

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Společné účinky sójových izoflavónov genisteínu a daidzeínu na  
kvalitu spermií kancov**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Linda Bedeová**

**Odbor štúdia: Reprodukčné biotechnológie**

**Vedúci práce: doc. MVDr. Radko Rajmon, Ph.D.**

**Konzultant: Ing. Petra Folková**

**© 2018 ČZU v Prahe**

## **Čestné prehlásenie**

Prehlasujem, že svoju diplomovú prácu „Spoločné účinky sójových izoflavónov genisteínu a daidzeínu na kvalitu spermií kancov“ som vypracovala samostatne pod vedením vedúceho diplomové práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce. Ako autorka uvedenej diplomovej práce ďalej prehlasujem, že som v súvislosti s jej vytvorením neporušila autorské práva tretích osôb.

V Prahe dňa \_\_\_\_\_

## **Pod'akovanie**

Touto cestou by som rada pod'akovala vedúcemu práce doc. MVDr. Radko Rajmonovi, PhD. za odborné vedenie tejto práce a jeho cenné rady, ktoré mi dal počas písania práce. Taktiež by som chcela pod'akovať konzultantke Ing. Petre Folkovej za to, že sa ma ako konzultantka ujala a venovala mi obrovské množstvo času a snažila sa mi v každej komplikovanej situácii poradiť a pomôcť. Veľké ďakujem patrí aj mojej rodine a blízkym, ktorí ma počas písania práce neustále podporovali.

## Súhrn

Genisteín a daidzeín sú hlavnými zástupcami izoflavónov, vyskytujúci sa takmer vo všetkých rastlinách, no najviac sú zastúpené v sóji. Sója je dnes populárnou zložkou v kŕmnej dávke hospodárskych zvierat. Vzhľadom na to, že výživa je úzko spojená s reprodukciou a hlavným princípom účinku týchto látok je väzba na estrogénové receptory, dochádza k obave, že tieto látky môžu ovplyvniť reprodukčný trakt zvierat vrátane pohlavných buniek. Cieľom tejto práce bolo tak overiť ich možný vplyv na kančie spermie v *in vitro* podmienkach pri expozícii blízkej situácii *in vivo*.

K pokusom bol použitý natívny kančí ejakulát. Bol testovaný samotný vplyv genisteínu a daidzeínu o koncentrácii 1,7  $\mu\text{M}$  a tri rôzne koncentrácie (0,425, 0,85 a 1,7  $\mu\text{M}$ ) spoločnej kombinácie izoflavónov v pomere 1 : 0,7 na motilitu, mitochondriálny membránový potenciál, viabilitu a kapacitáciu spermií.

V prípade samotného pôsobenia genisteínu o koncentrácii 1,7  $\mu\text{M}$  boli pozorované protektívne účinky na motilitu spermií už po 1 hodine inkubácie, ktoré pretrvali aj po 2 hodinách. Daidzeín v rovnakej koncentrácii 1,7  $\mu\text{M}$  vykazoval taktiež protektívne účinky v porovnaní medzi 1. a 2. hodinou inkubácie. Vplyv týchto látok sa prejavil aj na mitochondriálnom membránovom potenciály a viabilite spermií, kde rovnako ako pri motilite vykazovali stimulačný účinok. V prípade kapacitácie spermií u genisteínu nebol zistený žiadny významný vplyv, naopak daidzeín mal na kapacitáciu stimulačné účinky.

Pri testovaní spoločného pôsobenia genisteínu a daidzeínu na motilitu spermií nebol zistený žiadny významný vplyv v jednotlivých koncentráciách po 1. a 2. hodine inkubácie. Spoločný vplyv izoflavónov na mitochondriálny membránový potenciál a viabilitu sa prejavil pozitívnym účinkom vo všetkých sledovaných koncentráciách, pričom najvyššia testovaná koncentrácia 1,7  $\mu\text{M}$  prevyšovala nižšie testované koncentrácie. V poslednom teste nižšie koncentrácie izoflavónov (0,425 a 0,85  $\mu\text{M}$ ) stimulovali kapacitáciu spermií avšak pri vyššej koncentrácii (1,7  $\mu\text{M}$ ) nedošlo k významnému vplyvu na kapacitáciu spermií.

Už pri nízkych koncentráciách izoflavónov je zrejмый vplyv na jednotlivé testované parametre spermií, čím tak môžeme poukázať na možný vplyv týchto látok *in vivo*.

**Kľúčové slová:** izoflavóny, genisteín, daidzeín, spermie, kanec

## Summary

Genistein and daidzein are major representants of isoflavones, which occur by all plants, whereby most of them are represented in soybeans. Today, soy is popular component in daily ration in livestock. Since nutrition is closely associated with reproduction and with the fact that the bond to the estrogen receptors is the main principle of the effect of these substances, there comes to raising concern, that they can affect the reproductive track of animals, including sex cells. The aim of this work was to verify their possible effect on boar sperm *in vitro* conditions when exposed to a near *in vivo* situation.

The native boar ejaculate was used for the experiment. Single effect of genistein and daidzein at concentration of 1,7  $\mu\text{M}$  was tested as well as three different concentrations (0,425, 0,85, 1,7) of mutual combination of isoflavones in 1 : 0,7 ratio on motility, mitochondrial membrane potencial, viability and capacitation.

Genistein above, at concentration 1,7  $\mu\text{M}$  show protective effects on sperm motility just after 1 hour of incubation, which persisted after 2 hours inkubation. Daidzein at the same concentration of 1,7  $\mu\text{M}$  also exhibited protective effects in comparison, between 1 and 2 hours of incubation. The effect of these substances also manifested on mitochondrial membrane potential and sperm viability, which showed as in the motility stimulatory effect. In the case of capacitation, there was no significant effect found in genistein, on the other hand, daidzein showed stimulatory effects on sperm capacitation.

In testing of combined effect of genistein and daidzein on sperm motility, there was not found any significant effect in all tested concentrations after 1 and 2 hours of incubation. The combined effect of isoflavones on the mitochondrial membrane potential and viability was manifested by a positive effect at all observed concentrations, while the higher concentration 1,7  $\mu\text{M}$  exceeded the lower concentrations. In the last test, lower isoflanoves concentrations (0,425 and 0,85  $\mu\text{M}$ ) stimulated sperm capacitation, but higher concentration (1,7  $\mu\text{M}$ ) had no significant effect on sperm capacitation.

Even at low concentrations of isoflavones there is a obvious effect on individual tested parameters of sperm, so we can suggest, that there is a possible effect of these substances *in vivo*.

**Key words:** isoflavones, genistein, daidzein, sperm, boar

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Ciele a hypotézy práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literárna rešerš</b> .....	<b>3</b>
3.1	Fytoestrogény.....	3
3.1.1	Klasifikácia fytoestrogénov.....	7
3.1.2	Genisteín, charakteristika a vlastnosti.....	11
3.1.3	Daidzeín, charakteristika a vlastnosti.....	14
3.2	Vplyv fytoestrogénov na reprodukciu .....	15
3.3	Kančí ejakulát .....	21
3.3.1	Základná charakteristika .....	21
3.3.2	Motilita spermíí .....	22
3.3.3	Mitochondriálny membránový potenciál spermíí .....	23
3.3.4	Viabilita spermíí.....	24
3.3.5	Kapacitácia spermíí .....	24
<b>4</b>	<b>Materiál a metódy</b> .....	<b>26</b>
4.1	Príprava roztokov.....	27
4.2	Stanovenie motility spermíí pomocou systému CASA .....	28
4.3	Mitochondriálny membránový potenciál spermíí.....	29
4.4	Viabilita spermíí .....	30
4.5	Kapacitácia spermíí.....	31
4.6	Štatistické hodnotenie .....	32
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>33</b>
5.1	Vplyv izoflavónov na motilitu spermíí.....	33
5.2	Vplyv izoflavónov na mitochondriálny membránový potenciál spermíí .....	36
5.3	Vplyv izoflavónov na viabilitu spermíí .....	37
5.4	Vplyv izoflavónov na kapacitáciu spermíí .....	38
<b>6</b>	<b>Diskusia</b> .....	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>Záver</b> .....	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>Použitá literatúra</b> .....	<b>44</b>

# 1 Úvod

V prostredí je obsiahnuté nespočetné množstvo rôznych látok. O nemalej časti z nich má ľudská populácia veľmi malé vedomie aj napriek tomu, že je týmto látkam neustále vystavená. Patria sem aj endokrinné disruptory, chemické látky, ktoré môžu narúšať endokrinný systém živého organizmu, vyvolať tak nepriaznivé účinky na vývoj, nervovú sústavu, imunitu a taktiež reprodukciu. Tieto látky nie sú hrozbou len pre nás ľudí, no aj pre zvieratá. Patria sem látky používané pri výrobe plastov, pesticídov, priemyselne využívané látky, ale aj prirodzene sa vyskytujúce fytoestrogény. Fytoestrogény patria do heterogénnej skupiny rastlinných látok so štruktúrou podobnou 17 $\beta$ -estradiolu. Vyskytujú sa vo veľkom množstve druhov rastlín, najviac sú však obsiahnuté v strukovinách. Princípom účinku týchto látok je okrem iného najmä väzba na estrogénové receptory. Najpočetnejšou skupinou fytoestrogénov sú izoflavóny a z nich najviac zastúpený genisteín a daidzeín. Tieto izoflavóny sú najviac obsiahnuté v sóji. Sója je dnes populárna potravinárska prísada, pretože je to rastlinný proteín bez cholesterolu bohatý na komplexné sacharidy a nenasýtené tuky, s vysokým obsahom vlákniny. Okrem súčasť ľudskej stravy je taktiež súčasťou krmív pre hospodárske zvieratá, najmä ošípané. Výživa prasiat má významný vplyv na reprodukciu, ktorá je jedným z najdôležitejších ukazovateľov rentability chovu, preto je potrebná vysoká reprodukčná schopnosť zvierat. To, ale okrem správneho managementu závisí aj na kvalite pohlavných buniek, samičích vajčiek a samčích spermii, ktoré sú pre vznik nového jedinca veľmi dôležité. Spermie sú však v samičom trakte vystavované obrovskému vplyvu estrogénnych a im podobných látok, ktoré sú prítomné v sekrétoch pohlavného ústrojenstva. Sójové izoflavóny, genisteín a daidzeín tak môžu pôsobiť veľmi rozmanito na ejakulované kančie spermie, ba dokonca je možný ich spoločný vplyv nakoľko spermie sú v trakte samíc ovplyvnené niekoľkými látkami naraz. Úlohou tejto práce bolo tak zistiť potenciálne účinky genisteínu a daidzeínu na fyziologický status kančích spermii.

## 2 Cieľ práce

### Ciele práce:

Organizmus plemenných prasiat je bežne exponovaný izoflavónmi sóje. Cieľom práce je tak overiť v *in vitro* podmienkach ich možný vplyv na fyziologický status kančích spermíí pri expozícii blízkej situácii *in vivo* - dávky okolo 1  $\mu\text{M}$  a spoločné pôsobenie genisteínu a daidzeínu v pomere 1 : 0,7.

### Hypotézy:

- 1) izoflavóny sóje vo zvolených koncentráciách pozitívne ovplyvňujú pohyblivosť, vitalitu, mitochondriálny membránový potenciál a kapacitáciu spermíí;
- 2) účinky kombinácie oboch izoflavónov sa líšia od pôsobenia porovnateľných koncentrácií týchto látok jednotlivo.



## 3 Literárna rešerš

### 3.1 Fytoestrogény

Slovo fytoestrogén je odvodené z Gréckeho slova *phyto*, čo znamená rastlina a slova *estrogen*, ako hormón regulujúci fertilitu u samíc cicavcov (Ganai and Farooqi, 2015).

Fytoestrogény sú difenolické, nesteroidné, estrogénom podobné látky, čím môžu rôznymi mechanizmami ovplyvňovať estrogénny stav organizmu. Sú obsiahnuté takmer vo všetkých rastlinách, vo vysokých koncentráciách však len v strukovinách (Baber, 2010), pričom ich konečná koncentrácia závisí od odrody, geografickej polohy a roku rastu rastliny (Knight and Eden, 1995). Keďže sú prijímané potravou a nie sú produkované organizmom, radia sa medzi neendokrinné estrogény (Menzel et al., 2007).

Spolu so syntetickými xenoestrogénami sa radia do veľkej a štrukturálne rôznorodnej skupiny zlúčenín, a to enviromentálnym estrogénom, ktoré dokážu napodobňovať a v niektorých prípadoch antagonizovať účinky endogénnych estrogénov, čím sa často označujú ako endokrinné disruptory (Belcher and Zsarnovszky, 2001). Ako disruptory dokážu ovplyvniť endokrinný systém a tým spôsobiť vývojové a reprodukčné poruchy (Galeati et al., 2010).

Damstra et al. (2002) definujú endokrinné disruptory (EDC) ako exogénne látky alebo zmesi, ktoré menia funkcie endokrinného systému a následne spôsobujú nepriaznivé účinky na zdravie intaktného organizmu alebo jeho potomstva, prípadne populácie. Yeung et al. (2011) poukazujú na účinky EDC na spermatogézu, pričom uznávajú, že ich účinky môžu byť viacstranné a pleiotropné. Expozícia voči EDC môže interferovať so signalizáciou bunky prostredníctvom priamej alebo nepriamej hormonálnej dráhy alebo dráhy súvisiacej s oxidačným stresom v hyotalamo-hypofyzárnej osi, ale aj iných orgánoch, ako je pečeň. Endokrinné disruptory spôsobujú počas prenatalného a postnatalného vývoja ireverzibilné zmeny, avšak u dospelých jedincov sú ich účinky zväčša reverzibilné ako náhle dôjde k obmedzeniu ich pôsobenia na organizmus (McLachlan et al. 2012).

