

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

Vliv modelové látky s anti-progestagenní aktivitou na vývoj gonád a štítné žlázy u žáby drápatky vodní (*Xenopus laevis*)

Autor: Kateřina Karbusová

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Ing. Michal Pech

Dipl. Biol. Christoph Steinbach, Ph.D.

Studijní program a obor: Ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2023

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

Datum:

Podpis studenta:

Kateřina Karbusová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Haně Kocour Kroupové, Ph.D. za cenné rady a věnovaný čas při vedení mé bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat svým konzultantům Ing. Michalovi Pechovi a Dipl. Biol. Christophu Steinbachovi, Ph.D. za ochotu a pomoc při získání potřebných informací a podkladů. Na závěr bych chtěla vyjádřit díky mé rodině a přátelům za jejich podporu.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Kateřina KARBUSOVÁ
Osobní číslo: V20B033P
Studijní program: B0588A030002 Ochrana vod
Téma práce: Vliv modelové látky s anti-progestagenní aktivitou na vývoj gonád a štítné žlázy u žáby drápatky vodní (*Xenopus laevis*)
Zadávací katedra: Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Zásady pro vypracování

V posledních desetiletích byly shromážděny důkazy o tom, že některé sloučeniny, které se dostávají do životního prostředí, mohou negativně ovlivňovat endokrinní systém volně žijících živočichů i lidí. Tyto látky začaly být souhrnně označovány jako endokrinní disruptory. V důsledku výskytu některých endokrinních disruptorů s estrogenní aktivitou byl v minulosti zaznamenán například neobvykle častý výskyt intersexních (hermafroditních) jedinců ryb v řekách. Ve vodním prostředí České republiky, a nejen tam, byla navíc opakovaně zaznamenána přítomnost látek s anti-progestagenní aktivitou. Tyto látky se vyznačují tím, že blokují progesteronový receptor a zabraňují tak působení přírodních progestinů (např. progesteronu) u exponovaných jedinců. Přírodní progestiny hrají klíčovou roli v reprodukci všech obratlovců. O reálném vlivu látek s anti-progestagenní aktivitou na obojživelníky nejsou k dispozici téměř žádné údaje. Vzhledem k jejich vazbě na progesteronový receptor však existuje důvodné podezření, že by tyto látky mohly mít negativní vliv na vývoj a plodnost obojživelníků, kteří žijí v zasažených lokalitách.

Cílem práce je proto stanovení vlivu modelového anti-progestinu, mifepristonu, na vývoj gonád a štítné žlázy u modelového druhu obojživelníka, žáby drápatky vodní (*Xenopus laevis*).

Metodický postup: vliv modelového anti-progestinu, mifepristonu, bude hodnocen na základě makroskopického vyšetření gonád a histologického vyšetření vzorků štítné žlázy odebraných z žab (drápatky vodní, *Xenopus laevis*), které budou v laboratorních podmínkách po dobu několika týdnů vystaveny různým koncentracím této látky. Žáby budou po ukončení testu nejdříve usmrceny a poté bude otevřena jejich tělní dutina tak, aby bylo možné pořídit fotografie gonád. Na zhotovených snímcích budou hodnoceny případné makroskopické změny a dále budou pomocí analýzy obrazu měřeny rozměry gonád. Z pokusných žab bude odebrána také štítná žláza, která bude nejdříve uložena do formalínu a později z ní budou zhotoveny histologické řezy. Na takto připravených histologických řezech budou zjišťovány případné histopatologické změny. Pomocí získaných výsledků bude možné zhodnotit vliv mifepristonu na vývoj gonád a míru případného poškození štítné žlázy exponovaných žab.

Rozsah pracovní zprávy: 25-50 stran
Rozsah grafických prací: dle potřeby
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- Grim, K. C., Wolfe, M., Braunbeck, T., Iguchi, T., Ohta, Y., Tooi, O., Touart, L., & Tiedge, J. (2009). Thyroid histopathology assessments for the amphibian metamorphosis assay to detect thyroid-active substances. *Toxicologic pathology*, 37(4), 415-424.
- Kloc, M., & Kubiak, J. Z. (2014). *Xenopus development*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Li, S., Li, M., Gui, W., Wang, Q., & Zhu, G. (2017). Disrupting effects of azocyclotin to the hypothalamo-pituitary-gonadal axis and reproduction of *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*, 185, 121-128.
- Lorenz, C., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Nützmann, G., Lutz, I., & Kloas, W. (2011). The synthetic gestagen levonorgestrel impairs

metamorphosis in *Xenopus laevis* by disruption of the thyroid system. *Toxicological Sciences*, 123(1), 94-102.

Lorenz, C., Contardo-Jara, V., Trubiroha, A., Krüger, A., Viehmann, V., Wiegand, C., Pflugmacher, S., Nützman, G., Lutz, I., & Kloas, W. (2011). The synthetic gestagen levonorgestrel disrupts sexual development in *Xenopus laevis* by affecting gene expression of pituitary gonadotropins and gonadal steroidogenic enzymes. *Toxicological Sciences*, 124(2), 311-319.

Lutz, I., Kloas, W., Springer, T., Holden, T. L., Wolf, J. C., Krueger, H. O., & Hosmer, A.J. (2008). Development, standardization and refinement of procedures for evaluating effects of endocrine active compounds on development and sexual differentiation of *Xenopus laevis*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(8), 2031-48.

Mahajan, D. K., & London, S. N. (1997). Mifepristone (RU486): a review. *Fertility and Sterility*, 68(6), 967-976.

Nieuwkoop, P.D., & Faber, J. (1994). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, New York, NY, USA.

Piprek, R. P., Kloc, M., Tassan, J. P., & Kubiak, J. Z. (2017). Development of *Xenopus laevis* bipotential gonads into testis or ovary is driven by sex-specific cell-cell interactions, proliferation rate, cell migration and deposition of extracellular matrix. *Developmental Biology*, 432(2), 298-310.

Thambirajah, A. A., Koide, E. M., Imbery, J. J., & Helbing, C. C. (2019). Contaminant and environmental influences on thyroid hormone action in amphibian metamorphosis. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 276.

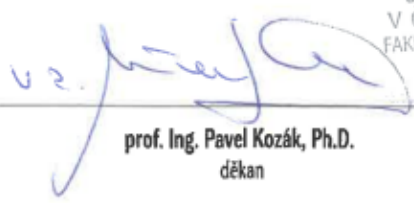
Urbatzka, R., Lorenz, C., Lutz, I., & Kloas, W. (2010). Expression profiles of LHβ, FSHβ and their gonadal receptor mRNAs during sexual differentiation of *Xenopus laevis* tadpoles. *General and Comparative Endocrinology*, 168(2), 239-244.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický


Konzultanti bakalářské práce: **Ing. Michal Pech**
Dipl.-Biol. Christoph Steinbach
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: 26. ledna 2023

Termín odevzdání bakalářské práce: 2. května 2023


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zátiší 228/II
389 25 Vodňany (2)


prof. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 26. ledna 2023

Obsah

1.	Úvod.....	8
2.	Literární přehled	9
2.1.	Progestiny	9
2.1.1.	Přírodní progestiny	9
2.1.1.1.	Progesteron.....	10
2.1.1.2.	Progesteronové receptory	11
2.1.2.	Syntetické progestiny	12
2.2.	Látky blokující progesteronový receptor	13
2.2.1.	Mifepriston	14
2.2.2.	Další látky s anti-progestagenní aktivitou	15
2.3.	Výskyt anti-progestagenní aktivity ve vodním prostředí.....	16
2.3.1.	Anti-progestagenní aktivita ve světě	16
2.4.	Obojživelníci v toxikologickém výzkumu.....	18
2.4.1.	Drápatka vodní	18
2.4.1.1.	Původ a způsob života.....	18
2.4.1.2.	Reprodukce a pohlavní dimorfismus	19
2.4.1.3.	Vývoj a metamorfóza	20
2.4.1.4.	Štítná žláza	24
2.4.1.5.	Gonády	26
2.4.1.6.	Chov dospělců v zajetí	26
3.	Materiál a metodika	28
3.1.	Experiment.....	28
3.2.	Morfologie gonád	29
3.3.	Histologie štítné žlázy.....	30
3.4.	Analýza obrazu	31

3.4.1.	Analýza histologických snímků	32
3.4.2.	Analýza snímků gonád	39
3.5.	Statistické zpracování dat	41
4.	Výsledky	43
4.1.	Vliv mifepristonu na vývoj gonád drápatky vodní	43
4.2.	Histologie štítné žlázy drápatky vodní.....	51
5.	Diskuze	53
6.	Závěr	57
7.	Seznam použité literatury	58
8.	Seznam zkratek	65
9.	Abstrakt.....	66
10.	Abstract.....	67

1. Úvod

V posledních desetiletích bylo na základě mnoha studií zjištěno, že se ve vodním prostředí vyskytují sloučeniny, které jsou hormonálně aktivní a mají schopnost narušovat u exponovaných živočichů funkci žláz s vnitřní sekrecí, zejména tvorbu, transport a působení hormonů. Tyto látky začaly být označovány jako endokrinní disruptory. Na základě údajů o výskytu endokrinních disruptorů ve vodním prostředí je snaha objasnit jejich vliv na vodní organismy a celý vodní ekosystém. Mezi endokrinní disruptory patří celá řada sloučenin včetně látek s anti-progestagenní aktivitou. Právě anti-progestagenní aktivity byly detekovány opakovaně ve vodním prostředí České republiky, Číny, Francie a v řadě dalších zemí. Nebezpečí látek s anti-progestagenní aktivitou spočívá v jejich schopnosti navázat se na progesteronový receptor. Po jejich navázání je receptor obsazen a nedojde k navázání přírodních progestinů, jako je například progesteron, na tento receptor. Přírodní progestiny hrají významnou roli v reprodukčním cyklu všech obratlovců. O vlivu látek s anti-progestagenní aktivitou na obojživelníky je doposud jen velmi málo informací. Obojživelníci jsou pevně vázáni na vodní prostředí, ve kterém se mohou látky s anti-progestagenní aktivitou vyskytovat, a tím vzniká podezření, že by tyto látky mohly ovlivňovat jejich reprodukci a vývoj.

Cílem této bakalářské práce bylo posoudit vliv mifepristonu, modelové látky s anti-progestagenní aktivitou, na vývoj gonád a štítné žlázy u žáby drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Drápatka vodní byla zvolena, protože se jedná o zavedený modelový druh obojživelníka v toxikologických testech.

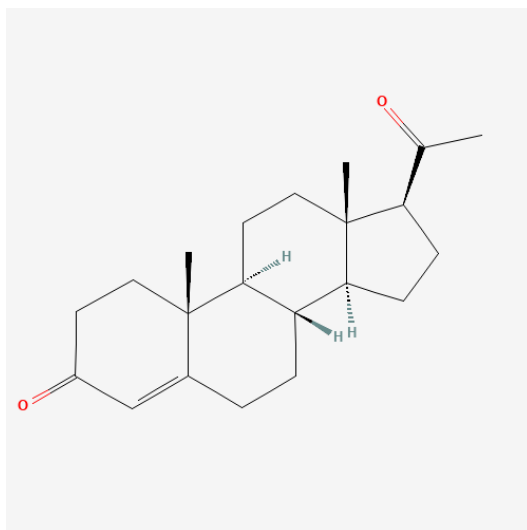
2. Literární přehled

2.1. Progestiny

Progestiny jsou steroidní hormony. Jedná se o molekuly malých rozměrů, které jsou rozpustné v tucích, jelikož jsou odvozené od cholesterolu (Otová a kol., 2021). Progestiny jsou dvojího typu, a to progestiny přírodní a syntetické.

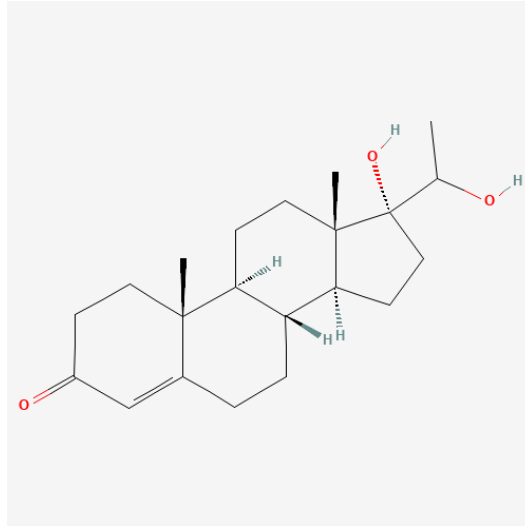
2.1.1. Přírodní progestiny

Nejvýznamnějším přírodním progestinem je, zejména u člověka, progesteron (Obr. 1). Dalším přirozeným progestinem je 17α -hydroxyprogesteron, který není tak významný jako progesteron zejména proto, že má velmi malou progestagenní aktivitu (Roztočil, 2011).

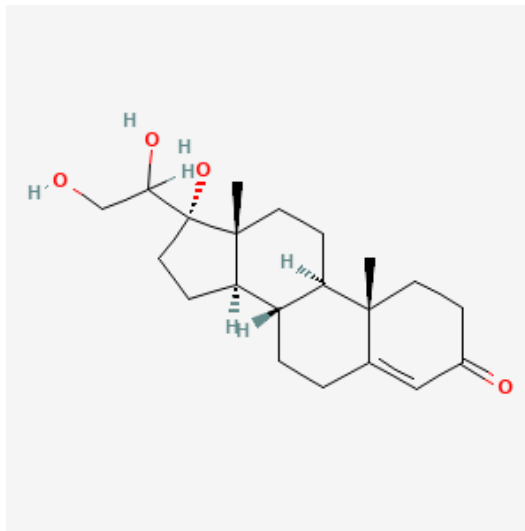


Obr. 1: Strukturní vzorec progesteronu

U většiny ryb je nejvýznamnějším progestinem, který aktivuje progesteronový receptor, $17,20\beta$ -dihydroxypregn-4-en-3-an (Obr. 2). U některých druhů ryb je hlavním progestinem $17,20\beta,21$ -trihydroxy-pregn-4-en-3-an (Obr. 3) (Baker, 2022; Scott a kol., 2010). Tyto progestiny jsou významné zejména pro reprodukční fyziologii ryb, regulují vývoj gonád a hrají roli při dozrávání oocytů a spermií, dále stimulují produkci mlíčí (Scott a kol., 2010).



Obr. 2: Strukturální vzorec 17,20 β -dihydroxypregn-4-en-3-an



Obr. 3: Strukturální vzorec 17,20 β ,21-trihydroxy-pregn-4-en-3-an

2.1.1.1. Progesteron

Progesteron je pohlavní hormon steroidní povahy (Štěpánková, 2020), který byl izolován a charakterizován v roce 1929 (Corner a Allen, 1929). Progesteron je syntetizován z cholesterolu přes meziprodukt pregnenolon (Švihovec a kol., 2018). Přeměna pregnenolonu je katalyzovaná pomocí enzymu 3 β -hydroxysteroidní dehydrogenázy (Chapman a kol., 2005). U samic je progesteron jedním ze tří hlavních pohlavních hormonů vedle androgenů a estrogenů. Tvorba progesteronu probíhá u samic v granulózních buňkách ovariálního folikulu (Silla a kol., 2021), ve žlutém tělísku a během těhotenství v placentě. Menší množství ho produkuje jak u samic, tak u samců kůra nadledvin a u samců je také produkován varlaty (Roztočil, 2011; Singh a Su, 2013).

Progesteron se podílí na reprodukčním cyklu samic (Otová a kol., 2021) tím, že připravuje podmínky pro uhníždění oplozeného vajíčka, a to díky přechodu endometria do sekreční fáze (Martínková a kol., 2007). Progesteron má schopnost podněcovat sekreci inzulinu a podporovat tvorbu zásob glykogenu jeho ukládáním do jater (Štěpánková, 2020). Progesteron je přirozeně vylučován lidmi i živočichy (Houtman a kol., 2021).

Žluté tělísko produkuje progesteron nejen u člověka, ale také u dalších živočichů, u kterých žluté tělísko vzniká. Těmito živočichy jsou žraloci, obojživelníci, plazi a savci. U savců je progesteron produkován u placentálů, vačnatců a ptakořitných (Gemmell, 1995). Tvorba pohlavních hormonů, včetně přírodních progestinů, je u obratlovců, a tedy i u obojživelníků, řízená působením luteinizačního a folikulostimulačního hormonu (Silla a kol., 2021).

2.1.1.2. Progesteronové receptory

Progesteronový receptor (PR) je protein, nacházející se v cytosolu buňky (Mahajan a London, 1997), schopný specificky vázat progesteron jako signální molekulu (Otová a kol., 2021). PR je u většiny obratlovců, včetně lidí, aktivován navázáním progesteronu (King a Brucker, 2011). PR se nacházejí v pohlavních orgánech, adenohipofýze a hypotalamu (Martínková a kol., 2007).

Lidský progesteronový receptor (hPR) se vyskytuje ve 2 izoformách hPR-A a hPR-B (Kastner a kol., 1990; King a Brucker, 2011), které jsou kódované stejným genem, ale mají rozdílnou molekulovou hmotnost (Kastner a kol., 1990; Speroff a Fritz, 2005). hPR-A je v podstatě zkrácenou verzí hPR-B, který má na rozdíl od hPR-A na N-terminálním konci navíc 164 aminokyselin (King a Brucker, 2011; Mahajan a London, 1997; Speroff a Fritz, 2005). Oba receptory mají společnou ligand-vázací doménu (LBD) a DNA-vázací doménu (DBD). LBD se nachází na C-terminálním konci PR a umožňuje vazbu hormonu. V LBD dochází k dimerizaci receptoru, čímž se receptor převede do aktivní podoby (Fawell a kol., 1990).

PR jsou vázané na protein teplotního šoku (heat-shock protein, HSP) o molekulární hmotnosti 90 kDa (HSP 90) (Baulieu, 1997). Poté, co progesteron vstoupí do buňky, dojde k jeho navázání na receptor (King a Brucker, 2011) a vytvoří se komplex (progesteron + receptor + HSP). Komplex vstupuje do jádra, kde se jaderný protein p59 naváže na HSP 90. PR získá kladný náboj a komplex HSP 90 + p59 se oddělí od receptoru. Komplex hormonu s receptorem se naváže na DNA v genech, které

obsahují takzvaný hormon-responzivní element, úsek DNA přítomný v promotoru regulovaného genu. Receptor nasedá na tento úsek svojí DBD. Změna v nukleozomu a navázání transkripčního faktoru vyvolá začátek transkripce (Baulieu, 1997; Mahajan a London, 1997).

Kromě jaderných progesteronových receptorů existují i membránové progesteronové receptory (mPR) pocházející z rodiny progestinových a adiponektinových receptorů, které se nacházejí na povrchu buněk. Existuje několik subtypů mPR, a to mPR α , který se vyskytuje v placentě, vaječnících, varlatech a děloze, mPR β , který se vyskytuje v mozku a páteřní míše a mPR γ , který se vyskytuje v ledvinách, tlustém střevu a v plicích. Dalšími subtypy jsou mPR δ a mPR ϵ . Prostřednictvím mPR jsou zprostředkovávány rychlé účinky progesteronu. mPR aktivují intracelulární signální dráhy. Výskyt mPR byl prokázán u celé řady obratlovců včetně obojživelníků (Petersen a kol., 2013; Thomas a Pang, 2012; Zhu a kol., 2003).

2.1.2. Syntetické progestiny

Syntetické progestiny se dělí podle chemické struktury (Tab. 1) na progestiny odvozené od progesteronu (pregnany, norpregnany), testosteronu (estrany, gonany) nebo spironolaktonu. Pregnany jsou strukturně odvozené od 17 α -hydroxyprogesteronu a norpregnany od 19-norprogesteronu (King a Brucker, 2011).

Syntetické progestiny jsou strukturně podobné progesteronu a mají imitovat jeho funkci. Syntetické progestiny se nejčastěji využívají v hormonální terapii při menopauze a v hormonální antikoncepci (King a Brucker, 2011; Roztočil, 2011), kde se hojně využívají samostatně, ale také v kombinaci s estrogy (Roztočil, 2011). Používají se dále například k zabránění hyperplazie endometria, která vzniká působením estrogenu a může být prekurzorem rakoviny (King a Brucker, 2011).

