seminiferi contorti*) sbíhající se na hrotu lalůčku do jednoho kanálku (*tubulus seminifer rectus*). Vnitřní část semenotvorných kanálků vystýlá spermatogenní epitel se dvěma typy buněk. Mezi tyto buňky patří buňky zárodečné, ze kterých se tvoří spermie dozrávající v několika postupných vývojových stádiích. Dalšími buňkami jsou Sertoliho buňky. Tyto buňky jsou navzájem spojeny mezibuněčným těsným kontaktem a zaujímají až 30 % objemu semenotvorných kanálků. Tento spoj tvoří bariéru mezi vyvíjejícími se buňkami a intersticiálním prostorem varlete. Díky této bariéře nepronikají proteiny z vyvíjejících se buněk do krve a neindukují tvorbu protilátek proti pohlavním buňkám. Vmezeřená tkáň varlete obsahuje nervy, cévy a řídké vazivo. V intersticiu se od období puberty nacházejí další buňky, intersticiální Leydigovy buňky, které pod kontrolou hypofýzy produkují testosteron (Vacek, 2006; Weiss, 2010; Carlson, 2013; Jonas a Lopez, 2013).

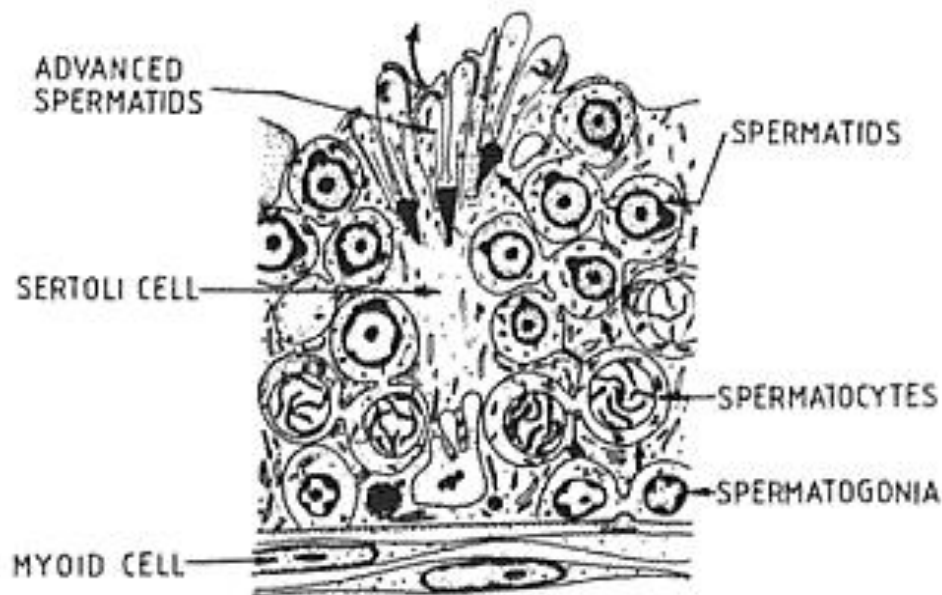
3.1.1.1 Vývoj spermií

Vývoj spermií neboli spermatogeneze, začíná v období puberty a pokračuje po celý život jedince. Dělí se na dvě hlavní části, a to na samotný vývoj spermií – spermatogenezi a konečnou přeměnu spermatid ve spermie – spermiogenezi. Celý tento proces trvá asi 75 dnů

s mezidruhovými rozdíly. Pro správný vývoj spermií je nutná snížená teplota asi o 2 °C, což je zajištěno díky lokalizaci a funkci šourku (Weiss, 2010; Carlson, 2013).

Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces, při kterém se z buněk s diploidním počtem chromozomů vytváří buňky haploidní. Celý proces probíhá v semenotvorných kanálcích varlete. Zahrnuje tři hlavní stádia: doba množení, redukčního dělení a zrání (Weiss, 2010; Jones a Lopez, 2013).

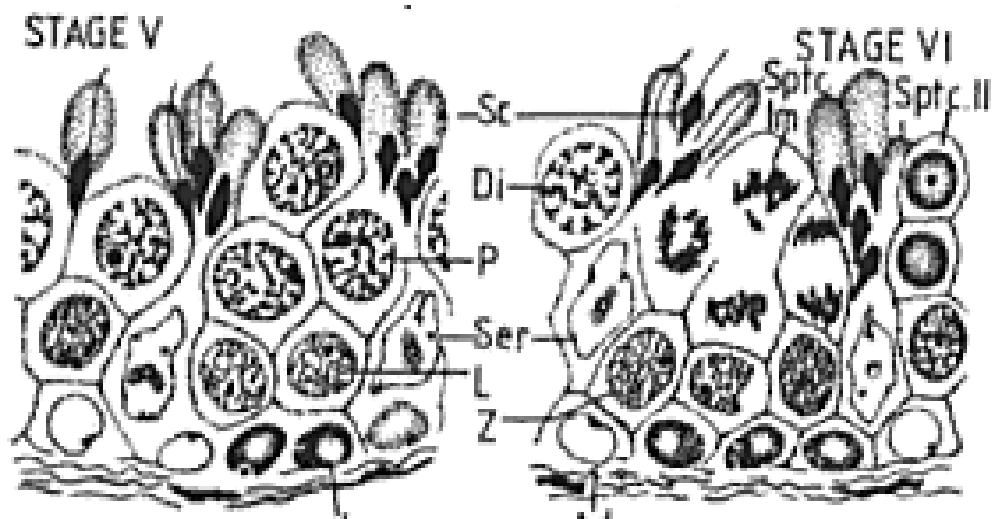


Obr. 3.1: Jednotlivá buněčná stádia zárodečných buněk v semenotvorném kanálku varlete (Guraya, 1987).

Prvním stádiem buněk jsou spermatogonie (obr. 3.1). Spermatogonie jsou zárodečné buňky. Tyto diploidní buňky leží na bazální straně semenotvorných kanálků. Díky mitotickému dělení dochází k množení, a tak se z každé jedné spermatogonie A vyvinou dvě dceřiné spermatogonie B. Tyto buňky jsou kulovité. Spermatogonie A obsahují podlouhlé nebo kulovité jádro s homologně rozloženým chromatinem a jedním či několika jádřky s dobře viditelnou nukleolou. Vzniklé spermatogonie B jsou posledním stádiem buněk vzniklých procesem mitosy. Ve spermatogoniích B probíhá růst, dochází ke změnám v jádře a dochází k počátku meiotického dělení. Výsledkem jsou preleptotenní primární spermatocyty, opět oválné kulovité buňky. Tato linie buněk prochází podél Sertoliho buněk do interiorního segmentu semenotvorných kanálků. K tomu dochází již v období leptotenního stádia první meiosy (Guraya, 1987; Rooij, 2001; Vacek, 2006; Carlson, 2013).

Poslední fází spermatogeneze jsou dvě na sebe navazující meiosy. Vstup do bloku redukčního dělení je zřejmě v důsledku přítomného derivátu vitamínu A a genům obsažených v primárních spermatocytech. Díky prvnímu redukčnímu dělení vzniknou z primárních spermatocytů nové spermatocyty sekundární (Weiss, 2010; Carlson, 2013).

První meiotické dělení probíhá v několika krocích. Preleptotenní primární spermatocyty vstupují do meiosy, která je charakteristická dlouhou profází. Ta zahrnuje stádium leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakenezi. Tímto končí první profáze a následuje první metafáze, první anafáze a první telofáze. Na konci těchto kroků vznikají sekundární spermatocyty. V zygotenním stádiu prvního redukčního dělení začíná párování homologních chromozomů, tak aby v diplotenním stádiu byly chromozomy oddělené. Během profáze první meiosy prochází chromatin velkou kondenzací, kdy se homologní maternální a paternální chromozomy podélně rozdělí ve dvě chromatidy. Chromatidy se od sebe vzdalují stejně jako jádro během dalších stádií meiosy. Tím dají vzniknout sekundárním spermatocytům (obr. 3.2) (Guraya, 1987).



Obr. 3.2: Sc spermatida, Di primární spermatocyt v diplotene, P pachytene primární spermatocyt, Ser Sertoliho buňka, L leptotene primární spermatocyt, Z zygotene primární spermatocyt, Sptc-Im primární spermatocyt v dělení, Sptc-II sekundární spermatocyt (Guraya, 1987).

Jádro primárních spermatocytů je tmavé a malé, obsahuje chromatin viditelný kolem membrány jádra. Velikost jádra a objem cytoplazmy je důležitý pro správný průběh meiotické profáze. Sertoliho buňky jsou tak velké jako je objem pachytenních spermatocytů (Guraya, 1987). Během tohoto období dochází k tvorbě molekul, které se zde skladují pro následný druhý blok meiosy. Tato příprava zahrnuje produkci mRNA molekul a jejich skladování v neaktivní formě pro budoucí tvorbu proteinů. Syntéza mRNA zajišťuje také produkci

protaminů. Protaminy jsou jaderné proteiny bohaté na aminokyseliny arginin a cystein. Tyto proteiny nahrazují na lysin bohaté jaderné histony, a tak umožňují nutné zahuštění jaderného chromatinu potřebné během finální tvorby spermií (Carlson, 2013).

Sekundární spermatocyty jsou kulovité haploidní buňky s polovičním počtem chromozomů a DNA. Ve druhém bloku meiosis dochází k rozdělení sekundárních spermatocytů za vzniku spermatid. Toto dělení je oproti prvnímu velmi rychlé a zahrnuje na rozdíl od prvního dělení jen druhou metafázi, druhou anafázi a druhou telofázi. Druhá meiosa zajišťuje separaci dvou sesterských chromatid a formaci spermatid. Redukčním dělením vznikají dva druhy spermatid s pohlavním chromozomem, kdy se větší označuje písmenem X (samičí) a menší Y (samčí). Během celé spermatogeneze tak z jedné spermatogonie B vzniknou 4 spermatidy. Správné rozdělení genů do haploidních buněk a časová koordinace tohoto procesu je zajištěna díky propojení mezibuněčnými cytoplazmatickými můstky jednotlivých stádií spermatických buněk (Guraya, 1987; Vacek, 2006; Carlson, 2013; Jonas a Lopez, 2013).

Spermiogeneze

Spermiogeneze je konečným proces spermatogeneze. Pomocí procesu spermiogeneze vznikají z kulatých spermatid spermie. Spermatidy mají jádro menší než sekundární spermatocyty a chromatin je vysoce kondenzovaný. Spermatidy obsahují Golgiho komplex, mitochondrie, RNA (nebo ribosomy), fosfolipidová granula, multivesikulární tělíska, chromatoid a endoplazmatické retikulum. Množství těchto komponent v porovnání se sekundárními spermatocyty je menší (Guraya, 1987; Eddy, 2006; Jonas a Lopez, 2013).

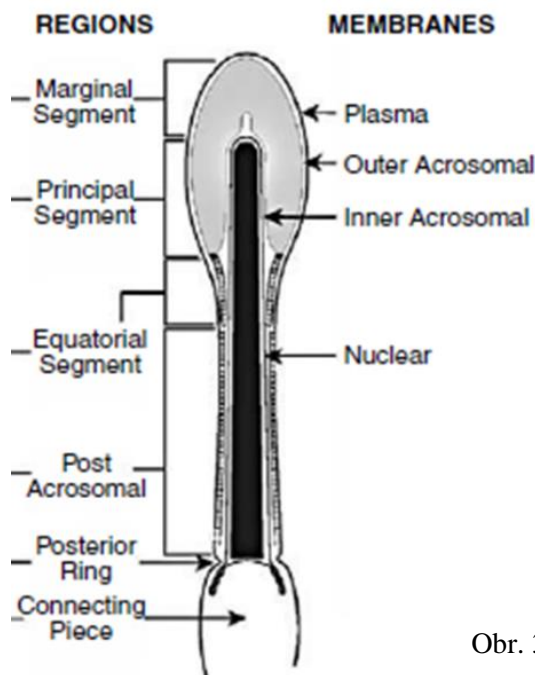
Ve spermatidách probíhá několik podstatných procesů, které lze rozdělit na kondenzaci jádra, formaci akrozomu a tvorbu bičíku. Během toho se z kulovitých spermatid stávají oválné, které se na konci metamorfózy mění na spermie. Tento proces probíhá stále ve varlatech. Z počátku kulovité spermatidy leží akrozomální částí směrem k lumen sementovných kanálků. Jakmile se mění na oválné spermatidy, otáčí se o 180° tak, že akrozomální část leží v bazální části a budoucí část s bičíkem v lumen kanálku (Guraya, 1987). Spermie jsou jako poslední stádium vývoje zárodečných buněk uloženy v lumen sementovných kanálků. Sertoliho buňky zajišťují jejich výživu a ochranu (Weiss, 2010). Savčí spermie mají dvě hlavní části: hlavičku a bičík, které jsou spojeny krčkem. Při dozrávání spermií dochází k redukci cytoplazmy, kdy cytoplazma opouští spermii od hlavičky po bičík. Tato reziduální hmota je fagocytována Sertoliho buňkami (Eddy, 2006; Carlson,

2013). Konečný proces dozrávání spermií probíhá v nadvarleti (De Grava Kempinas a Klinefelter, 2014).

3.1.1.2 Stavba spermie

Hlavička spermie

Hlavní součástí hlavičky spermie je jádro a akrozom (obr. 3.3) (Eddy, 2006). Konečné podobě hlavičky předchází řada změn, mezi něž patří zmenšení velikosti jádra a kondenzace chromozomů. Součástí kondenzace chromozomálního materiálu je výměna histonů za protaminy. Změna velikosti hlavičky je umožněna odchodem cytoplazmy (Carlson, 2013). Největším kompartmentem je akrozomální váček vzniklý z Golgiho aparátu, který nasedá na jádro a zaujímá přední část hlavičky (Vacek, 2006). Je umístěn pod plazmatickou membránou (Eddy, 2006). Akrozom je bohatý na enzymy, které jsou nutné při oplození pro průnik spermie přes *zona pellucida* vajíčka (Carlson, 2013). Komponenty cytoskeletu vyplňují místa mezi akrozomem a jádrem a mezi akrozomem a plazmatickou membránou. Funkcí cytoskeletu hlavičky je udržení jejího tvaru. Jeho pomocí je také umožněn průchod do vajíčka ve fázi penetrace a vlastního oplození. Cytoskelet této části spermie má unikátní složení proteinů, které jsou specifické právě pro spermatické buňky (Eddy, 2006).



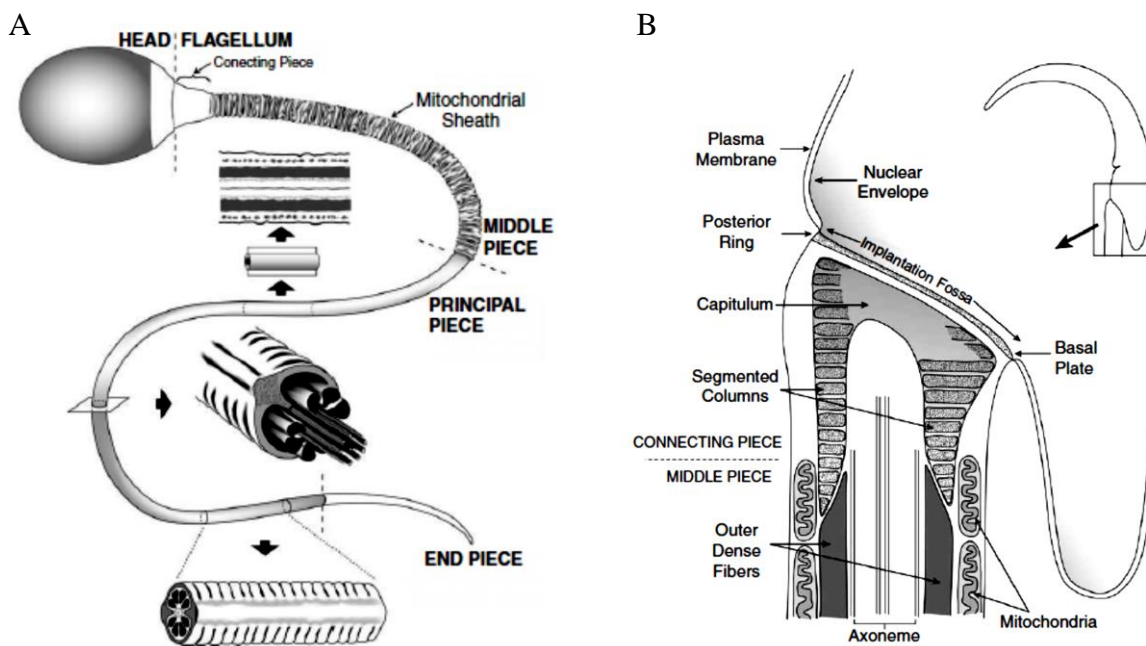
Obr. 3.3: Struktura hlavičky spermie (Eddy, 2006).

Chromatin jádra spermie je vysoce kondenzovaný. Jeho objem a průhlednost je několika násobně menší než je tomu u normálních somatických buněk. Naopak je zvýšena jeho stabilita. Jádro obsahuje vzhledem k haploiditě jen jeden chromozom, a to buď X nebo Y (Guraya, 1987). Hlavními proteiny jádra jsou protaminy, malé (27-65 AMK) molekuly obsahující hojné množství argininu a cysteinu. Protaminy jsou pravděpodobně s chromatinem spojeny kovalentní vazbou, čímž usnadňují správnou kondenzaci DNA a stabilizují ji (Eddy, 2006).

Akrozom vzniká z Golgiho komplexu během procesu dozrávání spermie ze spermatid. Jeho tvar je stejně jako tvar hlavičky variabilní dle druhu. Obsahuje enzymy nezbytné pro penetraci spermie skrz *zona pellucida* oocyty. Nachází se na přední části hlavičky jako tzv. akrozomální čepička. Akrozom podobně jako jádro je obklopen membránou. Tato membrána se rozlišuje na vnější a vnitřní membránu. Na akrozomu se rozlišují dvě hlavní části, a to akrozomální čepička (anteriorní akrozom) a ekvatoriální segment (posteriorní akrozom). Během akrozomální reakce vnější akrozomální membrána fúzuje s plazmatickou membránou a je uvolněn obsah akrozomu. Součástí akrozomu jsou enzymy podobné enzymům v lysozomech a specifické enzymy spermie. Nejlépe popsaným enzymem je proakrosin/akrosin, typický proteolytický enzym spermatických buněk a hyaluronidasa, která patří mezi glykosidasy (Eddy, 2006).

Bičik spermie

Bičik spermie savců lze rozdělit na čtyři segmenty (obr. 3.4A): krček, střední část, hlavní část a část koncovou. Hlavními komponentami bičíku jsou: axonema, mitochondriální pochva (střední část bičíku), vnější hustá vlákna a fibrózní pochva (obr. 3.4B) (Eddy, 2006).



Obr. 3.4: Bičík spermie (A); spojovací část bičíku spermie (B) (Eddy, 2006).

Axonema tvoří hlavní komponentu bičíku. Skládá se ze dvou centrálních mikrotubulů a 9 mikrotubulových dubletů. Dublety jsou složeny z mikrotubulů A, na které nasedají mikrotubuly B. Vždy dvě dyneinová ramena z mikrotubulu A táhnou B mikrotubul k sousedními dubletu. Dyneinové raménka se tedy pohybují po mikrotubulech a díky spotřebě ATP umožňují pohyb bičíku. (Eddy, 2006).

Mitochondriální pochva se nachází ve střední části bičíku spermie. Dle druhu je počet mitochondrií variabilní. Mitochondrie jsou drženy komplexem filament – submitochondriální reticulum. Jeho funkcí je shromažďování a sestavování mitochondrií ve střední části bičíku. Mitochondriální proteinová kapsule tvoří nerozpustnou pochvu kolem mitochondrií a její důležitou složkou je selen (Eddy, 2006).