Fytoestrogény sú podobné estrogénom, hormónom, ktoré zohrávajú kľúčovú rolu vo vývoji a zachovaní normálnej sexuálnej a reprodukčnej funkcie. Okrem toho majú obrovský rozsah biologických efektov v kardiovaskulárnom, muskulo-skeletárnom, imunitnom a centrálnom nervovom systéme. Najúčinnším estrogénom produkovanom v tele je 17 $\beta$ -estradiol. Jeho dva metabolity, estrón a estriol, sú oveľa slabšími agonistami estrogénových receptorov. Fytoestrogény sú tak štrukturálne podobné estrogénom a majú im podobné funkcie. Dokážu sa správať ako estrogénny agonisti, vykazujúc synergickú funkciu s endogénnymi estrogénmi,

čím vyvolávajú estrogénne účinky. Okrem agonizmu sa správajú ako antagonisti, ktorí môžu blokovať estrogénne receptory alebo meniť ich vlastnosti, čím spôsobujú antiestrogénne účinky (Ganai and Farooqi, 2015). Tým ich vieme klasifikovať ako selektívne modulátory estrogénnych receptorov (SERMs), čo sú nesteroidné chemikálie s rovnakou štruktúrou ako E2 (Ososki and Kennelly, 2003) a diferenciálnou afinitou voči estrogénnym receptorom (Luconi et al., 2002).

Tieto prírodne sa vyskytujúce látky disponujú niekoľkými účinkami, no práve schopnosť viazať sa na estrogénové receptory (ER) a imitovať tak estrogénový efekt, je ich najcharakteristickejším mechanizmom účinku. Estrogénové receptory patria medzi intracelulárne receptory, ktoré sú primárne lokalizované v jadre a pôsobia ako transkripčné faktory pre gény regulované estrogénom (Beck et al., 2005). U cicavcov rozlišujeme estrogénové receptory na ER $\alpha$  a ER $\beta$  (Miláčková, 2016). Oba estrogénové receptory sprostredkovávajú bunkovú signalizáciu estrogénov. Estrogénová signalizácia je rovnováha medzi dvomi protichodnými silami vo forme oboch estrogénových receptorov (Nilsson et al., 2001). Nakoľko nie sú estrogénové receptory schopné fungovať samy o sebe, vyžadujú množstvo koregulačných proteínov, ktorých bunecná expresia vysvetľuje niektoré odlišné účinky estrogénov na bunky (Heldring et al., 2007). Pozostávajú z troch nezávislých, ale interagujúcich funkčných domén, a to z terminálnej A/B domény, DNA viažúcej domény C a D/E/F domény viažucej ligand. Viaženie ligandu na ER spúšťa konformačné zmeny v receptoroch a to vedie k zmenám rýchlosti transkripcie estrogénom regulovaných génov (Nilsson et al., 2001). Rovnako ako sú rozdelené ER, sa aj cieľové tkanivá rozdeľujú na dve skupiny. Pre nešpecifické cieľové tkanivá ako prostata, semenníky, vaječníky, epifýza, štítna žľaza, koža, močové cesty, lymfoidné a erytroidné tkanivo je typický vysoký obsah ER $\beta$  (Weihua et al., 2003). Naopak ER $\alpha$  zohráva dôležitú úlohu v klasických tkanivách ako sú maternica, mliečna žľaza, hypotalamus, hypofýza, kostné tkanivo (Harris, 2007), kardiovaskulárny systém a pečeň (Weihua et al., 2003).

Fytoestrogény interagujú ako s ER $\alpha$  tak s ER $\beta$  čím vytvárajú slabé estrogénové alebo antiestrogénové účinky. Estradiol (E2) má vyššiu afinitu k estrogénovým receptorom (ER) v porovnaní s fytoestrogénami (Retana-Márquez et al., 2012). Viacerí autori (Kuiper et al., 1997; Casanova et al., 1999; Pfitscher et al., 2008; Retana-Márquez et al., 2012) uvádzajú, že pri *in vitro* testoch zistili, že aj keď väčšina fytoestrogénov, hlavne izoflavóny sa viažu na oba typy ER a aktivujú ER dependentnú génovú transkripciu, tak vykazujú vyššiu estrogénovú aktivitu voči ER $\beta$ . To, že väčšina fytoestrogénov sa ľahšie viaže na ER $\beta$  ako

ER $\alpha$  je funkčne významná, pretože tieto oba estrogénové receptory sú diferenčne distribuované po celom tele a mozgu. Napríklad v nádorových bunkách prsníka je súbor génov multiplikovaný aktiváciou ER $\beta$ , pričom zvyšuje progresiu bunkového cyklu a celkovo potláča proliferáciu, nakoľko aktivácia ER $\alpha$  má do značnej miery opačné účinky. Môžeme tak konštatovať, že oba tieto subtypy ER regulujú rôzne aspekty reprodukcie, správania, neuroendokrinné funkcie a majú pravdepodobné rozdielne úlohy počas celého života (Patisaul and Jefferson, 2010).

Vďaka väzbe na ER dokážu fytoestrogény navodiť podobné účinky ako majú estrogénové hormóny. Môžu tak pozmeniť a tiež narušiť rôzne aspekty reprodukcie ako je sexuálny vývoj, nástup puberty a schopnosť vaječníkov a semenníkov produkovať dostatočné množstvo hormónov (Miláčková, 2016). Na druhej strane epidemiologické štúdie naznačujú, že strava bohatá na fytoestrogény je spojená so zníženým rizikom niektorých hormonálnymi účinkami vyvolávajúcich rakovinu (Witorsch, 2002). Okrem toho majú taktiež význam v prevencii rakoviny, osteoporózy, kardiovaskulárnych ochorení a menopauzy (Ososki and Kennely, 2003).

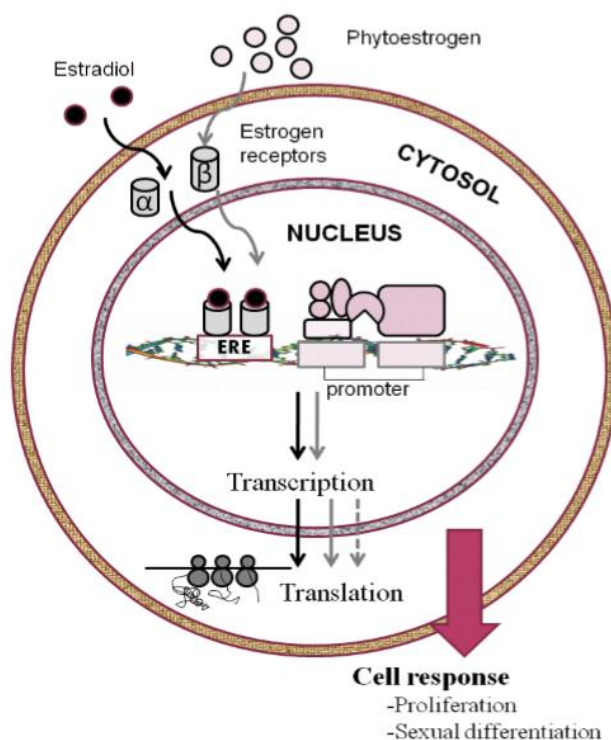
Sójové izoflavóny väzbou na ER hypotalamu, hypofýzy, či pohlavných orgánov podporujú produkciu a vylučovanie testosterónu u samcov, čo následne stimuluje spermatogézu, spermioogézu a rast semenníkov (Yuan et al., 2012). Napríklad, relatívna estrogénová sila genisteínu pre ER $\beta$  je 30 krát vyššia ako pre ER $\alpha$ . Väzbové aktivity týchto izoflavónov pre obidva ER sú oveľa vyššie ako pre mnohé z klasických syntetických endokrinných disruptorov, ako je bisfenol A, nonylfenol, DDT a metoxychlor (Cederroth et al., 2012).

Gu et al. (2006) uvádzajú poradie aglykónov sójových izoflavónov v schopnosti väzby na estrogénové receptory v tomto poradí: equol > genisteín > daidzeín a ich konjugáty sú menej účinné. I napriek tomu, že majú izoflavóny 100 až 1000 krát nižšiu afinitu voči ER ako estradiol (Kuiper et al., 1998). Thomas and Dong (2006) uvádzajú, že sa silno viažu na membránové ER a spôsobujú tak negenomické účinky, ktoré sú potenciálne škodlivé pre mužskú fertilitu (Fraser, 2006).

Ako náhle sa isoflavóny naviažu na receptory, nesprávajú sa ako typický agonisti estrogénu, ale ako selektívne modulátory estrogénových receptorov, ako napríklad tamoxifén, ktorý je agonistom ER v maternici a kostiach, ale antagonistom v prsníku. Táto diferenciálna aktivita týchto látok je výsledkom ko-aktivátorov a ko-represorových proteínov prítomných v bunke (Patisaul and Jefferson, 2010).

Ososki and Kennelly (2003) uvádzajú, že vďaka interakcii s enzýmami a receptormi, vzhľadom k ich stabilnej štruktúre a nízkej molekulárnej hmotnosti dokážu prechádzať cez bunkové membrány.

Mechanizmus pôsobenia estradiolu a fytoestrogénov je tak znázornený na obrázku 1 kde vytvorený komplex ligand-receptor je schopný indukovať transkripčnú aktivitu (Retana-Márquez et al., 2012). Je dôležité pripomenúť, že v tomto prípade sa jedná o negenomický účinok, ktorý oproti genomickému účinku trvá veľmi krátko (Singh et al., 2002). Negenomický účinok je nezávislý od génovej transkripcie a zahŕňa steroidmi indukovanú modifikáciu cytoplazmatických alebo bunkových membránovo viazaných regulačných proteínov. Tieto signalizačné mechanizmy tak zohrávajú primárnu úlohu pri tvorbe účinkov steroidov na endotelové bunky (Simoncini et al., 2004).



Obr. 1 - Mechanizmus účinku estradiolu a fytoestrogénov (Retana-Márquez et al., 2012).

Medzi ďalšie účinky patrí schopnosť správania sa ako antioxidanty, inhibujú aktivitu enzýmov zapojených do biosyntézy estradiolu a iných steroidov ako sú napríklad 17β-hydroxysteroid dehydrogenáza, 5α-reduktáza, aromatáza alebo kinázy regulujúce fosforylačné kaskády, ktoré sa podieľajú na intracelulárnej signalizácii (Whitten and Naftolin, 1998).

Niektorí autori (Mitchel et al., 2001, Akiyama et al., 1987) uvádzajú, že niektoré fytoestrogénne zlúčeniny majú chemoprotekčné vlastnosti prostredníctvom mnohých nereceptorových mechanizmov vrátane inhibície proteín-tyrozín kinázy, poškodenia aktivity topoizomerázy ochrany proti poškodeniu DNA a taktiež zmenu metabolizmu pohlavných hormónov.

Fytoestrogény môžu taktiež manipulovať s biosyntézou steroidov a ich transportom, napríklad stimuláciou syntézy hormónov viazaných na globulín (SHBG – stimulating hormone-binding globulin), ktorý je transportným proteínom estrogénov a androgénov v bunkách pečene a kompetitívne vytesňovať buď 17 $\beta$ -estradiol alebo testosterón z plazmy SHBG. Táto jemná odchýlka z kvantity alebo dostupnosť SHBG pomocou fytoestrogénov mení voľnú frakciu endogénnych hormónov v obehu systematicky alebo lokálne. Fytoestrogény môžu tiež manipulovať s hladinami endogénnych hormónov zasahovaním do enzýmov potrebných na biosyntézu steroidov (Patisaul and Jefferson, 2010).

Niektoré fytoestrogény vykazujú inhibičný účinok na steroidné enzýmy. Príkladom sú izoflavonoidy a lignany, ktoré inhibujú aktivitu reduktázy, čím znižujú konverziu testosterónu na aktívnu formu DHT (Retana-Márquez et al., 2012).

### 3.1.1 Klasifikácia fytoestrogénov

Dnes je známe, že vyše 300 druhov rastlín obsahuje fytoestrogény medzi ktoré radíme hlavne izoflavóny, lignány, kumestány a stilbeny (Oborná a kol., 2007). Podľa chemickej štruktúry ich môžeme rozdeliť do štyroch podtried, a to izoflavonoidy, flavonoidy, kumestány a lignany (Nilson, et al., 2001). Za najbežnejšie z nich sú považované lignány a izoflavóny Mazur (1998). Moutsatsou (2007) radí k hlavným fytoestrogénom aj flavonoidy.

**Lignány** sú polyfenolické látky odvodené od fenylalanínu. Nachádzajú sa v rôznych semenách, celých zrnách, luskoch a ovocí ako súčasť bunkovej steny rastlín. Jedným z najdôležitejších zdrojov sú rastlinné oleje, kde sú obsiahnuté lignány ako sekoizolariciresinol, matairezinol, pinoresinol či sesamin (Moravcová, 2002). Tie sú produktmi interstínálneho mikrobiálneho rozkladu zo zlúčenín nachádzajúcich sa v celých zrnách, ľanových semenách a mnohých druhoch zeleniny a ovocia. Lignány majú podobnú štruktúru ako 17- $\beta$  estradiol a iné steroidové hormóny (Mazur, 1998), avšak ich estrogénová aktivita je veľmi nízka, kedy na dosiahnutie akýchkoľvek aktivít sprostredkovaných ER $\alpha$  a ER $\beta$  sú potrebné koncentrácie 1mM a viac (Santell, et al., 1997). Okrem estrogénovej

aktivity, disponujú aj antivírusovou, antikarcinogénnou a baktericídnu funkciou, pričom zároveň majú významný antimykotický význam (Rice, et al., 2008).

Estrogénne aktívne lignany, enterodiol a enterolaktón sú odvodené zo zlúčenín secoizolariciresinolu a matairesinolu obsiahnutých v rastlinách. Tieto prekurzory sa vyskytujú v aleuronickej vrstve zrna blízko vláknitej vrstvy (Murkies et al., 1998).