Tab. 1: Rozdělení syntetických progestinů podle chemické struktury (King a Brucker, 2011)

Rozdělení syntetických progestinů					
Deriváty progesteronu	Pregnany	S acetátovou skupinou	Medroxyprogesteron acetát		
			Megestrol acetát		
			Chlormadinon acetát		
			Cyproteron acetát		
	Norpregnany	S acetátovou skupinou	Dydrogesteron		
			Medrogeston		
		Bez acetátové skupiny	Nomegestrol acetát		
			Nestoron		
Deriváty testosteronu	Estrany	S acetátovou skupinou	Demegeston		
			Promegeston		
			Trimegeston		
			Gonany	Bez acetátové skupiny	Norethindron
					Norethindron acetát
					Ethinodiol diacetát
	Norethynodrel				
	Deriváty spironolaktonu	Gonany	Bez acetátové skupiny	Lynestrenol	
Dienogest					
Levonorgestrel					
Desogestrel					
			Norgestimát		
			Gestoden		
			Drospirenon		

2.2. Látky blokující progesteronový receptor

Látky blokující PR neboli antagonisté PR jsou někdy označovány také jako antigestageny, antiprogestiny či antiprogestageny (Roztočil, 2011; Spitz, 2006). Antigestageny působí tak, že obsadí receptor a zabrání jeho aktivitě, kterou by za normálních okolností způsobila přítomnost progesteronu na daném receptoru (Spitz, 2006). Po navázání antigestagenu se vytvoří komplex (antigestagen + receptor + HSP) a posílí se reakce mezi proteinem p59 a HSP 90, ale v DNA nedojde ke změně nukleozomu a zastaví se navázání transkripčního faktoru a tím nedojde k začátku transkripce (Baulieu, 1997; Mahajan a London, 1997).

Látky, které blokují PR, mohou být plně antagonistické, nebo mohou mít smíšený charakter agonista/antagonista. Ty, které jsou dvojího charakteru, jsou také označovány jako selektivní modulátory progesteronového receptoru (SPRM – selective progesterone receptor modulators) (Islam a kol., 2020; Spitz, 2006).

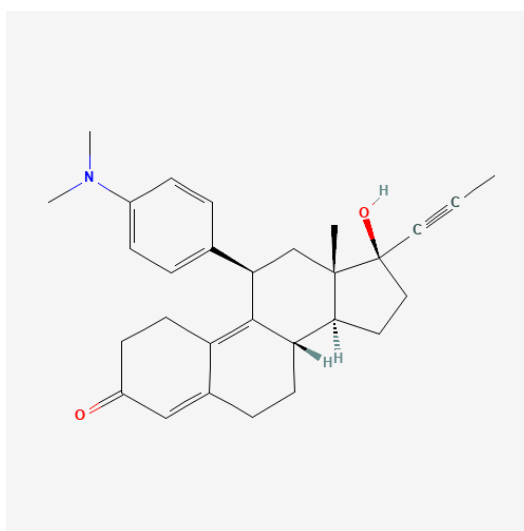
Antigestageny se používají jako abortiva (tzn. k přerušení těhotenství), jako nouzové antikoncepční přípravky, k léčbě děložních myomů, endometriózy, dysfunkčního děložního krvácení a jsou testovány jako potenciální léčiva pro léčbu rakoviny, a to u nádorů, které reagují na steroidy (Spitz, 2006).

Při dlouhodobém podání antagonistů PR a SPRM dochází k projevu antiproliferativního účinku v endometriu, ke zthutnění endometria a k rozvoji amonorey (tzn. vynechání menstruace), která má souvislost s antiproliferativním působením. Antagonisté PR mohou zpomalovat nebo inhibovat ovulaci, a to může vést k amonoree (Croxatto a kol., 1993; Chwalisz a kol., 2005; Spitz, 2006).

2.2.1. Mifepriston

Mifepriston byl objeven vědci na Roussel UCLAF (bývalá farmaceutická firma ve Francii) a byl poprvé popsán v roce 1981 (Philibert a kol., 1982). Jeho původním označením bylo RU-486 (RU-38486). Jde o první syntetizovaný antigestagen sloužící jako abortivum (Philibert a kol., 1982; Roztočil, 2011).

Mifepriston má podobnou chemickou strukturu (Obr. 4) jako progesteron a glukokortikoidy a jedná se o derivát norethindronu. Skupina 4-dimethylaminofenyl přítomná na 11 β pozici je zodpovědná za jeho antagonistickou aktivitu. Řetězec 1-propynyl, nacházející se na 17 α pozici, způsobuje vysokou afinitu k PR (Baulieu, 1997).



Obr. 4: Strukturní vzorec mifepristonu

Ve vysokých dávkách je mifepriston silný anti-glukokortikoid. Anti-glukokortikoidní účinek je pozorován při dávce $\geq 200 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$, což je dávka výrazně vyšší než dávka potřebná k pozorování jeho anti-progestagenní aktivity. Této vlastnosti se dá využít při léčbě neuropsychiatrických poruch, např. deprese či bipolární poruchy (Spitz, 2003).

Mifepriston se využívá k předčasnému ukončení těhotenství a je podáván orálně (Lähteenmäki a kol., 1987). Dnes se většinou používá v kombinaci s prostaglandiny (gemeprost, sulprostone), které jsou důležité pro bezpečnost a dostatečnou efektivitu předčasného ukončení těhotenství. Při použití mifepristonu k těmto účelům je pozorováno, že s pokročilejší fází těhotenství se snižuje účinnost (Mahajan a London, 1997).

Při jednorázové dávce 10 mg je mifepriston účinný jako nouzová antikoncepce (Jin a kol., 2005). Po podání může způsobit prodloužení cyklu a tím pozdější příchod menstruace (Mahajan a London, 1997). Naopak jeho dlouhodobé podávání má jistou účinnost při léčbě děložního myomu a endometriózy. Nízké dávky mohou být, díky schopnosti mifepristonu blokovat ovulaci zejména během střední a pozdní folikulární fáze (Luukkainen a kol., 1988; Mahajan a London, 1997), potenciálně účinné jako antikoncepce (Spitz, 2006).

2.2.2. Další látky s anti-progestagenní aktivitou

Lilopriston a onapriston jsou sloučeniny podobné svou strukturou mifepristonu. Jejich syntéza byla provedena v polovině 80. let 20. století společností Schering AG (Wiechert a Neef, 1987). S lilopristonem byla provedena pouze jedna studie testující jeho účinnost jako abortiva a následně bylo jeho další testování ukončeno (Swahn a kol., 1994). Při studiích s onapristonem bylo zjištěno jeho dobré anti-progestagenní působení, následně byla prokázána jeho hepatotoxicita, a tak byly studie ukončeny (Klijn a kol., 2000).

Sloučeniny ORG-33628 a ORG-31710 byly testovány za účelem snížení krvácení, které bylo u žen vyvoláno užíváním antikoncepce čistě na bázi progestinů. Tyto látky byly tudíž podávány současně s antikoncepcí. Při studiích bylo sice pozorováno snížení krvácení, ale zároveň se ukázalo, že při současném podání těchto sloučenin nebyla blokována ovulace. Testy s těmito sloučeninami byly tedy následně ukončeny (Spitz, 2006; Verbost a kol., 2005).

Aglepriston (RU-p46534, alizin) je sloučenina používaná výhradně u zvířat a je registrovaná k používání pro veterinární účely. Její účinky spočívají v přerušení nebo předcházení březosti (Galac a kol., 2000; Hoffmann a Schuler, 2000).

Ulipristal acetát (CDB-2914) prokazatelně zabraňuje ovulaci (Levens a kol., 2008) a této vlastnosti se tedy využívá. V současnosti je ulipristal acetát součástí léčiva EllaOne, ve kterém tvoří aktivní složku. Jedna tableta EllaOne obsahuje 30 mg ulipristal acetátu. Tento lék je prodáván i v České republice a používá se k předcházení těhotenství po nechráněném pohlavním styku (Roztočil, 2011). Ulipristal acetát vykazuje podobnou anti-progestagenní aktivitu jako mifepriston (Šauer a kol., 2018) a podobně jako mifepriston vykazuje zároveň i aktivitu anti-glukokortikoidní (Levens a kol., 2008).

2.3. Výskyt anti-progestagenní aktivity ve vodním prostředí

Ve vodách včetně vyčištěných vod z čistíren odpadních vod (ČOV) se vyskytuje celá řada endokrinních disruptorů a mezi nimi i látky s anti-progestagenní aktivitou (Rao a kol., 2014). Endokrinní disruptory jsou látky, které jsou hormonálně aktivní a mají schopnost narušovat funkci žláz s vnitřní sekrecí, zejména tvorbu, transport a působení hormonů (National Institute of Environmental Health Sciences, 2023). Na organismy, které se vyskytují v prostředí s touto aktivitou, mohou mít endokrinní disruptory nepříznivé účinky (Rao a kol., 2014). Zdrojem tohoto znečištění je průmysl, zemědělství, ale také domácnosti (Scott a kol., 2014). Při úpravě pitné vody z povrchových zdrojů potom může dojít k ohrožení veřejného zdraví těmito látkami (Houtman, 2010).

2.3.1. Anti-progestagenní aktivita ve světě

V hlavním městě Číny Pekingu byla testována účinnost odstranění endokrinních disruptorů, včetně těch s anti-progestagenní aktivitou, na ČOV. Anti-progestagenní aktivita se v odpadních vodách na přítoku ČOV a v průběhu čištění pohybovala od 31,5 do 271 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ EQ mifepristonu (ekvivalenty mifepristonu). Čistírenské procesy dokázaly eliminovat až 88,4 % kontaminantů podílejících se na této aktivitě (Rao a kol., 2014).

V Nizozemsku byl na základě informací o výskytu anti-progestagenní aktivity v povrchových vodách proveden dvouletý průzkum (od ledna 2018 do prosince 2019), při kterém byly odebírány každé čtyři týdny vzorky ze třech povrchových zdrojů pitné vody (řeka Máza, řeka Rýn a poldr Bethune). Studie ukázala, že je v nizozemských

povrchových vodách přítomná anti-progestagenní aktivita. Tato aktivita byla prokázána téměř ve všech vzorcích, a to v koncentracích větších než $1,2 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ EQ mifepristonu. Anti-progestagenní aktivita byla vyvolána zejména přítomností pesticidů metolachloru (herbicid), cyazofamidu (fungicid) a epoxiconazolu (fungicid) a dále léčiv telmisartanu a diklofenaku. Epoxiconazol přispěl na lokalitách na řece Rýnu a Máze k anti-progestagenní aktivitě největší měrou. Při úpravě na pitnou vodu byla anti-progestagenní aktivita odstraněna, z toho vyplývá, že přítomnost látek s anti-progestagenní aktivitou ve vodním prostředí může v tomto případě představovat problém pro ekosystém, ale ne pro bezpečnost pitné vody (Houtman a kol., 2021).

V České republice a na Slovensku byla anti-progestagenní aktivita analyzována na šesti přítocích a odtocích z ČOV a v povrchových vodách nad i pod zaústěním vyčištěných odpadních vod. Aktivita byla zaznamenána na všech šesti přítocích a na třech ze šesti odtoků z ČOV. Čistírenskými procesy byla aktivita značně snížena nebo úplně odstraněna. Koncentrace na přítoku se pohybovaly v rozmezí $2,63\text{-}83 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ EQ mifepristonu a na odtoku v rozmezí $0,77\text{-}1,01 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ EQ mifepristonu. Ve vzorcích z povrchových vod byla anti-progestagenní aktivita pod mezí kvantifikace. Ve vzorcích vody byla navíc zjišťována přítomnost mifepristonu a ulipristal acetátu, z těch byl detekován pouze mifepriston, a to jen v jednom případě v koncentraci $0,65 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Není tudíž zřejmé, jaké látky anti-progestagenní aktivitu způsobily (Šauer a kol., 2018).

Ve Francii byly analyzovány vzorky na šesti městských ČOV a ve všech šesti vzorcích byla detekována anti-progestagenní aktivita. Údaje o anti-progestagenní aktivitě jsou však k dispozici pouze u dvou ze šesti monitorovaných ČOV. Zde byly naměřeny aktivity $2,8$ a $3,8 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ EQ mifepristonu. Bylo zjištěno, že z menší části jsou za tuto aktivitu zodpovědné 17β -testosteron a dihydrotestosteron, ale hlavní antagonisté nebyli zjištěni (Bellet a kol., 2012).

V Austrálii byla provedena studie, která trvala rok a byly během ní čtvrtročně odebírány vzorky z říčních toků (celkem 73 vzorků). Anti-progestagenní aktivita $> 8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ EQ mifepristonu byla detekována u 16 % vzorků. V jednom ze vzorků, který byl z průmyslové oblasti, byla zjištěna aktivita dosahující $32 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ EQ mifepristonu. Nejvíce vzorků vykazujících anti-progestagenní aktivitu bylo z lokalit v průmyslových oblastech (50 %), dále z oblastí v blízkosti obytných sídel (23 %), v oblastech pod výpustí vody z ČOV (13 %), na lokalitách obklopených zemědělskými

plochami (6 %) a nejméně v oblastech nezastavěných (4 %). V této studii však nebyly identifikované látky způsobující anti-progestagenní aktivitu (Scott a kol., 2014).

2.4. Obojživelníci v toxikologickém výzkumu

Obojživelníci jsou důležitou součástí vodního ekosystému, na který jsou úzce vázáni. Díky této vazbě jsou také citliví na jeho změny a znečištění. Většina druhů obojživelníků prodělává metamorfózu, což je velmi delikátní proces, který může být snadno narušen zvnějšku, mimo jiné i přítomností polutantů. Pro testy toxicity se používají zejména embryonální a larvální stádia obojživelníků a sleduje se vliv testovaných látek na průběh metamorfózy (Kočí a Mocová, 2009).

Mezi nejběžnější a nejčastěji používané modelové organismy pro testy toxicity na obojživelnících patří drápatka vodní (*Xenopus laevis*) (Kočí a Mocová, 2009). Kromě drápatky vodní je často používána také drápatka tropická (*Xenopus tropicalis*) (Fort a kol., 2004). Další, méně používané druhy, jsou skokani (*Rana sp.*), a to skokan hnědý (*Rana temporaria*) a skokan levhartí (*Rana pipiens*) (Burlibaşa a Gavrila, 2011), ropuchovití (*Bufo*), rosníčkovití (*Hyla*) a z ocasatých obojživelníků například axolotlovití (*Ambystoma*) (Gendron, 2013).

2.4.1. Drápatka vodní

Drápatka vodní (*Xenopus laevis*) je často používána pro laboratorní účely, jelikož je její chov v zajetí poměrně snadný (Coborn, 1992) a je nenáročná na péči (Sive a kol., 2000). Díky její rychlé reprodukci může být velkým problémem její případný únik do volné přírody, jelikož se z ní snadno může stát invazní druh vytlačující druhy původní (Speybroeck a kol., 2016).

Další výhody využití drápatky vodní jako modelového druhu jsou snadná manipulace, cenová dostupnost, velké množství materiálů pro různé experimenty, možnost řídit rozmnožování tak, aby bylo možné zajistit reprodukci až čtyřikrát za rok, průhlednost larev (Parisis, 2012), schopnost přijímat usmrcenou potravu, odolnost vůči chorobám, dobře popsaná morfologie a vývoj (Green, 2002; Nieuwkoop a Faber, 1994; Reed, 2005).

2.4.1.1. Původ a způsob života

Drápatka vodní (*Xenopus laevis*) je bezocasý obojživelník patřící do řádu žab (*Anura*), který pochází ze subsaharské Afriky (Coborn, 1992; Nieuwkoop a Faber, 1994).

Tento druh má převážně neaktivní způsob života a je velmi odolný (Reed, 2005; Simmonds, 1985).

Přírodním habitatem drápatek jsou oblasti savan, kde obývají pomalu tekoucí až stojaté vody, v nepříznivých podmínkách jako je období sucha jsou schopné přežívat i v bahnitě části dna a vytvořit si v něm tunely pro vstup vzduchu. V klidovém stavu mohou přežít až rok (Coborn, 1992; Simmonds, 1985). Drápatka je primárně vodní organismus (Coborn, 1992), který tráví většinu času pod vodou a na hladinu se vynořuje, aby se nadechla (Simmonds, 1985). Je schopná přežít v téměř jakémkoliv typu a množství vody, dokonce je schopná migrovat i po souši (Nieuwkoop a Faber, 1994), ale vyžaduje k tomu, aby bylo mokro či alespoň vlhko (Speybroeck a kol., 2016). Stojaté vodní plochy, ve kterých se vyskytuje, jsou většinou pokryté zelenými řasami, ale jen zřídka obsahují vyšší vegetaci (Nieuwkoop a Faber, 1994).

Přírozenou potravu drápatek tvoří celá řada bezobratlých živočichů, například členovci, ale mohou se živit i menšími obratlovci jako jsou ryby, obojživelníci nebo dokonce jejich vlastní larvy (Speybroeck a kol., 2016). Potravu vyhledávají pomocí prstů a čichu, následně ji loví rychlým otevřením úst, hydrobranchiální pumpou, čímž vtáhnou potravu dovnitř. Potrava u pulců je zajišťována pomocí filtrace (Seale, 1982; Speybroeck a kol., 2016).

2.4.1.2. Reprodukce a pohlavní dimorfismus

Drápatky dosahují pohlavní dospělosti během 12 měsíců života (Sive a kol., 2000) a reprodukce může probíhat kdykoliv během roku, ale většinou začíná na jaře a přetrvává až do léta. Samice kladou až 2500 lepidých vajíček většinou na malé hromady nebo jednotlivě na vegetaci (Speybroeck a kol., 2016).

Samce drápatek od samic můžeme snadno rozeznat na základě několika znaků. Jedním z nich je, že samice jsou obecně mohutnější a větší než samci stejného stáří. Dále má samec v období páření na spodní straně předních končetin pářící mozoly tmavé barvy (Obr. 5) a na rozdíl od samců mají samice v zadní části těla kloakální pysky (Obr. 6). Samcům chybí hlasový váček, i přesto však vydávají zvuky stahy vnitřních hrtanových svalů, kterými vábí opačné pohlaví, které jim na tyto zvuky odpovídá. Samotné páření probíhá v noci, kdy si samec chytne samici do pářícího objetí, které se nazývá pánevní amplexus (Kwong-Brown a kol., 2019; Sive a kol., 2000; Starnberger a kol., 2014).



Obr. 5: Pářící mozoly samce drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Fialovou šipkou jsou vyznačeny tmavé pářící mozoly (foto autor).

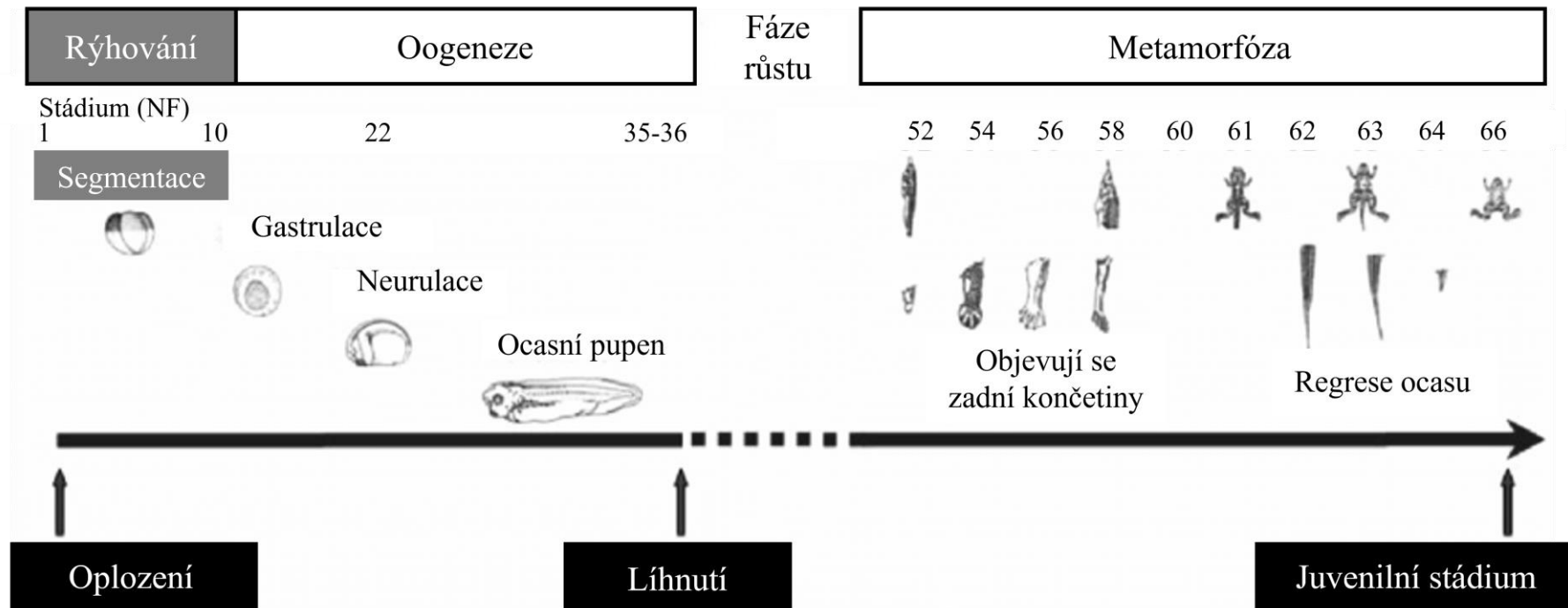


Obr. 6: Samec (vpravo) a samice (vlevo) drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Fialově jsou vyznačené kloakální pysky u samice (foto autor).