Vnější hustá vlákna vytváří kolem axonemy komplex 9+9+2 hustých vláken, která ji obklopuje od střední části až po hlavní část bičíku. Vlákna jsou bohaté na aminokyseliny, jejichž složení se druhově liší hlavně obsahem lysinu nebo cysteinu. V současné době není přesně známo, zda jsou hustá vlákna v asociaci s ATP. Jejich funkcí je zajistit elasticitu bičíku spermie a možnou ochranu během transportu do nadvarlete (Eddy, 2006).

Fibrózní pochva obklopuje bičík v celé délce. Nachází se v těsné blízkosti plazmatické membrány, ale nezasahuje do ní. Funkce fibrózní pochvy je zachovat rovinu bičíku a zajišťovat správnou funkci ostatních částí bičíku během pohybu spermie (Eddy, 2006).

3.1.2 Nadvarle (*epididymis*)

Nadvarle je orgán, který úzce přisedá na varle. Je párový a od počátečního segmentu se dělí na tři části: hlavu (*caput*), tělo (*corpus*) a ocas (*cauda*) (De Grava Kempinas a Klinefelter, 2014).

Na povrchu chrání nadvarle vazivový obal. Uvnitř je kanálek, který do hlavy vstupuje jako vývodný kanálek varlete (*ductuli efferentes testis*). Kanálek vytváří lalůčky (*lobuli epididymis*) se stočenými kanálky, které se napojují do kanálku nadvarlete (*ductus epididymis*). *D. epididymis* prostupuje nadvarletem jako jediný kanálek (Weiss, 2010).

Epitel nadvarlete tvoří několik typů specializovaných buněk: sekreční buňky 65-80 %, bazální buňky 15-20 %, apikální buňky a fagocytující buňky (Joseph a kol., 2011). Počáteční segment tvoří buňky resorbující vodu, ionty, malé molekuly a HCO_3^- (Joseph a kol., 2011). Buňky v části hlavy nadvarlete jsou zodpovědné za sekreci proteinů a lipidů, které jsou součástí semenné plazmy. Přebytky cytoplazmy, které se exocytózou dostávají ze spermií, jsou fagocytovány. V ocasu nadvarlete, kam se spermie dostávají, je sekretován immobilin, který zajišťuje potřebnou anabiózu spermií. Tekutina, ve které jsou spermie v nadvarletí, je složena z iontů, proteinů a lipidů. Její množství a složení je regulováno sekrečními a absorpčními buňkami podél celé délky epitelu (De Grava Kempinas a Klinefelter, 2014).

Funkcí nadvarlete je tvorba vhodného prostředí pro konečné dozrávání spermií, jejich transport, ochranu a uchování. Během průchodu nadvarletem nabývá spermie své fertilizační schopnosti a schopnost pohybu (Cooper, 1986).

3.2 Hormonální řízení pohlavní soustavy samců

Hormonální systém řídí činnost organismu spolu s nervovou soustavou (Vacek, 2006). Nadřazenými centry pro produkci hormonů v endokrinních žlázách jsou hypotalamus a hypofýza. Hormony jsou látky chemické povahy, které lze rozdělit podle složení na proteiny a peptidy, aminy odvozené od aminokyselin a hormony odvozené od mastných kyselin (Jonas a Lopez, 2013). Do poslední skupiny hormonů patří steroidy, kam spadají mimo jiné pohlavní hormony. Tyto hormony jsou odvozené od cholesterolu. Příkladem jsou samčí androgeny a samičí estrogeny a progestiny (Weiss, 2010).

3.2.1 Hypotalamo-hypofyzární hormony

Producentem těchto hormonů je hypotalamus a hypofýza. Hypofýza se nachází v mozku. Dělí se na neurohypofýzu a adenohypofýzu. Adenohypofýza tvoří hormony, které cestují krevním řečištěm a řídí činnost žláz s vnitřní sekrecí. Mezi ně patří varlata u samců a vaječníky u samic (Vacek, 2006).

Hypotalamus, neurohypofýza, adenohypofýza

Hypotalamus je část v mozku, která ovlivňuje tělesnou teplotu, spánek, hlad, stres, agresivitu a sexuální chování. Tento segment sahá svými axony do části hypofýzy zvané neurohypofýza. Touto cestou se do neurohypofýzy dostávají neurosekrety (oxytocin a vasopresin). Ty se potom dostávají do krevního řečiště. Oxytocin u samců pomáhá při transportu spermií. Hypotalamus syntetizuje tzv. uvolňující (GnRH, gonadotropin releasing hormone) a inhibiční hormony. Tyto hormony podporují nebo inhibují sekreci a tvorbu hormonů adenohypofýzy takzvanou pulzační sekrecí (Jonas a Lopez, 2013).

Adenohypofýza je přední část hypofýzy sekretující hormony pod kontrolou hypotalamu. Obsahuje několik typů buněk, které se liší svou barvitelností. Největšími buňkami jsou acidofilní, které syntetizují růstový hormon (GH) a prolaktin (PRL). Basofilní buňky sekretují thyreotropní hormon (TSH), adrenokortikotropní hormon (ACTH), lipotropin (LPH), melanoformní stimulační hormon (MSH) a endorfin s enkefalinem. Pohlavní hormony zvané gonadotropní jsou také řazeny mezi basofilní a jsou to látky glykoproteinové povahy. Patří sem folikulostimulační hormon (FSH) a luteinizační hormon (LH) (Jonas a Lopez, 2013).

3.2.2 Působení gonadotropinů na samčí pohlavní trakt

Folikulostimulační hormon (FSH) působí u samců na aktivaci spermatogeneze aktivací Sertoliho buněk. Luteinizační hormon (LH) pak stimuluje Leydigovy buňky k produkci testosteronu. Hladinu FSH a LH regulují zpětně hladiny androgenů. To znamená, že pokud se v krvi zvýší hladina androgenů, sníží se i hladina FSH a LH. Tímto způsobem vznikají negativní zpětné vazby mezi adenohypofýzou a varlaty. V opačném případě, kdy hladina testosteronu klesne, zvýší se hladina LH, která stimuluje Leydigovy buňky k produkci androgenů (Jonas a Lopez, 2013). Hladina a sekrece LH je zajištěna GnRH z hypotalamu, kdy pro správnou funkci stačí jen jedna negativní vazba (Verhoeven a kol., 2010). FSH funguje na

principu dvou negativních vazeb. Při vysoké hladině testosteronu klesá hladina FSH negativní zpětnou vazbou. Dalším způsobem ovlivnění je koncentrace inhibinu, glykoproteinu sekretovaného Sertoliho buňkami. Inhibin snižuje sekreci FSH, a to tak, že se sníží senzitivita buněk v adenohipofýze k GnRH. Naopak sekrece FSH je stimulována proteinem aktivinem, podobným inhibinu a také produkovaným Sertoliho buňkami (Jonas a Lopez, 2013).

3.2.3 Samčí steroidní hormony

Obvykle se v krevní plazmě samců nachází šest steroidních hormonů o různé koncentraci. Nejvýše koncentrovanými jsou pohlavní hormony. Prvním je testosteron a dále estradiol. Dalšími hormony jsou pak hormony nadledvin, kde nejvyšších koncentrací dosahuje kortisol a dále sestupně kortikosteron, deoxykortikosteron a aldosteron (Siiteri a kol, 1982).

3.2.3.1 Hlavní samčí steroidní hormony

Testosteron, hlavní samčí steroidní hormon, produkují varlata a v malé míře také nadledvinky. Syntéza testosteronu probíhá v endoplazmatickém retikulu Leydigových buněk v intersticiu semenotvorných kanálků varlete (Verhoeven a kol., 2010). Zde se z cholesterolu syntetizuje steroidní hormon. Tento proces steroidogeneze zajišťuje řada enzymů a kofaktorů. Mezi hlavní enzymy patří cytochrom P450 z mitochondrií a endoplazmatického retikula (Auchus a Miller a Auchus, 2011).

Testosteron zajišťuje vývoj sekundárních pohlavních znaků, má anabolické účinky a působí na sexuální libido samců (Kicman, 2008). Leydigovy buňky jsou aktivní již v časném embryonálním vývoji, v pozdní části vývoje dochází pak k jejich útlumu. Znovu aktivní jsou od počátku puberty. Hladina testosteronu je asi 100krát vyšší ve varleti než je množství cirkulující v těle (Jonas a Lopez, 2013). V mnoha tkáních testosteron konvertuje na 5- α -dihydrostesteron (DHT) (Verhoeven a kol., 2010). DHT pomáhá v růstu a přežití buněk prostaty a je vysoce afinitní k androgenovým receptorům (Tan a kol., 2015).

Vysoká hladina testosteronu je pro spermatogenezi nezbytná. Ovšem zpočátku nemají samčí kmenové buňky dostatek receptorů pro samotný testosteron, proto jsou v jejich blízkosti Sertoliho buňky, které mají receptory pro FSH. Vysoká hladina FSH nakonec způsobí zvýšení syntézy testosteronu. Tímto způsobem zajišťují průběh spermatogeneze i spermiogeneze, podporují přežití spermatogonií i spermatocytů a potlačují apoptózu kmenových buněk. Mimo jiné FSH je zodpovědný za přísun ABP (androgen vázající protein), který je produktem Sertoliho buněk a je sekretován do lumen semenotvorných kanálků, kde se

váže na testosteron a DHT. Působením ABP se androgeny kumulují kolem Sertoliho buněk, a mohou tak lépe ovlivňovat spermatogenezi. Androgeny mimo jiné udržují bariéru mezi krví a varlaty (Jonas a Lopez, 2013).

3.2.3.2 Estrogeny v samčím reprodukčním traktu a jejich syntéza

Estradiol (estrogen) je primárně řazen k samičím pohlavním hormonům. Nicméně je známo, že se tento hormon nachází také v samčím organismu. Samotná varlata produkují až 15 % estradiolu (Simpson, 2000). Produkce probíhá v Sertoliho buňkách, Leydigových buňkách a i v ostatních zárodečných buňkách v různých stádiích vývoje (Simpson, 2000). V dospělosti kance dokáží estrogen produkovat v nejvyšší míře Leydigovy buňky, protože obsahují vysoké koncentrace aromatázy zodpovědné za konverzi testosteronu na estrogen (Hess a Carnes, 2004).

Syntéza estrogenu probíhá i extragonadálně v tukové tkáni, některých částech mozku, endotelu cév a hladké svalovině. Jednou z funkcí extragonadálního estrogenu u obou pohlaví je mineralizace kostí, čímž zodpovídá za prevenci vzniku osteoporózy u samic i samců. Zajímavostí je také fakt, že u člověka je produkce estrogenu v mozkové tkáni velmi důležitou prevencí vzniku Alzheimerovi choroby a je dále příčinou kognitivních funkcí chování (Simpson a kol., 2000).

Princip syntézy estrogenů je aromatizace testosteronu, z něhož přes androstenedion vzniká estradiol a estron (Holst a kol., 2004). Estrogen vzniká konverzí testosteronu na 17 β -estradiol v cílových buňkách a závislá na přítomnosti enzymu cytochrom P450 aromatáza (Jonas a Lopez, 2013).

Cytochrom P450 aromatáza byla lokalizována v Leydigových buňkách mnohých savců. U potkanů bylo zjištěno, že před obdobím dospělosti probíhá produkce estrogenů hlavně v Sertoliho buňkách, kdežto v dospělosti tuto úlohu přebírají především buňky Leydigovy (Carreau a kol., 2003). Nicméně dalším zjištěním je fakt, že estrogeny jsou ve velkém měřítku produkovány i zárodečnými buňkami semenotvorných kanálků. Což bylo potvrzeno u dospělých myší, u nichž byla aromatáza detekována právě v zárodečných buňkách (Nitta a kol., 1993). Poté bylo toto popsáno také u potkanů (Levallet a kol., 1998; Carreau a Hess, 2010) V haploidních buňkách byla nalezena vyšší exprese aromatázy než u zárodečných buněk. (Carreau a kol., 2009). Aktivita aromatázy je z 60 % zajištěna zárodečnými buňkami ve varlatech v dospělosti (Carreau a kol., 2003). U lidí jsou hlavním

zdrojem estrogenů Leydigovy buňky (Carreau a kol., 2010). Cytochrom P450 aromatáza byla také prokázána v bičíku kančích spermii (Rago a kol., 2007).

Funkce estrogenu v samčím reprodukčním traktu

Estradiol je u samců nutný pro normální průběh spermatogeneze, vývoj spermii a motilitu spermii (Cui a kol., 2013). Je schopen kontrolovat kapacitaci a akrozomální reakci spermii u různých druhů savců (Luconi, 2006). V neposlední řadě přítomnost estrogenů moduluje epidydimální funkce v dospělosti kanců (Carpino a kol., 2004). Primární funkce estrogenů u samců je regulace množství tekutiny ve vývodných kanálcích varlete přes ER α . Narušení ER α má za následek redukci transport Na⁺, Cl⁻ a H₂O a resorpci tekutiny, což vede ke snížení fertility. Navíc je přítomnost estrogenu důležitá pro diferenciaci epiteliálních buněk, což zahrnuje vývoj mikrokloků a lysozomů těchto buněk (Hess a Carnes, 2004). Koncentrace estradiolu je mnohokrát vyšší v tekutinách v části rete testis, vývodných kanálcích varlete a epididymu než v krvi. V neposlední řadě ovlivňuje estrogen růst kostí a maskulinaci samčího mozku, což zajišťuje projev samčího chování (Jonas a Lopez, 2013). Nejvyšších koncentrací dosahuje estrogen u kanců v semenné plazmě 430 pg/ml (estradiol) a 860 pg/ml (estron), dále v žilné krvi varlat 1,09 nmol/l (estrogen) a v lymfě varlat 1,86 nmol/l. Nejméně potom v tekutině rete testis 0,38 nmol/l (Hess a Carnes, 2004).

Vedle endogenních estrogenů mohou působit na reprodukční trakt skrze ERs také estrogeny z vnějšího prostředí, tzv. endogenní disruptory. Tyto xenoestrogeny mohou působit přes ERs agonisticky nebo antagonisticky, mají buď estrogeny nebo antiestrogeny účinky, a zasahovat do procesu reprodukce a gametogeneze (Shemes a Shore, 2012).

3.3 Mechanismus účinku hormonů

Buňky mají ve své membráně či cytoplazmě/jádře specifické receptory pro navázání hormonu. Receptory jsou proteiny, které jsou schopné rozpoznat specifické ligandy molekul přítomných v okolním prostředí. Navázání hormonu na receptor vyvolá buněčnou odezvu (Jonas a Lopez, 2013).

3.3.1 Působení hormonů proteinové povahy

Receptory, které vážou proteinové hormony (GnRH, FSH, LH, PRL), se nachází v membráně buněk. Skládají ze tří domén: extracelulární, transmembránové a intercelulární.

Po navázání signální molekuly – prvního posla (hormonu) na receptor, dojde k přenosu signálu do nitra buňky – transdukcí. Vytváří se druhý posel. Příkladem druhých poslů jsou cAMP, cGMP a Ca^{2+} (Trojan, 2003). Poté dochází k buněčné odezvě ve smyslu regulace aktivity buňky, která je charakteristická změnou aktivity efektorových proteinů (enzymy, transkripční faktory, složky cytoskeletu, iontové kanály) (Alberts a kol., 1998; Jonas a Lopez, 2013).

3.3.2 Působení hormonů steroidní povahy

Mezi steroidní hormony patří estrogen, testosteron a progesteron. Jsou to látky nerozpustné ve vodě a mohou tak bez obtíží přecházet do buněk skrz fosfolipidovou membránu. Receptory pro tyto hormony jsou přítomné buď v cytoplazmě, nebo v jádře buněk (Murphy a Zheng, 2016)

Těchto receptorů je celá řada a liší se dle hormonu, který je schopen se na daný receptor navázat, např. estrogenní receptory (ERs), glukokortikoidní receptory (GR), mineralokortikoidní receptory, progesteronové receptory (PR), androgenové receptory (AR) a mnohé další. (Murphy a Zheng, 2016)

Po navázání hormonu k receptoru změní receptor svou konformaci. Tyto receptory se obecně skládají ze čtyř domén: variabilní N-terminální doména, DNA vázající doména, region s lokalizačním signálem, hormonální/ligand vázající doména (Murphy a Zheng, 2016). Změna konformace odhalí DNA vázající doménu daného receptoru, která se naváže na DNA přítomnou v jádře. Výsledkem působení hormonu je regulace transkripce určitého genu. Změna transkripce vede k syntéze specifických proteinů (Jonas a Lopez, 2013). Výsledkem těchto procesů je zajištění potřebných funkcí, mezi které patří udržení homeostáze, proliferace a buněčná smrt (Murphy a Zheng, 2016)

3.3.3 Estrogenní receptory u samců

Hess a Carnes (2004) uvádějí původní hypotézu výskytu estrogenních receptorů (ERs), které byly mylně řazeny k reziduíům embryonálního vývoje. Nicméně ERs jsou známy

již přes 30 let. Prostřednictvím těchto receptorů mohou působit hormony – estrogény (Luconi et. al., 2002).

Je známo, že ERs fungují jako transkripční faktory v jádrech buněk – genomický mechanismus, nebo indukují tvorbu druhého posla v buňkách – negenomický mechanismus. V případě působení estrogenů přes negenomický mechanismus dochází k buněčných efektům díky změnám, které probíhají na membráně nebo v cytoplazmě konkrétní buňky (Acconcia a Kumar, 2006; Pedram a kol., 2007).

Jako ERs jsou známy tři estrogenní receptory. Typické ERs jsou dva jaderné estrogenní receptory, subtypy ER α a ER β . Někdy jsou v literatuře tyto subtypy označeny jako ER1 (ER α) a ER2 (ER β) (Luconi et al., 2002; Acconcia et al., 2003; Aquila a kol., 2014). Třetím definovaným estrogenním receptorem je GPER (GPR30). Jedná se o membránově asociovaný receptor spřažený s G-proteinem (Olde a Leeb-Lundberg, 2009).

ERs byly detekovány v reprodukční tkáni samců u řady savčích druhů: potkan (Fisher a kol., 1997; Van Pelt a kol., 1999; Pelletier a kol., 2000; Zaya a kol., 2012), kočka a pes (Nie a kol., 2002), myš (Jefferson a kol., 2000; Zhou a kol., 2002), kozel (Goyal a kol., 1997), člověk (Ergün a kol., 1997; Mäkinen a kol., 2001; Saunders a kol., 2001), opice (Saunders a kol., 2001), kůň (Parlaviet a kol., 2006; Pearl a kol., 2011) a prase (Carpino a kol., 2004; Lekhkota a kol., 2006; Rago a kol., 2004; Gunawan a kol., 2011; 2012). Detekce lokalizace jednotlivých ERs je ve tkáních, jako je testes, epididymis, nebo ve spermiích je u všech těchto savčích druhů rozdílná.

Oba jaderné receptory ER α i ER β jsou složeny z 6 domén se společnou strukturou: N-terminální oblast s A/B doménou, DNA-vázací doména (DBD), jinak označovaná jako C-doména, D-doména tvoří spojnic mezi DBD a LBD, E-doména ligand vázací doména (LBD) a poslední C-terminální F-doména (Luconi a kol., 2002; Acconcia a kol., 2003; Hess a kol., 2011). Kromě přítomnosti ERs v jádře se tyto receptory mohou nacházet také v plazmatické membráně buněk, kde mohou být uchyceny pomocí palmitoylace. V tomto případě ERs postrádají DNA-vázací doménu (Schwartz a kol., 2016). Lokalizace těchto ERs je v kaveolách, což je doména plazmatické membrány obsahující protein caveolin-1 (Acconcia a kol., 2003). Po navázání estradiolu k ER α v plazmatické membráně uvnitř kaveolárního úseku dochází k aktivaci G-proteinů (Schwartz a kol., 2016).

3.3.3.1 Jaderné ERs v samčím reprodukčním traktu u různých druhů savců

Prase

U prasete byly v testes popsány oba typy klasických estrogenních receptorů α i β (Carpino kol., 2004). ER α u prasete je složen z 595 aminokyselin (AMK) a obsahuje tři hlavní domény – DNA vazebnou část a 2 části vázajících zinek). DNA vazebné místo leží mezi 185-250 AMK (Uniprot.org., 31.10. 2016). ER β obsahuje 526 AMK a stejně jako ER α 3 hlavní domény, kdy DNA vazebné místo leží mezi 146. a 211. AMK (Uniprot.org., 31.10. 2016).