Bowey et al. (2002) uvádza ako hlavné lignány syringirensinol, pinorensinol, lariciresinol, isolariciresinol, matairesinol a secoisolariciresinol zvyčajne vyskytujúce sa vo forme glukozidov a diglukozidov.

Pôsobením črevných baktérií a ich enzýmami sú hydrolyzované a metabolizované na účinné enterolignány ako sú enterodiol a enterolaktón (Moravcová, 2002).

**Kumestány** sú derivátmi kumarínu, ktoré sa vyskytujú v telách rastlín a to najčastejšie v lucerne, ďateline a luskovinách ako sú hrach a fazuľa. Estrogénne účinky majú väčšie ako izoflavóny, no nie všetky ich majú. Medzi jeden z estrogénne aktívnych patrí kumestrol (Moravcová, 2002). Kumestrol má vyššiu väzbovú aktivitu k estrogénovým receptorom ako má genisteín a tým vykazuje silnú estrogénovú aktivitu podobnú estradiolu (pri uterotrofickom teste potkana) (Baber, 2010). Ďalšou potláča konverziu estrónu na estradiol *in vitro* inhibíciou enzýmu 17 $\beta$ -hydroxysteroid oxidoreduktázy závislým od množstva dávky (Patisaul and Jefferson, 2010).

Najdôležitejším derivátom **stilbenov** je resveratrol, ktorý je najviac obsiahnutý v šupkách červeného hrozna (Oborná et al., 2007). Ukázalo sa, že resveratrol moduluje metabolizmus lipidov, inhibuje oxidáciu lipoproteínov s nízkou hustotou a tiež inhibuje agregáciu krvných doštičiek. Ako fytoestrogén môže chrániť kardiovaskulárny systém, má protizápalové a protinádorové vlastnosti (Messina et al., 2015). Avšak biologická dostupnosť a metabolické dráhy musia byť známe skôr ako sa vyslovia akékoľvek závery o výhodách resveratrolu pre zdravie (Frémont, 2000). Taktiež sa ukázalo, že vysoké dávky resveratrolu výrazne predlžujú životnosť mnohých druhov vrátane *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* a *Drosophila melanogaster* (Patisaul and Jefferson, 2010).

Medzi **flavonoidy** spadajú chrysin, apigenin, naringenin, kaempferol a quercetin. Niektoré flavonoidy vykazujú miernu estrogénu aktivitu, zatiaľ čo iné sú úplne neaktívne (Nilsson et al., 2001). Spolu s karotenoidmi sú zodpovedné za pestré sfarbenie ovocia a zeleniny (Szalay, 2015). Baber (2010) rozdeľuje flavonoidy na flavóny, flavonoly, flavanony a posledne izoflavóny, ktoré považuje za najdôležitejšiu skupinu.

**Izoflavóny** tvoria najpočetnejšiu skupinu, kde radíme genisteín a daidzeín, glycetín, formononetín, a biochanín A. Sú to polyfenolické nesteroidné rastlinné zlúčeniny, vyskytujúce sa takmer vo všetkých rastlinách, pričom najbohatším zdrojom izoflavónov je ďatelina červená (formononetín, biochanín A) a hlavne sója fazuľová (genisteín, daidzeín) (Oborná et al., 2007). Sója je dnes súčasťou nielen rôznych alternatívnych diét u ľudí, ale jej významným konzumentom sú z hospodárskych zvierat najmä prasatá. Je to preto, že sója je dnes hlavným zdrojom proteínov v kŕmnych dávkach. Jej význam sa zvýšil hlavne po zákaze skrmovania väčšiny živočíšnych bielkovín. Plnotučné sójové bôby alebo sójové extrahované šroty disponujú priaznivým zložením aminokyselín a relatívne vysokým obsahom energie. Antinutričné látky, hlavne inhibítory trypsínu, pôsobia negatívne. Termickým spracovaním je ich možné eliminovať. Pre výkrmné prasatá sa tak bežné zastúpenie sóje v zmesiach pohybuje v rozmedzí 6 – 18 % (Vavrečka a kol., 2005).

Vysoké množstvo genisteínu a daidzeínu sa okrem sóje vyskytuje v ďalších strukovinách a obilninách (vid'. tabuľka 1) ako sú fazuľa (*Phaseolus vulgaris*), cícer (*Cicer arietinum*), arašidy (*Arachis hypogaea*), jačmeň (*Hordeum*), šošovica (*Lens culinaris*), hrach (*Pisum sativum*) a taktiež v koreňoch kudzu (*Pueraria lobata*)(Mazur, 1998).

Tabuľka 1 - Množstvo genisteínu a daidzeínu obsiahnutého v jednotlivých rastlinách uvádzaných v nanomoloch na gram suchej hmotnosti (Dixon, 2004)

<b>Rastlina</b>	<b>Genisteín</b>	<b>Daidzeín</b>
<b>Sójové bôby</b>	993 - 3115	413 - 2205
<b>Korene kudzu</b>	467	7283
<b>Fazuľa</b>	< 1 - 19	< 1 - 2
<b>Cícer</b>	3 - 8	< 1 - 8
<b>Ľanové semienko</b>	0	0
<b>Arašid</b>	2	1
<b>Pšeničné otruby</b>	< 1	< 1
<b>Jačmeň (celé zrno)</b>	< 1	< 1
<b>Šošovica</b>	< 1	< 1
<b>Hrach</b>	< 1	< 1

Izoflavóny sa prirodzene vyskytujú ako biologicky neaktívne glykozidové konjugáty, genistín a daidzín (Cederroth et al., 2009), ktoré obsahujú glukózové alebo sacharidové zvyšky a aktívnymi sa stávajú po odstránení zvyškov cukru črevnými baktériami. Po vstupe do tráviaceho traktu sa rýchlo metabolizujú, absorbujú a vstupujú do systémového obehu prevažne ako konjugáty s obmedzenou biologickou dostupnosťou. Nekonjugovaná forma, aglykón je bioaktívna forma (Retana-Márquez et al., 2012).

Aglykóny sú flavoidné molekuly bez pripojených cukrov alebo iných derivátov. Medzi aglykóny patria genisteín, daidzeín a glycetin (Lee and Lee, 2009). Sú jednou zo štyroch chemických foriem troch typov izoflavónov (Liu, 1997). Druhá je  $\beta$ -glukozidová forma v ktorej je genistin, daidzin a glycitin.  $\beta$ -D-glukozidová forma genisteínu, genistin tvorí 55 – 65 % obsahu tohto izoflavónu v sójových produktoch,  $\beta$ -D-glukozidová forma daidzeínu, daidzin obsahuje asi 30 – 35 %. Glycitín, glycitein, biochanin A a formononetin spolu tvoria < 10 % zo sójových izoflavónov (Jefferson et al., 2012). Pod acetylglukozidovú formu spadajú 6"-O-acetyldaidzin, 6"-O-acetylgenistin a 6"-O-acetylglycetin. Do poslednej malonylglukozidovej formy patria 6"-O-malonylgenistin, 6"-O-malonyldaidzin a 6"-O-malonylglycetin (Liu, 1997). Surové sójové bôby sú zložené približne zo 70 – 80 % malonyl- $\beta$ -glukozidov, 25 %  $\beta$ -glukozidov, 5 % acetyl- $\beta$ -glukozidov a menej než z 2 % aglykónov (Lee et al., 2004).

U ovci sú formononetin a biochanin A biotransformované baktériami z bachora na medziprodukty daidzeín a genisteín a potom na equol (Retana-Márquez et al., 2012). Equol bol prvý krát izolovaný v roku 1932 z konského moču a následne o 50 rokov bol identifikovaný u ľudí ako metabolit genisteínu a daidzeínu (Setchell and Clerici, 2010). Je produktom črevných baktérií počas metabolizmu izoflavónov a disponuje estrogénovou aktivitou s afinitou k obom estrogénovým receptorom ER $\alpha$  a ER $\beta$ . Ako konečný produkt biotransformácie daidzeínu disponuje väčšími antioxidantnými schopnosťami pomedzi izoflavónmi (Setchell et al., 2002).

No aj napriek rýchlej degradácii izoflavónov v črevách sú koncentrácie v plazme významné (20 mmol/L u oviec), ktoré zodpovedajú patofyziologickým účinkom na reprodukciu. Po absorpcii sa izoflavóny rekonjugujú v pečeni hlavne na kyselinu glukurónovú (Retana-Márquez et al., 2012). U hovädzieho dobytká a oviec mikroorganizmy bachoru konvertujú daidzeín a genisteín na dva aktívne metabolity, equol a paraethyl-fenol (Lundh et al., 1990)., avšak žiadne patofyziologické účinky neboli zistené (Retana-Márquez et al., 2012). Koncentrácia daidzeínu a genisteínu klesá hodinu po kŕmení, zatiaľ čo equol a pentyl-fenol sú prítomné v krvi niekoľko hodín po nakŕmení. Daidzeín sa v bachore metabolizuje na equol,

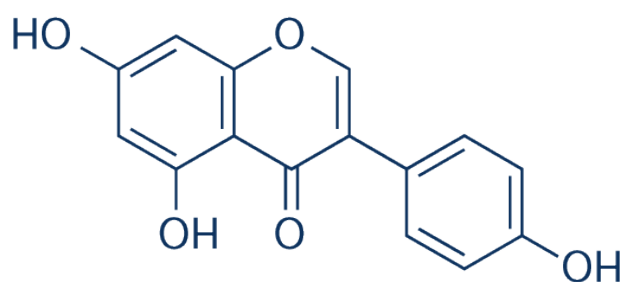


zatiaľ čo genisteín na pentyl-fenol. Kravy vykazovali vysoké koncentrácie týchto metabolitov v krvnej plazme a moči počas kŕmenia dávkou obsahujúcou vysoké koncentrácie sóje (Lundh et al., 1990). U ľudí po konzumácii rastlinných lignanov a izoflavónov v gastrointestinálnom trakte nastávajú komplexné enzymatické metabolické premeny, čo vedie k tvorbe heterocyklických fenolov so štruktúrou podobnou estrogénom. Absorbované metabolity izoflavónov podliehajú enterohepatálnemu obehu a môžu byť vylúčené do žlče, dekonjugované črevnou flórou, reasorbované, rekonjugované pečeňou a vylúčené močom (Murkies et al., 1998).

Na základe toho je možné izoflavóny detekovať v krvi a moči zvierat (Cederroth et al., 2009) v semene, žlči, slinách, výkaloch a mlieku (Murkies et al., 1998).

### 3.1.2 Genisteín, charakteristika a vlastnosti

Genisteín (4', 5, 7 trihydroxyizoflavón) je biosynteticky najjednoduchším z pomedzi izoflavonoidných zlúčenín (Dixon, 2002). Inak tiež nazývaný genisterin, prunetol či sophoricol. Molekulárny vzorec genisteínu je  $C_{15}H_{10}O_5$  (Rozman a kol., 2006). Chemická štruktúra genisteínu je zobrazená na obrázku 2. Genisteín na rovnaké fenolycké jadro a vzdialenosť medzi 4' a 7' hydroxylovými skupinami ako 17 $\beta$ -estradiol (Sureda et al., 2017). Rovnaká vzdialenosť medzi hydroxylovými skupinami na opačných stranách molekúl genisteínu a 17 $\beta$ -estradiolu robí genisteín schopný viazať sa na ER $\alpha$  a ER $\beta$  (Ganai and Farooqi, 2015).



Obr. 2 - Chemická štruktúra genisteínu (Fialová, 2012)

Je bežným prekursorom v biosyntéze antimikrobiálnych fytoalexínov a fytoanticipínov v strukovinách, a je dôležitou nutraceutickou molekulou obsiahnutou v sóji (Dixon, 2002). Disponuje škálou rôznych biologických vlastností ako je prevencia rakoviny, osteoporózy, kardiovaskulárnych ochorení u zvierat a ľudí (Mazumder, 2016, Nilsson et al., 2001).

Prvý krát bol izolovaný v roku 1899 z kručianky farbiarskej (*Genista tinctoria*), ktorá sa radí do čeľade bôbovité (Ganai and Farooqi, 2015). V roku 1931 bol prvý krát izolovaný zo sójových bôbov, pričom jeho estrogénna a uterotropná aktivita bola zistená koncom 50. rokov 20. storočia (West et al., 1978).

Genisteín je centrálnym medziproduktom biosyntézy zložitejších izoflavonoidov s úlohou vytvárania alebo inhibície interakcií medzi rastlinami a mikróbmi (Dixon, 2002).

Ako bolo vyššie spomenuté, genisteín patrí medzi fytoestrogény so širokou paletou farmakologických účinkov na živočíšne bunky, zahŕňajúcich inhibíciu tyrozín kinázy (Dixon, 2004), čo vo svojej publikácii uvádza aj Liggins (2000). Inhibícia tyrozín kinázy je dôležitá, pretože tieto receptorové enzýmy sa podieľajú na kontrole mitogenézy, regulácii bunkového cyklu, prežitia buniek a bunkovej transformácie prostredníctvom väzby na rastový faktor. Faktory regulujúce rast, ktoré sú modulované tyrozín kinázou zahŕňajú epidermálny rastový faktor, transformujúci rastový alfa faktor, rastový faktor odvodený od krvných doštičiek, inzulín a rastový faktory podobný inzulínu pričom všetky boli zapojené do rastu nádorov (Knight and Eden, 1995).

Proteínové tyrozín kinázy (PTK) katalyzujú fosforyláciu ich vlastných tyrozínových zvyškov a zvyškov iných proteínov vrátane rastových faktorov, ktoré sa podieľajú na proliferácii nádorových buniek. Genisteín môže tak svojou inhibíciou potenciálne spomaliť tumorigenézu. PTK sú vysoko exprimované v niekoľkých oblastiach mozgu. Pri vysokých dávkach, genisteín potláča expresiu PTK v mozgu, čím má tzv. neuroprotektívny účinok.