2.4.1.3. Vývoj a metamorfóza

Vývoj a metamorfóza drápatky vodní byl podrobně popsán v publikaci Nieuwkoop a Faber (1994). Ranný vývoj probíhá u drápatek od stádia Nieuwkoop a Faber (NF) 1, které nastává bezprostředně po oplození, až po stádium NF 66, které nastává přibližně 58 dní po oplození (Obr. 7). Mezi stádii NF 48 a NF 58 dochází k vývoji končetin. Stádium NF 58 nastává přibližně 44 dní po oplození a larva (pulec) v něm dosahuje své maximální délky. Ve stádiu NF 58 mizí schopnost regenerovat končetiny při poranění

a objevují se u nich přední končetiny, nejčastěji jsou první viditelné lokty s tím, že levá a pravá končetina se nemusejí objevit současně. Dále se na zadních končetinách v tomto stádiu objevují tři drápky, které postupně tmavnou a zpevňují se. Mezi stádii NF 58 a NF 66 dochází ke vstřebání ocasu a zániku žeber a jedinec začíná dýchat vzduch. Mezi stádiem NF 63 a NF 66 dochází ke změnám tvaru hlavy, polohy očí a úst spolu s polohou končetin. Jedinec, který dosáhne stádia NF 66, se stává juvenilním, tento jedinec zatím není schopen se pohlavně rozmnožovat, ale má již dokončený proces metamorfózy. Ve stádiu NF 66 má žabka již vstřebaný ocas (Nieuwkoop a Faber, 1994; Zahn a kol., 2022).



Obr. 7: Vývoj a metamorfóza drápatky vodní (*Xenopus laevis*) (převzato a upraveno z Estabel a kol., 2005; Shiokawa, 2012)

Dospělci drápatek (Obr. 8) dosahují rozměrů okolo 10-15 cm a mají zploštělou (Speybroeck a kol., 2016), ale robustní stavbu těla, což je zřetelné zejména na zadních končetinách (Coborn, 1992), kde jsou tři vnitřní prsty opatřeny černými, tvrdými drápkami (Obr. 9) (Speybroeck a kol., 2016). Díky těmto drápkám na zadních končetinách dostal tento druh žab svůj název (Coborn, 1992). Pomocí drápků jsou žáby schopné trhat i větší potravu. Drápatka vodní je specifická tím, že jí chybí jazyk a má poměrně malé oči, které jsou opatřeny pouze spodním očním víčkem a jsou posazené dorsálně na hlavě (Nieuwkoop a Faber, 1994; Reed, 2005; Schoonbee a kol., 1992). Zbarvení je většinou tmavší na hřbetní straně než na straně břišní. Hřbetní strana bývá šedo-hnědá, často mramorovaná, mramorování má tmavší barvu. Břišní strana těla je zbarvená krémovou až bílou barvou. U drápatek se můžeme setkat také s albinismem (Obr. 10). V přírodě se dožívají 15-16 let a v zajetí až 20 let (Coborn, 1992).



Obr. 8: Dospělci drápatky vodní (*Xenopus laevis*) (foto autor)



Obr. 9: Drápků na zadních končetinách drápatky vodní (*Xenopus laevis*) (foto autor)



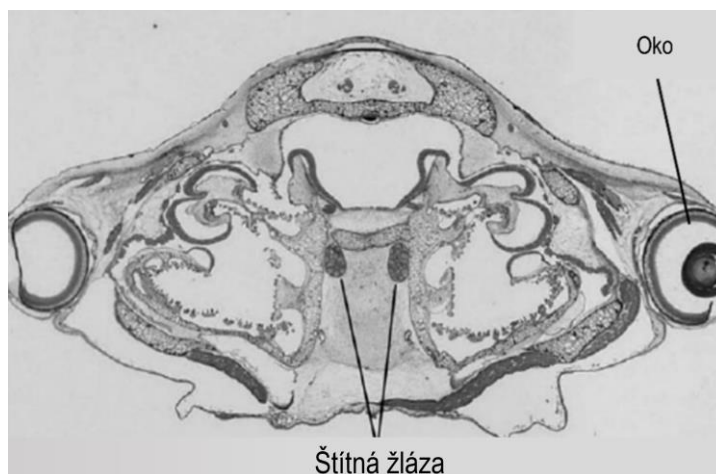
Obr. 10: Drápatka vodní (*Xenopus laevis*) albinotická forma (foto autor)

Na povrchu jsou drápatky slizké a jejich pokožka produkuje toxiny jako ochranu před predátory (Speybroeck a kol., 2016). V pokožce se nacházejí magaininy, skupina antibiotik, které mají antibiotickou, antimykotickou, antiparazitickou a antivirotickou funkci. Magaininy slouží k ochraně pokožky a při poranění k jejímu rychlému hojení (Zasloff, 1987).

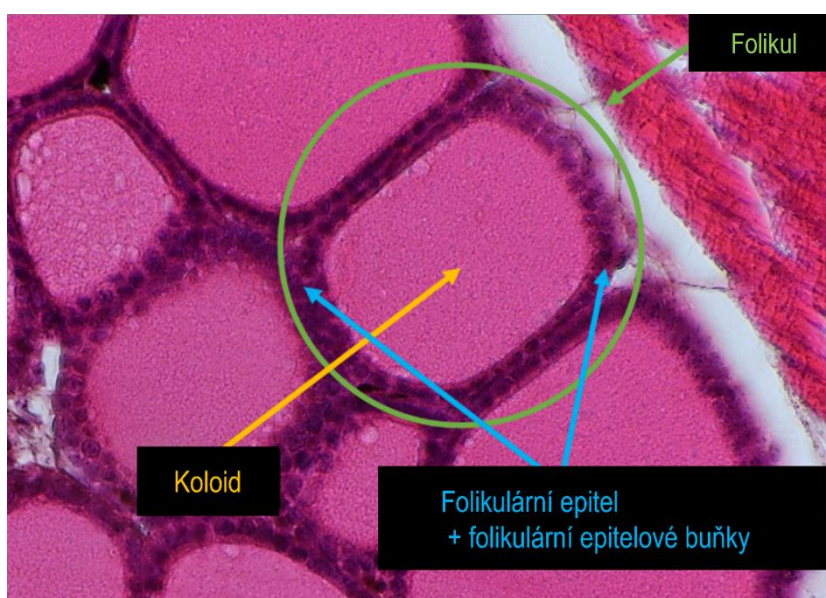
2.4.1.4. Štítná žláza

Štítná žláza je párový orgán, který se u drápatky nachází ve spodní části čelisti vedle průdušnice (Xenbase). Na histologickém řezu je vidět mezi očima (Obr. 11) (Fort a kol., 2011). Štítná žláza je tvořena folikuly, které ohraničuje na povrchu folikulární epitel s folikulárními epitelovými buňkami a uvnitř se nachází koloid (Obr. 12) (Nieuwkoop a Faber, 1994).

Štítná žláza se začíná vytvářet od stádia NF 33, kdy se zpočátku objevuje jako výběžek dna ústní části hltanu (*oropharynx*), který kaudálně roste v podobě buněčného vlákna a zesiluje se. Toto probíhá do stádia NF 39, kdy se začíná na nejkaudálnějších konci větvit na dva laloky. Štítná žláza je spojená se dnem ústní části hltanu pomocí kanálku (*ductus thyreoglossus*), první část spojení zaniká ve stádiu NF 41 a zbytek pak ve stádiu NF 43. Ve stádiu NF 41 tvoří štítná žláza dvě podélná buněčná vlákna, ve kterých se objevují uzlovitá ztlustění a štítná žláza tak dostává finální podobu. Ve stádiu NF 48 se začínají vytvářet první laloky, ve kterých se ve stádiu NF 49-50 vytvoří první folikuly. Ve stádiu NF 51 každá část štítné žlázy obsahuje přibližně 13 folikulů, tento počet do stádia NF 53 vzroste přibližně na 20. Vývoj štítné žlázy je dokončen ve stádiu NF 56 (Nieuwkoop a Faber, 1994).



Obr. 11: Poloha štítné žlázy u drápatky vodní (*Xenopus laevis*) (převzato a upraveno z Fort a kol., 2011)



Obr. 12: Folikuly štítné žlázy na histologickém řezu štítné žlázy u drápatky vodní (*Xenopus laevis*) (snímek autor)

Nejdůležitější funkcí štítné žlázy u obojživelníků je produkce hormonů tyroxinu (T4) a 3,5,3-trijodtyroninu (T3). Tyto hormony, a to zejména T3, jsou nezbytné mimo jiné pro správný průběh metamorfózy a její vrcholení. Na základě vazby mezi štítnou žlázou a hypofýzou se reguluje hladina produkovaných hormonů štítné žlázy, na změny koncentrací následně reagují tkáně a orgány. Nejvyšší hladina hormonů štítné žlázy je u drápatky vodní v období, kdy vrcholí metamorfóza (Galton, 1988; Huang a kol., 2001).

2.4.1.5. Gonády

Gonády jsou párový pohlavní orgán, který je u drápatky umístěn v tělní dutině. Gonády jsou spojeny každá s jednou ledvinou. Samičí gonády jsou vaječníky, které mají zvlněnou strukturu a produkují vajíčka. Samčí gonády jsou varlata, která mají hladkou strukturu a produkují spermie. Spolu s produkcí gamet produkují také pohlavní hormony. Pohlavní produkty jsou u obou pohlaví vypouštěny kloakou do vodního prostředí, kde dochází k oplození (Piprek, 2016; Piprek a kol., 2017).

Vývoj gonád začíná ve stádiu NF 40, kdy jsou primordiální zárodečné buňky, které obsahují žloutek, usazeny v oblasti, odkud bude vznikat budoucí pohlavní ústrojí. Ve stádiu NF 43 začnou buňky migrovat směrem k sobě a vytvoří střední nepárový pohlavní hřeben, následně nastává laterální migrace, při které vzniknou ve stádiu NF 46 dva pohlavní hřebeny. Zárodečné buňky se nacházejí zejména v korové oblasti pohlavního hřebene a ve stádiu NF 50 začínají ztrácet žloutek. Diferenciace pohlavních žláz začíná ve stádiu NF 52-53 a projevuje se rozdílným umístěním pohlavních buněk. U samců zárodečné buňky migrují z korové oblasti dovnitř gonád, kde vytvářejí spermatogonie (samčí zárodečné buňky). U samic zůstávají zárodečné buňky v korové oblasti a vytvářejí několik skupin oogonií (samičí zárodečné buňky). Ve stádiu NF 53 a 54 jsou varlata kompaktním orgánem stejně jako vaječníky. Ve varlatech se zvětšuje množství spermatogonií, které postupně spotřebovávají žloutkový materiál. Ve stádiu NF 55 se ve varlatech objevují primordia semenných kanálků, jejichž počet se až do stádia NF 66 zvyšuje. Ve vaječnicích se oogonie přeměňují na oocyty a rostou postupně až do stádia NF 66 (Nieuwkoop a Faber, 1994; Piprek a kol., 2017).

2.4.1.6. Chov dospělců v zajetí

Samci a samice drápatky jsou obvykle chováni odděleně v akváriích, která by měla být přikryta sítkou nebo drátěným víkem, aby se zabránilo úniku žab (Coborn, 1992; Sive a kol., 2000). Pro jedince s délkou těla > 12 cm by měla mít plocha hladiny alespoň 920 cm² a vodní sloupec by měl být alespoň 12,5 cm (Vyhláška č. 419/2012 Sb.). Teplota pro chov by se měla pohybovat mezi 16-22 °C a neměla by stoupnout nad 25 °C, jelikož by to mohlo způsobit zhoršenou kvalitu vajíček (Coborn, 1992; Sive a kol., 2000). Další důležitý sledovaný faktor je pH, optimální pH je 6,5 (Sive a kol., 2000). Drápatka vodní však snáší rozmezí pH mezi 6,5 a 8,5 (Xenopus Express). Ideální světelná perioda pro chov je 14-12 hodin světla a 12-10 hodin tmy. Jako krmivo se používají proužky syrového

libového masa, většinou hovězího nebo kuřecího masa či hovězího srdce, pokud je maso podáváno dlouhodobě je vhodné do něj přidávat multivitaminové (multiminerální) doplňky. Dále mohou být drápatky krmeny žížalami nebo běžnými bezobratlými. V laboratorních podmínkách jsou většinou krmeny speciálně upravenými granulami. Potrava by měla být podávána minimálně třikrát týdně (Coborn, 1992; Sive a kol., 2000).

Reprodukcí drápatků je možné indukovat uměle. Můžeme se setkat s několika způsoby, kdy je buď aplikováno sérum březí klisny v jedné injekci a následně injekce humánního choriové gonadotropinu (hCG) nebo je aplikován pouze hCG injekčně v jedné či dvou dávkách. Injekce jsou vždy aplikovány do dorsálního lymfatického vaku, kdy injekce s první dávkou hCG by měla být aplikována přibližně 12-18 h před plánovaným kladením vajíček (Liu, 2006; Parisi, 2012; Sive a kol., 2000). Sive a kol. (2000) uvádí dávku hCG pro samce 300 IU a pro samice 800 IU. Ve Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém ve Vodňanech se samcům aplikuje dávka 200 IU hCG, ve dvou injekcích, kdy je jedna podána ráno a druhá odpoledne den před plánovaným kladením vajíček. Samicím se aplikuje 500 IU hCG v jedné dávce, a to odpoledne (ústní sdělení Michala Pecha – student Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 5.6.2022). Počet nakladených vajíček se odvíjí od podané dávky hCG. Po naklazení vajíček je potřeba zabránit jejich sežráním rodičovským párem, proto je vhodné ho po naklazení vyjmout, nebo na dno umístit síťku (Sive a kol., 2000).

3. Materiál a metodika

Experiment, ze kterého jsem zpracovávala vzorky, se uskutečnil ve Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém ve Vodňanech (VÚRH), v Laboratoři vodní toxikologie a ichtyopatologie (LVTI). Cílem experimentu bylo zhodnocení vlivu mifepristonu na vývoj gonád a štítné žlázy u drápatky vodní (*Xenopus laevis*), která byla jeho působení vystavena. Mifepriston byl vybrán, jelikož se jedná o modelový antiprogestagen, který byl již v minulosti ve vodách detekován a anti-progestagenní aktivita ve vodách se často udává právě v ekvivalentech mifepristonu. Experiment byl navržen doc. Ing. Hanou Kocour Kroupovou, Ph.D. a proveden Dipl. Biol. Christophem Steinbachem, Ph.D. a Ing. Michalem Pechem, kteří následně odebrali a zpracovali vzorky gonád a štítné žlázy. Mou úlohou bylo provést analýzu obrazu, jednalo se zejména o pořizování snímků štítné žlázy s následným měřením vybraných parametrů a zároveň provést měření parametrů na předem připravených snímcích gonád, pořízených přímo v otevřené tělní dutině žab.

3.1. Experiment

In vivo experiment byl proveden v souladu s pokyny publikovanými v návodu OECD č. 241 (2015). Testovacím organismem byla drápatka vodní (*Xenopus laevis*). Začátek experimentu byl iniciován dosažením stádia NF 47-48 (larvální stádium) a byl ukončen dosažením stádia NF 66 (juvenilní stádium). V období, ve kterém experiment probíhal, docházelo k pohlavní diferenciaci (řízené osou hypotalamus-hypofýza-gonády) a metamorfóze (řízené osou hypotalamus-hypofýza-štítná žláza). Drápatky vodní (*Xenopus laevis*) byly vystaveny třem odstupňovaným koncentracím mifepristonu, konkrétně koncentracím 2 (M1), 22 (M2) a 215 (M3) ng·l⁻¹. K dosažení těchto koncentrací byl mifepriston rozpouštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO), kvůli jeho relativně vysokému rozdělovacímu koeficientu (log Kow). Každá pokusná skupina měla 4 opakování/replikáty (A, B, C, D). Kromě pokusných skupin, ve kterých byly žáby vystaveny mifepristonu, byla zároveň zahrnuta kontrolní skupina, rovněž ve 4 opakováních, kam bylo nadávkováno pouze rozpouštědlo DMSO (ve výsledné koncentraci 0,001 %obj.).

V každé pokusné skupině bylo chováno 45 žab, které byly umístěny ve 20l akváriích s 15l připravené lázně. Stejným způsobem byla připravena i kontrolní skupina

s rozpouštědlem. Akvária byla provzdušňována, aby bylo nasycení kyslíkem alespoň 60 %. Teplota v nich dosahovala $21,5 \pm 0,5$ °C a pH $7,49 \pm 0,16$. Teplota vody, obsah rozpuštěného kyslíku a pH byly zaznamenávány každý den. Světelná perioda byla 12 hodin světlo a 12 hodin tma. Vzorke žab byly odebírány při dosažení stádia NF 58 (před metamorfním vyvrcholením) a NF 66, které nastává krátce po dokončení metamorfózy. Zaznamenáván byl úhyn žab, vývojové abnormality, doba do dosažení stádia NF 66 a poměr pohlaví. Stádia NF 58 dosáhli první pulci 33 dní po oplození a stádia NF 66 bylo dosaženo 74 dní po oplození.

3.2. Morfologie gonád

Snímky gonád byly pořízeny během pitvy žab při vzorkování po dosažení stádia NF 66. Při pitvě byla žábám odstraněna kůže v břišní části s následným otevřením břišní dutiny, ze které byly vyjmuty orgány, tuková tkáň a svalovina až ke komplexu gonády-ledviny. Následně byl přidán roztok Bouinu, který zajistil lepší viditelnost gonád na snímcích. Gonády byly následně vyfoceny kamerou Olympus E-600, která byla propojena s binokulární lupou.

Pořízené snímky byly otevřeny pomocí programu QuickPHOTO MICRO 3.2, ve kterém se měřily jednotlivé parametry. Měřena byla délka gonád, šířka v průměrně širokém místě gonád, dále se zaznamenávalo pohlaví a počet melanoforů, což jsou pigmentové buňky s vysokým obsahem melaninu (Aspengren a kol., 2007). Vzorke gonád byly měřeny u kontrolních skupin samců (u 16 jedinců) a samic (u 14 jedinců) a dále v jednotlivých skupinách exponovaných mifepristonu: opět u samců (M1 – 20 vzorků, M2 – 17 vzorků, M3 – 8 vzorků) a samic (M1 – 14 vzorků, M2 – 16 vzorků, M3 – 25 vzorků).

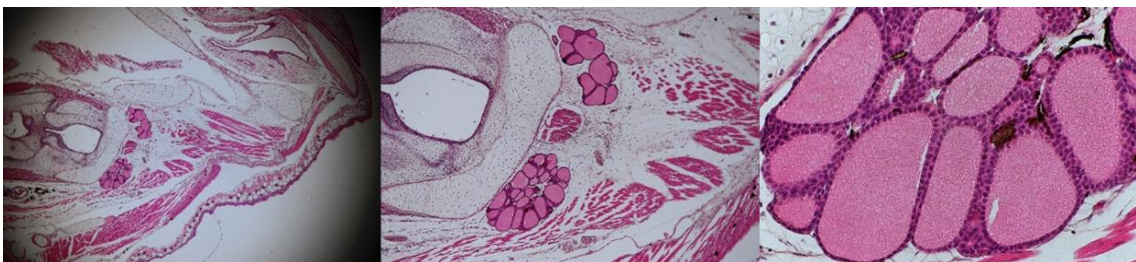
Kromě měřených parametrů byl posuzován i celkový vzhled gonád, který by mohl signalizovat abnormality ve vývoji. Počet melanoforů je u samic vyšší než u samců a jejich zvýšený výskyt u samců či naopak menší výskyt u samic by mohl ukazovat na intersexualitu jedinců. Měřené parametry délka a šířka gonád byly sledovány, jelikož změny v rozměru gonád by mohly znamenat hypoplazii, tedy neúplné vyvinutí tkáně, či v opačném případě hypertrofii. Zároveň by gonády měly být u samic delší než u samců, tudíž by se na základě délek mohly zjistit známky intersexuality.