Specifitou lokalizace ER α u kance je jeho věk. Před dospělostí se dle Rago a kol. (2004) nenachází ER α jak v zárodečných buňkách, tak ani v somatických buňkách varlete. V dospělosti je potom lokalizace ER α jiná. V silném zastoupení byl tento receptor detekován ve spermatocytech, slabě ve spermatogoniích. V Sertoliho buňkách a spermatidách nebyl ER α detekován, naopak byla detekce potvrzena v buňkách Leydigových (Rago a kol., 2004). Gunawan a kol. (2011) udává rozdílné výsledky, a to expresi ER α především v cytoplazmě Sertoliho buněk, Leydigových buněk a zárodečných buněk. Gunawan a kol. (2012) pak uvádí detekci receptoru ER β ve spermatogoniích, primárních spermatocytech, spermatidách, Leydigových a Sertoliho buňkách. Ovšem podobně jako u detekce ER α byla detekována přítomnost ER β v závislosti na věku jedince. U nedospělých kanečků byl ER β detekován ve spermatogoniích, peritubulárních myoidních a Leydigových buňkách. Naopak jeho lokalizace nebyla zjištěna v Sertoliho buňkách nedospělých kanečků. U dospělých kanců byla detekce ER β pozitivní ve spermatogoniích, spermatocytech a v peritubulárních myoidních buňkách. Lokalizace ER β nebyla nalezena v Sertoliho buňkách, spermatidách a v Leydigových buňkách (Rago a kol., 2004).

V ejakulovaných spermii se jednotlivé ERs nachází různě. U kance byl ER α detekován pomocí imunofluorescence v mitochondriální části bičíku, kdežto ER β v oblasti akrozomálního váčku (Rago a kol., 2007). Lokalizace ER β v akrozomu by mohla být pravděpodobně spojena s vlivem estrogenů na kapacitaci a akrozomální reakci spermii (Aquila a kol, 2003; Rago a kol, 2007).

V nadvarleti byla přítomnost ER α prokázána v hlavě, těle i ocase s lokalizací hlavně v epitelálních buňkách (Gunawan a kol., 2011, Pearl a kol., 2007). Pearl a kol. (2007) dále udává přítomnost ER α v nadvarleti závislou na věku prasete. U dvouměsíčních prasat byl ER α detekován ve všech částech epidydimu (E1-E3) v epitelálních buňkách. Ve věku 3-8 měsíců prasat byla lokalizace ER α především v bazálních buňkách celého epididymu. Naopak u osmiměsíčních prasat byl ER α nalezen v menší míře v těle (E2) a také v ocase (E3) nadvarlete. Hess a kol. (2011) uvádí nejvyšší míru ER α především v části hlavy nadvarlete.

ER β byl lokalizován v celé tkáni nadvarlete, tedy v hlavě, těle i ocase, a to především v epiteliálních buňkách (Gunawan a kol., 2012, Pearl a kol., 2007). Výskyt ER β se liší dle věku jedince, podobně jako ve tkáni varlete. U předpubertálních kanečků se ER β objevuje v nadvarleti v malé míře, o něco více pak v buňkách epitelu a v hladkosvalových buňkách slabě. Opakem je výskyt v pojivové tkáni, kde byla detekce ER β nejvyšší. U dospělých kanců jsou výsledky přítomnosti ER β jiné. Velmi slabě byl ER β detekován v epiteliálních buňkách, slabě ve hladkosvalových buňkách a nejvíce v pojivové tkáni (Carpino a kol., 2004). Trochu odlišné informace udává Pearl a kol. (2007), kdy jeho výsledky o výskytu ER β v epididymu nepotvrdily lokalizaci tohoto receptoru v závislosti na věku prasete. ER β se u tříměsíčních i osmiměsíčních prasat vyskytuje v bazálních buňkách celého epididymu. Současně se u dvouměsíčních vyskytuje ER β také v epiteliálních buňkách.

Člověk

Aquila a kol. (2004) detekoval ER α i ve spermatocytech, které se nacházely na počátku meiotického dělení a taktéž v prodloužených spermatidách. Lokalizace ER α byla objevena také v jádrech Leydigových buněk (Aquila a kol., 2004). Jiní autoři uvádějí lokalizaci ER α pouze ve spermatocytech a spermatidách (Pelletier a kol., 2000; Pentikäinen a kol., 2000).

Přítomnost ER β byla prokázána především ve spermatogonních, spermatocytech a v kulovitých spermatidách (Pentikäinen a kol., 2000; Mäkinen a kol., 2001; Lambard a kol., 2004; Aquila a kol., 2004). V prodloužených spermatidách nebyla lokalizace ER β potvrzena. ER β byl detekován ještě v Leydigových buňkách stejně jako ER α a navíc byla lokace ER β potvrzena i v Sertolihových buňkách (Mäkinen a kol., 2001). ER β je zřejmě zodpovědný za kontrolu proliferace a apoptózy (Aquila a kol., 2005).

V ejakulovaných spermích se nachází oba receptory ER α i ER β (Rago a kol., 2006). ER α byl detekován především ve střední části spermie a ER β v proximální části bičíku (Aquila a De Amicis, 2014). Rago a kol. (2006) dále uvádějí přítomnost ER α pouze ve střední části spermie a ER β v celém bičíku. Údaje o lokalizaci ERs ve spermích se liší dle autora. U člověka je předpoklad, že funkcí ER β je modulace transkripční aktivity ER α (Hall a McDonnell, 1999).

ER α byly detekovány i v nadvarleti, v hojné míře ve vývodných kanálcích (Hess a Carnes, 2004). Dle Saunders a kol. (2001) se u lidí ER α vyskytuje v epiteliálních a bazálních buňkách epididymu.

Ostatní savčí druhy

U myši byla také potvrzena přítomnost obou ERs. ER α byl prokázán v peritubulárních myoidních buňkách a Leydigových buňkách (Siriani a kol., 2008; Carreau a kol., 2010). V Sertoliho buňkách a zárodečných buňkách byl lokalizován ER β (Siriani a kol., 2008). Výsledky lokalizace ER β se v pracích různých autorských kolektivů liší. Carreau a kol. (2010) uvádí přítomnost ER α pouze v Leydigových buňkách a v peritubulárních myoidních buňkách, zatímco ER β byl u myši detekován v Leydigových buňkách, v Sertoliho buňkách a v některých zárodečných buňkách (spermatocyty). U myši stejně jako u ostatních druhů je přítomnost obou ERs pravděpodobně nezbytná pro zajištění samčí fertility (Eddy a kol., 1996). Toto bylo potvrzeno hlavně u ER α , kde transkripce závisí na věku, typu zárodečných buněk a stádiu vývoje semenotvorného epitelu, kdežto u ER β je exprese v těchto oblastech v nižší míře (Siriani a kol., 2008). V nadvarletí myši byl detekován ER α nejvíce v hlavě (Hess a kol., 2003).

U potkana byly oba tyto ERs v nejvyšší míře objeveny v oválných spermatidách, což vede k domněnce, že estrogeny jsou nezbytné v haploidních stádiích spermatogeneze (Bois a kol., 2010). Jiní autoři udávají nejvyšší míru exprese ER α v celé tkáni varlat, a to především v zárodečných buňkách (spermatocyty a kulaté spermatidy) a v Leydigových buňkách (Pelletier a kol., 2000; Mäkinen a kol., 2001; Carreau a kol., 2011b) ER β byl detekován v jádrech Sertoliho buněk (Pelletier a kol., 2000). V nadvarletí byla prokázána přítomnost ER α v epiteliálních buňkách, a to jak v jádře, tak i v cytoplazmě (Zaya a kol. 2012). Ovšem Hess a kol. (2011) uvádí přítomnost ER α v nadvarletí závislou na věku potkana i současnou přítomnost ER α nejvyšší v hlavě a méně v těle a ocase nadvarlete. ER β byl prokázán ve všech částech nadvarlete v podobném zastoupení (Hess a kol., 2011).

U hřebce byl ER α detekován v zárodečných i v Leydigových buňkách, v Sertoliho buňkách jen u předpubertálních hřebčků. ER β je dle výsledků přítomen bez závislosti na věku hřebce v Leydigových i Sertoliho buňkách. Lokalizace tohoto receptoru byla navíc prokázána v zárodečných buňkách, ale jen u předpubertálních hřebčků. V dalších buňkách ve varletí ER β chyběl (Pearl a kol., 2011; Arkoun a kol., 2014). V nadvarletí byla detekce ER α podmíněna podobně jako ve varletní tkáni věkem jedince. Hlava a tělo nadvarlete u předpubertálních samců obsahoval ER α . V ocasu nadvarlete byla přítomnost tohoto receptoru negativní. U samců postpubertálních byl v části hlavy nadvarlete lokalizován ER α , v menší míře potom v těle a v ocase nadvarlete. Bez podmínky věku byl ER β nalezen v celém orgánu nadvarlete (Parlevliet a kol., 2006). V bičíku hřebčích ejakulovaných spermii byly nalezeny obě formy ERs, ER α i ER β (Arkoun a kol., 2014).

3.3.3.2 GPER u jednotlivých savčích druhů včetně člověka

Dalším detekovaným estrogenním receptorem u samců je GPR 30, transmembránový intracelulární estrogenní receptor, známý také jako G-protein coupled estrogen receptor GPER (Rago a kol., 2014). Tento receptor je v membráně zanořen sedmkrát a funguje pravděpodobně jako mediátor rychlých negenomických odpovědí estrogenu v různých typech buněk (Olde a Leebundberg, 2009). Mimo negenomické funkce GPER jsou prokázány v jisté míře i funkce genomické, a to díky jeho schopnosti interagovat společně s ERs (Jacenik a kol., 2016).

Swarzt a kol. (2016) dále uvádějí, že GPER není pouze asociovaný s plazmatickou membránou, ale jeho přítomnost může být spojena také s cytoelem buňky nebo s endoplazmatickým retikulem. Dále bylo potvrzeno, že signální kaskáda GPER zahrnuje i uvolnění intracelulárních vápenatých iontů (Prossnitz a kol., 2008). Což úzce souvisí s kapacitací spermií a akrozomální reakcí a ukazuje na přítomnost GPER ve spermiích (Publicover a kol., 2007). GPER bylo detekováno ve spermiích člověka a prasete (Rago a kol., 2014). V reprodukčních tkáních dospělých prasat nebyla detekce GPER dosud popsána. Velikost tohoto receptoru u prasat činí 368 AMK (Uniprot.org., 31.10. 2016).

Ve tkáních varlat a nadvarlat byl GPER detekován jen u postnatálních kanečků v nadvarletí. Imunolokalizace GPER byla popsána u 6,5 týdnů starých kanečků na řezech těla nadvarlete. GPER byl lokalizován nejvíce v epiteliálních buňkách a méně v buňkách hladkosvalových (Katlaba et al., 2015). U ejakulovaných spermií byla lokalizace prokázána v ekvatoriální části hlavičky, v mitochondriální části bičíku a v akrozomu (Rago a kol., 2014).

U člověka byl GPER detekován hlavně ve spermiích, a to ve střední části bičíku spermie (Rago a kol., 2014). Rago a kol. (2011) pak uvádějí lokalizaci GPER v Leydigových buňkách a Sertoliho buňkách varlete.

U myši bylo prokázáno, že absence GPR 30 (GPER) nezpůsobuje infertilitu. Z čehož lze usoudit, že přítomnost GPR30 nezajišťuje kontrolu nad reprodukčními orgány v závislosti na estrogenu (Carreau a kol., 2011a).

U potkanů byl GPER detekován ve spermatocytech a v kulatých spermatidách (Chimento a kol., 2010; 2011). Dalším místem lokalizace jsou i Sertoliho buňky (Lucas a kol., 2010). V nadvarletí byla exprese GPER nejvyšší v těle a ocase a nižší v hlavě v apikální membráně a v cytoplazmě buněk epitelu (Martínez-Traverso a Pearl, 2015). U myši byla

přítomnost GPER prokázána v zárodečných buňkách v semennotvorném kanálku varlat (Siirianni a kol., 2008).

3.3.4 Funkce estrogenních receptorů

Hess a Carnes (2004) popisují funkci ER α , která zajišťuje pomocí přítomných estrogenů (estradiolu) resorpci tekutiny ve vývodných kanálcích varlete (transport sodných iontů a vody). K tomu dochází před přesunem spermií do hlavy nadvarlete (Hess, 2000, 2003). V případě, že je ER α poškozen, dochází k inhibici reabsorpce tekutiny ve vývodných kanálcích, což může morfologicky poškozovat spermie, a tím snižovat jejich oplozovací schopnost (Hess a Carnes, 2004). Podobně je tomu také u jiných druhů, myš a makak (Schleicher a kol., 1984). V této části nadvarlete dochází nejen stejně jako v těle nadvarlete k reabsorpci tekutin a proteinů, ale i sekreci proteinů, které jsou pak součástí semenné plazmy (Syntin a kol., 1999). Díky přítomným estrogenům je regulována produkce těchto proteinů, které remodelují membránu spermií, iniciují jejich motilitu a interakci mezi spermií a vajíčkem (Pearl a kol., 2007).

Ačkoliv u prasat není objasněna přesná funkce ER β , je známo, že přítomnost LH reguluje jeho funkci. LH a ER β mezi sebou korelují. LH kontroluje diferenciaci v nadvarletí, funkčnost a dozrávání spermií právě díky přítomnosti ER β (Gunawan a kol., 2012).

U genově inaktivovaných myší (tzv. knockout animal models) s ER α KO a ER β KO bylo důsledkem absence estrogenních receptorů prokázáno, že myši ER β KO neměly nijak poškozenou spermatogenezi. Z čehož vyplývá, že přítomnost ER β v tkáni varlete nemá přímý vliv na spermatogenezi (Couse a kol., 1997). Opak tomu byl v případě ER α KO myší, kdy přítomnost estrogenů je pravděpodobně nezbytná pro průběh dozrávání spermií. Tyto myši měly ve svých semennotvorných kanálcích příliš mnoho tekutiny, která způsobila destrukci zárodečných buněk (Eddy a kol., 1996; Hess a kol., 1997). U myší bylo dále zjištěno, že před pohlavní dospělostí zaniká mnoho zárodečných buněk vlivem apoptózy, která je kontrolována několika geny zahrnující i expresi ER β (Delbes a kol., 2004). U křečka *in vivo* aplikace estradiolu přinášela zlepšení motility spermií a současné zvýšení množství gonadotropinů (Jin a kol., 2005). Navíc fytoestrogeny a estrogény fungují u potkanů jako antioxidanty. Je tedy potvrzeno, že estrogény mají zásadní vliv na spermatogenezi u hlodavců (Carreau a kol., 2011a).

U lidí přítomnost ER α zajišťuje kvalitu spermií a plodnost (Suzuki a kol., 2002; Guarducci a kol., 2006; Lazaros a kol., 2010; Safarinejad a kol., 2010). Estradiol podporuje

přežívání zárodečných buněk a motilitu spermií. Navíc díky estrogenům může probíhat správná mitogenní aktivita zárodečných buněk, dozrávání spermatid a zvyšování počtu zárodečných buněk. ERs jsou schopné komunikovat s kanály v buněčné membráně (vápníkový kanál, kalmodulin komplex, NO), což má zřejmě vliv na motilitu a kapacitaci spermií (Carreau a kol., 2011a).

4 Materiál a metodika

4.1 Zpracování reprodukčních orgánů a epididymálních spermií

Vzorky reprodukčních orgánů (varlata, nadvarlata) a epididymálních spermií pocházely od dospělých kanců miniprasat chovaných v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. v Liběchově. Celé orgány byly převezeny na ledu a jejich další manipulace probíhala v laboratoři KVD ČZU. Epididymální spermie byly odsáty pomocí injekční jehly a stříkačky z ocasu nadvarlete. Části nadvarlete (hlava a tělo) byly nastříhány na malé kousky do 20 ml roztoku PBS (Phosphate-buffered saline, Sigma-Aldrich, USA) a inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 30 minut. Poté byly filtrací přes gázu odstraněny zbytky tkáně a získána tak suspenze spermií. Pro další zpracování spermií byl použit promývací roztok PBS. V tomto roztoku byly spermie centrifugovány 2x po dobu 10 minut při 250 x g.

Po zpracování částí orgánů a spermií byly tyto preparáty využity k imunochemickým metodám detekce pomocí specifických protilátek. Z tkání byly připraveny parafinové řezy a kryořezy. Tyto preparáty byly využity k morfologickému barvení a detekci ERs pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie. Spermie byly zpracovány vlhkou fixací a dále použity k detekci ERs nepřímou imunofluorescenční mikroskopií.

4.2 Seznam použitých protilátek

4.2.1 Primární protilátky

ER α _M: Monoklonální myší protilátka proti ER α (C-311): sc-787, proti aminokyselinám 495-595 bovinního proteinu, Santa Cruz, USA

ER β _M: Monoklonální myší protilátka proti ER β (1531): sc-53494, proti aminokyselinám 256-505 lidského proteinu, Santa Cruz, USA

ER α _R: Polyklonální králičí protilátka proti ER α (HC-20): sc-543, proti C- konci aminokyselinové sekvence lidského proteinu, Santa Cruz, USA

ER β _G: Polyklonální kozí protilátka proti ER β (L-20): sc-6822, proti oblasti v blízkosti C- konce aminokyselinové sekvence lidského proteinu, Santa Cruz, USA

GPER_R: Polyklonální králičí protilátka proti GPR30 (H-300): sc-134576, proti aminokyselinám 76-375 lidského proteinu, Santa Cruz, USA.

G-19_R: Polyklonální králičí protilátka proti GPR30 (K-19-R): sc- 48524-R, proti vnitřní části aminokyselinové sekvence lidského proteinu.

Wt1: Polyklonální králičí protilátka proti Wt1 (Wilms tumor gene) (C-19): sc-192, proti C-koncové aminokyselinové sekvenci lidského proteinu Wt1 specificky exprimovanému v Sertoliho buňkách (Wang a kol., 2013), Santa Cruz, USA

Ki-67: Monoklonální králičí protilátka proti Ki-67 (SP6) (MA5-14520), pro vizualizaci jaderného proteinu Ki -67 ve spermatogoniích (Steger a kol., 1998), Thermo Fisher, USA

VEGF: Monoklonální myší protilátka proti VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (C-1): sc-7269 proti aminokyselinové sekvenci 1-140 lidského proteinu, pro vizualizaci meiotických buněk (Guo a kol., 2004), Santa Cruz, USA

4.2.2 Sekundární protilátky

Anti-M (anti-mouse): Kozí protilátka proti myším IgG (celá molekula) konjugovaná s FITC, Sigma-Aldrich, USA

Anti-R (anti-rabbit): Kozí protilátka proti králičím IgG (celá molekula) konjugovaná s FITC, Sigma-Aldrich, USA

Anti-G (anti-goat): Kozí protilátka proti kozím IgG (H+L) konjugovaná s FITC, Merck Millipore, Německo

Anti-M_A (anti-mouse): Oslí protilátka proti myším IgG (H+L), Alexa Fluor 555, Invitrogen, USA

Anti-R_A (anti-rabbit): Oslí protilátka proti myším IgG (H+L), Alexa Fluor 555, Invitrogen, USA

4.3 Příprava parafinových řezů - histologické preparáty

4.3.1 Parafinové bločky odvodnění a prosycení vzorku intermédiem

Tkáně varlat a nadvarlat byly fixovány v 10 % formolu po dobu 24 hodin. Následně byly tkáně nakrájeny na kostky (1 cm³), které byly popsány jako T (*testes*), E1 (*caput*), E2 (*corpus*), E3 (*cauda*). Po fixaci ve formolu byly tkáně propláchnuty v košíčkách v tekoucí vodě.