Inhibícia aktivity proteínovej tyrozín kinázy môže zohrávať dôležitú úlohu pri zlepšovaní kardiovaskulárnych funkcií a taktiež zabraňuje vaskularizácii nádorov (Patisaul and Jefferson, 2010).

Okrem toho, že genisteín patrí medzi fytoestrogény naväzujúce sa pri nízkej koncentrácii na estrogénové receptory, pôsobí aj ako inhibítor akrozómovej reakcie indukovanej zónou pellucidou a tiež väzbou spermie na zónu pellucidu (Silvestre, 2015)

Okrem estrogénneho účinku môže genisteín tiež prispieť k antiestrogénnej aktivite kompetitívnou väzbou na rovnaké receptory ako estradiol (Sureda et al., 2017).

Genisteín môže potenciálne ovplyvniť mieru clearance adrogénov a estrogénov a tým vlastne ich dostupnosť. Výsledky podávania fytoestrogénov zvieratám a ľuďom sa tak môžu značne

meniť, pretože genisteín sa na ľudské  $\alpha$  a  $\beta$ -estrogénové receptory viaže inak. Biologická dostupnosť a metabolizmus genisteínu sú kľúčové vlastnosti potrebné k pochopeniu jeho biologických účinkov. Existuje malý počet izoflavónových glykozidov (ako napríklad genisteín) oproti známym flavonoidovým glykozidom. Malonyl glukozidy genisteínu nachádzajúce sa v sójových bôboch sú labilné, nakoľko po tepelnej úprave podliehajú degradácii na neacylované glukozidy. Následne sú hydrolyzované v tenkom čreve (Sureda et al., 2017).

Kompletný metabolizmus genisteínu nie je presne známi. Vieme však, že genistín sa nedokáže v sójových produktoch absorbovať, nakoľko jeho vysoká rozpustnosť vo vode mu zabraňuje priechodu cez lipidovú dvojvrstvu enterocytov. Glukozid musí najskôr prechádzať tenkým črevom do hrubého čreva skôr, ako ho bakteriálna flóra dekonjuguje na genisteín, ktorý je rozpustný v tukoch a nie vo vode. Rozpustnosť genisteínu v lipidoch uľahčuje jeho vstrebávanie v hrubom čreve (Rozman a kol., 2006). Pred vstupom do systémového obehu je väčšina genisteínu konjugovaná s kyselinou glukorónovou, uridin difosfátom (UDP) – glukoronosyltransferázou (UDPGT) a menšie množstvo je konjugované na sulfát pomocou enzýmu sulfotransferáza (Committee on Toxicity, 2003). Konjugácia genisteínu prebieha v čreve, no bola zistená aj v pečeni. Črevo tak hrá dôležitú úlohu pri gluronidácii genisteínu. Ososki and Kennelly (2003) uvádzajú, že genisteín je v tele metabolizovaný na dihydrogenisteín a potom na 6'-hydroxy-O-DMA a na hormonálne inertný p-ethylfenol u oviec a ľudí.

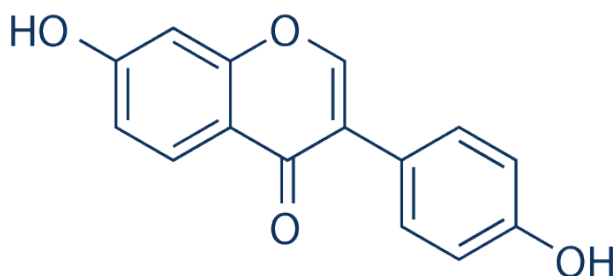
Ďalším účinkom je inhibícia hormónu súvisiaceho s karcinogéznou u zvierat. Bolo dokázané, že inhibuje proliferáciu buniek ľudskej rakoviny (Heldring et al., 2007), vďaka modulácii génov v bunkách a zvyšovaniu apoptózy rakovinotvorných buniek. Genisteín a izoflavóny tiež pôsobia ako inhibítory aromatázy. Vysoká hladina aromatázy je spojená s funkciou nadobličiek, rakovinou prostaty a prsníkov (Banerjee et al., 2008; Whitehead et al., 2003).

Silvestre et al. (2015) uvádzajú genisteín ako izoflavón s rôznymi vlastnosťami, ako je antioxidantná aktivita, ktorá má ochranný účinok na fragmentáciu DNA a pohyblivosť ľudských spermii. Menzel a kol. (2007) však uvádzajú, že pohyblivosť spermii u mačiek a hovädzieho dobytku nebola ovplyvnená genisteínom.

Liu et al. (1997) uvádzajú genisteín s antioxidantnou funkciou a schopnosťou ochrany pred peroxidáciou lipidov.

### 3.1.3 Daidzeín, charakteristika a vlastnosti

Daidzeín (4', 7 trihydroxyizoflavón) je prirodzene vyskytujúci sa izoflavón, patriaci k nesteroidným estrogénom. (Sun et al., 2016). Jeho molekulárny vzorec je  $C_{15}H_{10}O_4$  a vo svojej chemickej štruktúre sa daidzeín odlišuje od genisteínu absenciou hydroxylovej skupiny na piatej pozícii (Obr. 3). Táto hydroxylová skupina vzniká prirodzene kondenzáciou reziduí malonylkoenzýmu A počas tvorby naringenin chalkónu. K jej strate dochádza počas tvorby polyketidového intermediátu, ktorý sa zacyklí počas tvorby chalkónu a je katalyzovaný špecifickou NADPH dependentnou reductázou nazývanou aj chalkón reductáza (Dixon, 2004).



Obr. 3 - Chemická štruktúra daidzeínu (Fialová, 2012)

Hlavnou metabolickou dráhou izoflavónu daidzeínu, okrem konjugácie je konverzia na equol (70%) a O-desmetylangolesin (5 - 20%) (Bannwart et al., 1984). V niektorých štúdiách sa ukázalo, že equol, metabolit daidzeínu, vykazoval estrogénnu aktivitu v *in vitro* testovacích systémoch. Ďalej bolo preukázané, že vykazuje vyššiu estrogénnu aktivitu ako daidzeín (Chang et al., 1995). U hlodavcov je equol hlavným cirkulujúcim metabolitom medzi izoflavónmi, čo predstavuje asi 70 – 90 % zo všetkých cirkulujúcich izoflavónov. Kým všetky hlodavce dokážu produkovať equol (Cederroth et al., 2009), prasatá ho metabolizujú v menšom množstve (Setchell et al., 2002) a len 30% ľudí je schopných metabolizovať daidzeín na equol (Cederroth et al., 2009). Katalytickou hydrogenáciou môže byť equol ľahko syntetizovaný z daidzeínu, ale týmto vzniká forma využívaná komerčne a hlavne pre štúdium jeho biologickej účinnosti a vlastností (Setchell, Clerici, 2010).

O-desmetylangolensin, druhý metabolit daidzeínu nebol skúmaný pre svoju estrogénnu aktivitu (Schmitt et al., 2001).

Daidzeín je taktiež inhibítorom alkoholdehydrogenázy a aldehyddehydrogenázy. Dokazuje to štúdia Keunga a Vallesa (1993), ktorí škrečkom u ktorých bola vytvorená závislosť voči

alkoholu podávali daidzeín. Ten ich chuť na alkohol znižoval. Vysoký obsah daidzeínu sa nachádza v koreňoch kudzu (viď. tabuľka 1), ktoré sa používajú najmä v Ázii k liečbe alkoholizmu.

### 3.2 Vplyv fytoestrogénov na reprodukciu

Keďže fytoestrogény najviac obsahuje sója, ktorá je dnes populárna potravinárska prísada, zvýšil sa tak záujem o výskum biologických vlastností týchto zlúčenín a ich vplyve na organizmus (Bingham et al., 1998).

Veľký význam majú fytoestrogény u žien v období menopauzy. Niekoľko štúdií (Clarkson et al., 2011; Bedell et al., 2014; Lagari and Levis, 2014) dokazuje pokles návalov tepla u žien, ktorým bola podávaná denná dávka izoflavónov v porovnaní so ženami bez suplementácie. Lagari and Levis (2014) dokonca uvádzajú, že aj samotný equol má schopnosť redukovať vazomotorické menopauzálne symptómy.

Lu et al. (1996) nepoukazujú na významné zmeny dĺžky menštruačného cyklu u žien, ktorým bol podávaný sójový džús s celkovým obsahom izoflavónov 200 mg/deň počas jedného mesiaca. Rovnaké výsledky pozorovali aj Martini et al. (1999) pri podávaní sójového nápoja počas 2 menštruačných cyklov s obsahom 38 mg izoflavónov za deň a Maskarinec et al. (2002) pri podávaní 100 mg izoflavónov na deň u premenopauzálnych žien počas jedného roka.

Existujú však štúdie, ktoré naopak potvrdzujú negatívny vplyv fytoestrogénov na reprodukciu u žien. Unfer et al. (2004) uvádzajú, že pri dlhodobej suplementácii (do 5 rokov) fytoestrogénami dochádza k zvýšenému výskytu hyperplazie endometria. Rovnaké výsledky zistili aj Murray et al. (2003) a Wolf et al. (2006).

Nedá sa tak jednoznačne potvrdiť pozitívny alebo negatívny vplyv fytoestrogénov na reprodukčný trakt. Je potrebné ale zdôrazniť, že pri vyššie uvedených prípadoch došlo k odzneniu príznakov ako aj návrat dočasnej neplodnosti u žien, ktoré prestali konzumovať výrobky s vysokým obsahom sóje. Taktiež treba brať ohľad na rôznorodosť jednotlivých prípadov, ako aj náročnosť realizácie takto zameraných štúdií. Z doterajších zistení môžeme však konštatovať, že v ľudskej populácii prevažujú pozitívne účinky fytoestrogénov.

To sa však u zvierat potvrdiť nedá, nakoľko sa väčšinou stretávame s negatívnym efektom na organizmus.

Najstarším dôkazom o nepriaznivom vplyve prírodne sa vyskytujúcich fytoestrogénov na reprodukciu u cicavcov, bola správa v roku 1946, ktorá naznačovala, že ovce pasúce sa na pastve s obsahom červenej ďateliny vykazujú neplodnosť (Bennetts et al., 1946).

Biggers et al. (1954) uvádzajú, že to bolo spôsobené vysokými koncentráciami equolu tvoreného črevnými baktériami po požití veľkého množstva metoxylovaného izoflavónu, formononetínu, bohatého na niekoľko druhov ďateliny.

Neskôr, boli zistené nízke plazmatické koncentrácie progesterónu a estrogénov u gravidných ovci kŕmených ďatelinou. To vyústilo k podstatnému zníženiu (27 % ) počtu gravidných oviec, ktoré úspešne porodili oproti ovciam kŕmených trávou (95 % ). Podobné účinky na plodnosť boli pozorované u oviec, ktorým sa podávali veľké množstvá estradiolu (300 mg) po dobu 26 mesiacov (Adams and Sander, 1998).

O dvadsať rokov neskôr bolo prevedené podobné skúmanie na kravách, ktoré vykazovali poruchy plodnosti v období skrmovania červenej ďateliny. U gepardov chovaných v zajatí sa prejavila rovnaká porucha pri sójovej diéte. Vo všetkých troch prípadoch sa po znížení obsahu fytoestrogénov v kŕmnej dávke obnovila fertilita (Jefferson et al., 2012).

Štúdie ukázali, že vystavenie sójovým izoflavónom v rannom veku zvyšuje diferenciáciu mliečnej žľazy, ktorá je následne menej citlivá na chemicky indukovanú rakovinu prsníka. Tento účinok je prítomný pri vysokých dávkach (500 mg genisteínu/kg telesnej hmotnosti) a nemení plodnosť a vek nástupu puberty. Ďalším reprodukčným orgánom citlivým na expozíciu izoflavónov je maternica. Neonatálne myši liečené genisteínom vykazovali zväčšenú maternicu (pri dávke 50 mg genisteínu/kg hmotnosti) a zvýšenú hmotnosť maternice a výšku epitelových buniek pri vyšších dávkach (100 mg/kg hmotnosti). Toto naznačuje estrogény účinok genisteínu na maternicu. Navyše pri subkutánnej dávke 50 mg genisteínu bol pozorovaný adenokarcinom maternice, absencia žltého telieska a abnormality vaječníkov. Zaujímavé však je, že daidzeín takéto účinky na maternicu u myší nespôsobil a tým nemá merateľný estrogénny účinok (Dinsdale and Ward, 2010).

Bolo dokázané, že fytoestrogény podávané vo vysokých dávkach alebo v kritických štádiách vývoja u hlodavcov môžu spôsobovať vážne poruchy reprodukčného traktu (Mitchell et al., 2001) čo potvrdila štúdia Nagao et al. (2001), ktorí poukazujú na vplyv genisteínu počas neonatálneho obdobia vyúsťujúceho v abnormálny vývoj pohlavných žliaz u samíc potkana v postpubertálnom období.

Pri dennej suplementácii 50mg genisteínu na kilogram živej hmotnosti bol zistený zvýšený výskyt atrofie vaječníkov u samíc potkana. Pri zvýšení dávky na 500mg/kg ž. hm. došlo

k zvýšenému výskytu rôznych patologických javov ako je hydrometra, hyperplazia maternice, žliaz maternice a krčku, zvýšenej sekrécie mliečnej žľazy, pričom došlo k celkovému zvýšeniu hmotnosti maternice a vaječníkov (Rozman, et al., 2006).

Skrmovaním vysokého obsahu sóje v kŕmnych dávkach u kráv môže spôsobiť poruchy cyklu a poruchy funkcie vaječníkov počas ranného štádia gravidity. Môže to byť spôsobené inhibíciou produkcie progesterónu, čo vedie k nárastu abortov (Tiemann et al., 2007).