Dále byla provedena korelační analýza mezi rozměry gonád a hmotností a délkou těla jednotlivých žab, abychom zjistili, zda je mezi těmito parametry nějaký vztah. V případě,

kdy byla nalezena statisticky signifikantní korelace mezi těmito parametry, byly hodnoty rozměrů gonád normalizovány tak, že byly vyděleny hmotností či délkou těla. Tyto hodnoty pak byly znovu statisticky hodnoceny.

3.3. Histologie štítné žlázy

Vzorky štítné žlázy byly odebrány z žab ve stádiu NF 58 a NF 66 a byly fixovány ve formaldehydu. Následně byly dekalifikovány a v automatickém tkáňovém procesoru (Bamed) dehydratovány v odstupňovaných koncentracích ethanolu (70, 95, 100 %) a očištěny xylenem. Vzorky byly po tomto procesu zality do parafinových bločků pomocí embedovacího zařízení (Leica Biosystems EG 1150 HC). Hotové parafinové bločky byly před nařezáním na několik minut umístěny do mrazáku, kvůli snadnější tvorbě histologických řezů. Nařezány byly pomocí mikrotomu (Diapath Galileo) na řezy o tloušťce 4,5 μm , tyto řezy byly následně přesunuty do vodní lázně (Medite TFB 55), ze které byly přeneseny na podložní sklíčko. Podložní sklíčko s řezy bylo položeno na nahřívací desku (Sakura1452), čímž byly řezy na sklíčku fixovány. Sklíčka byla dána do sušárny (Thermostat Ekom BT50), aby došlo k odstranění parafínu a poté byly obarveny hematoxylinem a eosinem v barvicím automatu (TISSUE-TEK® DRS™ 2000, Sakura) a po obarvení bylo podložní sklíčko se vzorkem zalepeno krycím sklíčkem. Štítná žláza na histologickém sklíčku byla následně vyfocena v programu QuickPHOTO MICRO 3.2 pomocí kamery Canon BX51, která byla propojena s mikroskopem. Snímek byl pořízen z jednoho vzorku a jednoho řezu vždy ve třech zvětšeních objektivu, a to 4x, 10x a 60x (Obr. 13).



Obr. 13: Snímky štítné žlázy ve zvětšení 4x (vlevo), 10x (uprostřed), 60x (vpravo)

U vzorků, které byly ze stádia NF 58, bylo ze skupiny M3 měřeno 8 vzorků štítné žlázy a z kontrolní skupiny bylo měřeno 9 vzorků štítné žlázy. U vzorků, které byly odebrány ve stádiu NF 66 ze skupiny M1, bylo měřeno celkem 8 vzorků štítné žlázy (4 od samců a 4 od samic), ze skupiny M2 bylo rovněž měřeno celkem 8 vzorků (4 od samců

a 4 od samic). U vzorků ze skupiny M3 bylo celkem měřeno 16 vzorků štítné žlázy (12 od samic a 4 od samců). U kontrolní skupiny bylo měřeno celkem 14 vzorků štítné žlázy (10 od samic a 4 od samců). Folikulární (epitelové) buňky byly měřeny při zvětšení 60x. U 10 folikulů byla ve stěně folikulárního epitelu měřena šířka na 5 místech pro každý folikul (Obr. 14). Pokud jedna část štítné žlázy neměla dostatek folikulů, nebo se na obrázek nevešlo dostatek folikulů, bylo snímek vyfoceno více nebo byly vyfoceny obě části štítné žlázy.



Obr. 14: Ukázka hotového měření jednoho řezu štítné žlázy (skupina M3 – replikát B)

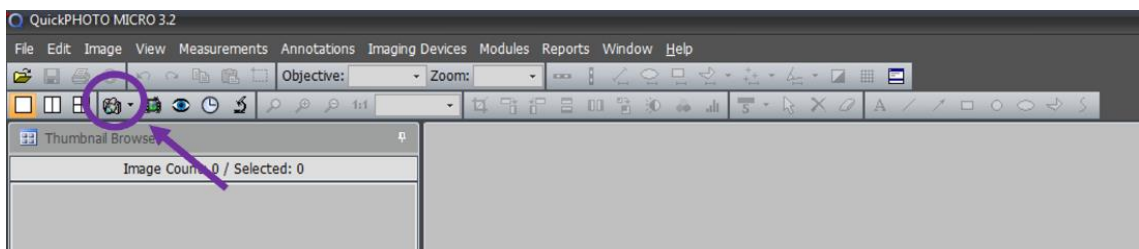
U vzorků štítné žlázy bylo kromě tloušťky folikulárních buněk sledováno také, zda byly folikulární buňky v jedné či více řadách a zda nenastaly změny v koloidu, který vyplňuje prostor folikulu. Více vrstev folikulárních buněk v epitelu by mohlo ukazovat na hyperplazii. Změny v šířce folikulárního epitelu by mohly znamenat atrofii nebo hypertrofii štítné žlázy, to znamená nedostatečný nebo naopak nadměrný růst. Změny v koloidu a jeho vyčerpání by mohly indikovat změny v produkci či spotřebě hormonu štítné žlázy tyroxinu (T4).

3.4. Analýza obrazu

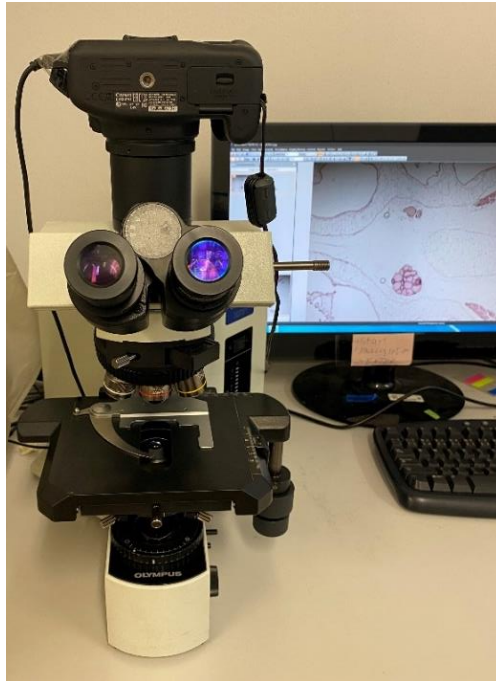
Pro analýzu obrazu byl používán program QuickPHOTO ve verzi 3.2, ve kterém byly vybrané parametry měřeny u snímků jednotlivých vzorků gonád a štítné žlázy.

3.4.1. Analýza histologických snímků

V první řadě byl otevřen program QuickPHOTO, ve kterém byly následně snímky pořizovány. Při pořizování snímků bylo postupováno následovně. Ve výchozím okně spuštěného programu se v horní polovině obrazovky nacházejí tři hlavní lišty (horní, prostřední a spodní). Na spodní hlavní liště nalezneme ikonu fotoaparátu (Obr. 15), která umožňuje pořizování snímků pomocí propojení mikroskopu s kamerou Canon BX51 (Obr. 16). Kliknutím na ikonu se otevře nové okno zobrazující obraz (Obr. 17) vloženého histologického sklíčka (Obr. 18) s řezem umístěným pod mikroskopem, ve kterém je možné obraz upravit a pořídit potřebnou fotografii. Pomocí ikon vpravo nahoře (vyvážení bílé barvy – „Auto WB“, „One Point WB“ – Obr. 17) je možné upravit vyvážení bílé barvy obrazu. Prostřednictvím mikroskopu je potřeba najít požadovaný orgán, v tomto případě štítnou žlázu, a zaostřit obraz rovněž pomocí mikroskopu. Ikona vlevo nahoře s fotoaparátem „Capture“ (Obr. 17) slouží k pořízení snímku. Vyfocený snímek je stejný jako obraz, který vidíme v otevřeném okně.



Obr. 15: Ikona fotoaparátu v programu QuickPHOTO



Obr. 16: Mikroskop propojený s kamerou Canon BX51, připojený k počítači

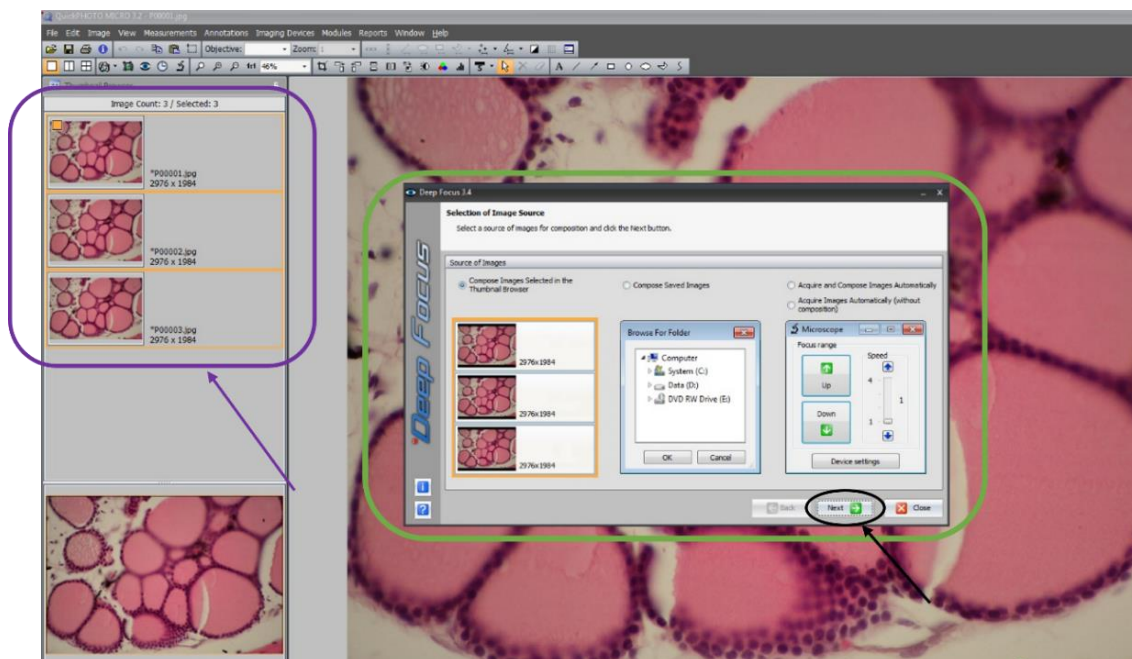


Obr. 17: Nové otevřené okno, ve kterém probíhá pořizování snímku (zvětšení 4x). Fialově zvýrazněna ikona na pořizování snímků „Capture“ (vlevo) a ikony na vyvážení bílé barvy (vpravo).

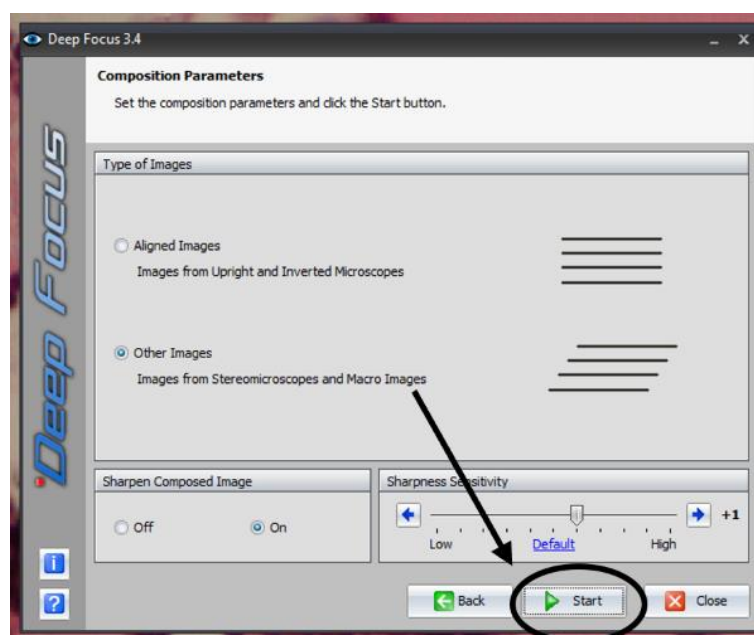


Obr. 18: Histologické sklíčko jednoho vzorku s řezy štítné žlázy (skupina M3 – replikát B)

Pokud nejde zaostřit celý obraz najednou, je potřeba vyfotit několik snímků, u nichž je potřeba, aby byla vždy zaostřena jiná část objektu (zde štítné žlázy) a aby po složení snímků do jednoho daly celý ostrý obraz. Tohoto lze docílit pomocí funkce programu s názvem Deep Focus, která se spouští pomocí klávesy „F6“ na klávesnici. Deep Focus z několika snímku zaostřených vždy na konkrétní část udělá jeden ostrý snímek, nesmí však být použito příliš mnoho snímků, jelikož by to mohlo ovlivnit výslednou kvalitu. Optimální je nepřekračovat čtyři snímky, ze kterých se složí výsledný snímek. Po vyfocení snímků je potřeba v původním okně programu označit snímky (Obr. 19), ze kterých chceme vytvořit jeden. Označení provedeme podržením klávesy „Ctrl“ na klávesnici a současným kliknutím myši na snímky. Poté, co jsou snímky označené, je potřeba kliknout na klávesu „F6“ a spustit Deep Focus. Otevře se nové okno s funkcí Deep Focus (Obr. 19), ve kterém je potřeba stisknout tlačítko „Next“ (Obr. 19), které zobrazí nové okno (Obr. 20), ve kterém je následně potřeba kliknout na tlačítko „Start“ (Obr. 20), a tím spustit transformaci snímků. Po chvíli se na levé straně základního okna u ostatních snímků objeví nový námi vytvořený snímek.



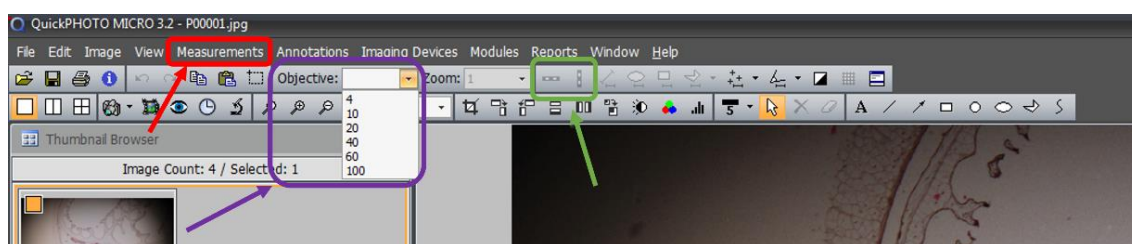
Obr. 19: Spouštění funkce Deep Focus. Fialově zvýrazněné snímky, které byly označené k transformaci, zeleně zvýrazněné nové otevřené okno s Deep Focus funkcí, černě vyznačené tlačítko „Next“.



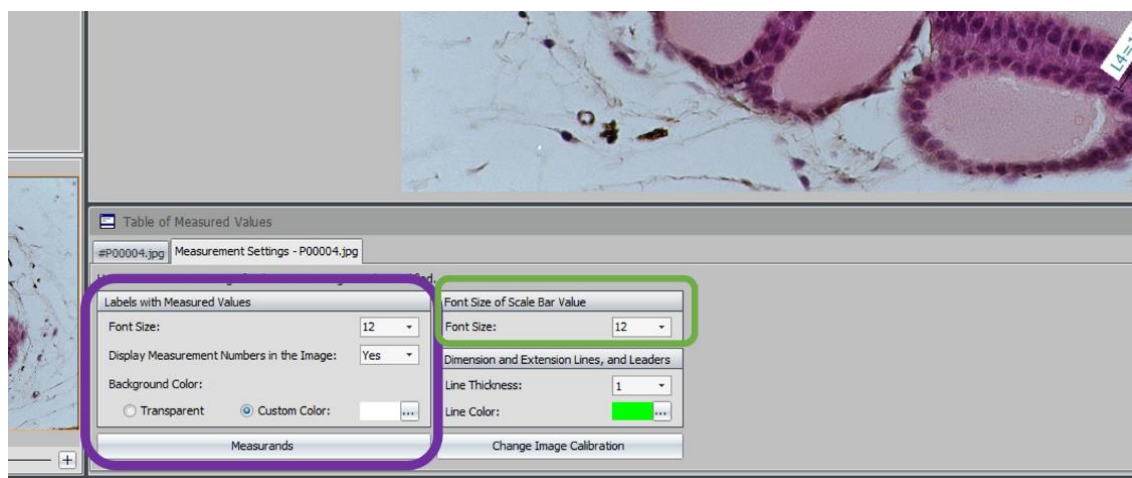
Obr. 20: Okno funkce Deep Focus, které se zobrazí po kliknutí na tlačítko „Next“ v předchozím okně. Černě zvýrazněno tlačítko „Start“.

Kvalitní a zaostřený snímek otevřeme. Nejdříve je potřeba nastavit velikost zvětšení objektivu na horní liště v nabídce „Objective“ a přidat k obrázku měřítko pomocí ikony měřítka (Obr. 21), měřítko je možné zvolit svislé nebo vodorovné. U měřítka je možné upravit jeho velikost textu na kartě „Table of Measured Values“, v záložce „Measurement

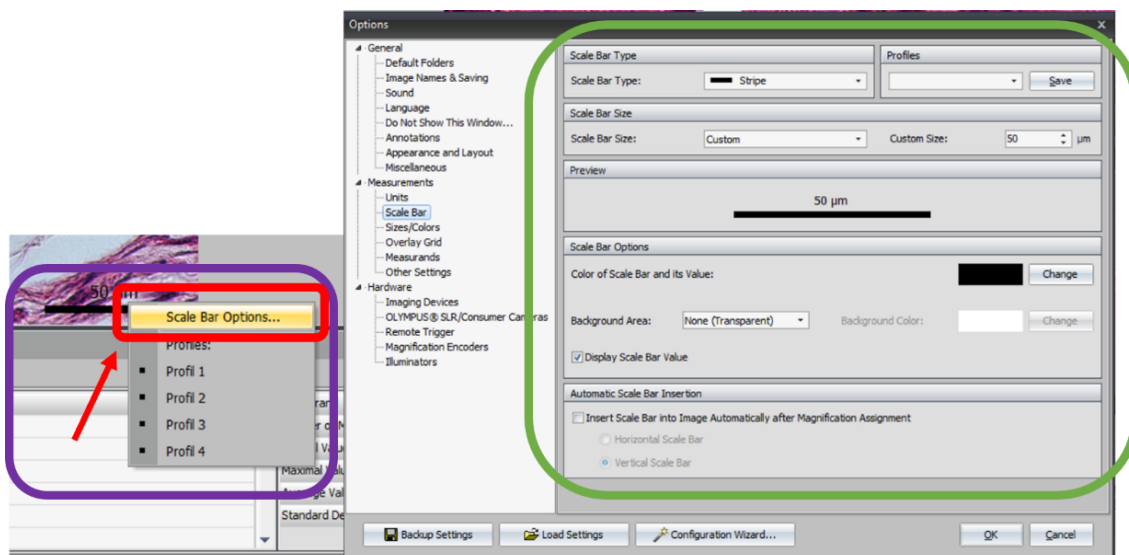
Settings“ (Obr. 22). Dále je možné upravit parametry měřítka kliknutím pravým tlačítkem myši na měřítko (Obr. 23), kde z možností vybereme první („Scale Bar Options...“, Obr. 23), následně se nám otevře nové okno, ve kterém je možné parametry měřítka upravit. Před vlastním zahájením měření je potřeba na horní liště v kartě „Measurements“ (Obr. 24) zkontrolovat na záložce „Set Active Calibration“ zvolení správné kamery (Obr. 24), kterou byly snímky pořizovány a na záložce „Units“, na stejné kartě, zvolit námi požadované jednotky (Obr. 24), ve kterých bude měření prováděno. Jednotky pro měření štítné žlázy byly mikrometry (μm).