Před zalitím vzorků do parafínu byly tkáně odvodněny a prosyceny intermédiem. Odvodnění sloužilo k odstranění vody z tkání. Voda je tímto způsobem nahrazena samotným odvodňovacím médiem. K tomuto účelu byla využita metoda vzestupné alkoholové (etanolové) řady: 70 %, 80 % a 2x 96 %. Tkáně procházející alkoholovou řadou byly ponechány v jednotlivých lázních vždy po dobu 1 hodiny.

Po lázních alkoholu byly tkáně postupně vkládány do lázní s obsahem toluenu. Toluén slouží jako náhrada za alkohol, neboť alkohol se nemísí se zalévacím médiem nerozpustným ve vodě (parafín). Lázně toluenu byly tři, přičemž v poslední lázni byl toluén mísen v poměru 1:1 s xylenem. V prvních dvou lázních setrvaly tkáně po dobu 40 minut, v poslední lázni 30 minut. Poslední dvě lázně obsahovaly pouze xylen. Doba fixace v těchto lázních byla 30 minut. Tím byla ukončena vzestupná alkoholová řada. Voda z tkání byla nahrazena intermédiem (toluén a xylen).

Finálním krokem bylo zalití tkání do parafínu. Každý kousek tkáně byl vložen do speciální komůrky. Takto připravený preparát byl následně zalit tekutým parafínem (52-58 °C). Zalití parafínem probíhalo dvakrát. Po prvním zalití s odstupem 4 hodin následovalo druhé zalití parafínem. Vytvrzení druhého zalití probíhalo při pokojové teplotě po dobu 8 hodin. Výsledkem byly parafínové bločky, které byly řádně popsány jako T (*testes*), E1 (*caput*), E2 (*corpus*), E3 (*cauda*) a skladovány při pokojové teplotě.

4.3.2 Krájení

Bločky byly krájeny na rotačním mikrotomu (prototyp BD-RM70, Čína). Před samotným krájením byly jednotlivé bločky přilepeny na dřevěnou podložku. Na podložku bylo nakapáno několik kapek tekutého parafínu. Následně byl na připravenou podložku přiložen bloček tkáně zalitý parafínem. Po vytvrzení parafínu byl horkým skalpelem celý bloček upraven. Takto připravené bločky byly po dobu 1-2 hodin temperovány v lednici, čímž parafín zcela vychladl a lépe se krájel.

Připravené a vytemperované bločky byly následně zamontovány do samotného mikrotomu a krájeny na řezy o tloušťce řezu 5-7 μm . Jednotlivé řezy byly nejprve nataženy ve studené vodě a následně lepeny na skla, která byla potřena vrstvou glycerin-bílek. Napínání a sušení řezů na sklech probíhalo na výhřevných deskách o teplotě 55 °C. Po usušení takovýchto preparátů probíhalo samotné barvení hematoxylin-eosin.

4.3.3 Barvení hematoxylin-eosin

Prvním krokem barvení bylo odparafinování. Připravená skla s nalepenými parafinovými řezy se vložila do lázní s xylenem. Tyto lázně byly dvě a v každé lázni setrvaly preparáty po dobu 5 minut. Poté následovaly 3 lázně s alkoholovou řadou: 2x 96 % a pak 70 %. V těchto lázních taktéž setrvaly preparáty vždy 5 minut. Posledním krokem odparafinování byla rehydratace destilovanou vodou. Rehydratace probíhala ve dvou lázních a doba každé lázně preparátů činila 5 minut.

Po odparafinování probíhalo samotné barvení preparátů hematoxylinem (10 minut). Poté se preparáty postupně opláchly vodou, kyselým alkoholem (96 ml 70 % etanol + 0,1 ml HCl) a opět vodou. Po oplachu preparátů následovala lázeň ve vodě po dobu 10 minut, až do zmodrání jader. Preparáty byly následně opláchnuty destilovanou vodou a vloženy do lázně s eosinem na dobu 5 minut. Nakonec byly preparáty opláchnuty destilovanou vodou.

Po obarvení procházely preparáty ještě alkoholovou řadou o koncentraci: 70 % a 2x 96 %. V těchto třech lázních byly preparáty jen opláchnuty.

V předposledním kroku se preparáty vkládaly do dvou lázní s karboxylenem (175 ml xylen + 50 ml karboxylová kyselina) a dvou lázní s xylenem. Zde se podobně jako v předchozím kroku preparáty jen opláchly. Po lázních v xylenu došlo k projasnění preparátů.

Posledním krokem bylo montování preparátů. Preparáty byly natřeny kanadským balzámem a překryty krycím sklem. Takto připravené preparáty byly dále skladovány při pokojové teplotě v krabičkách. Následně byl pod mikroskopem Nikon Eclipse E 600 zhodnocen stav těchto histologických preparátů.

4.4 Příprava kryořezů

Tkáně varlat a nadvarlat byly nakrájeny na kostky (1 cm³). Kostky tkání byly dále vkládány do formiček a zality gelovým přípravkem TissueTek (OCT Compound for Cryostat Sectioning, Austrálie). Takto připravené tkáně (bločky) byly zamrazeny v tekutém dusíku a uskladněny až do zpracování při teplotě -80 °C. Každý bloček byl popsán jako T (*testes*), E1 (*caput epididymis*), E2 (*corpus epididymis*), E3 (*cauda epididymis*).

Zpracování zamražených tkání (bločeků) probíhalo na přístroji Cryo-cut (Leica, Biocev, Vestec) po předchozí temperaci přístroje (1 hodina, -20 °C). Do komory Cryo-cut se postupně vkládaly jednotlivé bločky s tkáněmi, kde se 30 minut temperovaly spolu se skly. Poté se pomocí TissueTek bločky lepily na podložku. Na podložce se každý připravený

preparát upravil jednoduchým ořezem. Zhotovené preparáty se postupně vkládaly do rámečku před žiletkou. Tloušťka kryorezů dosahovala dle typu tkáně od 6 do 8 μm . Každý řez byl nalepen na vytemperované podložní sklo. Hotová skla s řezy byla dále skladována v mrazáku při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Preparáty kryorezů byly použity v nepřímé imunofluorescenční mikroskopii k detekci ERs pomocí specifických protilátek.

4.4.1 Barvení kryorezů hematoxylin-eosin

Připravené preparáty se postupně opláchly vodou, kyselým alkoholem (96 ml 70 % etanol + 0,1 ml HCl) a opět vodou. Po oplachu preparátů následovala lázeň ve vodě po dobu 10 minut, až do zmodrání jader. Preparáty byly následně opláchnuty destilovanou vodou a vloženy do lázně s eosinem na dobu 5 minut. Nakonec byly preparáty opláchnuty destilovanou vodou.

Po obarvení procházely preparáty ještě alkoholovou řadou o koncentraci: 70 % a 2x 96 %. V těchto třech lázních byly preparáty jen opláchnuty.

V předposledním kroku se preparáty vkládaly do dvou lázní s karboxylenem (175 ml xylen + 50 ml karboxylová kyselina) a dvou lázní s xylenem. Zde se podobně jako v předchozím kroku preparáty jen opláchly. Po lázních v xylenu došlo k projasnění preparátů.

Posledním krokem bylo montování preparátů. Preparáty byly natřeny kanadským balzámem a překryty krycím sklem. Takto připravené preparáty byly dále skladovány při pokojové teplotě v krabičkách. Následně byl pod mikroskopem Nikon Eclipse E 600 zhodnocen stav těchto histologických preparátů.

4.5 Nepřímá imunofluorescence na kryorezech, detekce ERs

4.5.1 Lokalizace ERs v tkáni varlete a nadvarlete

Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie byla využita k detekci ERs pomocí specifických protilátek na kryorezech varlat (*testes* T) a nadvarlat (*epididymis*; E1: *caput*, E2: *corpus*, E3: *cauda*). Na každém sklu byly většinou 4 řezy preparátů ohraničené speciální fixou (Sigma-Aldrich). Skla byla řádně popsána, a to i včetně schématu nanesení jednotlivých protilátek.

Po temperaci kryorezů byla skla omyta v PBS (Phosphate-buffered saline, Sigma-Aldrich, USA) v kyvetě na třepačce 5 minut. V kyvetě probíhala následná fixace kryorezů pomocí vymraženého acetonu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. Po fixaci byla všechna skla omyta

v PBS v kyvetě na třepačce 3x 5 minut. Omytá skla byla dále blokována SuperBlock médiem (ThermoFisher) v kyvetě 30 minut. Poté byl proveden oplach skel kádinkou s PBS. Následovala inkubace primárních protilátek ředěných v poměru 1:50 nebo 1:100 v PBS. Použité protilátky: ER α _M, ER α _R, ER β _M, ER β , ER β _G, G-19_R, GPER_R. Na každý preparát bylo napipetováno množství 50 μ l. Každá protilátka byla po 2 řezech na sklu ohraničené fixem. Jako kontroly (KO_M, KO_R, KO_G) byly použity řezy inkubované bez primární protilátky pouze s PBS, nanесeny vždy na jeden ohraničený řez na sklu. Inkubace skel probíhala přes noc ve vlhké komůrce v lednici (4 °C). Následující den po inkubaci byla skla omyta 2x 5 minut v kyvetě s PBS na třepačce. Poté byly na skla nanесeny sekundární protilátky značené fluorescein isothiokyanátem (FITC) v množství 50 μ l ředěné v PBS: anti-rabbit (R) 1:500, anti-mouse (M) 1:300, anti-goat (G) 1:500. Inkubace probíhala ve tmě v lednici (4 °C) po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byla skla omyta v PBS v kyvetě 3x 5 minut a 5 minut destilovanou vodou na třepačce ve tmě. Po osušení skel proběhlo zamontování pomocí Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, USA). Tím je prodloužena doba imunofluorescence preparátů a současně označena jaderná DNA. Negativní kontroly byly inkubovány jen se sekundární protilátkou. Na skla byla přiložena krycí sklíčka a bylo provedeno vyhodnocení imunofluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E 600. Nafocení preparátů bylo provedeno pomocí kamery (Nikon Digital Sight DS-Fi 1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements.

4.5.2 Detekce jednotlivých typů testikulárních buněk

Nepřímá imunofluorescenční mikroskopie byla využita k detekci jednotlivých typů buněk (Sertoliho buňky, spermatocyty a spermatogonie) pomocí specifických protilátek na kryorezech varlat (*testes*, T). Na každém sklu byly většinou 3 řezy preparátů ohraničené speciální fixou. Skla byla řádně popsána, a to i včetně schématu nanесení jednotlivých protilátek.

Skla byla temperována na laboratorní teplotu a řezy poté fixovány v kyvetě ve vymraženém (-20 °C) acetonu:metanolu (1:1) po dobu 10 minut. Po fixaci byla skla omyta 3x 5 minut v kyvetě v PBS na třepačce. Poté byla skla blokována po dobu 30 minut při pokojové teplotě, na každý řez bylo nanесeno 100 μ l blokačního činidla SuperBlock (ThermoFischer). Následovalo omytí skel pomocí PBS. Na řezy byly nanесeny primární protilátky ředěné v PBS v množství 50 μ l. Použité primární protilátky byly: Wt1 králičí polyklonální protilátka, ředění 1:50 (značí Sertoliho buňky), VEGF myši monoklonální protilátka, ředění 1:100 (značí

cytoplazmu spermatocytů), Ki-67 králičí monoklonální protilátka, ředění 1:25 (značí spermatogonie). Pro negativní kontroly bylo použito jen PBS. Inkubace těchto protilátek proběhla ve vlhké komůrce v lednici (4 °C) přes noc. Následující den byla skla omyta v PBS v kyvetě 2x 5 minut na třepačce. Poté byly na řezy nanесeny sekundární protilátky anti-R_A (anti-rabbit) a anti-M_A (anti-mouse) značené Alexa Fluor 555 v ředění 1:300. Inkubace těchto protilátek probíhala ve vlhké komůrce v lednici (4 °C) ve tmě po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byla skla omyta 3x 5 minut v PBS a 1x 5 minut v destilované vodě v kyvetě na třepačce ve tmě. Po osušení skel proběhlo zamontování pomocí Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, USA). Na skla byla přiložena krycí sklíčka. Vyhodnocení bylo provedeno imunofluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E 600. Fotografie preparátů byly nafoceny pomocí kamery (Nikon Digital Sight DS-Fi 1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements.

4.5.3 Lokalizace ERs spolu s detekcí jednotlivých typů testikulárních buněk

Pro detekci ERs a jednotlivých typů buněk *testes* byla využita také nepřímá imunofluorescenční mikroskopie. Na každém sklu byly zracovány vždy 3 řezy a skla byla popsána.

Skla byla vyjmuta z mrazáku a následně temperována, řezy byly ohraničeny speciálním fixem. Poté byla vytemperovaná skla fixována ve vymraženém (-20°C) roztoku aceton:metanol (1:1) po dobu 10 minut. Po fixaci byla skla omyta 3x 5 minut v PBS v kyvetě na třepačce. Poté byla skla blokována 30 minut pomocí SuperBlock (ThermoFischer). SuperBlock byl nakapán v množství 100 µl přímo na řezy *testes*. Po inkubaci byl SuperBlock ze skel setřepán a skla byla omyta PBS. Následovalo nanесení primárních protilátek proti ERs v množství 50 µl na řez. Ředění jednotlivých primárních protilátek v PBS bylo následovné: ERβ_M (1: 50), ERα_R (1: 50), G-19_R (1: 100). Skla s těmito primárními protilátkami byla inkubována po dobu 4 hodin v termostatu při 37 °C ve vlhké komůrce. Na kontroly bylo nanесeno jen PBS v množství 50 µl. Po inkubaci byla skla opláchnuta pomocí PBS a osušena. Po osušení skel byly nanесeny primární protilátky značící jednotlivé buňky. Poměr a ředění v PBS bylo následovné: Wt1 (1:50), Ki67 (1:25), VEGF (1:100). Inkubace probíhala přes noc při 4°C ve vlhké komůrce. Na kontroly bylo nanесeno jen PBS. Další den byla skla promyta 3x 5 minut v PBS a osušena. V následujícím kroku byly na skla aplikovány sekundární protilátky konjugované s FITC ředěné v PBS: anti-mouse (1:300), anti-rabbit (1:500). Inkubace probíhala po dobu 1 hodiny v lednici při 4°C ve tmě ve vlhké komůrce (všechny

řezy včetně kontrol). Po inkubaci byla skla opláchnuta PBS a osušena. Na osušená skla byly nanášeny sekundární protilátky anti-M_A (1:500) a anti-R_A (1:800) konjugované s Alexa Fluor 555 ředěné v PBS. Inkubace těchto protilátek na sklech proběhla v lednici po dobu 1 hodiny při 4 °C ve tmě ve vlhké komůrce (všechny řezy včetně kontrol). Po inkubaci byla skla promyta 3x 5 minut PBS v kyvetě na třepačce ve tmě a poté opláchnuta destilovanou vodou a osušena. Po osušení skel proběhlo zamontování pomocí Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, USA). Na skla byla přiložena krycí sklíčka. Vyhodnocení bylo provedeno imunofluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E 600. Fotografie preparátů byly nafoceny pomocí kamery (Nikon Digital Sight DS-Fi 1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements.

4.6 Nepřímá fluorescenční mikroskopie na epididymálních spermích

4.6.1 Zpracování preparátů spermíí vlhkou fixací

Suspenze spermíí izolované z jednotlivých částí epididymu byly zpracovány metodou vlhké fixace vymraženým acetonem:metanolem (1:1). Na podložní sklo byla nakapána suspenze spermíí v PBS (cca 10⁶ buněk) v objemu 20 µl do kroužku nakresleného speciálním fixem. Do kroužku se suspenzí spermíí byl dále nakapán roztok směsi aceton:metanol (poměr 1:1) v množství 50 µl. Následovala inkubace po dobu 5 minut. Poté byla skla opláchnuta pomocí PBS. Nakonec se skla se vzorky nechala zaschnout. Skladování skel probíhalo v lednici při 4 °C.

4.6.2 Lokalizace estrogenních receptorů v epididymálních spermích

Pro lokalizaci estrogenních receptorů ve spermích byla využita nepřímá imunofluorescenční mikroskopie s pomocí monoklonálních a polyklonálních komerčních protilátek proti estrogenním receptorům. Specifické sekundární protilátky byly značené fluorescein isothiokyanátem (FITC).

Epididymální spermie z části hlavy těla i ocasu nadvarlete (E1, E2, E3) fixované vlhkou fixací na sklech byly v kyvetách blokovány médiem SuperBlock (Thermo Fisher) po dobu 30 minut. Následně byla skla opláchnuta PBS. Na skla byly nanášeny primární protilátky v množství 100 µl (ER_{αM}, ER_{αR}, ER_{βM}, ER_{βG}, GPER_R, G-19_R - ředěny 1:100 v PBS). U negativních kontrol byly primární protilátky nahrazeny PBS. Inkubace probíhala přes noc v lednici (4 °C) ve vlhké komůrce. Po inkubaci byla skla promyta v PBS v kyvetě, a to 2x

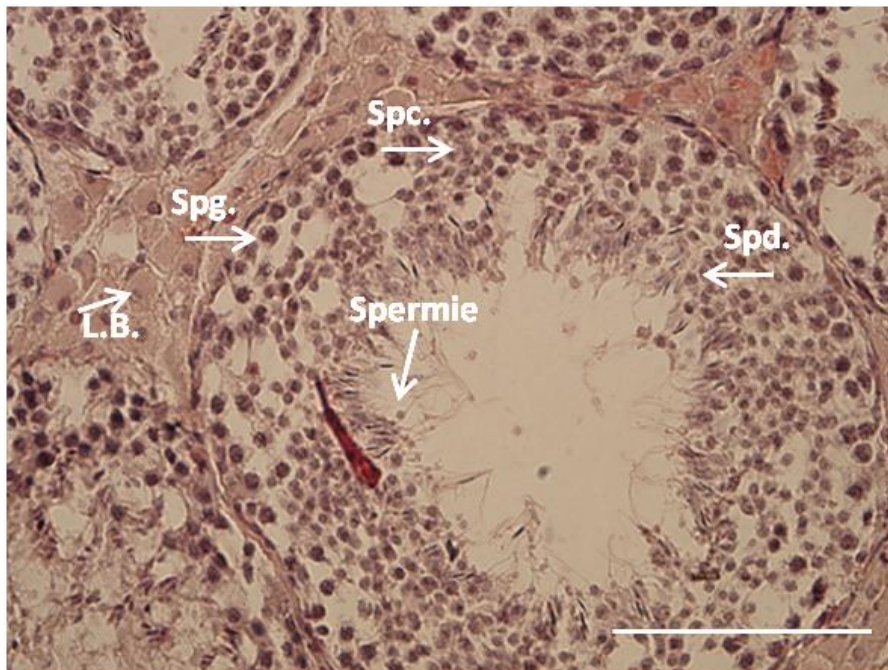
po dobu 5 minut na třepačce. Následně probíhala aplikace sekundární protilátky značené FITC (anti-R 1:500, anti-M 1:300, anti-G 1:500 v PBS) v objemu 100 μ l. Negativní kontroly byly značené jen sekundární protilátkou. Inkubace probíhala po dobu 1 hodiny v lednici ve tmě při 4 °C. Poté byla skla omyta v PBS 3x 5 minut v kyvetě ve tmě na třepačce a následně propláchnuta destilovanou vodou. Po osušení skel byl na řez aplikován roztok PNA značeného rhodaminem v PBS ředěný 1:300. Schopnost vazby PNA na sacharidové struktury přítomné na vnější akrozomální membráně nám posloužila ke zjištění integrity akrozomu. Doba inkubace řezů s PNA dosahovala 30 minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě ve tmě. Poté byla skla omyta v PBS 3x 5 minut v kyvetě ve tmě na třepačce a následně propláchnuta destilovanou vodou v kyvetě 5 minut na třepačce ve tmě. Po usušení skel probíhalo zamontování preparátů pomocí Vectashield s DAPI (Vector Laboratories, USA). Tím byla prodloužena doba imunofluorescence preparátů a současně označena jaderná DNA. Na skla byla přiložena krycí sklíčka. Vyhodnocení bylo provedeno imunofluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse E 600. Nafocení preparátů bylo provedeno pomocí kamery (Nikon Digital Sight DS-Fi 1, Japonsko) a softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements.