Zvýšené percento ranných embryonálnych úmrtí pozorovali aj Woclawek-Potocka et al. (2013) vo svojej publikácii, kedy izoflavóny a ich aktívne metabolity vyvolávajú syntézu PGF epiteliálnymi a stromatickými bunkami endometria, znižujú hladiny progesterónu počas luteálnej fázy, čím dochádza k stimulácii PGF luteálnymi bunkami a zníženiu frekvencií pulzov LH. Hashem et al. (2016) v nedávnej štúdií taktiež poukázali na zníženú mieru koncepcie u jalovic pri skrmovaní krmiva s obsahom fytoestrogénov.

Tiemann et al. (2007) skúmali účinky daidzeínu a genisteínu na sekréciu progesterónu kultivovaných primárnych folikulárnych buniek získaných z vaječníkov prasníc. Daidzeín neznižoval životaschopnosť kultivovaných buniek pri koncentrácii od 0,1 do 100  $\mu\text{M}$ , avšak genisteín ich životaschopnosť znižoval pri 50  $\mu\text{M}$  v porovnaní s kontrolnou skupinou. Obidva izoflavóny pri netoxických koncentráciách 1 a 10  $\mu\text{M}$  inhibujú produkciu progesterónu. Inhibičnú aktivitu daidzeínu na produkciu progesterónu bunkami prasacej granulózy popísal aj Nynca et al. (2009) a Galeati et al. (2010), ktorí zároveň uvádzajú, že daidzeín o koncentrácii 1 – 10  $\mu\text{M}$  pridávaný počas dozrievania oocytov neovplyvňoval vývoj embrya ošípaných.

Štúdie *in vitro* ukázali, že daidzeín a quercetin pôsobia priamo na vaječníky prasníc znížením syntézy progesterónu a 17 $\beta$ -estradiolu a zvyšujú expresiu ER $\beta$ , čo poukazuje na škodlivé účinky fytoestrogénov na reprodukčné procesy u samíc (Retana-Márquez et al., 2012).

Ford et al. (2006) poukázali nato, že exogénny genisteín ovplyvňuje tkanivá v reprodukčnom trakte u ovariektomizovaných postpubertálnych prasníc. A to postupným zvyšovaním dávok genisteínu (od 50 po 400 mg/deň) aplikovaného intramuskulárne v dvanásť hodinových intervaloch počas 10 dní. Pri najvyššej dávke genisteínu (400 mg/deň) došlo k zmenám celého reprodukčného traktu a to k zvýšeniu hmotnosti maternice a krčku, nárastu výšky epiteliálnych buniek obklopujúcich maternicové žľazy, lumen maternice a krčok. Bolo zaznamenané taktiež zvýšenie celkového obsahu bielkovín a zmmnoženie koncentrácie DNA v reprodukčných tkanivách.

Farmer et al. (2009) uvádza, že pri skrmovaní prasníc ad libitum od 90 do 119 dňa života sa preukázal celkový vyšší príjem krmiva a tým aj vyššie prírastky na hmotnosti u prasníc s diétou obsahujúcou sóju, ktorým bolo denne pridávané 2,3g genisteínu premixovaného v 15g kukurice oproti skupine prasníc bez obsahu sóje v krmive. Je potrebné tiež podotknúť, že vyššie uvedená strava, nemala žiadny vplyv na cirkulujúce koncentrácie progesterónu, prolaktínu, estradiolu a IGF1, avšak hmotnosť pri prvej ruji bola vyššia u skupiny suplementovanej sójou ale dĺžka estru bola skrátená oproti skupine bez obsahu sóje v krmive. Po 119 dňoch života prasničiek neboli zjavné rozdiely medzi jednotlivými skupinami čo naznačuje adaptáciu na krmivo a tak vyvracia zistené údaje o účinku pridaného genisteínu u prepubertálnych prasničiek. Jefferson et al. (2007) však poukázal na zmeny v dĺžke estrálneho cyklu a skorší nástup puberty (Lewis et al., 2003) u neonatálnych myši ošetrovaných genisteínom. Sú preto pravdepodobné medzidruhové rozdiely v obsahu a metabolizme izoflavónov u samíc potkana, prasnice, opíc v porovnaní so ženou, čo skúmali Gu et al. (2006), ktorí zistili, že celkový metabolický profil ošípaných bol bližšie k metabolizmu u žien ako u potkanov či opíc. V sére prasiat a ľudskej plazme equol nebol zistený, ale daidzeín a genisteín prispeli k > 88 % celkovým izoflavónom. Moč opíc a potkanov obsahoval vysoké hladiny aglykónov (> 85 % a > 32%), zatiaľ čo u žien a prasníc boli izoflavóny vylučované vo forme glukuronidov (> 80 %) s 10 % aglykónov.

Estrogény sú hlavnými samičími steroidnými hormónmi. To, že sa v malej miere uplatňujú aj u samcov je známe už od 30-tych rokov 20. storočia kedy bola zistená vnímavosť semenníkov voči týmto hormónom. Neskôr v 70-tych rokoch bol tento predpoklad potvrdený prítomnosťou estrogénových receptorov na semenníkoch a prísemenníkoch. Tento objav tak otvoril brány k početným štúdiám pre bližšie zistenie funkcie estrogénov u samcov (Hess, 2003).

Estrogény hrajú významnú rolu pre vývoj zárodočných buniek a pri procese spermatogenézy, napríklad estradiol je dôležitý pre správnu pohyblivosť, životaschopnosť spermíí a ich penetráciu do oocyty (Idaomar et al., 1989).

Ded et al. (2010) zistili, že estrogény pôsobia na kančie spermie *in vitro* a navodzujú tak prokapacitačný účinok, ktorý závisí na fáze kapacitácie a individuálnej citlivosti zvierat voči estrogénom. U kancov s vysokou vnímavosťou voči estrogénom došlo k stimulácii kapacitácie už pri nízkych koncentráciách estradiolu (5 nM). Avšak u jedincov so slabou citlivosťou voči estrogénom až vysoké koncentrácie (10 -100 µM) stimulovali kapacitáciu.



Pri expozícii zvýšených koncentrácií estrogénov *in vivo* u pubertálnych myší došlo k predčasnej kapacitácii spermií už v nadsemenníkoch. Tento stav bol však reverzibilný po ukončení stimulácie (Ded et al., 2013).

Podobne Sebkova a kol. (2012) uvádzajú, ako prírodné, tak syntetické estrogény môžu modifikovať proces kapacitácie a tým zvyšujú riziko prokapacitačného účinku nakoľko počet spermií, ktoré následne prešli akrozómovou reakciou bol menší.

Vzhľadom na to, že fytoestrogény majú schopnosť napodobňovať estrogény bolo predložených niekoľko štúdií sledujúcich vplyv týchto látok na reprodukciu mužov a samcov jednotlivých druhov.

U mužov neboli zistené výrazné zmeny v sérových koncentráciách testosterónu, SHBG a luteinizačného hormónu počas príjmu stravy obsahujúcej sóju (Allen et al., 2001). Mitchell et al. (2001) uvádzajú, že dávka izoflavónu v doplnku stravy (40 mg) podávaná mužom počas 2 mesiacov, ktorá je zhodná množstvu spotrebovanému v mnohých východných krajinách, nemala žiadny vplyv na hladiny gonadotropínu alebo pohlavných hormónov, pričom neboli zistené žiadne zmeny v objeme ejakulátu, koncentrácií a motility spermií.

Bolo tiež preukázané, že príjem vysokých dávok sójových potravín alebo sójových izoflavónov bol spojený s nižšou koncentráciou spermií u ľudí (Chavarro et al., 2008).

Štúdie na pokusných zvieratách naznačujú, že expozícia fytoestrogénov počas obdobia vývoja sa neodporúča. Dokazuje to štúdia Wisniewski et al. (2005) ktorí tvrdia, že vystavenie vplyvu genisteínu v perinatálnom období spôsobí nižšiu celkovú hmotnosť ako aj hmotnosť semenníkov, skrátenú anogenitálnu oblasť a nižšiu koncentráciu testosterónu čo sa v dospelosti prejavilo demaskulinizáciou pohlavných orgánov a zmeneným pohlavným správaním.

Expozícia samcov potkanov na sójové izoflavóny obsiahnuté v kŕmnej dávke, zvýšila hladinu testosterónu v sére a semenníkoch (McVey et al., 2004), vysoké koncentrácie daidzeín oneskorili vývoj a rast semenníkov a tiež indukovali štrukturálne zmeny v tkanivách semenníkov a zhoršovali spermatogézu (Jiang, et al., 2008).

Hagele et al. (1998) uvádzajú, že inkubácia býčích spermií s obsahom genisteínu neovplyvnila motilitu spermií. Genisteín však spôsoboval redukcii väzby medzi spermiiou a zonou pellucidou.

Pri skrmovaní 250 ppm izoflavónov v kŕmnej dávke bol zvýšený obsah fruktózy oproti kontrolnej skupine kancov. Vieme, že fruktóza je považovaná za hlavný energetický zdroj spermií, pričom zvyšuje podiel spermií s lineárnym pohybom a indukuje kmitavý pohyb. To dokazuje, že suplementácia izoflavónmi s koncentráciou 250 ppm zaistila dostatočnú energiu

pre spermie, čím sa zlepšila kvalita spermií u čínskych miniatúrnych kancov. Autori ďalej poukazujú nato, že nižšia koncentrácia izoflavónov (250 ppm) zvyšuje testis index, percento životaschopných zárodočných buniek,  $\alpha$ -glykozidázy a hladiny Bcl-2 proteínu v testikulárnom tkanive, zatiaľ čo vysoké koncentrácie (500 ppm) výrazne narušujú jednotlivé parametre. Tí istí autori ďalej uvádzajú, že nižšie koncentrácie nepôsobia negatívne na reprodukčné parametre, ale vysoké koncentrácie izoflavónov negatívne ovplyvňujú reprodukčné parametre kancov (Yuan et al., 2012).

Z výsledkov Krejčárovej a kol. (2017) je zrejмый inhibičný účinok genisteínu na motilitu spermií pri koncentráciách vyšších ako 2,5  $\mu$ M v porovnaní s kontrolou po dvoch a štyroch hodinách inkubácie.

Naopak Kim a kol. (2014) vo svojej štúdií uvádzajú, že ani jedna z koncentrácií (1, 50 a 100  $\mu$ M) genisteínu neovplyvnila motilitu spermií pri inkubácii 3 a 6 hodín v porovnaní s kontrolou, dokonca koncentrácie 1 a 50  $\mu$ M mali pozitívne účinky na motilitu a viabilitu spermií počas inkubácie 3 a 6 hodín. Vysoká koncentrácia (100  $\mu$ M) znížila mitochondriálnu aktivitu spermií v porovnaní s kontrolou počas 6 hodinovej inkubácie. Autori tiež uvádzajú, že genisteín mal priaznivé účinky na životaschopnosť spermií pri rozmedzí koncentrácií 1 – 50  $\mu$ M počas šiestich hodín inkubácie. Avšak pri koncentracii 100  $\mu$ M počas 6 hodinovej inkubácie mal genisteín škodlivý účinok na mitochondriálnu aktivitu. Genisteín tak mal antioxidačné vlastnosti pri koncentráciách 1 – 50  $\mu$ M a môže taktiež jednotlivé charakteristiky zlepšovať. Tieto výsledky sú v súlade so zisteniami iných výskumov, že genisteín má antioxidačnú funkciu tiež na kultúru červených krviniek a potkanie spermie pričom spôsobuje zníženie oxidačného stresu a peroxidácie lipidov. Nízke (0,01 – 1  $\mu$ M) ani vysoké (5 – 10  $\mu$ M) koncentrácie genisteínu neovplyvnili vývoj embrya IVF.

## 3.3 Kančí ejakulát

### 3.1.1 Základná charakteristika

Každá samčia pohlavná bunka, spermia, je vysoko špecializovaná bunka predurčená k splynutiu so samičou pohlavnou bunkou, vajíčkom, za účelom vzniku nového životaschopného jedinca. Na to, aby však bola schopná prekonať všetky bariéry samičieho pohlavného traku musí prejsť zložitým vývojom počínajúcim v stočených semenotvorných kanálikoch umiestnených v semenníkoch samca. Tento proces nazývame spermatocytogéza, na ktorý nadväzuje samotný vývoj spermatídy v zrelú spermium, spermatohistogéza. Tento proces prebieha u všetkých druhov zvierat rovnako, no jeho dĺžka je druhovo variabilná, rovnako ako aj samotná morfológická stavba spermie.

U kancov trvá spermatogéza 45 dní, pričom 10 až 12 dní prebieha priechod a zrenie spermií v prísemenníkoch (Louda, et al., 2001).

Percentuálny podiel spermií z celkového ejakulátu je 3 – 5 %. Zrelá kančia spermia disponuje dĺžkou 43 – 45  $\mu\text{m}$ , s dvomi odlišiteľnými oblasťami a to hlavičkou a chvostíkom, ktoré sú od seba oddelené krátkym spojovacím segmentom nazývaným krčok. Hlavička je bilaterálne sploštená a oválna s nasledujúcimi rozmermi: 7  $\mu\text{m}$  dlhá, 3,7  $\mu\text{m}$  široká v najširšom bode a 0,4  $\mu\text{m}$  hrubá. Bičik má dĺžku 37,4  $\mu\text{m}$ , pričom najdlhšou časťou je s 26,2  $\mu\text{m}$  hlavná časť bičíku (Bonet et al., 2013).