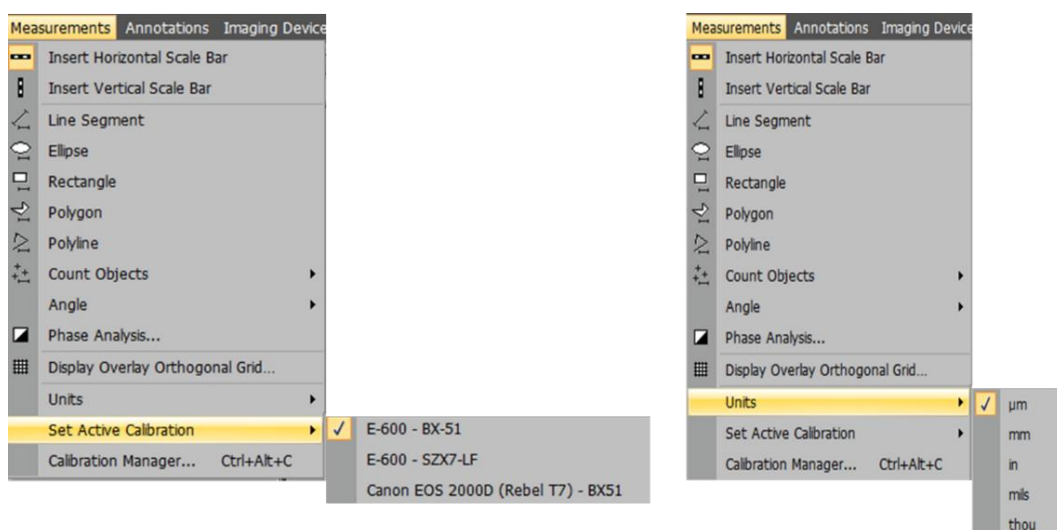
Obr. 21: Hlavní lišta v programu QuickPHOTO. Fialově označené zvolení zvětšení objektivu, zeleně označené vkládání měřítka, červeně zvýrazněna karta „Measurements“.



Obr. 22: Karta „Table of Measured Values“ s otevřenou záložkou „Measurement Settings“. Fialově zvýrazněna úprava popisku u měření, zeleně zvýrazněna úprava velikosti písma měřítka.



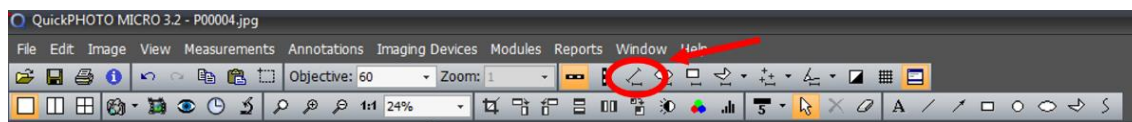
Obr. 23: Okno pro úpravu měřítka, objeví se po kliknutí pravým tlačítkem myši. Fialově označeno okno, zeleně označené nastavení pro úpravu měřítka na dalším novém okně, které se zobrazí po kliknutí na „Scale Bar Options...“ (označeno červeně).



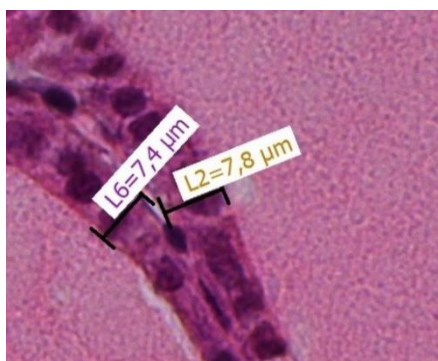
Obr. 24: Rozbalená karta „Measurements“, vlevo záložka „Set Active Calibration“ a vpravo záložka „Units“

Po nastavení a zkontrolování parametrů, které by mohly ovlivnit výsledky naměřených hodnot, je možné zahájit měření. Pro měření tloušťky folikulárního epitelu byla použita ikona pro měření „vzdáleností“ (Obr. 25). Kliknutím na ikonu se zahájí měření, první se umístí ukotvující bod a následně se posune myší konečný bod měření. Vznikne tak úsečka (Obr. 26), se kterou je možné manipulovat pomocí dvou koncových bodů, důležité je správné umístění obou bodů. Při vytvoření úsečky, se vedle ní objeví popisek, který označuje číslo měření a naměřenou velikost. Tento popisek lze upravit dole

na kartě „Table of Measured Values“ v záložce „Measurement Settings“ (Obr. 22), možnosti úpravy jsou znázorněny na obrázku. S měřením dále pokračujeme, dokud nemáme naměřené všechny hodnoty. Naměřené hodnoty se zobrazují na kartě „Table of Measured Values“ na záložce s názvem měřeného snímku (Obr. 27). Hodnoty byly následně přepsány do programu Microsoft Excel, kde se s nimi mohlo dále pracovat.



Obr. 25: Měření vzdálenosti v programu QuickPHOTO. Červeně je označená ikona pro měření.



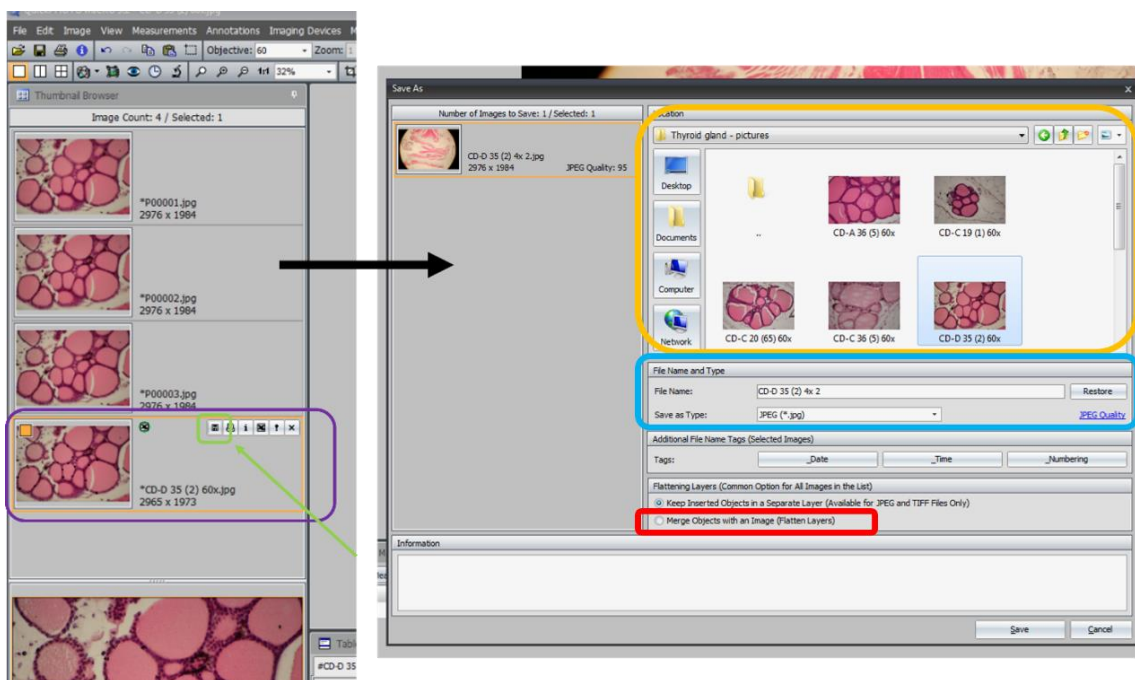
Obr. 26: Ukázka měření s jeho popisem

Table of Measured Values					
#P00004.jpg Measurement Settings - P00004.jpg					
Object Type	Measurand	Meas. Nr.	Value	Units	Description
Line Segment	Length	1	7,3	μm	
Line Segment	Length	2	6,1	μm	
Line Segment	Length	3	11,0	μm	
Line Segment	Length	4	12,6	μm	

Obr. 27: Naměřené hodnoty na kartě Table of Measured Values

Po dokončení měření je potřeba snímek uložit. V levé části okna se nachází náhled všech obrázků a snímek právě otevřený je ohraničený. První ikona zleva v jeho pravé části vypadající jako disketa slouží k ukládání snímků (Obr. 28). Po kliknutí na tuto ikonu se otevře okno, ve kterém musíme zvolit parametry ukládání. Jinou možností ukládání je postup přes kartu „File“, která se nachází na horní hlavní liště. Při prvním ukládání je potřeba zvolit místo a název pod kterým chceme snímek uložit a dále formát obrázku (Obr. 28), následně pak stisknout tlačítko „Save“ v pravém dolním rohu okna pro uložení.

Snímek, který je uložený pouze tímto způsobem, po otevření v programu na prohlížení snímků nezobrazí naměřené hodnoty, ty se zobrazí až po otevření v programu QuickPHOTO. Aby bylo možné vidět naměřené hodnoty i při otevření obrázku v programu na prohlížení snímků, je v okně po kliknutí na ikonu diskety důležité zaškrtnout políčko vyznačené v Obr. 28 červeně, tímto dojde k zamrazení měření na snímku a nedá se s ním dále pohnout a není možné ho upravovat. Výchozí ukládání je automaticky nastaveno na uložení snímku bez měření. Zamrazení měření je případně možno docílit klávesovou zkratkou „Ctrl + E“ před ukládáním. Snímky je dobré uložit oběma způsoby, aby bylo možné měření vidět i při otevření v programu na prohlížení snímků a zároveň se případně daly naměřené hodnoty upravovat.

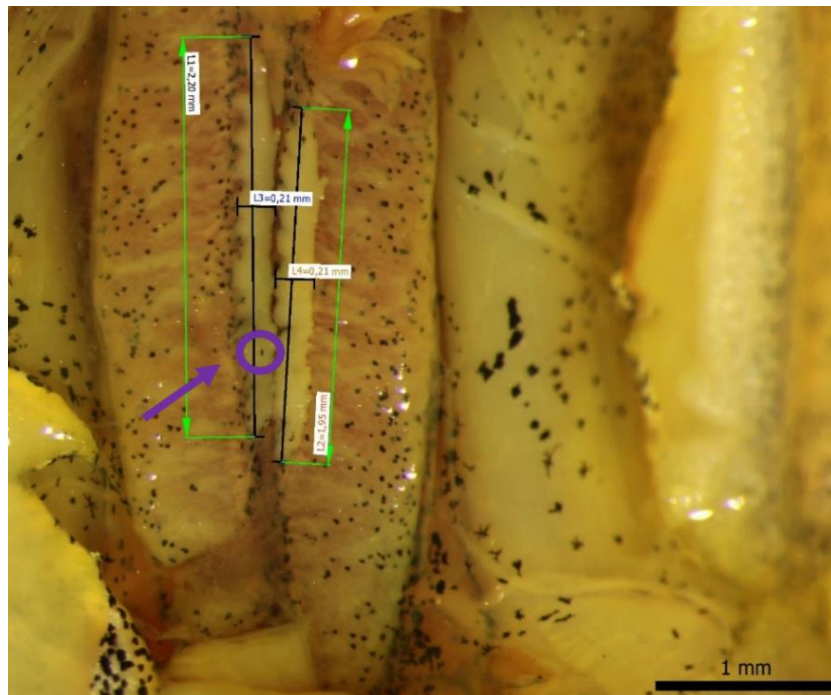


Obr. 28: Ukládání snímků v programu QuickPHOTO. Fialově zvýrazněný otevřený snímek, který chceme uložit, zeleně znázorněna ikona diskety, černě označeno okno parametrů uložení, červeně označené tlačítko pro zamrazení měření ve snímku, žlutě vyznačeno zvolení místa uložení a modře vyznačeno zvolení názvu a formátu ukládaného obrázku.

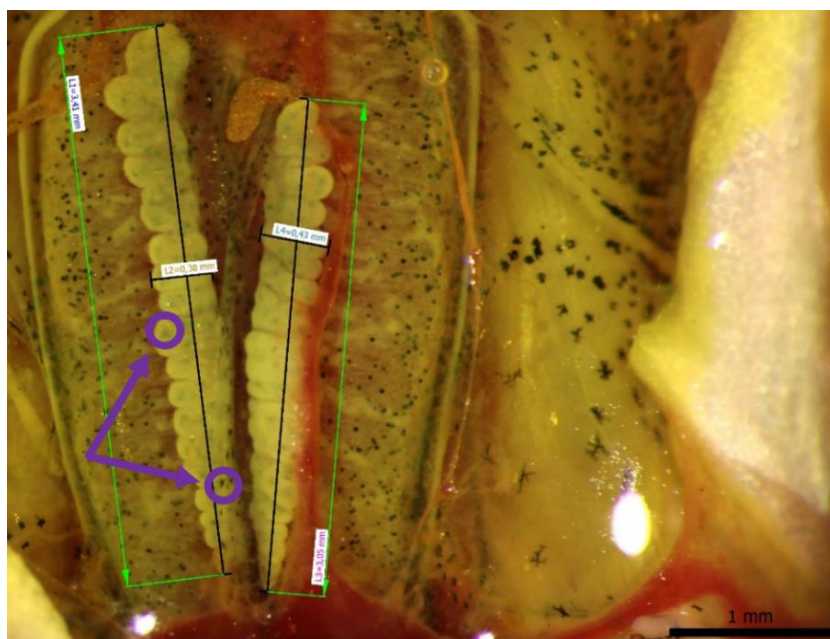
3.4.2. Analýza snímků gonád

Při měření parametrů na snímcích gonád (Obr. 29, 30) se postupovalo obdobně jako u snímků štítné žlázy. Před zahájením měření se musí zkontrolovat na hlavní liště v kartě „Measurements“ na záložce „Set Active Calibration“ zvolení správné kamery, která byla u gonád odlišná a nastavit jednotky na záložce „Units“, ve kterých budou parametry měřeny. Pro měření délky a šířky gonád byla použita jednotka milimetr (mm). Na hlavní

horní liště je potřeba nastavit zvětšení objektivu, při kterém byly snímky pořizovány, nejčastěji bylo zvětšení objektivu 2,8x a 2,5x nebo méně často 2x. Dále je potřeba přidat měřítko. Následně bylo zahájeno měření, při kterém byl nejprve umístěn ukotvující bod na horní nebo dolní okraj gonád a změřila se délka. Šířka byla měřena obdobně, vždy byl umístěn ukotvující bod na pravý či levý okraj gonád a následně na opačný okraj bod druhý. Naměřené hodnoty spolu s pohlavím a počtem melanoforů byly zaznamenávány do programu Microsoft Excel.



Obr. 29: Snímek gonád (samec) s vyznačenou délkou a šířkou. Fialově označen melanofor (kontrolní skupina – replikát A, zvětšení objektivu 2,8x).



Obr. 30: Snímek gonád (samice) a vyznačenou délkou a šířkou. Fialově označeny melanofory (kontrolní skupina – replikát D, zvětšení objektivu 2,8x).

3.5. Statistické zpracování dat

Při statistickém zpracování dat byl hodnocen vliv koncentrace mifepristonu na vybrané parametry změřené u exponovaných jedinců v porovnání s kontrolou. Všechny statistické analýzy byly zpracovány v programu STATISTICA (StatSoft ČR s.r.o.) a grafy byly vytvořeny prostřednictvím programu Microsoft Excel.

Parametry morfometrie gonád (délka, šířka) a počet melanoforů juvenilních jedinců žab (stádium NF 66), u samců a samic zvláště, byly vyhodnoceny za použití jednocestné analýzy variance (ANOVA) s následným Dunnettovým post-hoc testem porovnávajícím jednotlivé skupiny exponované koncentracím mifepristonu s kontrolní skupinou. Pokusné skupiny (kontrolní skupina, M1, M2, M3) byly použity jako nezávislá proměnná. Šířka stěny folikulárního epitelu štítné žlázy byla analyzována u stádia NF 66 dvoucestnou analýzou variance (ANOVA) s pokusnou skupinou a pohlavím jako nezávislou proměnnou. S následným Dunnettovým post-hoc testem. Pro analýzu šířky stěny folikulárního epitelu ve stádiu NF 58 byl použit Welchův t-test. Pro posouzení vztahu mezi hmotností/délkou těla a šířkou/délkou gonád juvenilních jedinců byla použita korelační analýza a byl vypočten Pearsonův korelační koeficient. Pro statistickou analýzu normalizovaných hodnot šířky gonád k délce těla a šířky gonád k hmotnosti byla použita

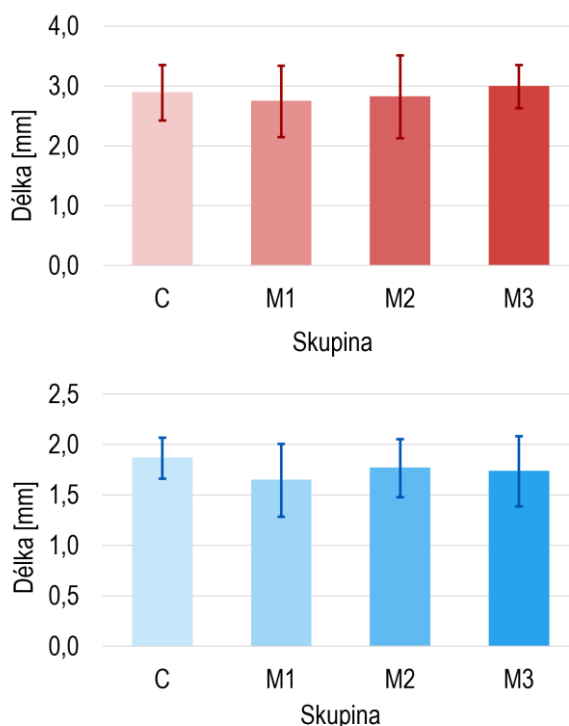
jednocestná ANOVA a následně Dunnettův post-hoc test. Změny byly považovány za statisticky významné v případě, že byla p-hodnota $\leq 0,05$.

4. Výsledky

4.1. Vliv mifepristonu na vývoj gonád drápatky vodní

Vliv mifepristonu na vývoj samčích gonád (varlat) i samicích gonád (vaječnicků) byl hodnocen na základě naměřených hodnot délky a šířky gonád, počtu melanoforů a celkového vzhledu gonád. U všech parametrů, které byly při analýze a následně v grafech použity, byl vypočten aritmetický průměr z hodnot naměřených parametrů na obou gonádách jednoho jedince. Následně byl spočten aritmetický průměr pro všechny vzorky v dané skupině a byl vynesena do grafu.

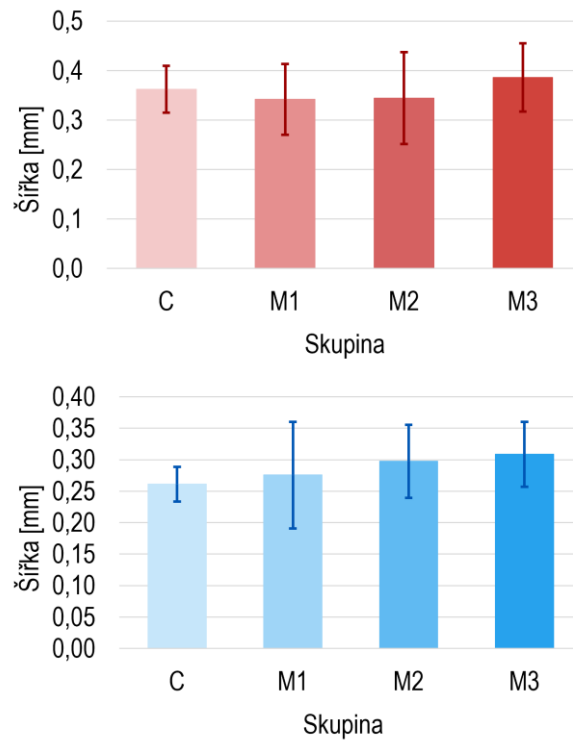
Průměrná délka gonád všech jedinců žab v jednotlivých testovaných skupinách (skupiny C, M1, M2, M3) je uvedena v Grafu 1 pro samice a samce zvlášť. U samic byla průměrná délka gonád v jednotlivých skupinách vystavených mifepristonu v porovnání s kontrolní skupinou velmi podobná. Ani u samců ani u samic nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v délce gonád mezi pokusnými skupinami exponovanými mifepristonu a kontrolní skupinou.