5 Výsledky

5.1 Morfologie tkání

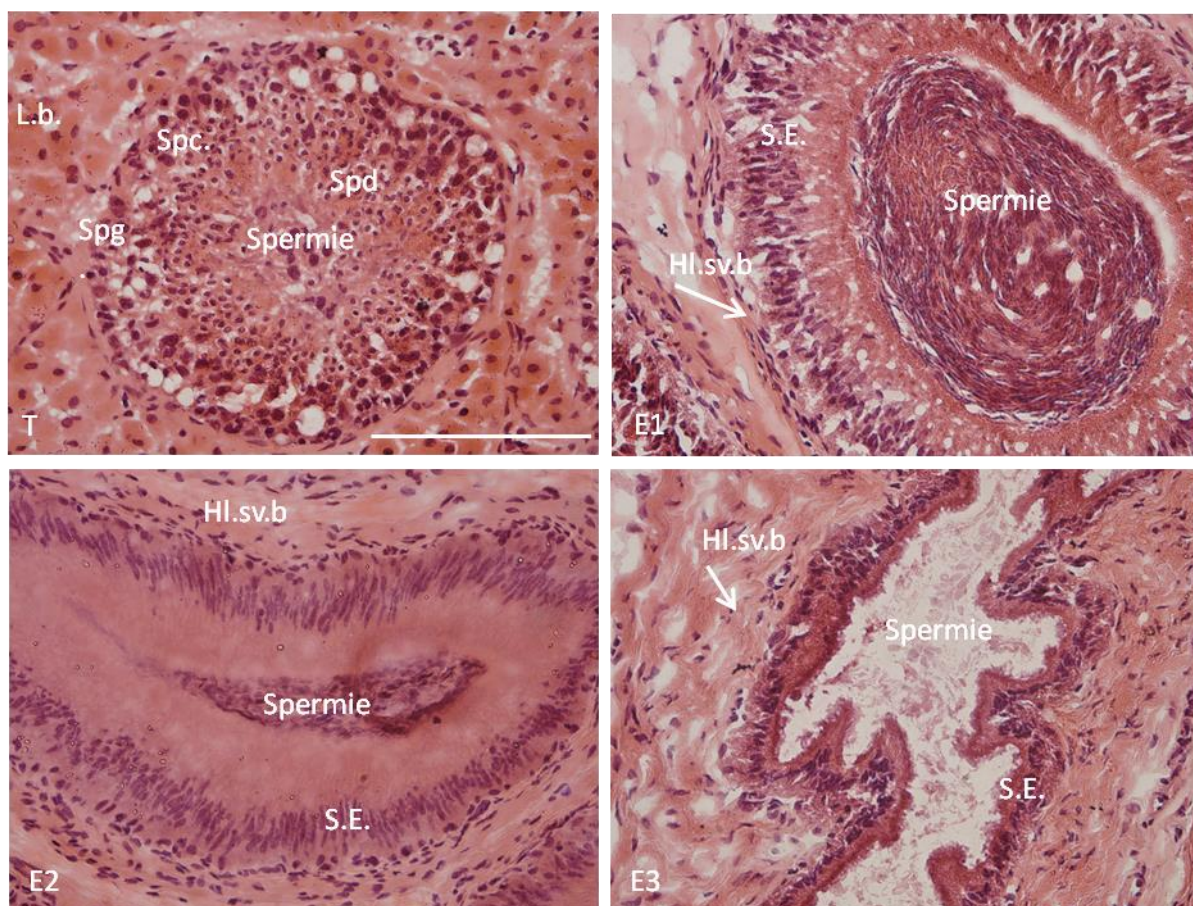
Za účelem rozpoznání spermatických a somatických buněk ve tkáních varlat (testes) a nadvarlat (epididymu) byly připraveny parafínové řezy obarvené metodou barvení hematoxylin-eosin (kap. 4.3.3.).

Na obrázku 5.1 je příklad parafínového řezu varlat (testes). Na obrázku jsou zřetelně patrné jednotlivé spermatické buňky: spermatogonie, spermatocyty, spermatidy a spermie, včetně buněk Leydigových v intersticiu. Spermie v řezu testes soustředěné uprostřed lumen svými bičíky směřují do středu semenotvorného kanálku varlete. Směrem k bazální membráně kanálku jsou jasně patrná jednotlivá vývojová stadia spermatických buněk: spermatidy (Spd.), spermatocyty (Spc.) a spermatogonie (Spg). Spermie jsou malé a kulovité, některé spermatidy jsou již oválné a prodloužené. Spermatocyty jsou velké kulovité buňky. Spermatogonie leží při bazální membráně semenotvorného kanálku. V intersticiu se nacházejí Leydigovy buňky s jádrem a větším množstvím cytoplazmy. Parafínové řezy epididymu nejsou zahrnuty ve výsledcích, a to z důvodu špatného zobrazení jednotlivých buněk. Řezy z částí této tkáně byly velmi křehké, což mělo za následek poškození tkáňových struktur již během krájení parafínových bločků.



Obr. 5.1: Parafínový řez testes (barvení hematoxylin-eosin); L.B. Leydigovy buňky, Spg. spermatogonie, Spc. spermatocyty, Spd. spermatidy; měřítko 100 μm ; zvětšení 400x

Na obrázku 5.2 jsou snímky kryořezů varlat a částí nadvarlat: hlava (E1), tělo (E2), ocas (E3). Tyto tkáně byly podobně jako tkáně fixované parafínem obarveny barvicí metodou hematoxylin-eosin (kap. 4.4.1). Výsledky tohoto barvení jsou o něco lepší než výsledky barvení parafínových řezů. Jednotlivé buněčné struktury jsou lépe probarveny a celková vizualizace těchto řezů byla proto úspěšnější. Obrázek T zobrazuje strukturu *testes*. Na tomto snímku jsou velmi dobře patrné jednotlivé spermatické buňky – spermatogonie (Spg.), spermatocyty (Spc.), spermatidy (Spd.) a spermie a také buňky intersticiální Leydigovy s dobře patrným jádrem. Na obr. E1-E3 jsou postupně zobrazeny jednotlivé části epididymu – hlava (E1), tělo (E2) a ocas (E3). V obrázcích jsou jasně viditelné struktury jednotlivých buněk. Spermie ležící uprostřed lumen jsou obklopeny membránou sekrečního epitelu. V sekrečním epitelu jsou viditelná jádra sekrečních buněk. Intersticiium tvoří viditelné hladkosvalové buňky s jasně probarvenými jádry.

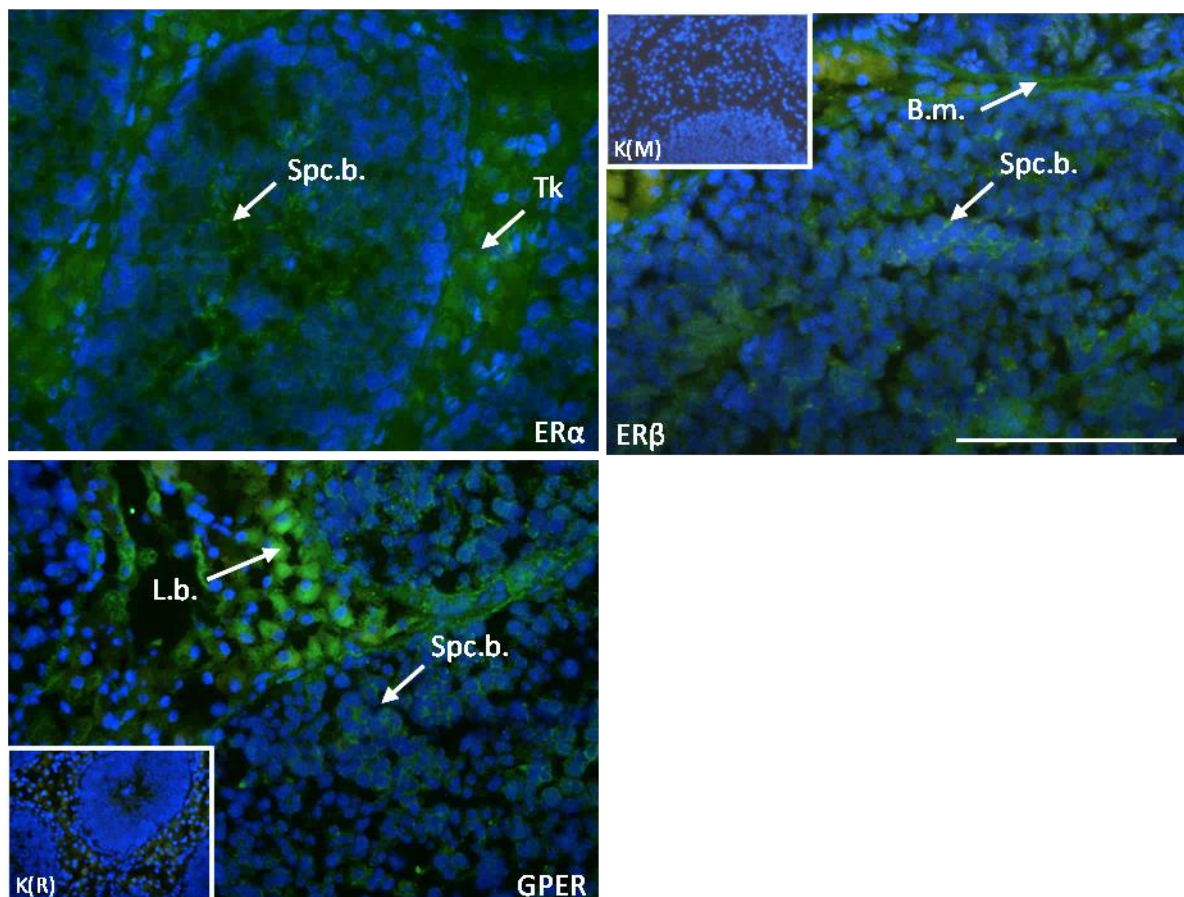


Obr. 5.2: Morfologie tkání testes (T) a hlavních částí epididymu (E1, E2, E3) na kryořezech (barvení hematoxylin-eosin): L.b. Leydigovy buňky, Spg. spermatogonie, Spc. spermatocyty, Spd. spermatidy, spermie; Hl.sv.b. hladkosvalové buňky, S.E. sekreční epitel; měřítko 100 μ m, zvětšení 400x.

5.2 Lokalizace estrogenních receptorů v tkáni varlete

Pro detekci ERs v reprodukčních tkáních prasete byla použita metoda nepřímé imunofluorescenční mikroskopie s použitím kryořezů (kap. 4.5.1). Byly použity primární protilátky s různou specifitou řaděné v PBS. Protilátky, které značily ERs ve tkáni byly $ER\alpha_R$, $ER\beta_M$, G-19_R. Protilátky, které na řezech neznačily ERs byly $ER\alpha_G$, $ER\alpha_M$, $ER\beta_G$, GPER_R.

V obrázku 5.3 je vložena série snímků lokalizace ERs v testes. Modře jsou značena jádra pomocí DAPI a šipky značí detekované estrogenní receptory (FITC, zeleně). Na prvním snímku ($ER\alpha$) je řez s použitou protilátkou $ER\alpha_R$. Šipky označují místa s lokalizací $ER\alpha$. Protilátka značila spermatické buňky (Scp.b.) uvnitř lumen semenotvorného kanálku a také tkáň (Tk) s pravděpodobným značením cytoplazmy Leydových buněk. Druhým snímkem ze série je řez s lokalizovaným $ER\beta$ s použitou protilátkou $ER\beta_M$. Šipky značí lokalizaci $ER\beta$ v bazální membráně (B.m.) semenotvorného kanálku a také ve spermatických buňkách (Scp.b.). Na třetím obrázku je detekce GPER s použitou protilátkou G-19_R. Lokalizace GPER označená šipkami byla nalezena v cytoplazmě Leydigových buněk (L.b.) a také v buňkách spermatických (Scp.b.) Jako negativní kontrola pro protilátky anti- $ER\alpha_R$ a anti-G-19_R (GPER) byla použita sekundární protilátka proti králíčím IgG (anti-R). Snímek je vložen do rohu obrázku GPER a označen jako K(R). Negativní kontrola pro protilátku anti- $ER\beta_M$ (sekundární protilátka anti-M) je vložena v rohu tohoto snímku s označením K(M).

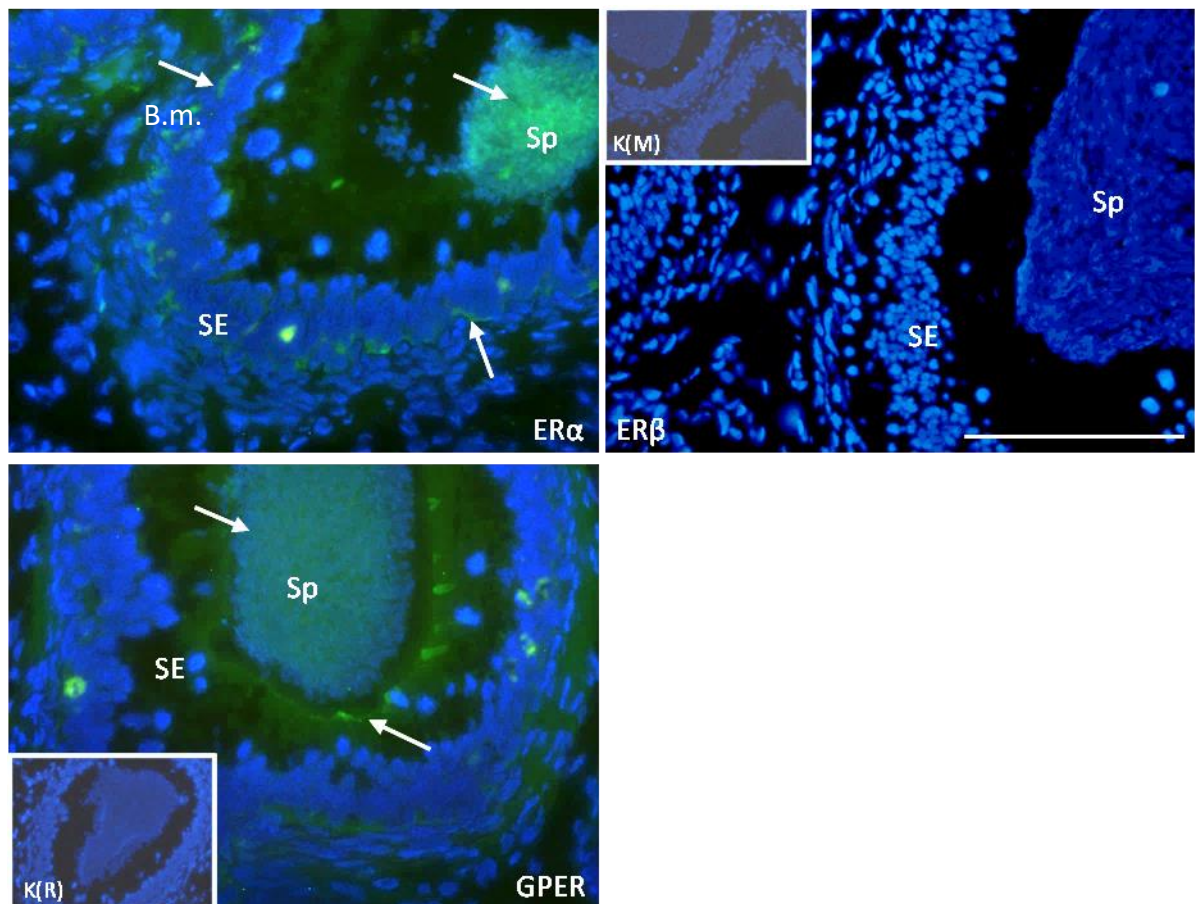


Obr. 5.3: Lokalizace ERs v tkáni testes: $ER\alpha$: šipky značí detekci receptoru $ER\alpha$ v místě spermatických buněk (Spc.b.) a v tkáni (Tk); $ER\beta$: šipky značí detekci receptoru v bazální membráně (B.m.) a ve spermatických buňkách (Spc.b.); GPER: šipky značí detekci receptoru v Leydigových buňkách (L.b.) a spermatických buňkách (Spc.b.); K(R) negativní kontrola pro protilátky G-19_R a $ER\alpha_R$, K(M) negativní kontrola pro anti- $ER\beta_M$; pozitivní reakce zeleně (FITC), jádra buněk odře (DAPI); měřítko 100 μm , zvětšení 400x.

5.3 Lokalizace estrogenních receptorů v tkáni nadvarlete

Na obrázku 5.4 jsou zobrazeny řezy epididymu části E1 (hlava, *caput*) s jednotlivě lokalizovanými estrogenními receptory. $ER\alpha$ zobrazuje řez s imunolokalizací pomocí protilátky $ER\alpha_R$. V místě šipek jsou označena místa s lokalizací $ER\alpha$ zeleně (FITC). Protilátka značila spermie a bazální membránu (B.m.). Modře jsou zobrazena jádra buněk značené DAPI. Detekce $ER\beta$ s použitou protilátkou $ER\beta_M$ byla na řezu této části epididymu negativní. Na posledním obrázku lokalizace GPER pomocí protilátky G-19_R viditelná ve spermiích (Sp) a v sekrečním epitelu (SE). Negativní kontroly jsou vloženy do rohu obrázků. Jako negativní kontrola pro protilátky anti- $ER\alpha_R$ a anti-G-19_R (GPER) byla použita sekundární protilátka

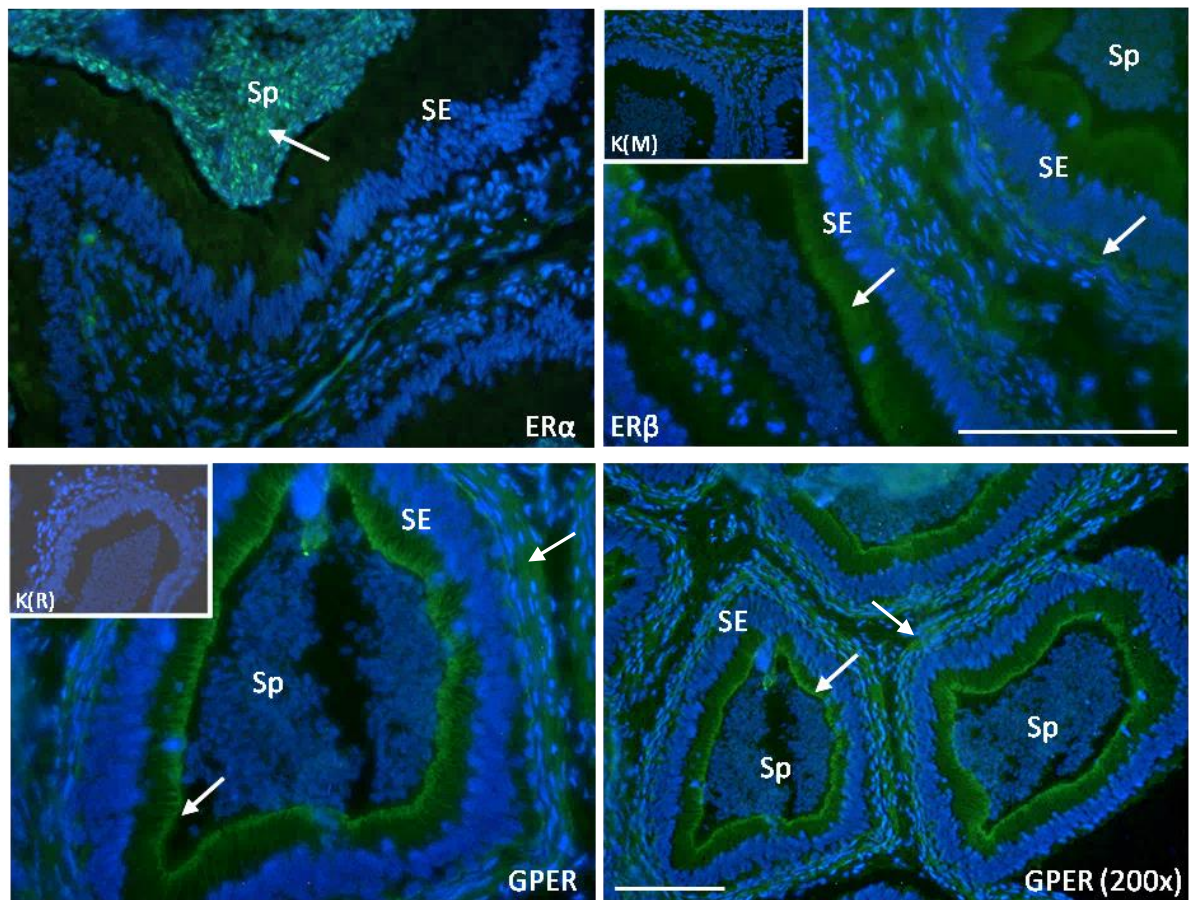
proti králičím IgG (anti-R). Snímek je označen jako K(R). Negativní kontrola pro protilátku anti-ER β _M (sekundární protilátka anti-M) je vložena v rohu tohoto snímku s označením K(M).