Semenná plazma tvorí najväčší objem z celého ejakulátu a to 95 – 97 %. Hlavnou úlohou semennej plazmy je poskytnúť spermiám potrebné živiny a vytvoriť vhodné prostredie k ich prežitiu v samičom pohlavnom trakte. Je tvorená sekrétom z prídavných pohlavných žliaz, ktoré sú tvorené mechúrikovitými žlazami, bulbouretrálnymi žlazami, prostatou (Reece, 1998). Mechúrikovité žľazy majú lalôčkovitý tvar a tvoria najväčší objem z celého ejakulátu. Ich sekrét obsahuje množstvo sacharidov, bielkovín, aminokyseliny, enzýmy, kyselinu askorbovú a citrónovú. U kanca je obsiahnuté veľké množstvo ergothioneínu, ktorého funkciou je chrániť spermie pred vplyvom paralyzujúcich látok, ako sú napríklad ťažké kovy (Gamčík, 1992). Bulbouretrálne žľazy, taktiež nazývané Cowperove sú u kancov najväčšie spomedzi hospodárskych zvierat. Ich sekrét je špecifický svojou viskozitou vďaka obsahu sialomucínu. Spolu so sekrétom mechúrikovitých žliaz sa podieľajú na vytvorení tzv. vaginálnej zátky, ktorá zabráni spätnému výtoku ejakulátu z pohlavných ciest samice (Noakes et al., 2001). Prostata je nepárová žľaza, ktorej sekrét je bohatý na zinok, anorganické soli a voľné aminokyseliny. Sú v ňom prítomné aj prostaglandíny, ktoré reagujú s hlienom

sliznice krčku a napomáhajú tak priechodu cezeň a taktiež napomáhajú v transporte spermií smerom k vaječníkom vďaka kontrakcii hladkých svalov.

Kančí ejakulát by mal mať mliečne bielu až sivo bielu farbu bez akýchkoľvek prímiesí. Pach by mal byť nevýrazný. Akýkoľvek ostrý zápach značí kontamináciu semena a tým nie je vhodný k ďalšiemu použitiu. Je špecifický svojím veľkým objemom ( $> 100 \text{ cm}^3$ ) v porovnaní s ostatnými druhmi hospodárskych zvierat. Koncentrácia spermií v 1 ml je 200 – 300 miliónov, čím je kančí ejakulát asi päť krát menej koncentrovaný oproti býčiemu a približne rovnaký ako žrebčí. Najdôležitejším a najčastejšie hodnoteným parametrom je pohyblivosť spermií, ktorá by mala byť 50 – 80 % u normálneho ejakulátu. Percento zreých spermií v ejakuláte by sa malo pohybovať medzi 80 – 95 %, podiel nezreých spermií by mal byť od 5 do 15 % a abnormálne spermie by nemali prekročiť 5 % z celkového ejakulátu (Bonet et al., 2013). Hodnota pH je zásaditá (7,3 – 7,8) ako u ostatných druhov (Hafez, 2016). Je potrebné podotknúť, že jednotlivé vyššie uvedené hodnoty kolísajú nie len medzi jednotlivými plemenami, ale aj individuálne u kancov. Treba brať do úvahy aj iné faktory ovplyvňujúce jednotlivé parametre ejakulátu ako je napríklad zdravotný stav plemenníka, podmienky chovu, krmivo a hlavne ročné obdobie, ktoré má zvlášť u kancov značný vplyv. Najhoršie výsledky hodnotenia ejakulátu boli zaznamenané počas letných mesiacov, ale počas zimných mesiacov dosahovali parametre naopak lepšie hodnoty a celkovo bol ejakulát kvalitnejší (Smítal, 2009). Kančím spermiám nevyhovujú však ani veľmi nízke teploty, preto je ťažké ich uchovávať pri teplotách nižších ako  $10^\circ\text{C}$  jak v kvapalnom stave tak i mrazené. Je to kvôli vysokému obsahu nenasýtených mastných kyselín v plazmatických membránach spermií kancov a nízkej koncentrácii očistných enzýmov v cytosole, čo vedie k indukcii lipidovej peroxidácie a zníženiu pohyblivosti a životaschopnosti spermií (Brezizinska-Slebozinska a kol., 1995, Cerolini et al., 2000)

### 3.1.2 Motilita spermií

Schopnosť pohybu získavajú spermie v prísenníkoch, kde však prebývajú v anabióze a až vplyvom ejakulácie a zmiešaním s produktmi prídavných pohlavných žliaz dochádza k ich aktivácii a schopnosti pohybu (Gamčík, 1992).

Je to dôležitá vlastnosť zabezpečujúca distribúciu spermií v samičom pohlavnom trakte a ich penetráciu do vajíčka. To radí motilitu spermií medzi základné parametre mikroskopického hodnotenia ejakulátu, ktorý určuje kvalitu hodnoteného ejakulátu.

Hodnotenie sa stanovuje jak subjektívne, tak objektívne. Subjektívne hodnotenie udáva mikroskopicky zistiteľný podiel spermii s priamočiarym pohybom vpred za hlavičkou, ktorý považujeme za fyziologický. Nefyziologický pohyb môže predstavovať pohyb do kruhu, na mieste okolo hlavičky, kmitavý, prerušovaný a pod. (Štastný and Šťastná, 2013). Presnosť subjektívneho hodnotenia je plne závislá na skúsenostiach laboratórnych pracovníkov, no aj napriek tomu sú výsledky veľmi variabilné v porovnaní s objektívnym hodnotením pomocou počítačových systémov akým je CASA (Computer assisted sperm analysis).

Systém CASA je poloautomatická počítačová metóda pre hodnotenie morfológie a motility spermii. Optický systém zariadenia sníma obraz, ktorý je digitalizovaný a prenášaný na monitor vo forme pixelov. Pomocou špeciálnych algoritmov využívajúcich počty a jasnosť pixelov sú rozlišované pohyblivé a nepohyblivé spermie a je analyzovaná dráha každej spermie. Dráha týchto spermii je determinovaná funkciou ich bičikov a s charakteristikou pohybu odráža fyziologický stav spermie. Tieto parametre sú dôležitým faktorom pri posudzovaní celkovej motility (Věžník et al., 2004). U kanca je minimálna hodnota pohyblivých spermii 70% pre natívny ejakulát vhodný k ďalšiemu spracovaniu (Rozeboom, 2000).

### **3.1.3 Mitochondriálny membránový potenciál**

Mitochondrie sú jedným zo základných zdrojov ATP a v spermiiach sú tak potrebné pre zabezpečenie ich pohybu bičikom (Amaral et al., 2013). Mitochondriálny oddiel je pokračovaním krčka spermie, charakterizovaný prítomnosťou mitochondrií usporiadaných do závitnicovej pošvy tesne pod cytoplazmatickou membránou (Neil, 2006). Mitochondriálny oddiel spermie sa skladá z asi 90 individuálnych mitochondrií, sústredených v závitnicovej pošve. Mitochondriálna pošva sa priamo prikladá na chordovú sústavu komplexu osoých vlákien, pre ktoré je charakteristické usporiadanie 2+9+9 (Massányi, 1991).

Kľúčovým parametrom pre hodnotenie mitochondriálnej funkcie je mitochondriálny membránový potenciál (MMP). Je generovaný elektrochemickým gradientom, počas ktorého dochádza k transportu elektrónov na membráne bunky (Sakamuru et al., 2017).

MMP reguluje neporušené funkčné mitochondrie a priamo súvisí s pohyblivosťou spermii (Marchetti et al., 2002), čo vo svojej štúdií potvrdili aj Agnihotri et al. (2016). Gallon et al. (2006) vo svojej publikácii uvádzajú, že rýchle spermie majú MMP vyšší ako zvyčajne morfológicky normálne spermie. Autori ďalej uvádzajú, že spermie s nízkym MMP sú menej schopné akrozómovej reakcie.

Meraním membránového potenciálu spermii tak vieme ľahko posúdiť životaschopnosť spermii, čím dokážeme lepšie stanoviť fertilitu daného jedinca (Marchetti et al., 2004).

Pre hodnotenie MMP sa bežne využívajú fluorescenčné farbivá ako sú Rhodamín 123, Mitotracker Green, Mitotracker Red CMXROs, Mitotracker Deep Red 644, Mitotracker Orange TM a JC-1 (Farah et al., 2013).

### 3.1.4 Viabilita spermii

Celý povrch spermie pokrýva dvojvrstvá membrána, ktorá je veľmi citlivá na osmotické pomery a tak môže dôjsť k jej ľahkému poškodeniu. Intaktná plazmatická membrána je tak dôležitým predpokladom správnej funkcie spermii. Je tvorená komplexom proteínov a lipidov a je odlišná jak na hlavičke spermie tak na bičíku. Hlavnou súčasťou sú fosfolipidy, ktoré sa podieľajú na regulácii permeability membrány (Šťastný a Šťastná, 2015). Životaschopnosť spermii tak závisí na komplexe biosyntetických aktivít a na integrite plazmatickej membrány (Althouse and Hopkins, 1992). Viabilita spermii je hodnotená na základe permeability membrány. Pre vizualizáciu zmien, ktoré prebehli v membráne spermie sú používané rôzne metódy farbenia buniek. Princípom je neschopnosť farbív prechádzať intaktnou membránou, čo je dôvodom zafarbenia mŕtvych buniek, podľa ktorých vieme ľahko vyhodnotiť pomer živých a mŕtvych spermii v ejakuláte, ktorý nám tak presnejšie vyjadří jeho kvalitu. Najpoužívanejšou metódou použitím svetelného mikroskopu je farbenie eozín-nigrozínom, ale využívajú sa aj florescenčné metódy farbenia (Šťastný a Šťastná, 2015). Hodnotenie viability spermii v kombinácii s motilitou spermii pri použití médií s rôznou osmolalitou, nám môže priniesť presnejšie informácie o fyziologickom stave spermii (Fraser et al., 2001).

### 3.1.5 Kapacitácia spermii

Kapacitácia zahŕňa fyziologické zmeny, ktorými musia spermie prejsť, aby boli schopné preniknúť a oplodniť vajíčko (Ruffenach, 2009). Aby však získali schopnosť oplodnenia musia pobudnúť určitý čas v pohlavných orgánoch samice. Spermie, ktoré tak neboli v kontakte so sliznicou a sekrétmi maternice a vajcovodov nie sú schopné fertilizácie. Samotný proces kapacitácie spermii u kancov trvá 2 hodiny (Šťastný a Šťastná, 2015). Naproti tomu pri kultivácii *in vitro* sú spermie schopné kapacitácie v prostredí mimo samičieho ústrojenstva vďaka médiám, ktoré im poskytujú vhodné podmienky (Neil, 2006). Kapacitačné médium musí obsahovať príslušnú koncentráciu elektrolytov, zdrojov energie,

vápnikové ióny a  $\text{NaHCO}_3$  ako i proteíny bovinného séra albuminu (Abou-haila and Tulsiani, 2009). Sérový albumín, zväčša hovädzí (BSA) je v médiách používaný k vyplaveniu cholesterolu z plazmatickej membrány (Osheroff et al., 1999), vedúci k zvýšeniu jej fluidity, hyperpolarizácii a permeability voči hydrogénuhličitanovým a vápenatým iónom, zmenám forforylácie proteínov a aktivity proteínkinázy. Dochádza tiež k zvýšeniu koncentrácie intracelulárneho pH, hydrogénuhličitanov vápnikových iónov a cAMP (Ickowicz et al., 2012), ktoré sú kľúčovými sekundárnymi signalizačnými molekulami pre reguláciu kapacitácie (Abou-haila and Tulsiani, 2009). Na záver všetky tieto zmeny vedú k schopnosti uskutočniť akrozomálnu reakciu, vytvárať hyperaktívny pohyb, chemotaktické správanie a tak schopnosť oplodniť oocyt.

Schopnosť spermie prejsť kapacitáciou je tak dôležitou súčasťou overenia kvality ejakulátu, i keď nespadá pod bežne využívané metódy hodnotenia ejakulátu. Posledné roky sa popredne využíva prietoková cytometria na detekciu parametrov spermíí, vrátane kapacitácie. Disponuje vysokou efektivitou, objektivitou a rýchlosťou avšak je pomerne finančne náročná, preto je možné sa prikloniť k hodnoteniu pomocou fluorescenčného mikroskopu.

## 4 Materiál a metódy

Všetky pokusy boli realizované v priestoroch laboratórií na Katedre veterinárnych disciplín České zemědělské univerzity v Praze. K pokusom bol použitý natívny kančí ejakulát z inseminačnej stanice v Skršíne (LIPRA PORK, a. s.), ktorý bol transportovaný v termoboxe pri konštantnej teplote (37°C). Do 2 hodín po odbere bol ejakulát nariadený komerčným riedidlom Solusem (AIM Worldwide, Holandsko) na maximálnu koncentráciu 60 miliónov spermií na mililiter a uschovaný v klimaboxe (Selko Praha s. r. o.) pri konštantnej teplote 17°C. Jednotlivé pokusy boli realizované maximálne 72 hodín po odbere ejakulátu a boli opakované minimálne 10 krát. Vždy pred zahájením pokusu bola subjektívne zhodnotená motilita spermií. K pokusu bol použitý ejakulát, ktorého pohyblivosť pri subjektívnom hodnotení bola vyššia ako 75%. Všetky chemikálie použité k pokusom boli zakúpené od spoločnosti Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), pokiaľ nie je uvedené inak.