Graf 1: Průměrná délka gonád samic (nahore – červeně) a samců (dole – modře) drápatky vodní (*Xenopus laevis*) v jednotlivých testovaných skupinách. Sloupce v grafu znázorňují průměrné délky gonád žab v dané skupině a chybové úsečky představují směrodatné odchylky pro danou skupinu. C – kontrolní skupina, M1 – $2 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$; M2 – $22 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$; M3 – $215 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ mifepristonu.

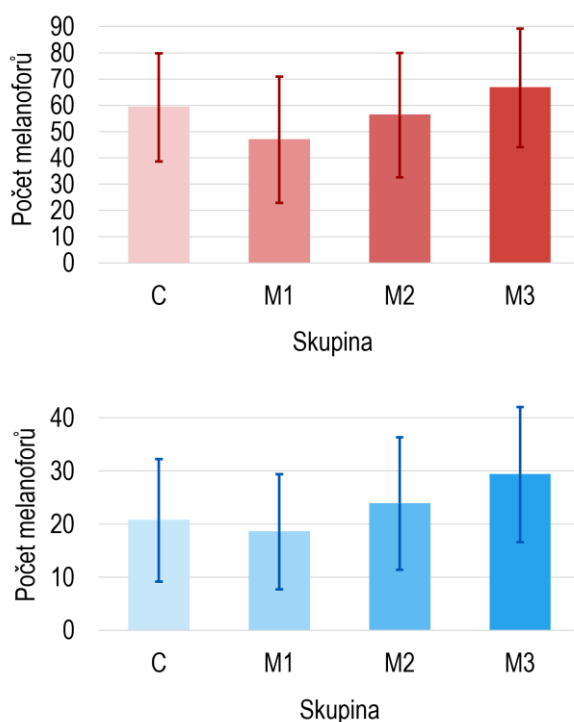
Hladina významnosti $p \leq 0,05$ (jednocestná ANOVA).

Průměrná šířka gonád žab obou pohlaví v testovaných skupinách je uvedena v Grafu 2. Ani u samců ani u samic nebyly, na základě statistické analýzy, zjištěny žádné signifikantní rozdíly v šířce gonád mezi skupinami, které byly exponované mifepristonu a kontrolní skupinou.



Graf 2: Průměrná šířka gonád samic (nahore – červeně) a samců (dole – modře) drápatky vodní (*Xenopus laevis*) v jednotlivých testovaných skupinách. Sloupce v grafu znázorňují průměrné šířky gonád žab v dané skupině a chybové úsečky představují směrodatné odchylky pro danou skupinu. C – kontrolní skupina, M1 – 2 ng·l⁻¹; M2 – 22 ng·l⁻¹; M3 – 215 ng·l⁻¹ mifepristonu. Hladina významnosti $p \leq 0,05$ (jednocestná ANOVA).

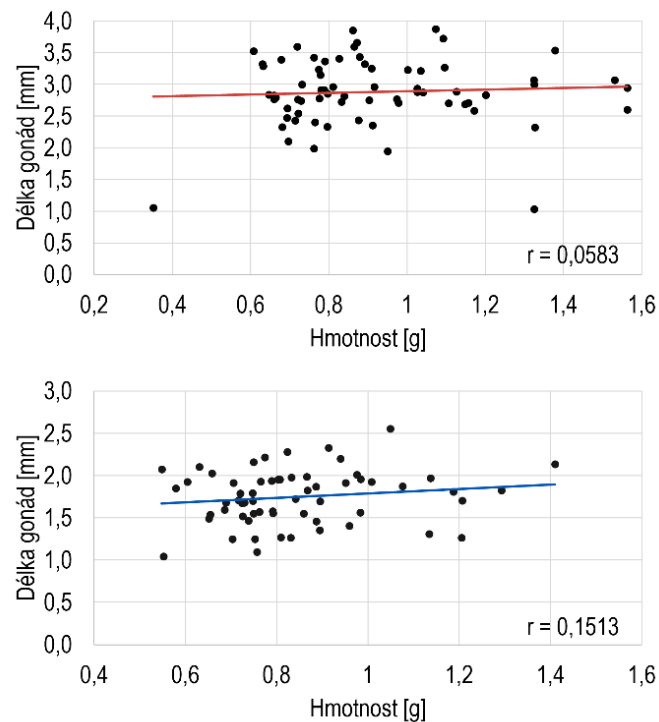
Průměrný počet melanoforů na gonádách samic a samců v jednotlivých testovaných skupinách je zobrazen v Grafu 3. S rostoucí koncentrací mifepristonu byl u samců i u samic pozorován mírný nárůst počtu melanoforů. Tento nárůst však nebyl při statistické analýze vyhodnocen jako signifikantní. Ani u jednoho pohlaví nebyly v počtu melanoforů zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinami exponovanými mifepristonu a kontrolní skupinou.



Graf 3: Průměrný počet melanoforů na gonádách samic (nahore – červeně) a samců (dole – modře) drápatky vodní (*Xenopus laevis*) v jednotlivých testovaných skupinách. Sloupce v grafu znázorňují průměrný počet melanoforů na gonádách žab v dané skupině a chybové úsečky představují směrodatné odchylky pro danou skupinu. C – kontrolní skupina, M1 – 2 ng·l⁻¹; M2 – 22 ng·l⁻¹; M3 – 215 ng·l⁻¹ mifepristonu. Hladina významnosti $p \leq 0,05$ (jednocestná ANOVA).

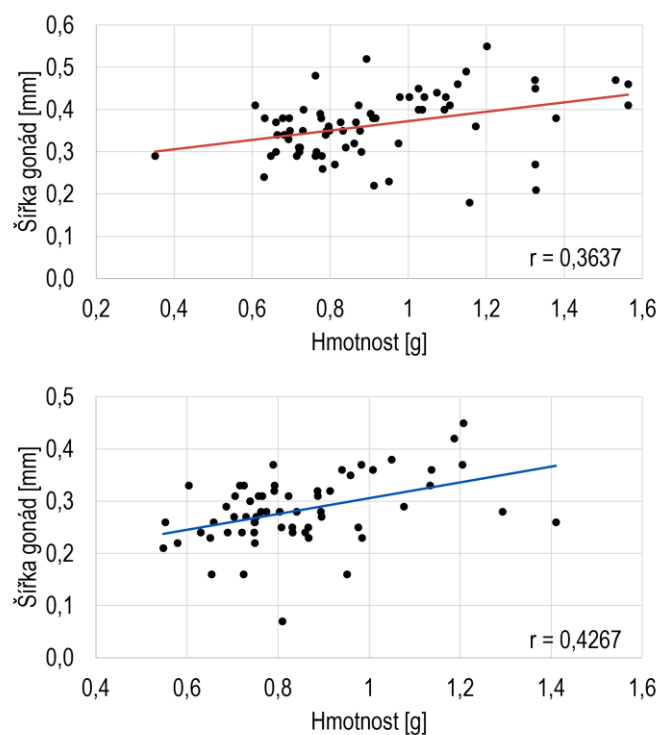
Dále byla provedena korelační analýza mezi hmotností žab a délkou gonád, hmotností žab a šířkou gonád, délkou žab a délkou gonád, délkou žab a šířkou gonád. Všechny korelační analýzy byly provedeny jak pro samce, tak pro samice. Nakonec byly zhotoveny korelační diagramy pro každou z výše zmíněných dvojic parametrů. Korelační analýzy byly provedeny proto, aby se zjistilo, zda má hmotnost a délka těla jedinců vliv na analyzované parametry.

Závislost délky gonád na hmotnosti žab je pro samice i pro samce zobrazena v Grafu 4. Mezi hmotností a délkou gonád nebyla u samic ani u samců prokázána korelace. Hmotnost žab tedy v tomto případě nemá vliv na délku gonád.

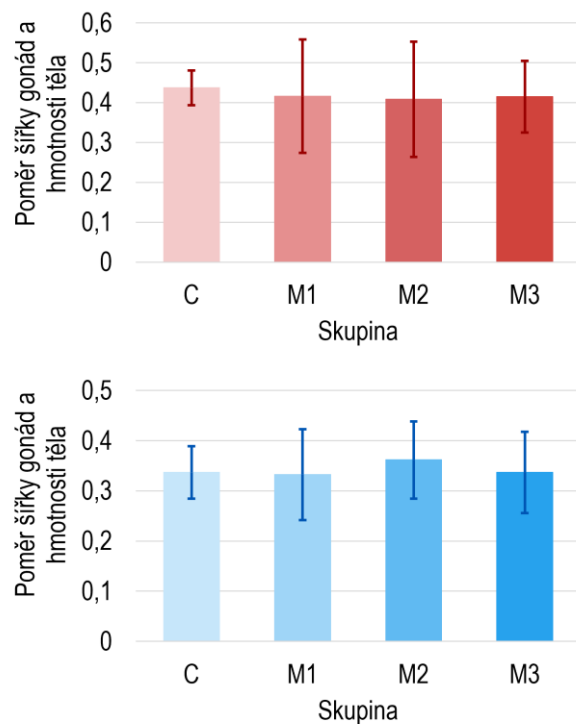


Graf 4: Závislosti délky gonád na hmotnosti samic (nahore – červeně) a samců (dole – modře) drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Body v grafu označují hodnotu hmotnosti a délky gonád, dále je v grafu lineární spojnice a Pearsonův korelační koeficient r . Hladina významnosti $p \leq 0,05$ ($n = 69$ pro samice a $n = 61$ pro samce).

Závislost šířky gonád na hmotnosti samic a samců žab je znázorněna v Grafu 5. Mezi hmotností samců a samic drápatky vodní a šířkou jejich gonád byla zjištěna statisticky průkazná pozitivní korelace na hladině významnosti $p \leq 0,05$. Na základě zjištění, že existuje průkazná pozitivní korelace mezi hmotností a šířkou gonád, byly hodnoty šířky gonád normalizovány tak, že šířka gonád byla vydělena hmotností. Výsledné hodnoty byly statisticky porovnány a následně byly průměrné hodnoty poměrů vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci pro obě pohlaví (Graf 6). Analýza poměru šířky gonád a hmotnosti neukázala žádný statisticky významný rozdíl mezi skupinami vystavenými mifepristonu a kontrolou.

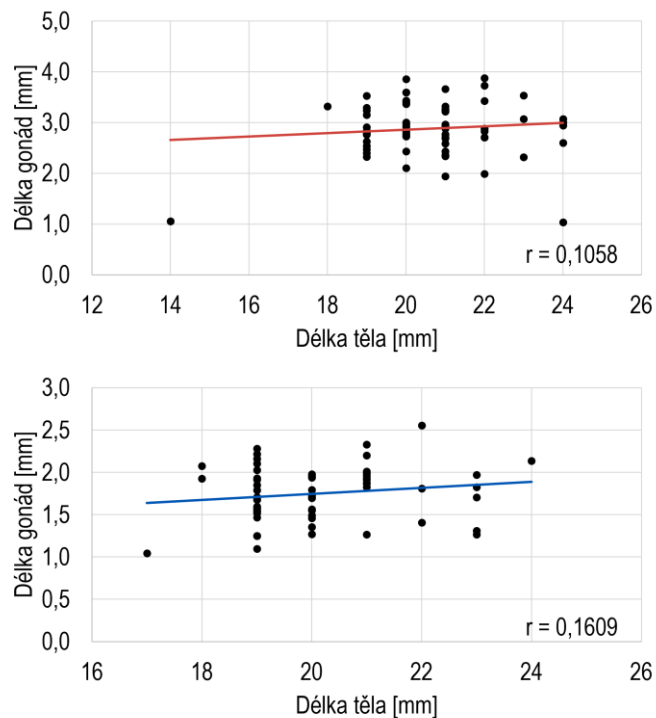


Graf 5: Závislosti šířky gonád na hmotnosti samic (nahore – červeně) a samců (dole – modře) drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Body v grafu označují hodnotu hmotnosti a šířky gonád, dále je v grafu lineární spojnice a Pearsonův korelační koeficient r . Hladina významnosti $p \leq 0,05$ ($n = 69$ pro samice a $n = 61$ pro samce).



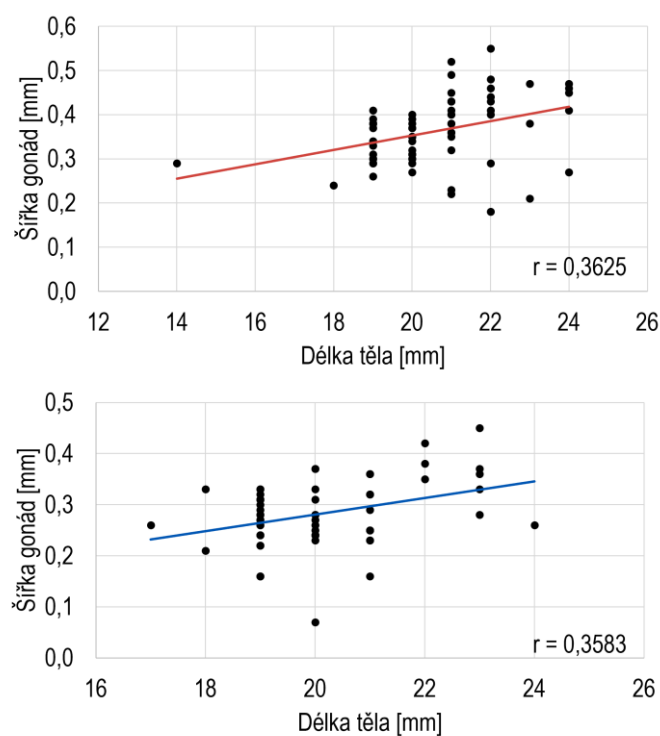
Graf 6: Průměrné hodnoty poměru šířky gonád a hmotnosti samic (nahore – červeně) a samců (dole – modře) drápatky vodní (*Xenopus laevis*) v jednotlivých testovaných skupinách. Sloupce v grafu znázorňují průměrné hodnoty poměru šířky gonád a hmotnosti těla v dané skupině a chybové úsečky (samice – červeně, samci – modře) představují směrodatné odchylky pro danou skupinu. C – kontrolní skupina, M1 – 2 ng·l⁻¹; M2 – 22 ng·l⁻¹; M3 – 215 ng·l⁻¹ mifepristonu. Hladina významnosti $p \leq 0,05$ (jednocestná ANOVA).

Závislost délky gonád na délce těla samic a samců drápatky je zobrazena v Grafu 7. Korelační analýza neprokázala mezi délkou těla a délkou gonád statisticky významnou korelaci. Délka těla tedy u pokusných žab neměla vliv na délku gonád.

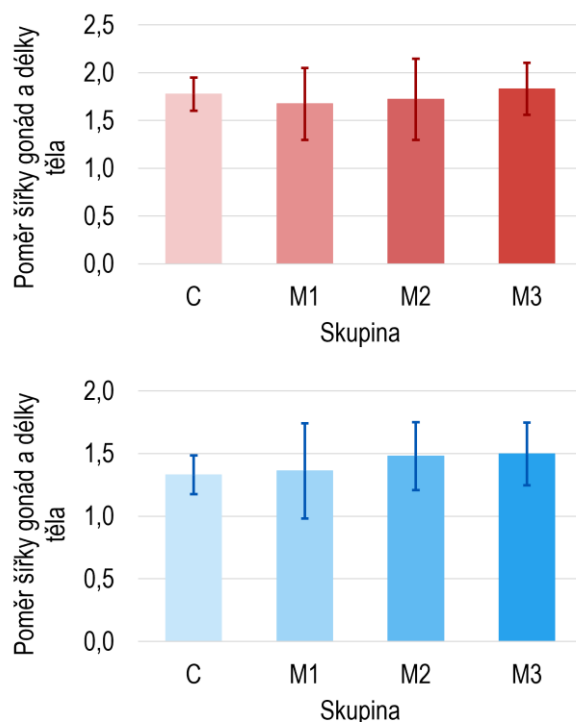


Graf 7: Závislosti délky gonád na délce těla samic (nahore – červeně) a samců (dole – modře) drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Body v grafu označují hodnotu délky těla a délky gonád, dále je v grafu lineární spojnice a Pearsonův korelační koeficient r . Hladina významnosti $p \leq 0,05$ ($n = 69$ pro samice a $n = 61$ pro samce).

Závislost šířky gonád na délce těla žab je pro obě pohlaví zobrazena v Grafu 8. Při korelační analýze byla zjištěna statisticky průkazná pozitivní korelace mezi délkou těla a šířkou gonád na hladině významnosti $p \leq 0,05$. Na základě zjištění, že existuje průkazná pozitivní korelace mezi délkou těla a šířkou gonád, byly hodnoty normalizovány tak, že šířka gonád byla vydělena délkou těla a následně vynásobena 100. Výsledné hodnoty byly statisticky porovnány a následně byly průměrné hodnoty poměrů vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci pro obě pohlaví (Graf 9). Analýza poměru šířky gonád a délky těla neukázala žádný statisticky významný rozdíl mezi koncentracemi mifepristonu a kontrolou.



Graf 8: Závislost šířky gonád na délce těla samic (nahore – červeně) a samců (dole – modře) drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Body v grafu označují délky těla a šířky gonád, dále je v grafu lineární spojnice a Pearsonův korelační koeficient r . Hladina významnosti $p \leq 0,05$ ($n = 69$ pro samice a $n = 61$ pro samce).

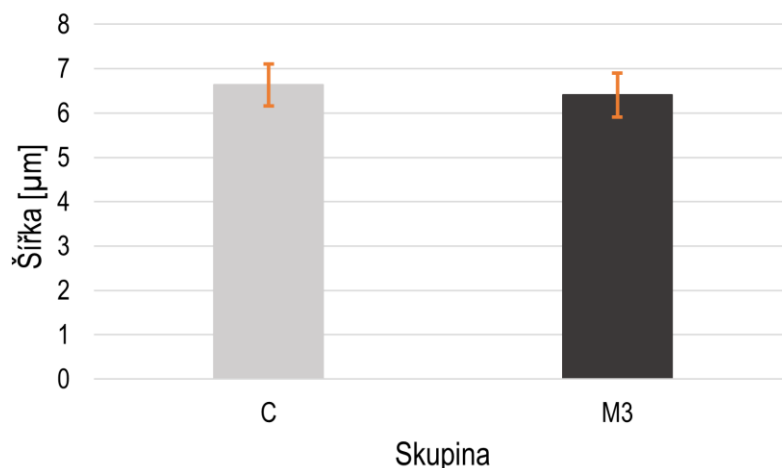


Graf 9: Průměrné hodnoty poměru šířky gonád a délky těla samic (nahore – červeně) a samců (dole – modře) drápatky vodní (*Xenopus laevis*) v jednotlivých testovaných skupinách. Sloupce v grafu znázorňují průměrné hodnoty poměru šířky gonád a délky těla vynásobené 100 v dané skupině a chybové úsečky (samice – červeně, samci – modře) představují směrodatné odchylky pro danou skupinu. C – kontrolní skupina, M1 – 2 ng·l⁻¹; M2 – 22 ng·l⁻¹; M3 – 215 ng·l⁻¹ mifepristonu. Hladina významnosti $p \leq 0,05$ (jednocestná ANOVA).

4.2. Histologie štítné žlázy drápatky vodní

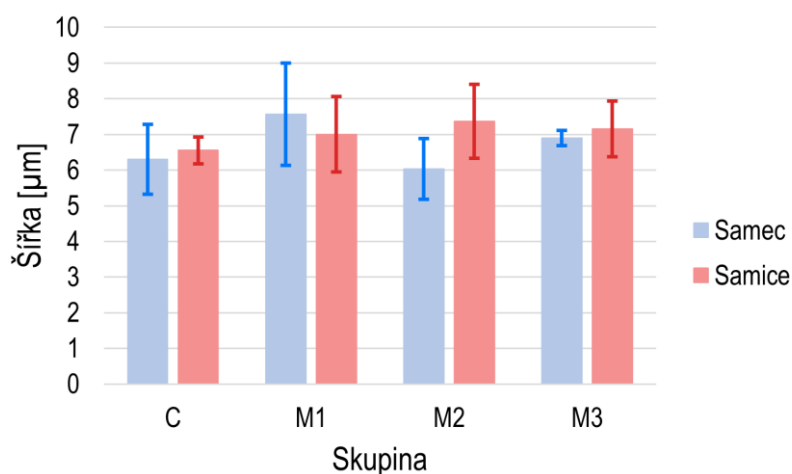
Vliv mifepristonu na vývoj štítné žlázy byl posuzován na základě naměřených hodnot šířky buněk folikulárního epitelu folikulů štítné žlázy a histopatologických změn na štítné žláze. Šířka buněk folikulárního epitelu štítné žlázy byla měřena vždy na 5 místech každého z 10 folikulů u jednoho jedince, z těchto hodnot byl následně vypočten aritmetický průměr, který byl použit pro statistické analýzy. V grafech byl vynesena aritmetický průměr šířky folikulárního epitelu folikulů štítné žlázy všech jedinců podle jednotlivých pokusných skupin.