Obr. 5.4: Lokalizace ERs v tkáni epididymu (caput – E1): ER α : šipky značí detekci receptoru ER α v místě bazální membrány (B.m.) a spermií (Sp); ER β : detekce receptoru v sekrečním epitelu (SE) a spermiích (Sp); GPER: šipky značí detekci receptoru GPER v místě sekrečního epitelu (SE) a ve spermiích (Sp); K(R) negativní kontrola pro protilátky G-19_R a ER α _R, K(M) negativní kontrola pro anti-ER β _M; pozitivní reakce zeleně (FITC), jádra buněk odře (DAPI); měřítko 100 μ m, zvětšení 400x.

Na obrázku. 5.5 je ukázána série fotografií s řezy z části epididymu E2 (tělo, corpus) s použitými jednotlivými protilátkami. Obrázek ER α zobrazuje řez s použitou protilátkou ER α _R. Lokalizace ER α (FITC zeleně) byla prokázána pouze na spermiích (Sp) v lumen epididymálního kanálku a velmi slabě v tkáni epididymu. Jádra buněk jsou značena DAPI (modře). Na dalším obrázku ER β je ukázáno značení pomocí protilátky ER β _M, která detekovala cytoplazmu sekrečního epitelu (SE) a bazální membránu (šipky). Negativní kontrola pro protilátku anti-ER β _M (sekundární protilátka anti-M) je vložena v rohu tohoto snímku s označením K(M). Na třetím obrázku GPER z této série je značení protilátkou G-19_R.

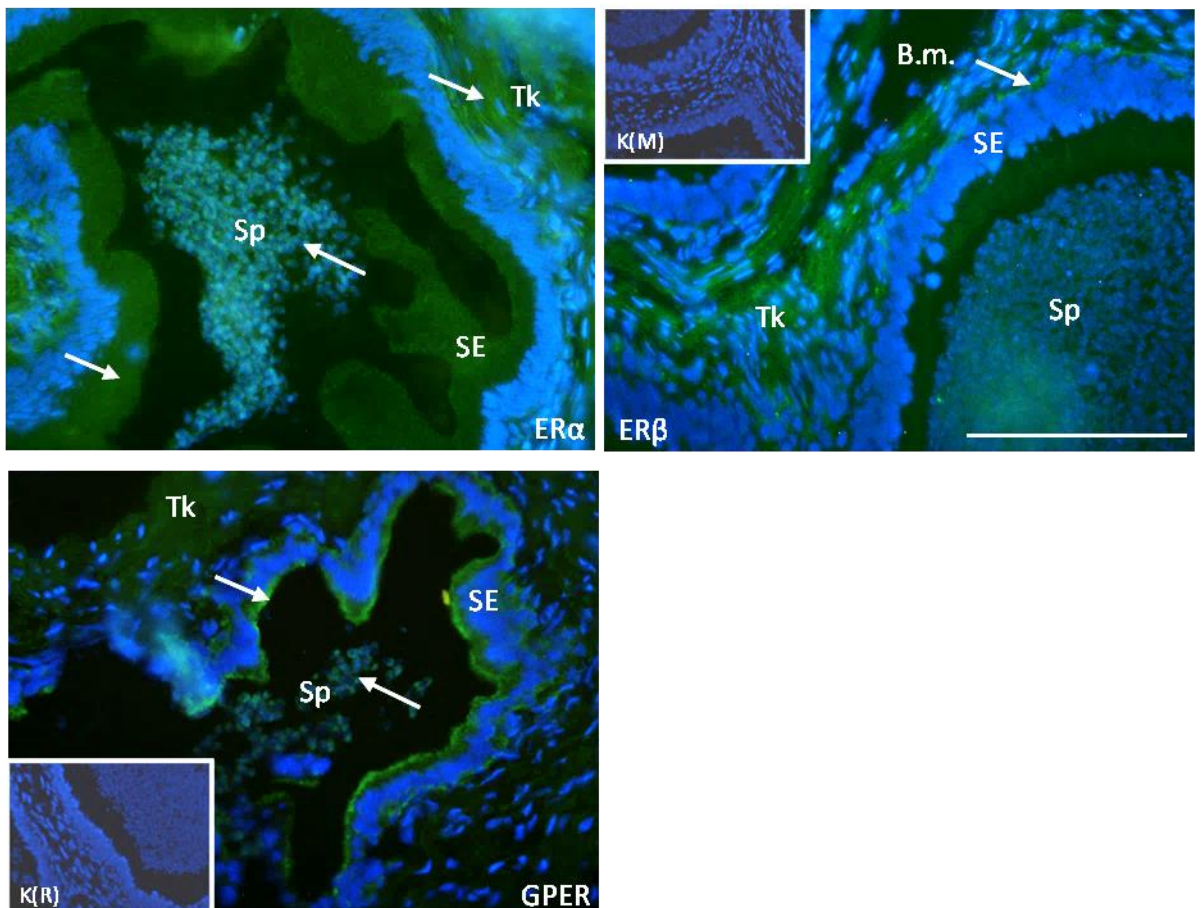
Šipka ukazuje lokalizaci GPER v membráně sekrečního epitelu (SE) a je viditelná i slabá reakce v tkáni nadvarlete. Na čtvrtém snímku ze série GPER(200x) je zobrazen řez E2 s detekcí GPER při zvětšení 200x. V tomto obrázku je patrné značení protilátky G-19_R v sekrečním epitelu (SE) těla nadvarlete. Spermie v lumen kanálků nejsou viditelně značeny. Jako negativní kontrola pro protilátky anti-ER α _R a anti-G-19_R (GPER) byla použita sekundární protilátka proti králičím IgG (anti-R). Snímek je vložen do rohu obrázku GPER a označen jako K(R).



Obr. 5.5: Lokalizace ERs v tkáni epididymu (corpus – E2): ER α : šipka značí detekci receptoru ER α v místě spermii (Sp), sekreční epitel (SE) je negativní; ER β : šipky značí detekci receptoru ER β v cytoplasmě sekrečního epitelu (SE) a v tkáni, spermie (Sp) jsou negativní; GPER: šipky značí detekci receptoru GPER v membráně sekrečního epitelu (SE) a v tkáni, spermie (Sp) jsou negativní; K(R) negativní kontrola pro protilátky G-19_R a ER α _R, K(M) negativní kontrola pro anti-ER β _M; měřítko 100 μ m, zvětšení 400x; GPER (200x): šipky značí lokalizaci receptoru GPER v membráně sekrečního epitelu (SE) a v tkáni; měřítko 50 μ m, zvětšení 200x; pozitivní reakce zeleně (FITC), jádra buněk odře (DAPI).

Na obrázku 5.6 je vložena série fotografií s řezy epididymu E3 (ocas, cauda) s použitými jednotlivými protilátkami. Obrázek ER α zobrazuje řez části epididymu s použitou

protilátkou $ER\alpha_R$. Šipky ukazují značení $ER\alpha_R$ na spermích (Sp) v lumen epididymálního kanálku, v cytoplazmě sekrečního epitelu (SE) a také v tkáni (Tk) kolem kanálku. Na dalším obrázku $ER\beta$ je zobrazeno značení pomocí protilátky $ER\beta_M$. Šipka označuje imunolokaci $ER\beta$ v bazální membráně (B.m.), reakce s protilátkou byla pozitivní také v hladkosvalových buňkách takáně (Tk) a ve spermích (Sp). Negativní kontrola pro protilátku anti- $ER\beta_M$ (sekundární protilátka anti-M) je vložena v rohu tohoto snímku s označením K(M). Na posledním snímku GPER z této série je značení protilátkou G-19_R. Šipka ukazuje lokalizaci GPER v membráně sekrečního epitelu (SE) a detekci na spermích (Sp). Jako negativní kontrola pro protilátky anti- $ER\alpha_R$ a anti-G-19_R (GPER) byla použita sekundární protilátka proti králíčím IgG (anti-R). Snímek je vložena do rohu obrázku GPER a označen jako K(R).



Obr.: 5.6: Lokalizace ERs v tkáni epididymu (cauda – E3): $ER\alpha$: šipky značí detekci receptoru $ER\alpha$ v místě spermí (Sp), sekreční epitel (SE), tkáň (Tk); $ER\beta$: šipka značí detekci receptoru $ER\beta$ v místě bazální membrány (B.m.), sekreční epitel (SE) je negativní; GPER: šipky značí detekci receptoru GPER v membráně sekrečního epitelu (SE) a ve spermích (Sp); K(R) negativní kontrola pro protilátky G-19_R a $ER\alpha_R$, K(M) negativní kontrola pro anti- $ER\beta_M$; měřítko 100 μ m, zvětšení 400x;

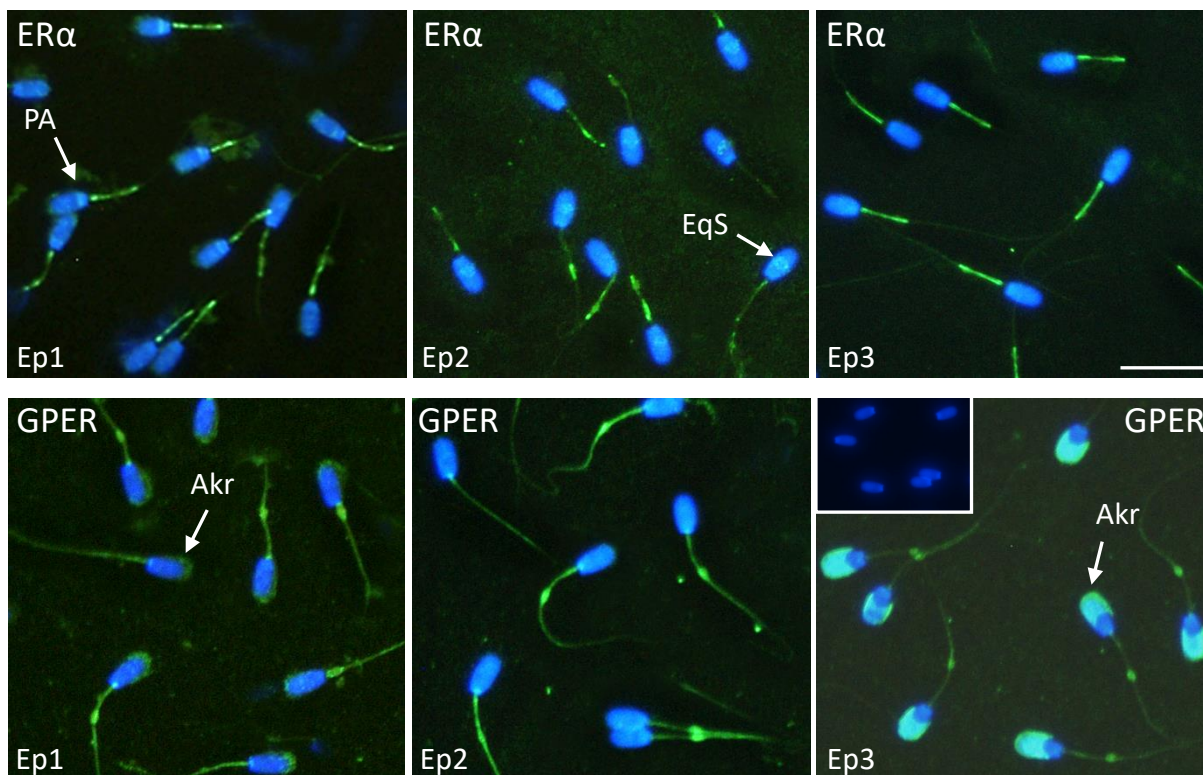
5.3.1 Lokalizace ERs spolu s detekcí jednotlivých typů testikulárních buněk

Výsledky duálního značení a detekce jednotlivých spermatických buněk nejsou uvedeny z důvodů nedostatečně optimalizované metodiky (kap. 4.5.3) značení vývojových stádií pomocí protilátek. Zvolené protilátky byly pravděpodobně nevhodné pro spermatické buňky prasete. Výsledky značení byly nespecifické patrně z důvodu nesprávného ředění sekundárních protilátek konjugovaných s Alexa Fluor 555.

5.4 Lokalizace estrogenních receptorů v epididymálních spermiiích

Výsledky detekce ERs v epididymálních spermiiích jsou ukázány na následujících sériích snímků (obr. 5.7), pro lepší přehlednost zde nejsou zařazeny obrázky se značením akrozomu pomocí lektinu PNA, kterým byla detekována jejich integrita. Imunolokalizace byla provedena dle metodiky (kap. 4.6.2) pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie. Snímky mají označení Ep1 (spermie z části hlavy nadvarlete), Ep2 (spermie z části těla nadvarlete) a Ep3 (spermie z části ocasu nadvarlete). Použité protilátky pro imunolokaci v epididymálních spermiiích byly: ER α _R a G-19_R. Protilátky ER α _M, ER β _M, ER β _G a GPER_R neznačily.

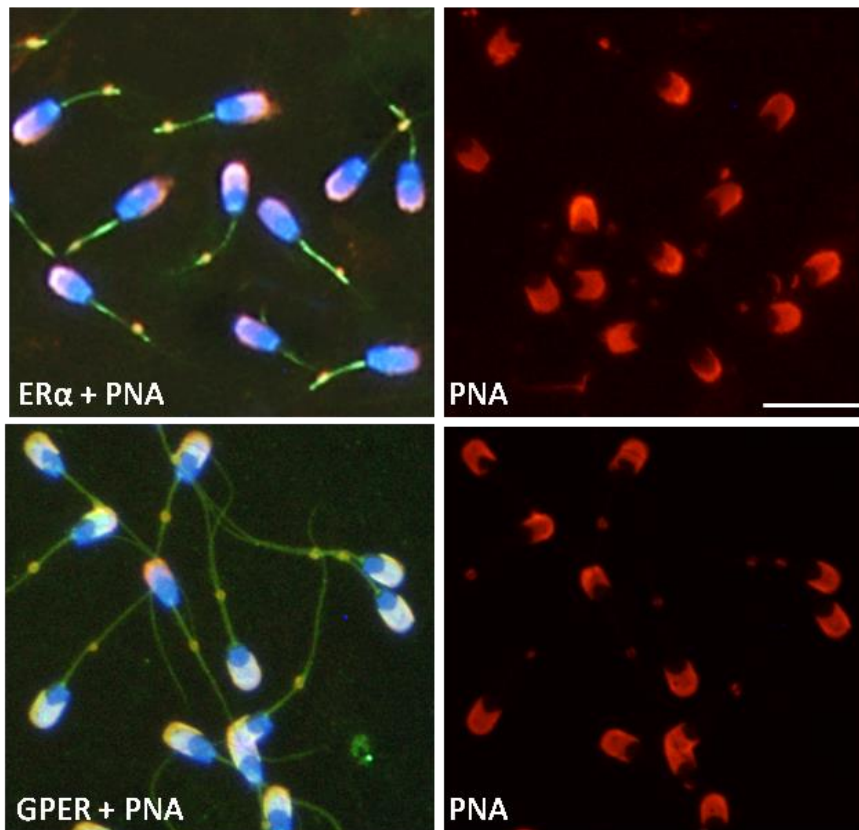
V první řadě snímků (obr. 5.7) je vložena detekce ER α na spermiiích izolovaných z jednotlivých částí epididymu. Na prvním snímku jsou spermie z hlavy nadvarlete (Ep1). ER α byl viditelně detekován ve střední části bičíku, šipka pak značí slabší reakci s protilátkou ER α _R v postakrozomální oblasti hlavičky spermii (PA). Na spermiiích z těla nadvarlete (Ep2) je patrná lokalizace ER α ve střední části bičíku spermii a šipkou je označena slabá reakce v ekvatoriálním segmentu (EqS) na hlavičce spermii. Na posledním snímku spermii Ep3 z těla nadvarlete je detekce ER α viditelná pouze ve střední části bičíku. Další sérií snímků je ukázána lokalizace GPER ve spermiiích z různých částí epididymu. Použitou protilátkou byla G-19_R. Snímek Ep1 značí slabé difuzní značení GPER v akrozomu, dále jeho detekci v bičíku s výraznějším značením v cytoplazmatických kapkách. Snímek Ep2, spermie z těla nadvarlete, ukazuje značení GPER v bičíku. Poslední snímek ze série Ep3 označuje místo lokalizace GPER v akrozomu a slabší reakce s protilátkou je pak viditelná v bičíku. Snímek negativní kontroly je vložena ve snímku Ep3. Jako negativní kontrola pro protilátky anti-ER α _R a anti-G-19_R (GPER) byla použita sekundární protilátka proti králičím IgG (anti-R). Snímek je



současně negativní kontrolou pro všechny obrázky s epididymálními spermii. Celkově tedy GPER značí u Ep1 a Ep2 především bičík zatímco Ep3 značí včetně bičíku i akrozom těchto spermii.

Obr. 5.7: Lokalizace ERs (ER α a GPER) ve spermii izolovaných z různých částí nadvarlete (Ep1 – hlava, Ep2 – tělo, Ep3 – ocas), šipky značí pozitivní reakci s protilátkou (FITC, zeleně), jádra jsou označena DAPI (modře); PA postakrozomální regionu, EqS ekvatoriální segment, Ak akrozom; měřítko 10 μ m, zvětšení 400x

Obrázek 5.8 ukazuje vybrané snímky s detekcí ER α a GPER v epididymálních spermii izolovaných z ocasu nadvarlete pomocí protilátky ER α _R a G-19_R se současným značením nepoškozených akrosomů pomocí lektinu PNA (kap. 4.6.2). Na prvním snímku (ER α + PNA) je zobrazena lokalizace ER α společně se značením PNA v akrozomu spermii. Snímek odpovídá obrázku 5.7 označenému Ep3 (ER α), jen je navíc ukázána integrita akrozomu. Detekce ER α je viditelná ve střední části bičíku spermii. Druhý snímek ukazuje pouze značení intaktních akrosomů pomocí PNA ve spermii. Na třetím snímku je zobrazena detekce GPER a vazba PNA (GPER + PNA) v epididymálních spermii. Snímek odpovídá obrázku 5.7 označenému Ep3 (GPER). GPER byl jasně lokalizován v akrozomu a bičíku spermie, PNA značí nepoškozený akrozom. Na čtvrtém snímku jsou vidět neporušené akrozomy epididymálních spermii značené pomocí PNA.



Obr. 5.8: Lokalizace ERs (ER α a GPER) ve spermích z ocasu nadvarlete spolu s detekcí integrity akrozomu pomocí PNA (rhodamin, červeně), pozitivní reakce s protilátkou zeleně (FITC), jádra buněk modře (DAPI); měřítko 10 μ m, zvětšení 400x.