Testovaný bol spoločný vplyv genisteínu a daidzeínu o celkovej koncentrácii 1,7  $\mu\text{M}$ , 0,85  $\mu\text{M}$  a 0,425  $\mu\text{M}$  v porovnaní s jednotlivým pôsobením týchto látok o koncentrácii 1,7  $\mu\text{M}$  (vid' tabuľka 2). S ohľadom na časovú náročnosť boli série pokusov rozdelené na 4 pokusy s čiastočne rozdielnou metodikou, a to hodnotenie motility, membránového mitochondriálneho potenciálu, viability a kapacitácie spermií,

Tabuľka 2 - Stanovené koncentrácie fytoestrogénov v mikrometroch ( $\mu\text{M}$ )

	Koncentrácia v $\mu\text{M}$		Označenie	
<b>Genisteín (G)</b>	1,7		G1,7	
<b>Daidzeín (D)</b>	1,7		D1,7	
<b>Izoflavóny (I)</b> <b>(z toho genisteín</b> <b>/daidzeín)</b>	1,7	1/0,7	I1,7	G1 D07
	0,85	0,5/0,35	I085	G05 D035
	0,425	0,25/0,175	I0425	G025 D0175
<b>Kontrola</b>	-		KD	



## 4.1 Príprava roztokov jednotlivých koncentrácií sójových izoflavónov

Pre prípravu daných koncentrácií boli použité zásobné roztoky genisteínu o koncentracii 40 mM a daidzeínu koncentracii 10 mM, ktoré boli pripravené rozpustením lyofilizovaného prášku v 100% dimethylsulfoxide (DMSO). Takto pripravené zásobné roztoky boli riedené roztokom DMSO za vzniku pracovných roztokov (vid'. tabuľka 3). Finálne roztoky boli pripravené riedením pracovných roztokov rovnakým riedidlom použitým pre riedenie ejakulátu, pričom v prípade kapacitácie bolo použité Tyrodovo kapacitačné médium (basic Tyrodes's capacitation medium - bTCM) - vid'. tabuľka 4. Finálne roztoky zodpovedajúce daným koncentráciám jednotlivých testovaných látok boli pridané do samotných testovaných vzoriek s nariedeným ejakulátom (vid'. tabuľka 5). Pre kontrolu (KD) bola použitá vždy jedna vzorka, do ktorej sa pridával iba roztok DMSO, aby bolo preukázané, že dané rozpúšťadlo nijak nepoškodzuje spermie.

Zásobné roztoky boli uschovávané v mrazničke pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Počas prípravy jednotlivých pracovných roztokov sa zásobné roztoky ponechali v izbovej teplote rozmraziť a následne sa s nimi pracovalo. Roztoky boli pripravované len prvý deň pokusu v danom týždni a zvyšok bol vždy uschovaný v chladničke. Pripravené roztoky bolo možné použiť len v danom týždni, potom bolo potrebné ich zlikvidovať.

Tabuľka 3 - Potrebné množstvá pre prípravu pracovných roztokov

Koncentračná rada daidzeínu		Koncentračná rada genisteínu	
<b>P-D1,7</b>	1 $\mu\text{l}$ zásobného roztoku daidzeínu (40 mM) s 46,1 $\mu\text{l}$ DMSO	<b>P-G1</b>	4 $\mu\text{l}$ zásobného roztoku genisteínu (10 mM) s 36 $\mu\text{l}$ DMSO
<b>P-D07</b>	5 $\mu\text{l}$ P-D1,7 + 1 $\mu\text{l}$ DMSO	<b>P-G1,7</b>	5 $\mu\text{l}$ P-G1 + 1 $\mu\text{l}$ DMSO
<b>P-D035</b>	3 $\mu\text{l}$ P-D07 s 3 $\mu\text{l}$ DMSO	<b>P-G05</b>	3 $\mu\text{l}$ P-G1 s 3 $\mu\text{l}$ DMSO
<b>P-D0175</b>	2 $\mu\text{l}$ P-D035 + 2 $\mu\text{l}$ DMSO	<b>P-G025</b>	2 $\mu\text{l}$ P-G05 + 2 $\mu\text{l}$ DMSO

Tabuľka 4 - Potrebné množstvá pracovných roztokov pre prípravu finálnych roztokov

<b>I0425</b>	<b>F-G025</b>	4 $\mu\text{l}$ P-G025 + 96 $\mu\text{l}$ solusem/bTCM
	<b>F-D0175</b>	4 $\mu\text{l}$ P-D0175 + 96 $\mu\text{l}$ solusem/bTCM
<b>I085</b>	<b>F-G05</b>	4 $\mu\text{l}$ P-G05 + 96 $\mu\text{l}$ solusem/bTCM
	<b>F-D035</b>	4 $\mu\text{l}$ P-D035 + 96 $\mu\text{l}$ solusem/bTCM

<b>I1,7</b>	<b>F-G1</b>	3 $\mu$ l P-G1 + 72 $\mu$ l SOLUSEM/bTCM
	<b>F-D07</b>	3 $\mu$ l P-D07 + 72 $\mu$ l SOLUSEM/bTCM
<b>F-G1,7</b>		3 $\mu$ l P-G1,7 + 72 $\mu$ l SOLUSEM/bTCM
<b>F-D1,7</b>		3 $\mu$ l P-D1,7 + 72 $\mu$ l SOLUSEM/bTCM
<b>F-KD</b>		3 $\mu$ l DMSO + 72 $\mu$ l SOLUSEM/bTCM

Tabuľka 5 - Potrebné množstvá pridané do vlastných vzoriek

<b>KD</b>	950 $\mu$ l ejakulátu + 50 $\mu$ l F-KD
<b>I0425</b>	950 $\mu$ l ejakulátu + 25 $\mu$ l F-G025 + 25 $\mu$ l F-D0175
<b>I085</b>	950 $\mu$ l ejakulátu + 25 $\mu$ l F-G05 + 25 $\mu$ l F-D035
<b>I1,7</b>	950 $\mu$ l ejakulátu + 25 $\mu$ l F-G1 + 25 $\mu$ l F-D07
<b>G1,7</b>	950 $\mu$ l ejakulátu + 50 $\mu$ l F-G1,7
<b>D1,7</b>	950 $\mu$ l ejakulátu + 50 $\mu$ l F-D1,7

## 4.2 Stanovenie motility spermíí pomocou systému CASA

Pred začatím pokusu bolo dopredu nachystaných 6 kusov 1,5 ml ependorfiek vopred vychladených na 17°C. Do každej ependorfky bolo napipetované 952  $\mu$ l nariedeného ejakulátu. Pokus bol zahájený ponechaním každej vzorky po dobu 4 minúty vo vodnom kúpeli (WNE 10, Memmert, Schwabach, Nemecko) pri 38°C pre aktiváciu spermíí. Po ubehnutí 4 minút prebehlo kontrolné nasnímanie (0. hodina) motility, po ktorom sa do jednotlivých vzoriek pridali množstvá pripravených finálnych roztokov.

Pohyb spermíí bol zaznamenávaný trikrát, a to v 0h, 1h a 2h. K snímaniu boli prichystané a vyhriate na 38°C Leja sklíčka o hĺbke komôrky 20 $\mu$ m, do ktorých bolo napipetovaných 2  $\mu$ l z pripravenej vzorky. Samotné snímanie motility bolo vykonávané pomocou monochromatickej kamery Digital Sight DS - 2MBW (Jenoptik Prog Red CT1, Nikon, Japonsko) s použitím mikroskopu Eclipse E600 (Nikon, Japonsko), s vyhrevnou doštičkou (38°C) a objektívom PH 1 BM 10x s negatívnym fázovým kontrastom. Pre snímanie a hodnotenie motility spermíí bol použitý systém CASA (computer - assisted sperm analysis). Snímaných bolo 6 videosekvencií vždy po 5 sekundách v jednotlivých zorných poliach v programe NIS-elements 4.5. Zo záberov boli vyhodnotené nasledujúce parametre pohybu, pomocou ktorých bola zhotovená konečná analýza:

- **VCL** (curvilinear velocity) – rýchlosť hlavičky na skutočnej dráhe, priemerná rýchlosť medzi bodmi merania [ $\mu\text{m}$ ]
- **VAP** (average-path velocity) – rýchlosť hlavičky na napriamenej dráhe, slúži k vyjadreniu plynulejšiemu pohybu [ $\mu\text{m}$ ]
- **VSL** (straight-line velocity) – rýchlosť hlavičky na priamej dráhe, medzi východiskovým a konečným bodom merania [ $\mu\text{m}$ ]
- **ALH** (amplitude of lateral head displacement) – maximálna šírka oscilácie hlavičky, odvodené z VCL a VAP, odráža pohyb bičíka
- **LIN** (linearity) – linearita skutočnej dráhy ( $\text{VSL}/\text{VCL} \times 100$ ) [%]
- **WOB** (wobble) – stupeň oscilácie skutočnej dráhy okolo jej napriamenej dráhy ( $\text{VAP}/\text{VCL} \times 100$ ) [%]
- **STR** (straightness)- prítomnosť napriamenej dráhy ( $\text{VSL}/\text{VAP} \times 100$ ) [%]
- **BCF** (beat cross frequency) – počet, koľkokrát je skutočná dráha prekrížená napriamenou dráhou [Hz] (Věžník a kol., 2004)

### 4.3 Mitochondriálny membránový potenciál spermií

Mitochondriálna aktivita bola hodnotená na základe upravenej metodiky Maharjan et al. (2014). Pre fluorescenčné značenie bol použitý Mitotracker Red CMXRos (chloromethyl-X-rosamin, Leiden, Holandsko). Jedná sa o červené fluorescenčné farbivo, ktoré počas inkubácie vo vzorke pasívne difunduje cez plazmatickú membránu a akumuluje sa v aktívnych mitochondriách. Pre fixáciu membrán buniek bol použitý formalín.

Pracovný roztok bol pripravený zmiešaním 5  $\mu\text{l}$  zásobného roztoku s 45  $\mu\text{l}$  média Solusem. Pracovný roztok ako aj Mitotracker Red CMXRos bol uschovávaný pri teplote  $-20^{\circ}\text{C}$ . Na 1000  $\mu\text{l}$  vzorky boli pridané 4  $\mu\text{l}$  pracovného roztoku, čím bola docielená výsledná koncentrácia Mitotrackeru 400 nM.

Pred začatím pokusu bolo dopredu nachystaných 6 kusov 1,5 ml ependorfiek vopred vychladených na  $17^{\circ}\text{C}$ . Do každej ependorfky bolo napipetované 950  $\mu\text{l}$  nariedeného ejakulátu. Pokus bol zahájený ponechaním každej vzorky po dobu 4 minúty vo vodnom kúpeli pri  $38^{\circ}\text{C}$ . Po ubehnutí 4 minút boli do jednotlivých vzoriek pridané množstvá pripravených finálnych roztokov. Okrem pripravených 6 vzoriek boli v tomto pokuse použité 2 kontrolné vzorky bez pridaných testovaných látok a roztoku DMSO.

Po temperovaní bolo 250  $\mu$ l suspenzie spermíí pridaných do vopred prichystanej 0,5 ml eppendorfky s 1  $\mu$ l pracovného roztoku s 2,5  $\mu$ l formalínu. Táto zmes bola potom inkubovaná po dobu 10 minút pri 37°C bez prístupu svetla. Po uplynutí 10 minút sa na podložné sklíčko pridalo cca 6ml suspenzie, ktorá bola prikrytá krycím sklíčkom. Pod mikroskopom s fluorescenčným objektívom bolo následne hodnotených 200 spermíí a sledované boli 3 fluorescenčné vzory:

- vysoký MMP (červeno fluoreskujúca spojovacia časť bičička)
- vyvážený MMP (červeno fluoreskujúca hlavička a spojovacia časť bičička)
- nízky MMP (nefluoreskujúca spojovacia časť bičička)

Jednotlivé vzorky boli hodnotené počas 0h a 2h.

#### 4.4 Viabilita spermíí

Metodika bola modifikovaná podľa metódy duálneho fluorescenčného farbenia popísaného Harrisonom a Vickersom (1990).

Propidium iodid (PI), DNA špecifické červené fluorescenčné farbivo, ktoré bolo použité pre značenie mŕtvych buniek s porušenou membránou. Pre značenie živých buniek bol použitý karboxyfluoresceín diacetát (CFDA), membránovo priechodné zelené fluorescenčné farbivo prezentované v prítomnosti enzýmu cytoplazmatickej esterázy. Formalín bol taktiež použitý pre fixáciu buniek ako v predošlom experimente.

Príprava PI spočívala v rozpustení 500  $\mu$ g PI (P4170) v 1 mL fyziologického roztoku, ktorého pH závislé od druhu zvierat'a, v tomto prípade kanca s hodnotou pH 7,2. Pre prípravu CFDA bolo potrebné rozpustiť 460  $\mu$ g CFDA (C8166) v 1 ml DMSO.

Pred začatím pokusu bolo dopredu nachystaných 6 kusov 1,5 ml eppendorfiiek vopred vychladených na 17°C. Do každej eppendorfky bolo napipetované 950  $\mu$ l nariedeného ejakulátu. Pokus bol zahájený ponechaním každej vzorky po dobu štyroch minút vo vodnom kúpeli pri 38°C. Po ubehnutí štyroch minút boli do jednotlivých vzoriek pridané množstvá pripravených finálnych roztokov. Okrem pripravených 6 vzoriek boli v tomto pokuse použité 2 kontrolné vzorky bez pridaných testovaných látok a roztoku DMSO.

Príprava vzorky spermíí spočívala v prichystaní 2,1 $\mu$ l PI, 2,1 $\mu$ l CDFA a 1 $\mu$ l 0,3% formalínu do 0,5mL eppendorfky, do ktorej bolo pridaných 100  $\mu$ l suspenzie spermíí priamo zo vzorky, ktorá prešla aktiváciou vo vodnom kúpeli. Táto zmes bola inkubovaná po dobu 10 minút pri 37°C bez prístupu svetla. Po uplynutí 10 minút sa na podložné sklíčko pridalo cca 6mL

suspenzie, ktorá bola prikrytá krycím sklíčkom. Pod mikroskopom s fluorescenčným objektívom bolo následne hodnotených 200 spermíí a sledované boli 3 fluorescenčné vzory : živá spermia (zeleno fluoreskujúca hlavička), mŕtva spermia (červeno fluoreskujúca hlavička) a poškodená spermia (výskyt oboch farieb na hlavičke). Hodnotenie jednotlivých vzoriek prebiehalo počas 0h a 2h.