Průměrná šířka buněk folikulárního epitelu folikulů štítné žlázy pulců ze stádia NF 58 je zobrazena v Grafu 10. U stádia NF 58 byla posuzována pouze kontrolní skupina a nejvyšší koncentrace mifepristonu (M3 – 215 ng·l⁻¹). Z grafu je patrné, že průměrná šířka buněk folikulárního epitelu je v obou skupinách přibližně stejná. V šířce folikulárního epitelu nebyl zjištěn žádný statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou, která byla exponovaná nejvyšší koncentraci mifepristonu.



Graf 10: Průměrná šířka buněk folikulárního epitelu folikulů štítné žlázy u stádia NF 58 drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Sloupce představují průměrnou šířku buněk folikulárního epitelu v dané skupině a chybové úsečky (oranžově) zobrazují směrodatnou odchylku. C – kontrolní skupina, M3 – 215 ng·l⁻¹ mifepristonu. Hladina významnosti $p \leq 0,05$ (Welchův t-test).

Průměrná šířka buněk folikulárního epitelu folikulů štítné žlázy u samců a samic drápatek vodních ve stádiu NF 66 v jednotlivých testovaných skupinách je prezentována v Grafu 11. U žab ve stádiu NF 66 nebyla zjištěna žádná statisticky významná změna v šířce folikulárního epitelu folikulů štítné žlázy u skupin vystavených mifepristonu v porovnání s kontrolou. Signifikantní rozdíl nebyl ani mezi šířkou buněk folikulárního epitelu mezi pohlavími.



Graf 11: Šířka folikulárního epitelu folikulů štítné žlázy u stádia NF 66 drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Sloupce představují průměrnou šířku folikulárního epitelu samců (modré) a samic (červené) v dané skupině a chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku v daných skupinách (u samců modré a samic červené odchylky). C – kontrolní skupina, M1 – 2 ng·l⁻¹; M2 – 22 ng·l⁻¹; M3 – 215 ng·l⁻¹ mifepristonu. Hladina významnosti $p \leq 0,05$ (dvoucestná ANOVA).

5. Diskuze

V této práci byl posuzován vliv mifepristonu, modelové látky s anti-progestagenní aktivitou, na vývoj gonád a štítné žlázy u žáby drápatky vodní (*Xenopus laevis*). O vlivu mifepristonu na vývoj obojživelníků doposud nebyly publikovány žádné studie a nemáme tedy v tomto ohledu s čím srovnávat. Nicméně studie o účinku mifepristonu byly v minulosti provedeny na jiných skupinách obratlovců.

Van der Schoot a Baumgarten (1990) ve své práci sledovali vliv mifepristonu, na vývoj potkanů. Mifepriston byl podáván potkanům injekčně v dávce 1 mg od prvního nebo čtvrtého dne po jejich narození, a to každý druhý den po dobu dvou týdnů. U obou pohlaví potkanů bylo pozorováno snížení hmotnosti nadledvinek, které ovšem nebylo trvalé, jelikož po ukončení podávání mifepristonu se hmotnost postupně navyšovala a po delší době byla srovnatelná s hmotností nadledvinek jedinců v kontrolní skupině. Změna v hmotnosti nadledvinek ukazuje na vliv mifepristonu na osu hypotalamus-hypofýza-nadledviny. Průběh dospívání u samic nebyl nijak významně ovlivněn, nastalo pouze dřívejší otevření vaginálního ústí o 1-2 dny než u kontrolní skupiny, nejednalo se však o signifikantní změnu. V dospělosti bylo u samic exponovaných mifepristonu pozorováno narušení ovariálních cyklů a snížení plodnosti v porovnání s kontrolou. Dále byly pozorovány abnormality ve struktuře vaječnicků a vaječnickových obalů. Zpomalení pohlavního dospívání bylo pozorováno u samců, kteří byli exponováni mifepristonu a bylo zjištěno na základě rozdvojení praepudia (předkožky). U mladých samců exponovaných mifepristonu měla varlata menší velikost a menší hmotnost v porovnání s kontrolou a tento stav přetrvával až do dospělosti. Velikost varlat potkanů v dospělosti dosahovala maximálně 65 % velikosti varlat potkanů v kontrolní skupině. Nicméně snížená velikost varlat pravděpodobně nevedla k narušení plodnosti. Koncentrace testosteronu v krvi samců byla normální (Van der Schoot a Baumgarten, 1990). Samci se tedy zdají na základě výsledků této studie citlivější k neonatální expozici antiprogestagenů, zejména z hlediska vývoje pohlavních orgánů.

Weinstein a kol. (1992) ve své práci také sledovali vliv neonatální aplikace mifepristonu na sexuální vývoj potkanů. Potkanům byla injekčně podávána dávka 100 a 300 µg mifepristonu 8, 24 a 48 hodin po narození, kontrolní skupině byl podáván olej, jelikož byl použit pro rozpouštění mifepristonu. U samic byl pozorován vliv mifepristonu na otevírání vaginálního ústí, které bylo podáním mifepristonu urychleno (Weinstein

a kol., 1992), což znamená, že došlo k urychlení pohlavního dospívání (Van der Schoot a Baumgarten, 1990). Dřívější otevření vaginálního ústí po expozici mifepristonu, byť statisticky nesignifikantní, ve své práci rovněž pozorovali Van der Schoot a Baumgarten (1990). Mifepriston měl také vliv na chování samců v dospělosti. V obou skupinách exponovaných mifepristonu byla zaznamenána vyšší frekvence tzv. lordózního chování než v kontrolní skupině (Weinstein a kol., 1992). Lordózním chováním je myšleno zaujetí polohy těla, při níž se samice potkanů připravují na pářící akt. Pro reprodukční chování samic je toto chování klíčové (Tsukahara a kol., 2014). Pokud toto chování vykazují samci, může to ukazovat na jisté známky feminizace.

Csaba a Karabélyos (2001) také zkoumali vliv mifepristonu na potkany, tentokrát na sexuální aktivitu exponovaných jedinců. Samcům a samicím potkanů byla injekčně podána jednorázová dávka mifepristonu 100 μg do 24 hodin od narození a sexuální chování se testovalo až v dospělosti (ve stáří 3,5 měsíce). U samic nebyl pozorován žádný signifikantní vliv expozice mifepristonu v dětství na jejich sexuální chování v dospělosti, ale u samců se signifikantně zvýšila sexuální aktivita (Csaba a Karabélyos, 2001).

Vliv mifepristonu byl testován také na vačicích (*Monodelphis domestica*). 8. den po jejich narození byl vačicím injekčně aplikován mifepriston v dávce 25 μg , kontrolní skupině byl podán kukuřičný olej, jelikož byl použit jako nosné médium pro mifepriston. Samice, kterým byl podán mifepriston, byly méně agresivní v porovnání se samicemi z kontrolní skupiny (Fadem a kol., 2010). Před pářením jsou samice silně agresivní vůči samcům, kteří se při námluvách snaží snížit tuto agresivní reakci (Trupin a Fadem, 1982). Snížení agresivity by mohlo vést k narušení přirozeného výběru tím, že pro samce bude jednodušší se se samicí spářit a nejsilnější samec tedy nemusí mít při námluvách největší šanci. U skupiny exponované mifepristonu byla zaznamenána signifikantně nižší hmotnost jak u samců, tak u samic v porovnání s kontrolní skupinou (Fadem a kol., 2010). Snížení hmotnosti může souviset s anti-glukokortikoidním působením mifepristonu, jelikož glukokortikoidy jsou nezbytné pro růst a vývoj (Bertagna a kol., 1984; Voorhoeve a kol., 2009). Vliv mifepristonu na vývoj pohlavních orgánů nebyl v této studii zkoumán (Fadem a kol., 2010).

V této bakalářské práci byl zkoumán vliv mifepristonu (v koncentracích 2, 22 a 215 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$) na raná vývojová stádia žab a expozice byla ukončena dosažením juvenilního stádia. Vliv na vývoj gonád nebyl pozorován, zároveň nebyl zjištěn ani výskyt intersexu. Na rozdíl od této práce byl ve studiích na savcích zjištěn účinek mifepristonu na vývoj

jejich pohlavního ústrojí, sexuální chování a plodnost (Csaba a Karabélyos, 2001; Fadem a kol., 2010; Van der Schoot a Baumgarten, 1990; Weinstein a kol., 1992). Dávky mifepristonu, kterým byly žáby v této práci exponovány, byly výrazně nižší než dávky, které byly podávány savcům. Koncentrace mifepristonu použité v této práci byly totiž zvoleny na základě anti-progestagenních aktivit zjištěných ve vodách, aby byly environmentálně relevantní. Savcům byla navíc dávka mifepristonu podávána injekčně (Csaba a Karabélyos, 2001; Fadem a kol., 2010; Van der Schoot a Baumgarten, 1990; Weinstein a kol., 1992), kdežto žáby byly exponovány mifepristonu ve vodě, ve které byly chovány. U žab byly změny vyvolané mifepristonem zkoumány pouze do dosažení juvenilního stádia, ale u savců se řada účinků projevila až později v dospělosti (Csaba a Karabélyos, 2001; Fadem a kol., 2010; Van der Schoot a Baumgarten, 1990; Weinstein a kol., 1992). Nelze tedy určit, zda by mifepriston neměl vliv například na plodnost žab v pozdějším věku. Všechny tyto faktory mohly být příčinou rozdílů ve výsledcích této bakalářské práce a studií na savcích.

Vliv mifepristonu byl zkoumán také na rybách (Blüthgen a kol., 2013). Nicméně ve struktuře rybího a lidského progesteronového receptoru jsou poměrně velké rozdíly. Bylo zjištěno, že některé látky mohou být agonisté hPR a současně antagonisté rybího PR a opačně, dále může být rozdíl v jejich účinnosti při aktivaci/inhibici receptoru (Kocour Kroupová a kol. 2023; Neale a kol., 2020). Například většina syntetických progestinů, agonistů hPR, jsou antagonisté rybího PR. U dania pruhovaného (*Danio rerio*), modelového rybího druhu, bylo zjištěno, že mifepriston je jen velmi slabým antagonistou jeho progesteronového receptoru. Porovnávat účinky mifepristonu u ryb a žab tedy není úplně možné. Silnější anti-progestagenní účinky budou u ryb vykazovat spíše syntetické progestiny, jelikož na rybí PR působí jako silní antagonisté (Garoche a kol., 2020).

Vliv levonorgestrelu, syntetického progestinu a antagonisty PR dania pruhovaného (zfPR), byl zkoumán ve studii Hua a kol. (2015) na daniu pruhovaném (*Danio rerio*). Ryby byly vystavovány levonorgestrelu v koncentracích 0, 1, 10, 33 a 100 ng·l⁻¹ a zjišťoval se jeho účinek na diferenciaci pohlaví od embrya (hned po oplození) až po dosažení pohlavní dospělosti. Ve skupinách exponovaných levonorgestrelu v koncentraci 10, 33 a 100 ng·l⁻¹ byl už 63 dní po zahájení testu (po oplození) zaznamenán 100% podíl samců. Muselo tedy dojít ke kompletní změně pohlaví u všech samic na samce. U skupiny exponované 1 ng·l⁻¹ levonorgestrelu nebyl pozorovaný žádný signifikantní rozdíl oproti

kontrolní skupině v poměru pohlaví. Tato studie prokazuje maskulinizaci ryb po jejich expozici levonorgestrelu (Hua a kol., 2015).

Ve studii Šauer a kol. (2020) byl zkoumán vliv dvou syntetických progestinů, gestodenu a drospirenonu, na vývoj kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Oba tyto syntetické progestiny jsou antagonisty zfPR (Garoche a kol., 2020). Ryby byly vystaveny koncentracím $2 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ gestodenu či drospirenonu nebo jejich směsi ve stejné koncentraci od 24 hodin po oplození do 160 dní po oplození (v tomto období je již možné identifikovat u kapra obecného pohlaví). Hlavním cílem bylo zjistit vliv syntetických progestinů na pohlavní diferenciaci na základě histologické analýzy gonád. Ve skupině ryb exponovaných směsí drospirenonu a gestodenu byl zjištěn signifikantně vyšší výskyt intersexu ve srovnání s kontrolou, ale jednotlivě látky signifikantní změny nezpůsobily. Intersexuální jedinci měli gonády se samičími vývody, ale obsahovaly spermatocyty (Šauer a kol., 2020).

Syntetické progestiny mají u ryb kromě anti-progestagenní aktivity celou řadu nescifických hormonálních účinků (Bain a kol., 2015; Ellestad a kol., 2014; Kumar a kol., 2015) a není jisté, zda byl zvrát pohlaví či výskyt intersexu po expozici progestinům způsoben jejich anti-progestagenní aktivitou či kombinací různých hormonálních aktivit (Šauer a kol., 2020). Některé syntetické progestiny jsou například agonisty androgenních receptorů ryb a maskulinizace ryb tak mohla být důsledkem jejich androgenní aktivity (Bain a kol., 2015).

Ve studii Šauer a kol. (2020) byl zároveň zkoumán vliv syntetických progestinů na osu hypotalamus-hypofýza-štítná žláza. Významný vliv na folikulární epitel byl pozorován u štítné žlázy v oblasti hlavové části ledvin, a to ve skupině exponované směsí obou látek v porovnání s ostatními skupinami i kontrolní skupinou, konkrétně se jednalo o ztenčení folikulárního epitelu. (Šauer a kol., 2020).

V této bakalářské práci byl rovněž zjišťován vliv testované látky na vývoj štítné žlázy. Vliv se hodnotil na základě šířky folikulárního epitelu folikulů štítné žlázy, tvaru buněk a jejich počtu ve stěně epitelu a stavu koloidu. Ani v jedné skupině exponované mifepristonu nebyly pozorovány žádné histopatologické změny štítné žlázy v porovnání s kontrolní skupinou. Štítná žláza u obojživelníků ovlivňuje průběh metamorfózy a její úspěšné dokončení (Galton, 1988; Huang a kol., 2001). Výsledky histopatologického vyšetření štítné žlázy odpovídají tomu, že metamorfóza u žab v této práci proběhla bez narušení.

6. Závěr

Ve vodním prostředí byla opakovaně detekována anti-progestagenní aktivita, vyvstala tedy otázka, jaký vliv má tato hormonální aktivita na vodní organismy žijící v takto kontaminovaném prostředí. Cílem mojí bakalářské práce proto bylo posoudit vliv mifepristonu, jako modelového antiprogestagenu, na vývoj gonád a štítné žlázy u žáby drápatky vodní (*Xenopus laevis*).

Vliv mifepristonu na vývoj gonád žab byl hodnocen na základě několika parametrů, a to délky a šířky gonád a počtu melanoforů na gonádách. Ani u jednoho z těchto parametrů však nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinami exponovanými různými koncentracemi mifepristonu (v koncentracích 2, 22 a 215 ng·l⁻¹) a kontrolní skupinou. Na gonádách zároveň nebyly pozorovány změny, které by ukazovaly na intersexualitu nebo jiné patologické změny. Mifepriston tedy v těchto koncentracích neovlivnil vývoj gonád exponovaných žab.

Vývoj štítné žlázy, který byl posuzován na základě šířky folikulárního epitelu folikulů štítné žlázy, také nebyl ani v jednom sledovaném vývojovém stádiu žab (NF 58, NF 66) významně ovlivněn expozicí mifepristonu. Dále nebyly pozorovány ani žádné histopatologické změny na štítné žláze, folikulární epitel sestával ve většině případů z jedné vrstvy buněk a buňky folikulárního epitelu měly normální tvar i velikost. Zároveň nebyly ani pozorovány žádné změny v koloidu folikulů štítné žlázy.

Vliv expozice mifepristonu byl sledován na žábách v larválním a juvenilním stádiu, efekt expozice látek s anti-progestagenní aktivitou se však může projevit až v dospělosti, jak se ukázalo například při pokusech na savcích, případně mohou být dospělci k této látce citlivější. Z těchto důvodů by bylo vhodné se v dalším výzkumu zaměřit na sledování vlivu antiprogestagenů na dospělé jedince obojživelníků.

7. Seznam použité literatury

- Aspengren, S., Hedberg, D., Wallin, M., 2007. Melanophores: A model system for neuronal transport and exocytosis?. *Journal of neuroscience research*. 85(12), 2591-2600.
- Bain, P.A., Kumar, A., Ogino, Y., Iguchi, T., 2015. Nortestosterone-derived synthetic progestogens do not activate the progestogen receptor of Murray–Darling rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) but are potent agonists of androgen receptors alpha and beta. *Aquatic Toxicology*. 163, 97-101.
- Baker, M.E., 2022. Divergent evolution of progesterone and mineralocorticoid receptors in terrestrial vertebrates and fish influences endocrine disruption. *Biochemical Pharmacology*. 198, 114951, 1-6.
- Baulieu, E.E., 1997. RU 486 (mifepristone): A short overview of its mechanisms of action and clinical uses at the end of 1996. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 828, 47-58.
- Bellet, V., Hernandez-Raquet, G., Dagnino, S., Seree, L., Pardon, P., Bancon-Montiny, C., Fenet, H., Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Cavailles, V., Budzinski, H., Antignac, J.P., Balaguer, P., 2012. Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. *Water research*. 46(6), 1912-1922.
- Bertagna, X., Bertagna, C., Luton, J.P., Husson, J.M., Girard, F., 1984. The new steroid analog RU 486 inhibits glucocorticoid action in man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 59(1), 25-28.
- Blüthgen, N., Castiglioni, S., Sumpter, J.P., Fent, K., 2013. Effects of low concentrations of the antiprogestin mifepristone (RU486) in adults and embryos of zebrafish (*Danio rerio*): 1. Reproductive and early developmental effects. *Aquatic toxicology*. 144-145, 83-95.
- Burlibaşa, L., Gavrilă, L., 2011. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. *Applied Ecology and Environmental Research*. 9(1), 1-15.
- Coborn, J., 1992. *The Proper Care of Amphibians*. T.F.H. Publications, pp. 7, 198-201.
- Corner, G.W., Allen, W.M., 1929. Physiology of the corpus luteum: II. Production of a special uterine reaction (progestational proliferation) by extracts of the corpus luteum. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 88(2), 326-339.
- Croxatto, H.B., Salvatierra, A.M., Croxatto, H.D., Fuentealba, B., 1993. Effects of continuous treatment with low dose mifepristone throughout one menstrual cycle. *Human Reproduction*. 8(2), 201-207.
- Csaba, G., Karabélyos, C., 2001. The effect of a single neonatal treatment (hormonal imprinting) with the antihormones, tamoxifen and mifepristone on the sexual behavior of adult rats. *Pharmacological Research*. 43(6), 531-534.