6 Diskuze

Přirozené estrogény stejně tak jako estrogenní látky z životního prostředí působí na organismus prostřednictvím estrogenních receptorů (ERs). ERs byly nalezeny nejen v buňkách samičího, ale také samčího reprodukčního traktu. Byl popsán vliv estrogenních látek jak na samčí reprodukční tkáň, tak na vývoj spermií. Detekce a lokalizace ERs v samčím reprodukčním traktu a spermiích je proto nezbytná pro pochopení účinku estrogenních látek ať už endogenních, nebo těch z vnějšího prostředí na reprodukční proces.

Zaměřili jsme se na detekci ERs tkáni varlete a nadvarlete u prasat a také na jejich lokalizaci ve spermatických buňkách během jejich vývoje a zrání. Přímý vliv estrogenních látek na spermie je klíčovým v jejich správném vývoji. Reprodukce prasat je významným ekonomickým aspektem, navíc organismus prasete slouží jako dobrý experimentální model.

První informace o lokalizaci ERs ve tkáni varlat popisuje Rago a kol. (2004). Bylo zjištěno odlišné zastoupení ERs u prasat dle jejich věku. Konkrétně u nedospělých kanců (věk 3 měsíce) byla detekce ER α negativní, zatímco detekce ER β byla pozitivní ve spermatogoniích, v peritubulárních svalových buňkách a Leydigových buňkách. U dospělých kanců (věk 18 měsíců) byla imunodetekcí potvrzena lokalizace ER α hlavně ve spermatogoniích a ve spermatocytech. ER β byl u této věkové kategorie detekován silně pozitivně ve spermatocytech. Nicméně publikované informace o lokalizaci ERs jsou často velmi rozdílné. Například Gunawan a kol. (2011) uvádí detekci ER α pouze v cytoplazmě Sertoliho buněk. ER β lokalizoval Gunawan a kol. (2012) v cytoplazmě Leydigových i Sertoliho buněk a slabě také v zárodečných buňkách. Důvod odlišného zastoupení těchto ERs může být v metodikách. S čím úzce souvisí i výběr primárních protilátek a jejich širší specifity proti ERs.

Také funkce ERs není s naprostou přesností v současné době zjištěna. Přesto Hess a Carnes (2004) a Schleicher a kol. (1984) popisují funkce ER α u prasat, která díky hormonálnímu působení estrogenu umožňuje resorpci tekutiny ve vývodných kanálcích varlete. V těchto vývodných kanálcích dochází k transportu sodných iontů a vody. K tomu dochází před přesunem testikulárních spermií do části hlavy nadvarlete (Hess, 2000, 2003). Absence ER α způsobuje narušení resorpce tekutiny ve vývodných kanálcích, což způsobuje poškození spermií a narušuje tak oplozovací schopnost těchto spermií (Hess a Carnes, 2004). Funkce ER β prozatím u prasat není zcela vysvětlena. Nicméně u myši bylo zjištěno, že mezi geny které zajišťují fyziologický zánik zárodečných buněk (apoptóza) patří i gen s expresí ER β (Delbes a kol., 2004). Na druhou stranu Couse a kol. (1997) uvádějí, že u ER β KO myši

nebyla zjištěna změna ve spermatogenezi. Proto je funkce ER β v pohlavním traktu samců i nadále spekulativní. Informací o detekci GPER ve tkáních prasat je velmi málo. Jediným autorem, který tento transmembránový receptor lokalizoval, byl Kadleba a kol. (2015). Jeho výsledky obsahují informace o imunodetekci GPER ve tkáni nadvarlete z části *corpus* u prasat (věk 6,5 týdne). Proto je v této práci kladen důraz na detekci GPER pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie ve tkáních a taktéž v epididymálních spermích. Ve spermích prasat byl GPER dekován pouze jedním autorským kolektivem (Rago a kol., 2014), a to pouze ve spermích ejakulovaných.

Využili jsme metodu barvení hematoxylin-eosin na parafinových řezech a kryorezech pro zobrazení jednotlivých buněčných struktur ve tkáni varlete a nadvarlete prasete. Přípravené histologické kryorezy byly využity v dalších metodických postupech. Provedení této metody sloužilo pro orientaci v lokalizaci buněk a pro správné určení jednotlivých typů buněk spermatických i somatických.

Imunolokalizace estrogenních receptorů (ERs) ukázala v buňkách varlat a nadvarlat jednotlivá zastoupení těchto receptorů. Naše výsledky ukazují místa lokalizace ER α ve tkáni varlat ve spermatických buňkách uvnitř lumen semenotvorného kanálku a taktéž ve tkáni kolem semenotvorného kanálku s pravděpodobným značením cytoplazmy v Leydigových buňkách. Gunawan a kol. (2011) detekovali pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie ER α v řezu testes v cytoplazmě Sertoliho buněk, slabě potom v zárodečných buňkách a velmi slabě v Leydigových buňkách. Nicméně značení v Sertoliho buňkách není zcela jednoznačné (Gunawan a kol., 2011). Rago a kol. (2004) využívali k detekci ER α ve tkáni varlat metodu imunoperoxidového barvení. Používali specifickou monoklononální protilátku proti části proteinu (570-595 AMK) v C-terminální doméně lidského ER α (F-10, Santa Cruz). Jejich výsledky ukazují jednoznačnou imunolokalizaci ER α v Sertoliho buňkách a ve spermatidách (Rago a kol., 2004).

V hlavě nadvarlete jsme detekovali ER α v bazální membráně a ve spermích v lumen epididymálního kanálu, což je ve shodě s výsledky Gunawan a kol. (2011). V těle nadvarlete byl ER α detekován v sekrečním epitelu a také ve spermích v lumen podobně jako u Gunawan a kol. (2011). Jejich výsledky navíc uvádějí místa detekce ER α ještě v epitelu. V ocasu nadvarlete byl ER α detekován na spermích v lumen kanálku, v sekrečním epitelu a ve tkáni. Gunawan a kol. (2011) uvádějí podobné výsledky detekce v epitelu a ve spermích a navíc v hojně míře v hladkosvalových buňkách. V naší metodice i v metodice Gunawan a kol. (2011) byla pro detekci ER α použita polyklonální protilátka proti C-konci aminokyselinové sekvence lidského proteinu (sc-543, Santa Cruz). Poněkud odlišné výsledky detekce ER α

publikovali Pearl a kol., 2007. Jejich použitá polyklonální protilátka proti myšimu proteinu ER α nerozpoznávala tento receptor v kančích epididymálních spermích v kanálku na řezech, ale pouze v sekrečním epitelu (hlava, tělo, ocas), bazálních buňkách (tělo) a v hladko-svalových buňkách (hlava) (Pearl a kol., 2007).

ER α jsme detekovali také v epididymálních spermích izolovaných z kanálku jednotlivých částí nadvarlete. Naše výsledky ukazují, že ER α je lokalizován především ve střední části bičíku epididymální spermie. Ve spermích izolovaných z jednotlivých částí epididymu byla nalezena slabší detekce ER α také v postakrozomálním regionu hlavičky spermie z části hlavy nadvarlete a v ekvatoriálním segmentu v epididymální spermie z části těla nadvarlete. Gunawan a kol. (2011) se zaměřil na detekci tohoto receptoru pouze ve spermích uvnitř kanálku na řezu jednotlivých částí epididymu, a to z části ocasu, kde byla viditelná lokalizace v postakrozomálním segmentu a části bičíku spermie. Rago a kol. (2007) detekovali ER α pouze na ejakulovaných spermích ve střední části bičíku a slabě v části koncové. Naše výsledky detekce ER α v epididymálních spermích jsou tedy ojedinělé.

ER β byl detekován pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie ve tkáni varlete v bazální membráně semenotvorného kanálku a ve spermatických buňkách, u kterých nebylo prokazatelné stádium vývoje. Gunawan a kol. (2012) popsali detekci ER β v zárodečných buňkách, především ve spermatogoniích, v primárních spermatocytech a ve spermatidách na řezech testes metodou nepřímé imunofluorescenční mikroskopie. Nicméně na snímcích ve zmíněné publikaci nejsou rozpoznatelná stádia jednotlivých spermatických buněk v semenotvorném kanálku a není jasné, zda nejsou značeny také Sertoliho buňky. Avšak detekce ER β v bazální membráně semenotvorného kanálku byla v tomto prokazatelně negativní. Naše použitá protilátka byla monoklonální primární protilátka ER β_M specifická proti aminokyselinám 256-505 lidského proteinu (sc-53494, Santa Cruz). Gunawan a kol. (2012) použily pro účel detekce tohoto receptoru polyklonální kozí primární protilátku proti C-terminální doméně lidského proteinu, která je pravděpodobně silnější, ale méně specifická oproti monoklonální primární protilátce ER β_M použité v naší metodice. Je tedy možné, že protilátka ER β_G mohla označit i místa s lokalizací ER α , neboť podobnost mezi receptory ER α a ER β je v DNA-vázací a ligand-vázací doméně až 80 % (databáze BLAST).

Rago a kol. (2004) detekovali ER β imunoperoxidázovým barvením u dospělých prasat ve spermatogoniích, ve spermatocytech a také v peritubulárních myoidních buňkách. Negativní detekce byla prokázána v Sertoliho a Leydigových buňkách a ve spermatidách. Pro účely detekce použili monoklonální protilátku proti lidskému proteinu (MCA1974, Serotec).

Výsledky Gunawan a kol. (2012) a Rago (2004) se shodují v případě detekce ER β ve spermatogoniích a primárních spermatocytech. Naše výsledky korespondují s výsledky obou autorů v případě detekce ve spermatických buňkách, ale nebyli jsme schopni určit jejich přesné vývojové stádium.

V části hlavy nadvarlete se nám ER β nepodařil detekovat. Použitá protilátka byla opět monoklonální protilátka ER β proti aminokyselinám 256-505 lidského proteinu (sc-53494, Santa Cruz). Gunawan a kol. (2012) dokládají své výsledky detekce pomocí kozí polyklonální protilátky ER β v této části nadvarlete v epitelu. Vzhledem k výběru polyklonální protilátky mohlo dojít k označení i ER α již z výše uvedených důvodů. Ovšem Carpino a kol. (2004) zvolili k detekci monoklonální protilátku ER β vyrobená proti celému lidskému proteinu (MCA1974, Serotec). U dospělých prasat byla popsána detekce ER β silně pozitivní ve tkáni, slabší v sekrečním epitelu a v hladkosvalových buňkách. Výsledky se s Gunawan a kol. (2012) shodují v detekci v epitelu hlavy nadvarlete spolu s Carpino a kol. (2004). Naše výsledky ukázaly lokalizaci ER β v těle nadvarlete v sekrečním epitelu a bazální membráně kanálku. Detekce ve spermích nebyla jednoznačná. Gunawan a kol. (2012) detekovali pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie ER β v epitelu a ve spermích v lumen epididymu. Carpino a kol. (2004) detekovali pomocí monoklonální protilátky ER β v těle nadvarlete dospělých prasat ve tkáni, slaběji pak v epitelu a ve hladkosvalových buňkách. Výsledky detekce ER β se mezi autory a našimi výsledky liší pravděpodobně vzhledem k použitým protilátkám, které mají rozdílnou specifitu. V ocase nadvarlete jsme našli detekci ER β v bazální membráně kanálku, v hladkosvalových buňkách a spermích. Carpino a kol. (2004) detekovali pomocí imunoperoxidázového barvení ER β u dospělých prasat ve tkáni, slaběji v epitelu a ve hladkosvalových buňkách. Gunawan a kol. (2012) popsali lokalizaci ER β v sekrečním epitelu ocasu nadvarlete a ve spermích. Výsledky detekce jsou u ostatních autorů a i v našem případě odlišné, a to pravděpodobně vzhledem k výběru a specifitě protilátek stejně jako v předchozích případech.

Imunolokace ER β na epididymálních spermích izolovaných z kanálků všech třech částí nadvarlete pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie byla negativní. Gunawan a kol. (2012) popsali lokalizaci ER β v akrozomu spermí v kanálku na řezu těla nadvarlete, nicméně značení v řezu není zcela zřetelné. Rago a kol. (2007) detekovali přítomnost ER β v akrozomu ejakulovaných spermí. Oba autorské kolektivy používali k detekci polyklonální protilátky, na rozdíl od námi použité monoklonální protilátky (sc-53494, Santa Cruz), u které nemuselo být zvoleno vhodné ředění pro značení ER β na roztěrech epididymálních spermí.

Detekce GPER transmembránového receptoru v reprodukčních tkáních dospělých kanců nebyla dosud publikována. Naše výsledky ukazují detekci tohoto receptoru jak ve tkáních varlat, nadvarlat tak v epididymálních spermích izolovaných z kanálku nadvarlete během epididymální maturace spermíí. Použitou protilátkou byla polyklonální G-19 proti vnitřní části aminokyselinové sekvence lidského proteinu bez konkrétní specifikace (Santa Cruz). GPER byl ve tkáni varlete detekován v Leydigových buňkách a také ve spermatických buňkách. V části hlavy nadvarlete byl GPER detekován ve spermích v lumen epididymu a v membráně sekrečních buněk, stejně jako v těle nadvarlete. Katleba a kol. (2015) jako jediný autor detekoval GPER u prasat (věk 6,5 týdne) ve tkáni těla nadvarlete. Místa imunolokalizace GPER byl epitel a méně potom hladkosvalové buňky. V ocasu nadvarlete jsme detekovali GPER v sekrečním epitelu a ve spermích v lumen epididymálního kanálku.

Detekce GPER v epididymálních spermích izolovaných z kanálku nadvarlete (hlava, tělo, ocas) pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie prokázaly přítomnost GPER v různé intenzitě. Značení GPER v epididymálních spermích z části hlavy nadvarlete pomocí polyklonální protilátky G-19 (Santa Cruz) bylo slabé (difúzní) v akrozomu spermie a silnější v bičíku s výrazným značením v cytoplazmatických kapkách. Imunolokalizace GPER na epididymálních spermích z části těla nadvarlete byla pozitivní v celém bičíku těchto spermíí. V epididymálních spermích z části ocasu nadvarlete byl GPER lokalizován jednoznačně v akrozomu a v bičíku. Rago a kol. (2014) detekovali pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie místa GPER na ejakulovaných spermích ve střední části bičíku spermie, dále pak na hlavičce v ekvatoriálním segmentu a v akrozomu. Výsledky Rago a kol. (2014) na ejakulovaných spermích a naše výsledky spermíí izolovaných z epididymu se do jisté shodují. Což by mohlo znamenat, že během epididymální maturace je GPER přítomný bez význačné změny až do stádia zralých spermíí v různých částech bičíku a především v akrozomu. Je známo, že během epididymální maturace spermíí prochází spermie řadou změn, které vedou k jejich oplozovací schopnosti. Mezi tyto změny, patří exprese proteinů v epididymu. Přítomnost těchto proteinů se liší v jednotlivých částech epididymu. Koncentrace proteinů je vysoká mezi přechodech z hlavy do těla nadvarlete (Dacheux a kol., 2012). Tyto proteiny se pravděpodobně vážou na plazmatickou membránu epididymálních spermíí a mohou tak zakrývat místa s GPER, což by mohlo mít za následek slabé nebo negativní značení protilátkami, jako v případě slabé detekce GPER v akrozomu spermíí z hlavy nadvarlete nebo neaktivní reakce z těla nadvarlete. Naopak v ocasu nadvarlete některé z těchto proteinů z povrchu spermíí odchází (Belleannee a kol., 2011), což znamená, že na plazmatické membráně mohou být opět odkryty epitopy pro vazbu použitých protilátek. Další

možností zůstává fakt, že může během post-testikulární maturace spermií v epididymu docházet ke změně exprese GPER ve spermii. K potvrzení tohoto předpokladu by bylo nutné detekovat GPER na úrovni mRNA přímo ve spermiích z různých částí epididymálního kanálku. Naše výsledky vůbec poprvé potvrdily přítomnost GPER v epididymálních spermiích prasete.

Otázkou zůstává samotná detekce ERs ve spermiích a jejich přesná lokalizace ve spermatické buňce. Možnost negenomického mechanismu působení estrogenních látek přes ERs v plazmatické membráně spermií zůstává stále nedořešena. Napomoci by mohla cílená extrakce proteinů z různých částí spermatické buňky a detekce jednotlivých typů ERs. Některé studie vedou k domněnce, že by i klasické jaderné subtypy ($ER\alpha$ a $ER\beta$) mohly být přítomné ve fosfolipidové vrstvě a účastnit se například kapacity či akrozomální reakce spermií (Schwartz a kol., 2016; Ded a kol, 2010).

7 Závěr

Detekce jednotlivých estrogenních receptorů pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie prokázala odlišné zastoupení jednotlivých receptorů ve varlatech, v různých částech nadvarlat a v epididymálních spermiích prasete. Ve varlatech byly pomocí specifických protilátek označeny místa imunolokalizace ER α ve spermatických buňkách uvnitř lumen semenotvorného kanálku a ve tkáni. ER β byl lokalizován ve spermatických buňkách a v bazální membráně semenotvorného kanálku. GPER byl detekován v Leydigových buňkách a ve spermatických buňkách. Lokalizace jednotlivých ERs byla prokázána ve spermatických buňkách a současně s různým zastoupením ERs v somatických buňkách varlete. V nadvarletí je zastoupení ERs různé. ER α byl detekován ve spermiích a v bazální membráně kanálku části hlavy a také ve tkáni v ocase nadvarlete. Výsledky detekce ER β byly negativní v hlavě nadvarlete, zatímco v těle nadvarlete byl ER β nalezen v sekrečním epitelu a v ocasu nadvarlete v bazální membráně kanálku. Imunolokalizace GPER byla jako první detekována v celém nadvarletí ve spermiích a v sekrečním epitelu. Podrobná detekce ERs v epididymálních spermiích prokázala ER α především v bičíku. ER β nebyl detekován, zatímco GPER byl detekován v bičíku a také v akrozomu. Přítomnost ERs v jednotlivém zastoupení dle části orgánu má patrně vliv na maturaci spermií. Hypotéza o detekci různých forem ERs v odlišných fázích vývoje spermatických buněk byla potvrzena.

8 Seznam použité literatury

- Acconcia, F., Kumar, R. 2006. Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer Letters*. 238(1). 1-14.
- Acconcia, F., Bocedi, A., Ascenzi, P., Marino, M. 2003. Does palmitoylation target estrogen receptors to plasma membrane caveolae? *Life*. 55. 33-35.
- Alberts, B., Bray, D, Johnson, A. 1998. *Základy buněčné biologie*. 1. vydání. Ústí nad Labem. Espero Publishing. p.630 . ISBN 80-902906-0-4.
- Aquila, S., De Amicis, F. 2014. Steroid receptors and their ligands: Effect on male gamete functions. A review. *Experimental Cell Research*. 328. 303-313.
- Aquila, S., Sisci, D., Gentile, M.E., Carpino, A., Middea, E., Catalano, S., Rago, V., Ando, S. 2003. Towards a physiological role for cytochrome P450 aromatase in ejaculated human sperm. *Human Reproduction*. 18. 1650-1659.
- Aquila, S., Sisci, D., Gentile, M., Middea, E., Catalano, S., Carpino, A., Ando, S. 2004. Estrogen receptor (ER) α and ER β are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 89(3). 1443-1451.
- Aquila, S., Gentile, M., Middea, E., Catalano, S., Andò, S. 2005. Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. *Endocrinology*. 146(2). 552-557.
- Arkoun, B., Gautier, G., Delalande, Ch., Barrier-Battut, I., Guénon, I., Goux, D., Bouraïma-Lelong, H. 2014. Stallion spermatozoa: Putative target of estrogens; presence of the estrogen receptors ESR1, ESR2 and identification of the estrogen-membrane receptor GPER. *Generaland Comparative Endocrinology*. 200. 35-43.
- Belleannee, C., Belghazi, M., Labas, V., Teixeira-Gomes, A.P., Gatti, J.L., Dacheux, J.L., Dacheux, F. 2011. Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. *Proteomics*. 11. 1952–1964.
- Bois, C., Delalande, C., Nurmio, M., Parvinen, M., Zanatta, L., Toppari, J., Carreau, S. 2010. Age- and cell-related gene expression of aromatase and estrogen receptors in the rat testis. *Journal of molecular endocrinology*. 45(3). 147-159.
- Carlson, B. M. 2013. *Human embryology and developmental biology*. Elsevier Health Sciences. China. p.506. ISBN:978-1-4557-2794-0.
- Carpino, A., Bilinska, B., Siciliano, L., Maggiolini, M., Rago, V. 2004. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the epididymis of mature and immature pigs. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 1(42). 13-17.
- Carreau, S., Bois, C., Zanatta, L., Silva, F.R., Bouraïma-Lelong, H., Delalande, C. 2011a. Estrogen signaling in testicular cells. *Life science*. 89(15). 584-587.
- Carreau, S., Bouraïma-Lelong, H., Delalande, C. 2011b. Estrogens – new players in spermatogenesis. A review. *Reproductive biology*. 11(3). 174-193.
- Carreau, S., Delalande, C., Galeraud-Denis, I. 2009. Mammalian sperm quality and aromatase expression. *Microscopy research and technique* . 72(8). 552-557.
- Carreau, S., Hess, R.A. 2010. Oestrogens and spermatogenesis. A review. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 365. 1517-1535.

- Carreau, S., Lambard, S., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bilinska, B., Bourguiba, S. 2003. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1(1). 35.
- Carreau, S., Wolczynski, S., Galeraud-Denis, I. 2010. Aromatase, oestrogens and human male reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 365(1546). 1571-1579.
- Chimento, A., Sirianni, R., Delalande, C., Silandre, D., Bois, C., Andò, S., Pezzi, V. 2010. 17 β -estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER α . *Molecular and cellular endocrinology*. 320(1). 136-144.
- Chimento, A., Sirianni, R., Zolea, F., Bois, C., Delalande, C., Andò, S., Pezzi, V. 2011. GPER and ESRs are expressed in rat round spermatids and mediate oestrogen-dependent rapid pathways modulating expression of cyclin B1 and Bax. *International Journal of Andrology*. 34(5pt1). 420-429.
- Cooper, T.G. 1986. *The epididymis, sperm maturation and fertilization*. Springer-Verlag, Berlin. p.281. ISBN: 3-540-16928-8.
- Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K.A.J., Gustafsson, J.A., Korach, K.S. 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse. *Endocrinology*. 138(11). 4613-4621.
- Cui, J., Shen, Y., Li, R. 2013. Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. *Trends in Molecular Medicine*. 19(3). 97-209.
- Dacheux, J.L., Belleannée, C., Guyonnet, B., Labas, V., Teixeira-Gomes, A.P., Ecroyd, H., Dacheux, F. 2012. The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 58(4). 197-210.
- De Grava Kempinas, W., Klinefelter, G.R. 2014. Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis*. 4 (2). e979114.
- Ded, L., Dostalova, P., Dorosh, A., Dvorakova-Hortova, K., Peknicova, J. 2010. Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 8. 87.
- Delbes, G., Levacher, C., Pairault, C., Racine, C., Duquenne, C., Krust, A., Habert, R., 2004. Estrogen receptor beta-mediated inhibition of male germ cell line development in mice by endogenous estrogens during perinatal life. *Endocrinology*. 145 (7). 3395– 3403.
- Eddy, E.M. 2006. The Spermatozoon. In: Neill, J.D., Challis, J.R.G., Pfaff, D.W., Plant, T.M., Kretser, D.M., Richards, J.S., Wassarman, P.M. (Eds). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier Academic Press. San Diego. p. 3-55. ISBN: 0-12-515400-3.
- Eddy, E.M., Washburn, T.F., Bunch, D.O., Goulding, E.H., Gladen, B.C., Lubahn, D.B., Korach, K.S. 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology*. 137(11). 4796-4805.
- Ergün, S., Ungefroren, H., Holstein, A.F., Davidoff, M. S. 1997. Estrogen and progesterone receptors and estrogen receptor related antigen (ER-D5) in human epididymis. *Molecular Reproduction and Development*. 47(4). 448-455.
- Fisher, J.S., Millar, M.R., Majdic, G., Saunders, P.T.K., Fraser, H.M., Sharpe, R.M. 1997. Immunolocalisation of oestrogen receptor- α within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *Journal of Endocrinology*. 153(3). 485-495.

- Goyal, H.O., Bartol, F.F., Wiley, A.A., Khalil, M.K., Chiu, J., Vig, M.M. 1997. Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptor in the developing testis and excurrent ducts of goats. *The Anatomical Record*. 249(1). 54-62.
- Guarducci, E., Nuti, F., Becherini, L., Rotondi, M., Balercia, G., Forti, G., Krausz, C. 2006. Estrogen receptor α promoter polymorphism: stronger estrogen action is coupled with lower sperm count. *Human Reproduction*. 21(4). 994-1001.
- Gunawan, A., Cinar, M.U., Uddin, M.J., Kaewmala, K., Tesfaye, D., Phatsara, C., Schellander, K. 2012. Investigation on association and expression of ESR2 as a candidate gene for boar sperm quality and fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(5). 782-790.
- Gunawan, A., Kaewmala, K., Uddin, M.J., Cinar, M.U., Tesfaye, D., Phatsara, C., Schellander, K. 2011. Association study and expression analysis of porcine ESR1 as a candidate gene for boar fertility and sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 128(1). 11-21.
- Guo R, Yu Z, Guan J, Ge Y, Ma J, Li S, Wang S, Xue S, Han D. 2004. Stage-specific and tissue-specific expression characteristics of differentially expressed genes during mouse spermatogenesis. *Molecular Reproduction and Development*. 67(3). 264-272.
- Guraya, S.S. 1987. *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*. Springer-Verlag. Berlin. p. 430. ISBN:3-540-17143-6.
- Hall, J.M., McDonnell. D.P., 1999. The Estrogen Receptor β -Isoform (ER β) of the Human Estrogen Receptor Modulates ER α Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens 1. *Endocrinology*. 140(12). 5566-5578.
- Hess, R.A., Bunick, D., Lee, K.H., Bahr, J., Taylor, J.A., Korach, K.S., Lubahn, D.B. 1997. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*. 390(6659). 509-512.
- Hess, R.A., Carnes, K. 2004. The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Animal Reproduction*. 1(1). 5-30.
- Hess, R.A., Fernandes, S.A.F., Gomes, G.R.O., Oliveria, C.A., Lazari, M.F.M., Porto, C.S. 2011. Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. A review. *Journal of Andrology*. 32(6): 600-612.
- Hess, R.A., 2000. Oestrogen in fluid transport and reabsorption in efferent ducts of the male reproductive tract. *Review of Reproduction*. 5 (2). 84-92.
- Hess, R.A., 2003. Estrogens in the adult male reproductive tract: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1(1). 52-62.
- Holst, J.P., Soldin, O.P., Guo, T., Soldin, S.J. 2004. Steroid hormones: relevance and measurement in the clinical laboratory. *Clinics in Laboratory Medicine*. 24(1). 105.
- Jacenic, D., Cygankiewicz, A. I., Krajewska, W. M. 2016. The G protein-coupled estrogen receptor as a modulator of neoplastic transformation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 429:10-18.
- Jefferson, W. N., Couse, J. F., Banks, E. P., Korach, K. S., Newbold, R. R. 2000. Expression of estrogen receptor β is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice. *Biology of Reproduction*. 62(2). 310-317.
- Jin, W., Arai, K. Y., Watanabe, G., Suzuki, A. K., Takahashi, S., Taya, K. 2005. The stimulatory role of estrogen on sperm motility in the male golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Journal of andrology*. 26(4). 478-484.

- Jones, R.E., Lopez, K., 2013. Human reproductive biology. Elsevier Academic Press. China. p. 400. ISBN: 978-0-12-382184-3.
- Joseph, A., Shur, B.D., Hess, R. A. 2011 Estrogen, Efferent Ductules, and the Epididymis. *Biology of reproduction*. 84 (2). 207-217.
- Katleba, K.D., Legacki, E.L., Conley, A. J., Berger, T. 2015. Steroid regulation of early postnatal development in the corpus epididymidis of pigs. *Journal of Endocrinology*. 225(3): 125-134.
- Kicman, A.T. 2008. Pharmacology of anabolic steroids. *British Journal of Pharmacology*. 154(3). 502-521.
- Kwon, S., Hess, R.A., Bunick, D., Kirby, J.D., Bahr, J. M. 1997. Estrogen receptors are present in the epididymis of the rooster. *Journal of andrology*. 18. 378-384.
- Lambard, S., Galeraud-Denis, I., Saunders, P. T. K., Carreau, S. 2004. Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors. *Journal of molecular endocrinology*. 32. 279-289.
- Lambard, S., Galeraud-Denis, I., Saunders, P.T., Carreau, S., 2004. Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors. *Journal of Molecular Endocrinology*. 32(1). 279-289.
- Lazaros, L.A., Xita, N.V., Kaponis, A.I., Zikopoulos, K.A., Plachouras, N.I., Georgiou, I.A. 2010. Estrogen receptor α and β polymorphisms are associated with semen quality. *Journal of Andrology*. 31(3). 291-298.
- Lekhkota, O., Brehm, R., Claus, R., Wagner, A., Bohle, R.M., Bergmann, A. 2006. Cellular localization of estrogen receptor-alpha (ER α) and -beta (ER β) mRNA in the boar testis. *Histochemistry and Cell Biology*. 125. 259-264.
- Levallet, J., Bilinska, B., Mittre, H., Genissel, C., Fresnel, J., Carreau, S. 1998. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biology of Reproduction*. 58(4). 919-926.
- Lucas, T.F.G., Royer, C., Siu, E.R., Lazari, M.F.M., Porto, C.S. 2010. Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction*. 83. 307-317.
- Luconi, M. 2006. Rapid responses to estrogens. *Médecine Thérapeutique/médecine de la reproduction*. 8 (2). 119-127.
- Luconi, M., Forti, G., Baldi, E. 2002. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 80(4). 369-381.
- Mäkinen, S., Mäkelä, S., Weihua, Z., Warner, M., Rosenlund, B., Salmi, S., Hovatta, O., Gustafsson, J.A. 2001. Localization of oestrogen receptors alpha and beta in human testis. *Molecular Human Reproduction*. 7(6). 497-503.
- Marino, M., Ascenzi, P., Acconcia, F. 2006. S-palmitoylation modulates estrogen receptor α localization and functions. *Steroids*. 71. 298-303.
- Martínez-Traverso, G.B., Pearl, C.A. 2015. Immunolocalization of G protein-coupled estrogen receptor in the rat epididymis. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 13. 48.
- Miller, W.L., Auchus, R. J. 2011. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*. 32 (1). 85-151.

- Murphy, L.C., Zheng, Y. 2016. Regulation of steroid hormone receptors and coregulators during the cell cycle highlights potential novel function in addition to roles as transcription factors. *Nuclear Receptor Signaling*. 14. e001.
- Nie, R., Zhou, Q., Jassim, E., Saunders, P.T., Hess, R.A. 2002. Differential Expression of Estrogen Receptors α and β in the Reproductive Tracts of Adult Male Dogs and Cats. *Biology of Reproduction*. 66(4). 1161-1168.
- Nitta, H., Bunick, D., Hess, R.A., Janulis, L., Newton, S.C., Millette, C.F., Bahr, J. M. 1993. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology*. 132(3). 1396-1401.
- Olde, B., Leeb-Lundberg, L.M., 2009. In: GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 20(8). 409-416.
- Parlevliet, J. M., Pearl, C.A., Hess, M.F., Famula, T.R., Roser, J.F. 2006. Immunolocalization of estrogen and androgen receptors and steroid concentrations in the stallion epididymis. *Theriogenology*. 66. 755-765.
- Pearl, C.A., Berger, T., Roser, J.F. 2007. Reduced endogenous estrogen delays epididymal development but has no effect on efferent duct morphology in boars. *Reproduction*. 134. 593-604.
- Pearl, C.A., Mason, H., Roser, J. F. 2011. Immunolocalization of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and androgen receptor in the pre-, peri- and post-pubertal stallion testis. *Animal Reproduction Science*. 125.103-111.
- Pedram, A., Razandi, M., Sainson, R.C., Kim, J.K., Hughes, C.C., Levin, E.R. 2007. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 282(31). 22278-22288.
- Pelletier, G., Labrie, C., Labrie, F. 2000. Localization of oestrogen receptor α , oestrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs. *Journal of Endocrinology*. 165. 359-370.
- Pentikäinen, V., Erkkilä, K., Suomalainen, L., Parvinen, M., Dunkel, L. 2000. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 85. 2057-2067.
- Prossnitz, E.R., Arterburn, J.B., Smith, H.O., Oprea, T.I., Sklar, L.A., Hathaway, H.J. 2008. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annual Review of Physiology*. 70. 165-190.
- Publicover, S., Harper, C.V., Barratt, C., 2007. $[Ca^{2+}]_i$ signalling in sperm – making the most of what you’ve got. *Nature Cell Biology*. 9(3). 235-242.
- Qian, H., Xuan, J., Liu, Y., Shi, G. 2016. Function of G-protein-coupled estrogen receptor-1 in reproductive system tumors. *Journal of Immunology Research*. A review. 2016:ID 7128702, 1-6.
- Rago, V., Aquila, S., Panza, R., Carpino, A. 2007. Cytochrome P450arom, androgen and estrogen receptors in pig sperm. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 5(1). 1.
- Rago, V., Giordano, F., Brunelli, E., Zito, D., Aquila, S., Carpino, A. 2014. Identification of G protein-coupled estrogen receptor in human and pig spermatozoa. *Journal of anatomy*. 224(6). 732-736.
- Rago, V., Maggiolini, M., Vivacqua, A., Palma, A., Carpino, A. 2004. Differential expression of estrogen receptors (ER α /ER β) in testis of mature and immature pigs. *The Anatomical*

- Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology. 281(2). 1234-1239.
- Rago, V., Romeo, F., Giordano, F., Maggiolini, M., Carpino, A. 2011. Identification of the estrogen receptor GPER in neoplastic and non-neoplastic human testes. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 9. 135.
- Rago, V., Siciliano, L., Aquila, S., Carpino, A. 2006. Detection of estrogen receptors ER-alpha and ER-beta in human ejaculated immature spermatozoa with excess residual cytoplasm. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4:36.
- Rooij, D.G., 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121. 347-354.
- Safarinejad, M. R., Shafiei, N., Safarinejad, S. 2010. Association of polymorphisms in the estrogen receptors alpha, and beta (ESR1, ESR2) with the occurrence of male infertility and semen parameters. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 122(4). 193-203.
- Saunders, P. T., Sharpe, R. M., Williams, K., Macpherson, S., Urquart, H., Irvine, D. S., & Millar, M. R. 2001. Differential expression of oestrogen receptor α and β proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Molecular Human Reproduction*. 7(3). 227-236.
- Schleicher, G., Drews, U., Stumpf, W. E., & Sar, M. 1984. Differential distribution of dihydrotestosterone and estradiol binding sites in the epididymis of the mouse. *Histochemistry*. 81(2). 1139-1147.
- Schwartz, N., Verma, A., Bivens, C. B., Schwartz, Z., Boyan, B. D. 2016. Rapid steroid hormone actions via membrane receptors. A review. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1863: 2289-2298.
- Shemes, M., Shore, L. S. 2012. Effects of Environmental Estrogens on Reproductive Parameters in Domestic Animals. *Israel Journal of Veterinary Medicine*. 67(1). 6-10.
- Sirianni, R., Chimento, A., Ruggiero, C., De Luca, A., Lappano, R., Andò, S., Pezzi, V. 2008. The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. *Endocrinology*. 149(10). 5043-5051.
- Siiteri, P. K., Murai, J. T., Hammond, G. L., Nisker, J. A., Raymoure, W. J., Kuhn, R. W. 1982. The serum transport of steroid hormones. *Recent Progress in Hormone Research*. 38. 457-510.
- Simpson, E., Rubin, G., Clyne, C., Robertson, K., O'Donnell, L., Jones, M., Davis, S. 2000. The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 11(5). 184-188.
- Sirianni, R., Chimento, A., Ruggiero, C., De Luca, A., Lappano, R., Andò, S., Pezzi, V. 2008. The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. *Endocrinology*. 149(10). 5043-5051.
- Solakidi, S., Psarra, A. G., Nikolaropoulos, S., Sekeris, C. E. 2005. Estrogen receptors α and β (ER α and ER β) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ER β and AR in mitochondria of the midpiece. *Human Reproduction*. 20(12). 3481-3487.

- Solakidi, S., Psarra, A.M.G., Nikolaropoulos, S., Sekeris, C.E. 2005. Estrogen receptors α and β (ER α and ER β) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ER β and AR in mitochondria of the midpiece. *Human Reproduction*. 20(12): 3481-3487.
- Steger K, Aleithe I, Behre H, Bergmann M. 1998. The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen. *Molecular Human Reproduction*. 4(3). 227-233.
- Suzuki, Y., Sasagawa, I., Itoh, K., Ashida, J., Muroya, K., Ogata, T. 2002. Estrogen receptor alpha gene polymorphism is associated with idiopathic azoospermia. *Fertility and Sterility*. 78(6). 1341-1343.
- Syntin, P., Dacheux, F., Druart, X., Gatti, J. L., Okamura, N., Dacheux, J. L. 1996. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biology of Reproduction*. 55(5). 956-974.
- Tan, M.E., Li, J., Xu, H.E., Melcher, K., Yong, E. 2015. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*. 36 (1). 3-23.
- Trojan, S. (2003). *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing a.s. Havlíčkův Brod. p.771 . ISBN: 80-247-0512-5.
- UniProtKB - I3LSZ2 (I3LSZ2_PIG)[databáze online]. Uniprot.org. [citováno 2016-10-31]. Dostupné z URL <<http://www.uniprot.org/uniprot/I3LSZ2>> .
- UniProtKB - Q29040 (ESR1_PIG) [databáze online]. Uniprot.org. [citováno 2016-10-31]. Dostupné z URL <<http://www.uniprot.org/uniprot/Q29040>> .
- UniProtKB - Q9XSW2 (ESR2_PIG)[databáze online]. Uniprot.org. [citováno 2016-10-31]. Dostupné z URL <<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9XSW2>> .
- Vacek, Z. 2006. *Embryologie*. Grada Publishing a.s. Praha. p.256. ISBN: 978-80-247-1267-3.
- Van Pelt, A. M., De Rooij, D. G., Van Der Burg, B., Van Der Saag, P. T., Gustafsson, J. A., Kuiper, G. G. 1999. Ontogeny of Estrogen Receptor- β Expression in Rat Testis. *Endocrinology*. 140(1). 478-483.
- Verhoeven, G., Willems, A., Denolet, E., Swinnen J. V., De Gendt, K. 2010. Androgens and spermatogenesis: lesson from transgenic mouse models. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 365(1546). 1537-1556.
- Wang XN, Li ZS, Ren Y, Jiang T, Wang YQ, Chen M, Zhang J, Hao JX, Wang YB, Sha RN, Huang Y, Liu X, Hu JC, Sun GQ, Li HG, Xiong CL, Xie J, Jiang ZM, Cai ZM, Wang J, Wang J, Huff V, Gui YT, Gao F. 2013. The Wilms tumor gene, *Wt1*, is critical for mouse spermatogenesis via regulation of sertoli cell polarity and is associated with non-obstructive azoospermia in humans. *PLoS Genetics*. 9(8). e1003645.
- Weiss, P., (eds.). 2010. *Sexuologie*. Grada Publishing a.s. Praha. p.744. ISBN: 978-80-247-2.
- Zhou, Q., Nie, R., Prins, G. S., Saunders, P. T., Katzenellenbogen, B. S., Hess, R. 2002. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *Journal of Andrology*. 23(6). 870-881.
- Zaya, R., Hennick, C., Pearl, C. A. 2012. In vitro expression of androgen and estrogen receptors in prepubertal and adult rat epididymis. *General and Comparative Endocrinology*. 178(3). 573-586.