- Ellestad, L.E., Cardon, M., Chambers, I.G., Farmer, J.L., Hartig, P., Stevens, K., Villeneuve, D.L., Wilson, V., Orlando, E.F., 2014. Environmental gestagens activate fathead minnow (*Pimephales promelas*) nuclear progesterone and androgen receptors in vitro. *Environmental science & technology*. 48(14), 8179-8187.
- Estabel, J., Koenig, N., Shiokawa, K., Exbrayat, J.M., 2005. Apoptosis in *Xenopus* genus.
- Fadem, B.H., Koester, D.C., Harder, J.D., 2010. Perinatal exposure to progesterone, estradiol, or mifepristone affects sexual differentiation of behavior in opossums (*Monodelphis domestica*). *Hormones and behavior*. 58(3), 390-396.
- Fawell, S.E., Lees, J.A., White, R., Parker, M.G., 1990. Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell*. 60(6), 953-962.
- Fort, D.J., Mathis, M.B., Hanson, W., Fort, C.E., Navarro, L.T., Peter, R., Büche, C., Unger, S., Pawlowski, S., Plautz, J.R., 2011. Triclosan and thyroid-mediated metamorphosis in anurans: Differentiating growth effects from thyroid-driven metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Toxicological Sciences*. 121(2), 292-302.
- Fort, D.J., Thomas, J.H., Rogers, R.L., Noll, A., Spaulding, C.D., Guiney, P.D., Weeks, J.A., 2004. Evaluation of the developmental and reproductive toxicity of methoxychlor using an anuran (*Xenopus tropicalis*) chronic exposure model. *Toxicological Sciences*. 81(2), 443-453.
- Galac, S., Kooistra, H.S., Butinar, J., Bevers, M.M., Dieleman, S.J., Voorhout, G., Okkens, A.C., 2000. Termination of mid-gestation pregnancy in bitches with aglepristone, a progesterone receptor antagonist. *Theriogenology*. 53(4), 941-950.
- Galton, V.A., 1988. The role of thyroid hormone in amphibian development. *American Zoologist*. 28(2), 309-318.
- Garoche, C., Aït-Aïssa, S., Boulahtouf, A., Creusot, N., Hinfrey, N., Bourguet, W., Balaguer, P., Brion, F., 2020. Human and zebrafish nuclear progesterone receptors are differently activated by manifold progestins. *Environmental Science & Technology*. 54(15), 9510-9518.
- Gemmell, R.T., 1995. A comparative study of the corpus luteum. *Reproduction, Fertility and Development*. 7(3), 303-312.
- Gendron, A., 2013. Amphibian ecotoxicology. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. 1. Springer, Netherlands, pp. 25.
- Green, S.L., 2002. Factors affecting oogenesis in the South African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Comparative medicine*. 52(4), 307-312.
- Hoffmann, B., Schuler, G., 2000. Receptor blockers — general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Animal Reproduction Science*. 60-61, 295-312.

- Houtman, C.J., 2010. Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. *Journal of Integrative Environmental Sciences*. 7(4), 271-295.
- Houtman, C.J., Brewster, K., ten Broek, R., Duijve, B., van Oorschot, Y., Rosielle, M., Lamoree, M.H., Steen, R.J.C.A., 2021. Characterisation of (anti-)progestogenic and (anti-)androgenic activities in surface and wastewater using high resolution effectdirected analysis. *Environment International*. 153, 106536, 1-13.
- Hua, J., Han, J., Guo, Y., Zhou, B., 2015. The progestin levonorgestrel affects sex differentiation in zebrafish at environmentally relevant concentrations. *Aquatic Toxicology*. 166, 1-9.
- Huang, H., Cai, L., Remo, B.F., Brown, D.D., 2001. Timing of metamorphosis and the onset of the negative feedback loop between the thyroid gland and the pituitary is controlled by type II iodothyronine deiodinase in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(13), 7348-7353.
- Chapman, J.C., Polanco, J.R., Min, S., Michael, S.D., 2005. Mitochondrial 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) is essential for the synthesis of progesterone by corpora lutea: An hypothesis. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3(1), 1-13.
- Chwalisz, K., Perez, M.C., DeManno, D., Winkel, C., Schubert, G., Elger, W., 2005. Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis. *Endocrine reviews*. 26(3), 423-438.
- Islam, M.S., Afrin, S., Jones, S.I., Segars, J., 2020. Selective progesterone receptor modulators—mechanisms and therapeutic utility. *Endocrine Reviews*. 41(5), 5.
- Jin, J., Weisberg, E., Fraser, I.S., 2005. Comparison of three single doses of mifepristone as emergency contraception: A randomised controlled trial. *Australian and New Zealand journal of obstetrics and gynaecology*. 45(6), 489-494.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P., 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO journal*. 9(5), 1603-1614.
- King, T.L., Brucker, M.C., 2011. *Pharmacology for women's health*. Jones & Bartlett Publishers, pp. 372-375.
- Klijn, J.G.M., Setyono-Han, B., Foekens, J.A., 2000. Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids*. 65(10-11), 825-830.
- Kocour Kroupová, H., Grimaldi, M., Šauer, P., Bořík, A., Zálhová, K., Balaguer, P., 2023. Environmental water extracts differentially activate zebrafish and human nuclear progesterone receptors. *Science of The Total Environment*. 859, 160232, 1-8.
- Kočí, V., Mocová, K., 2009. *Ekotoxikologie pro chemiky*. Vydavatelství VŠCHT, s. 153.

- Kumar, V., Johnson, A.C., Trubiroha, A., Tumová, J., Ihara, M., Grabic, R., Kloas, W., Tanaka, H., Kocour Kroupová, H., 2015. The challenge presented by progestins in ecotoxicological research: A critical review. *Environmental science & technology*. 49(5), 2625-2638.
- Kwong-Brown, U., Tobias, M.L., Elias, D.O., Hall, I.C., Elemans, C.P., Kelley, D.B., 2019. The return to water in ancestral *Xenopus* was accompanied by a novel mechanism for producing and shaping vocal signals. *eLife*. 8, e39946, 1-15.
- Lähteenmäki, P., Heikinheimo, O., Croxatto, H., Spitz, I., Shoupe, D., Birgersson, L., Luukkainen, T., 1987. Pharmacokinetics and metabolism of RU 486. *Journal of steroid biochemistry*. 27(4-6), 859-863.
- Levens, E.D., Potlog-Nahari, C., Armstrong, A.Y., Wesley, R., Premkumar, A., Blithe, D.L., Blocker, W., Nieman, L.K., 2008. CDB-2914 for uterine leiomyomata treatment: A randomized controlled trial. *Obstetrics and gynecology*. 111(5), 1129-1136.
- Liu, X.J., 2006. *Xenopus* protocols: cell biology and signal transduction. Humana Press, pp. 127.
- Luukkainen, T., Heikinheimo, O., Haukkamaa, M., Lähteenmäki, P., 1988. Inhibition of folliculogenesis and ovulation by the antiprogestone RU 486. *Fertility and Sterility*. 49(6), 961-963.
- Mahajan, D.K., London, S.N., 1997. Mifepristone (RU486): A review. *Fertility and sterility*. 68(6), 967-976.
- Martínková, J., Chládek, J., Mičuda, S., Chládková, J., 2007. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Grada Publishing as., s. 293-297.
- National Institute of Environmental Health Sciences, 2023. *Endocrine Disruptors and Your Health*. US Department of Health and Human Services: Research Triangle Park, NC, USA. 1-2.
- Neale, P.A., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Leusch, F.D.L., Balaguer, P., 2020. Assessing species-specific differences for nuclear receptor activation for environmental water extracts. *Water Research*. 185, 116247, 1-11.
- Nieuwkoop, P.D., Faber, J., 1994. *Normal Table of Xenopus Laevis (Daudin): A Systematical & Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis*. Garland Science, pp. 7-188.
- OECD, 2015. Test No. 241: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.
- Otová, B., Mihalová, R., Bobková, K., 2021. *Základy biologie a genetiky člověka*. Karolinum, Praha, s. 142, 145.
- Paris, N., 2012. *Xenopus laevis* as a Model System. *Mater Methods*. 2:151, 1-2.

- Petersen, S.L., Intlekofer, K.A., Moura-Conlon, P.J., Brewer, D.N., Del Pino Sans, J., Lopez, J.A., 2013. Novel progesterone receptors: Neural localization and possible functions. *Frontiers in neuroscience*. 7, 164, 1-7.
- Philibert, D., Deraedt, R., Tournemine, C., Mary, I., Teutsch, G., 1982. RU 38486—A potent antiprogestosterone. *Journal of Steroid Biochemistry*. 17(3), 68.
- Piprek, R.P., 2016. *Molecular mechanisms of cell differentiation in gonad development (Vol. 58)*, Springer.
- Piprek, R.P., Kloc, M., Tassan, J.P., Kubiak, J.Z., 2017. Development of *Xenopus laevis* bipotential gonads into testis or ovary is driven by sex-specific cell-cell interactions, proliferation rate, cell migration and deposition of extracellular matrix. *Developmental Biology*. 432(2), 298-310.
- Rao, K., Li, N., Ma, M., Wang, Z., 2014. In vitro agonistic and antagonistic endocrine disrupting effects of organic extracts from waste water of different treatment processes. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 8(1), 69-78.
- Reed, B.T., 2005. *Guidance on the housing and care of the African clawed frog Xenopus laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals, Horsham, United Kingdom, pp. 11, 54.
- Roztočil, A., 2011. *Moderní gynekologie*. Grada Publishing as., s. 422-441.
- Scott, A.P., Sumpter, J.P., Stacey, N., 2010. The role of the maturation-inducing steroid, 17,20beta-dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: A review. *Journal of Fish Biology*. 76(1), 183-224.
- Scott, P.D., Bartkow, M., Blockwell, S.J., Coleman, H.M., Khan, S.J., Lim, R., McDonald, J.A., Nice, H., Nuggeoda, D., Pettigrove, V., Tremblay, L.A., Warne, J.St.M., Leusch, F.D.L., 2014. An assessment of endocrine activity in Australian rivers using chemical and in vitro analyses. *Environmental Science and Pollution Research*. 21, 12951-12967.
- Seale, D.B., 1982. Obligate and facultative suspension feeding in anuran larvae: Feeding regulation in *Xenopus* and *Rana*. *The Biological Bulletin*. 162(2), 214-231.
- Shiokawa, K., 2012. Maternally-preset program of apoptosis and caspases involved in execution of the apoptosis at midblastula transition (MBT) but not before in *Xenopus laevis* embryogenesis. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 3(6), 751-769.
- Schoonbee, H.J., Prinsloo, J.F., Nxiwen, J., 1992. Observations on the feeding habits of larvae, juvenile and adult stages of the African clawed frog, *Xenopus laevis*, in impoundments in Transkei. *Water SA*. 18(4), 227-236.
- Silla, A.J., Calatayud, N.E., Trudeau, V.L., 2021. Amphibian reproductive technologies: Approaches and welfare considerations. *Conservation Physiology*. 9(1), coab011, 1-23.

- Simmonds, M.P., 1985. African clawed toad survey. *A British Herpetological Society Bulletin*. 13, 1-2.
- Singh, M., Su, C., 2013. Progesterone and neuroprotection. *Hormones and behavior*. 63(2), 284-290.
- Sive, H.L., Grainger, R.M., Harland, R.M., 2000. Early development of *Xenopus laevis*: A laboratory manual. CSHL Press, pp. 1-8.
- Speroff, L., Fritz, M.A., 2005. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 58.
- Speybroeck, J., Beukema, W., Bok, B., van der Voort, J., 2016. Field Guide to the Amphibians and Reptiles of Britain and Europe. Bloomsbury Publishin, pp. 116-117.
- Spitz, I.M., 2003. Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators: An overview. *Steroids*. 68(10-13), 981-993.
- Spitz, I.M., 2006. Progesterone receptor antagonists. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 7(10), 882-890.
- Starnberger, I., Preininger, D., Hödl, W., 2014. The anuran vocal sac: A tool for multimodal signalling. *Animal Behaviour*. 97, 281-288.
- Swahn, M.L., Kovács, L., Cekan, S.Z., Aedo, A.R., Westlund, P., 1994. Termination of early pregnancy with ZK 98, 734: Pharmacokinetic behaviour and clinical effect. *Human reproduction*. 9(1), 57-63.
- Šauer, P., Stará, A., Golovko, O., Valentová, O., Bořík, A., Grabic, R., Kocour Kroupová, H., 2018. Two synthetic progestins and natural progesterone are responsible for most of the progestagenic activities in municipal wastewater treatment plant effluents in the Czech and Slovak republics. *Water research*. 137, 64-71.
- Šauer, P., Tumová, J., Steinbach, C., Golovko, O., Komen, H., Maillot-Maréchal, E., Máchová, J., Grabic, R., Aït-Aïssa, S., Kocour Kroupová, H., 2020. Chronic simultaneous exposure of common carp (*Cyprinus carpio*) from embryonic to juvenile stage to drospirenone and gestodene at low ng/L level caused intersex. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 188, 109912, 1-9.
- Štěpánková, Š., 2020. *Obecná biochemie*. Univerzita Pardubice, s. 88.
- Švihovec, J., Bultas, J., Anzenbacher, P., Chládek, J., Příborský, J., Slíva, J., Votava, M., 2018. *Farmakologie*. Grada Publishing as., s. 823-825.
- Thomas, P., Pang, Y., 2012. Membrane progesterone receptors: Evidence for neuroprotective, neurosteroid signaling and neuroendocrine functions in neuronal cells. *Neuroendocrinology*. 96(2), 162-171.
- Trupin, G.L., Fadem, B.H., 1982. Sexual behavior of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Journal of Mammalogy*. 63(3), 409-414.

- Tsukahara, S., Kanaya, M., Yamanouchi, K., 2014. Neuroanatomy and sex differences of the lordosis-inhibiting system in the lateral septum. *Frontiers in Neuroscience*. 8, 299, 1-13.
- Van der Schoot, P., Baumgarten, R., 1990. Effects of treatment of male and female rats in infancy with mifepristone on reproductive function in adulthood. *Reproduction*. 90(1), 255-266.
- Verbost, P.M., Hanssen, R.G.J.M., Korver, G.H.V., Mulders, T.M.T., 2005. ORG 33628 and ORG 31710 to control vaginal bleeding in progestin-only contraceptive regimens. *Seminars in reproductive medicine*. 23 (1), 101-111.
- Voorhoeve, P.G., van den Akker, E.L.T., Lamberts, S.W.J., Delemarre-van de Waal, H.A., Hokken-Koelega, A.C.S., 2009. Glucocorticoid receptor gene polymorphism is less frequent in children born small for gestational age without catch-up growth. *Hormone Research in Paediatrics*. 71(3), 162–166.
- Vyhláška č. 419/2012 Sb., o ochraně pokusných zvířat, ve znění platném k 4.12.2012
- Weinstein, M.A., Pleim, E.T., Barfield, R.J., 1992. Effects of neonatal exposure to the antiprogestin mifepristone, RU 486, on the sexual development of the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 41(1), 69-74.
- Wiechert, R., Neef, G., 1987. Synthesis of antiprogestational steroids. *Journal of Steroid Biochemistry*. 27(4-6), 851-858.
- Xenbase. Xenbase: XB-ANAT-160 [online]. ©2000-2023 [cit. 2023-04-29]. Dostupné z: <https://www.xenbase.org/entry/anatomy/showanatomy.do?method=displayAnatomySummary&anatomyId=160&tabId=0>.
- Xenopus Express. Xenopus Express: Water quality [online]. ©1993-2023 [cit. 2023-11-02]. Dostupné z: <http://xenopus.com/frog-husbandry/>.
- Zahn, N., James-Zorn, C., Ponferrada, V.G., Adams, D.S., Grzymkowski, J., Buchholz, D.R., Nascone-Yoder, N.M., Horb, M., Moody, S.A., Vize, P.D., Zorn, A. M., 2022. Normal Table of *Xenopus* development: A new graphical resource. *Development*. 149(14), 1-6.
- Zasloff, M., 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 84(15), 5449-5453.
- Zhu, Y., Bond, J., Thomas, P., 2003. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(5), 2237-2242.

8. Seznam zkratek

ČOV	– Čistírna odpadních vod
DBD	– DNA-vázající doména
DMSO	– Dimethylsulfoxid
EQ	– Ekvivalenty
hCG	– Humánní choriový gonadotropin
hPR	– Lidský progesteronový receptor
hPR-A	– Lidský progesteronový receptor A
hPR-B	– Lidský progesteronový receptor B
HSP	– Protein teplotního šoku
HSP 90	– Protein teplotního šoku o molekulární hmotnosti 90 kDa
LBD	– Ligand-vázající doména
Log Kow	– Rozdělovací koeficient v systému oktanol/voda
mPR	– Membránový progesteronový receptor
mPRα	– Membránový progesteronový receptor α
mPRβ	– Membránový progesteronový receptor β
mPRγ	– Membránový progesteronový receptor γ
mPRδ	– Membránový progesteronový receptor δ
mPRϵ	– Membránový progesteronový receptor ϵ
NF	– Nieuwkoop a Faber
OECD	– Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PR	– Progesteronový receptor
SPRM	– Selektivní modulátory progesteronového receptoru
T3	– 3,5,3-trijodtyronin
T4	– Tyroxin
zfPR	– Progesteronový receptor dávná pruhovaného

9. Abstrakt

Vliv modelové látky s anti-progestagenní aktivitou na vývoj gonád a štítné žlázy u žáby drápatky vodní (*Xenopus laevis*)

Cílem této bakalářské práce bylo posoudit vliv steroidního hormonu mifepristonu, modelové látky s anti-progestagenní aktivitou, která se běžně používá v lékařství jako abortivum, na vývoj gonád a štítné žlázy u modelového druhu obojživelníka drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Drápatky vodní byly od stádia Nieuwkoop a Faber (NF) 47-48 až do dosažení stádia NF 66 vystaveny třem koncentracím mifepristonu 2, 22 a 215 ng·l⁻¹. Mifepriston byl rozpouštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO). Kontrolní skupina žab byla chována v čisté vodě s přidavkem rozpouštědla DMSO ve výsledné koncentraci 0,001 %_{obj.}. Snímky pro hodnocení morfologie gonád byly pořízeny během pitvy při vzorkování v závěru testu (po dosažení juvenilního stadia). Dále byly zpracovány vzorky štítné žlázy pro histologickou analýzu. Štítná žláza na histologickém sklíčku byla vyfocena pomocí programu QuickPHOTO MICRO 3.2. Na snímcích gonád a štítné žlázy byly pomocí analýzy obrazu v programu QuickPHOTO MICRO 3.2 měřeny vybrané parametry a na jejich základě byl hodnocen vliv mifepristonu na vývoj gonád a štítné žlázy.

Expozice mifepristonu nevyvolala patologické změny ve vývoji gonád ani nebyla zjištěna intersexualita. Ani u jednoho sledovaného parametru (délka a šířka gonád, počet melanoforů) nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi skupinami exponovanými mifepristonu a kontrolní skupinou. Na základě sledovaných parametrů můžeme konstatovat, že mifepriston neměl vliv na vývoj gonád exponovaných žab. Histopatologické vyšetření štítné žlázy rovněž neodhalilo žádné změny. Vývoj štítné žlázy, který byl posuzován na základě šířky folikulárního epitelu folikulů štítné žlázy, také nebyl ani v jednom sledovaném vývojovém stádiu žab (NF 58, NF 66) významně ovlivněn expozicí mifepristonu. Přestože v této práci nebyl pozorován žádný vliv mifepristonu na sledované parametry až do dosažení juvenilního stadia, není vyloučeno, že by se účinky mohly projevit až v dospělosti, proto je zapotřebí provést další experimenty.

Klíčová slova: analýza obrazu, antiprogestageny, drápatka vodní, gonády, mifepriston, obojživelníci, štítná žláza

10. Abstract

Effect of a model substance with anti-progestogenic activity on gonad and thyroid development in the African clawed frog (*Xenopus laevis*)

The aim of this bachelor thesis was to assess the effect of the steroid hormone mifepristone, a model substance with anti-progestogenic activity, commonly used in medicine as an abortivum, on gonadal and thyroid development in a model amphibian species, the African clawed frog (*Xenopus laevis*). African clawed frogs were exposed to three concentrations of mifepristone 2, 22 and 215 ng·l⁻¹ from stage Nieuwkoop and Faber (NF) 47-48 until reaching stage NF 66. Mifepristone was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The control group of frogs was kept in pure water with the addition of DMSO solvent at a final concentration of 0.001 %_{vol.}. Images for gonad morphology were taken during dissection sampling at the end of the test (after reaching the juvenile stage). Furthermore, thyroid samples were processed for histological analysis. The thyroid gland on the histological slide was photographed with QuickPHOTO MICRO 3.2 software. Selected parameters were measured on the gonadal and thyroid images using image analysis in the QuickPHOTO MICRO 3.2 software and the effect of mifepristone on gonadal and thyroid development was evaluated.

Exposure to mifepristone did not induce pathological changes in gonadal development, nor was intersexuality detected. No significant differences were found between the mifepristone-exposed groups and the control group for any of the parameters studied (gonad length and width, number of melanophores). Based on the observed parameters, we can conclude that mifepristone did not affect the gonadal development of exposed frogs. Histopathological examination of the thyroid gland also revealed no changes. Thyroid development, as assessed by the width of the thyroid follicular epithelium, was also not significantly affected by mifepristone exposure at any of the frog developmental stages studied (NF 58, NF 66). Although no effect of mifepristone on the parameters studied in this thesis was observed until the juvenile stage, it is possible that the effects could be seen in adulthood and further experiments are needed.

Keywords: image analysis, antiprogestogens, African clawed frog, gonads, mifepristone, amphibians, thyroid gland