#### **4.5 Kapacitácia spermíí**

Pred zahájením pokusu bolo do vopred pripravených 12 eppendorfiiek do ktorých bolo napipetovaných 1ml ejakulátu. Takto pripravené vzorky boli dvakrát centrifugované po dobu šiestich minút, pri 600g a resuspendované v 1ml základného Tyrodového kapacitačného média (bTCM, príprava podľa Kurz et al., 2005), ktoré bolo pred použitím inkubované pri 38°C a nasýtené 5% CO<sub>2</sub> v inkubátore (HERAcell 150, Heraeus, Hanau, Nemecko) minimálne 2 hodiny. Tretí krát boli vzorky po centrifugácii (6 min., 600g) resuspendované v 0,5 ml Tyrodového kapacitačného média (TCM,bTCM doplnené 1,18 UI/mL heparínu). Následne boli všetky objemy vzoriek prenesené do 15ml skúmavky, ktorá bola doriedená TCM do konečnej koncentrácie 55 mil./ml. Zo skúmavky bolo do 6 eppendorfiiek prenesených 950 µl, do ktorých boli pridané koncentrácie jednotlivých izoflavónov a následne boli inkubované jednu hodinu pri 38,5°C a nasýtené 5% CO<sub>2</sub>. Po hodinovej inkubácii bolo z každej vzorky odobraných 60µl a doplnené 0,5 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, riedené 1:10 destilovanou vodou) do 2ml eppendorfky. Zvyšné objemy boli dvakrát stočené na centrifuge po dobu 6 min., pri 300g, resuspendované v 0,5 ml DPBS. Na koniec boli doplnené a homogenizované v 2 ml DPBS. Medzitým bolo pripravených 6 podložných sklíčok na ktoré boli pomocou PAP pera vytvorené kruhy, pričom na jedno zo sklíčok bol vytvorený kruh pre negatívnu kontrolu. Do vopred vytvorených kruhov bolo aplikovaných 20 µl vzorky a 50 µl fixáže (roztok acetónu s metylénom v pomere 1:3). Sklíčka boli takto inkubované 5 minút. Pomocou T-PBS (PBS tableta rozpustená v 200 ml destilovanej vody s Tween®20) boli jednotlivé sklíčka po inkubácii opláchnuté 2x 1ml a nasledovala hodina inkubácie pri laboratórnej teplote vo vlhkej komôrke s aplikovanými 50 µl blokovacieho roztoku (Super Block Blocking Buffer in PBS, Thermo scientific, USA). Po inkubácii boli sklíčka so vzorkami opláchnuté 1 ml T-PBS a nasledovala aplikácia 50 µl roztoku primárnej protilátky (Anti-phospho tyrozine, Merck, Nemecko, riedená v pomere 1:300 s 1%BSA +DPBS), mimo negatívnu kontrolu. Takto boli vzorky inkubované 2 hodiny. Po inkubácii boli sklíčka opäť opláchnuté 2x 1ml T-PBS. Potom bolo aplikovaných 50 µl roztoku sekundárnej

protilátky (Anti mouse (goat) Igg-FITZ, riedená v pomere 1:400 s 1% BSA + DPBS) a ďalej inkubované 1 hodinu. Po uplynutí hodiny inkubácie boli vzorky opláchnuté 2x 1ml T-PBS a nakoniec 1 ml destilovanej vody. Na uschnuté sklíčka bol aplikovaný Vectashield (Vector, Burlingame, USA) prikrytý krycím sklíčkom a zalakovaný. Pod fluorescenčným mikroskopom bolo hodnotených 6 zorných polí s minimálne 200 spermiami na vzorku. Hodnotené boli 3 fluorescenčné vzory podľa Luño et al (2013):

- vzor I (slabý stupeň kapacitácie – spermie bez fluorescencie v ekvatoriálnom subsegmente, s alebo bez prítomnosti signálu v akrozóme alebo v bičíku)
- vzor II (stredný stupeň kapacitácie – zahrňoval spermie so signálom v ekvatoriálnom subsegmente, bez akrozómu, s alebo bez prítomnosti signálu v bičíku)
- vzor III (vysoký stupeň kapacitácie – spermieso signálom v ekvatoriálnom subsegmente a akrozóme, s alebo bez prítomnosti signálu v bičíku)

## 4.6 Štatistické hodnotenie

Výsledky všetkých experimentov boli spracované vo forme tabuliek v programe Microsoft Excel a následne vyhodnotené programom STATISTIKA 12 (StatSoft CR, Praha, Česká republika).

Pre analýzu motility spermií bola použitá zhuková analýza (viacrozmerová analýza) s použitím zhukovej metódy k-priemerov. Spermie boli na základe svojich CASA parametrov redistribuované do jednotlivých troch zhukov zodpovedajúcich kategóriám rýchle, stredne rýchle, pomalé (podľa metodiky Thurstona et al., 2001), ktorá bola modifikovaná pridaním štvrtej kategórie zhukov (nepohyblivé) na základe hodnoty parametra  $VAP < 10 \mu\text{m/s}$ , za účelom spresnenia zhukovej analýzy. Následne boli pre jednotlivé vzorky stanovené percentuálne podiely spermií spadajúcich do jednotlivých kategórií. Chí-kvadrátom boli stanovené štatistické rozdiely medzi jednotlivými vzorkami a testom rozdielov boli vyjadrené štatisticky významné rozdiely medzi jednotlivými zhukmi. S ohľadom na prirodzenú variabilitu hodnotených dát bola prevedená ich transformácia  $n = \frac{N}{10}$  vzhľadom na vysoký počet pozorovaní. Hladina významnosti tak bola stanovená na  $p=0,01$ .

Analýza viability, mitochondriálneho membránového potenciálu a kapacitácie spermií bola vyhotovená taktiež pomocou kontingenčných tabuliek s chí-kvadrátom. Hladina významnosti týchto testov bola  $p=0,05$ .

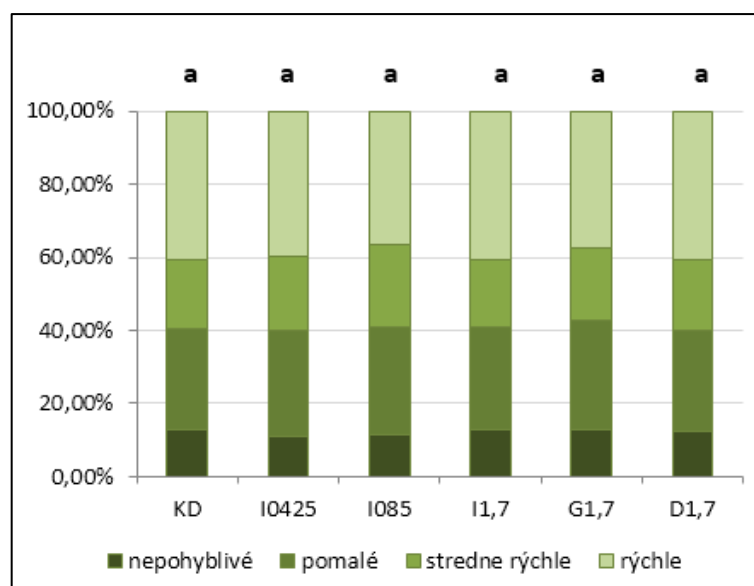
## 5 Výsledky

### 5.1 Vplyv izoflavónov na motilitu spermií

V čase 0 pred pridaním stanovených koncentrácií testovaných látok sa vzorky medzi sebou štatisticky nelíšili pri nastavení hladiny významnosti  $p=0,01$ , nakoľko berieme do úvahy možnú variabilitu vzoriek spôsobenú biologickým pozadím experimentu.

Tabuľka 6 – Percentuálne zastúpenie nepohyblivých a pohyblivých spermií vo vzorkách. Hodnoty v stĺpcoch označené rozdielnymi indexmi sa štatisticky významne líšia na hladine významnosti  $p=0,01$ .

0. hodina	nepohyblivé	str. rýchle + rýchle
KD	12,87 <sup>a</sup>	59,69 <sup>a</sup>
I0425	10,95 <sup>a</sup>	60,02 <sup>a</sup>
I085	11,30 <sup>a</sup>	59,11 <sup>a</sup>
I1,7	12,88 <sup>a</sup>	58,90 <sup>a</sup>
G1,7	12,93 <sup>a</sup>	57,26 <sup>a</sup>
D1,7	12,43 <sup>a</sup>	60,09 <sup>a</sup>

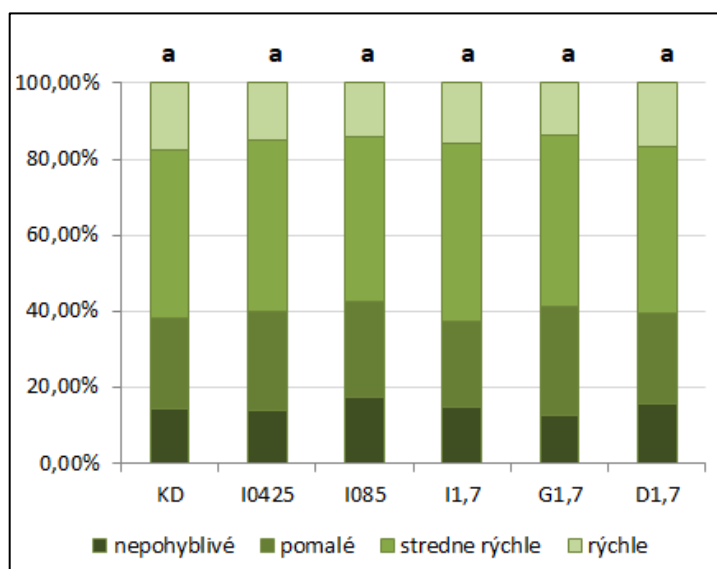


Graf 1 - Percentuálne zastúpenie jednotlivých subpopulácií spermií v 0. hodine. Nad skupinami uvedené rovnaké indexy naznačujú štatisticky nevýznamné rozdiely medzi vzorkami pri použití hladiny významnosti  $p = 0,01$ .

Po 1. hodine inkubácie došlo k očakávanému nárastu podielu nepohyblivých spermíí vo všetkých vzorkách okrem genisteínu (G1,7), u ktorého nedošlo k nárastu podielu čo je zrejme aj po 2. hodine inkubácie, kde bol zistený štatisticky významný rozdiel v porovnaní s ostatnými vzorkami (graf 2-3). Oproti nemu koncentrácia izoflavónov I085 vykazovala najväčší podiel nepohyblivých spermíí čo sa ďalej preukázalo zníženým počtom stredne rýchlych spermíí oproti ostatným vzorkám. U daidzeínu (D1,7) nedošlo k nárastu podielu nepohyblivých spermíí v porovnaní s 1. a 2. hodinou, pričom sa štatisticky nelíšil od kontroly (KD). Disponoval najväčším podielom rýchlych a stredne rýchlych spermíí spomedzi vzoriek a zároveň sa podiel nepohyblivých spermíí výrazne nezvýšil v porovnaní s 1. a 2. hodinou inkubácie (tabuľka 7).

Tabuľka 7 – Percentuálne zastúpenie nepohyblivých a pohyblivých spermíí vo vzorkách po 1. hodine inkubácie. Hodnoty v stĺpcoch označené rozdielnymi indexmi (a-b) sa štatisticky významne líšia na hladine významnosti  $p=0,01$ .

1. hodina	nepohyblivé	str. rýchle + rýchle
KD	14,40 <sup>ab</sup>	61,75 <sup>ab</sup>
I0425	13,76 <sup>a</sup>	60,22 <sup>ab</sup>
I085	17,49 <sup>b</sup>	57,38 <sup>b</sup>
I1,7	14,99 <sup>ab</sup>	62,57 <sup>a</sup>
G1,7	12,68 <sup>a</sup>	58,81 <sup>ab</sup>
D1,7	15,61 <sup>ab</sup>	60,69 <sup>ab</sup>



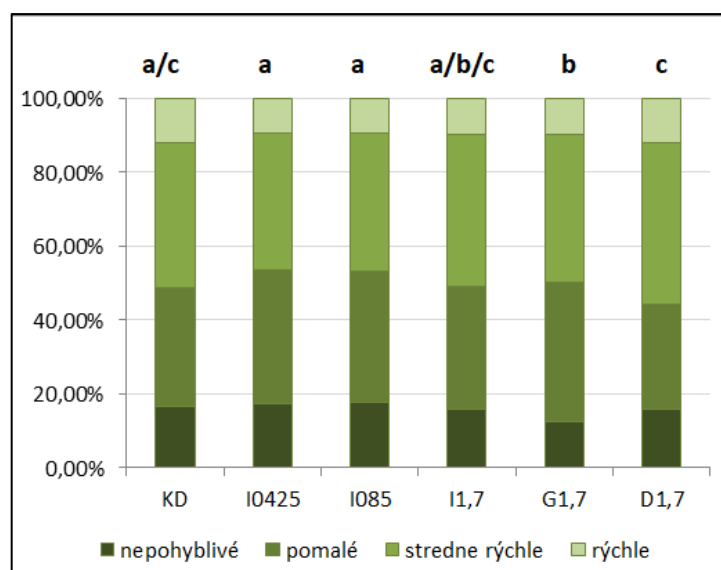
Graf 2 - Percentuálne zastúpenie jednotlivých subpopulácií spermíí po 1. hodine inkubácie v jednotlivých vzorkách. Nad skupinami uvedené rovnaké indexy naznačujú štatisticky nevýznamné rozdiely medzi vzorkami pri použití hladiny významnosti  $p = 0,01$ .



Nižšie koncentrácie kombinácií izoflavónov I0425 a I085 vykazovali po 2. hodinách inkubácie najväčší podiel nepohyblivých spermíí, pričom u koncentrácie I0425 došlo k najvyššiemu nárastu v porovnaní s 1. a 2. hodinou. Percentuálne zastúpenie kategórie rýchlych a stredne rýchlych tak úmerne pokleslo voči nepohyblivým spermíám. Tieto vzorky sa tak preukázali ako štatisticky rozdielne oproti koncentráciám genisteínu a daidzeínu (graf 3).

Tabuľka 8 – Percentuálne zastúpenie nepohyblivých a pohyblivých spermíí vo vzorkách po 2 hodinách inkubácie. Hodnoty v stĺpcoch označené rozdielnymi indexmi (a-b) sa štatisticky významne líšia na hladine významnosti  $p=0,01$ .

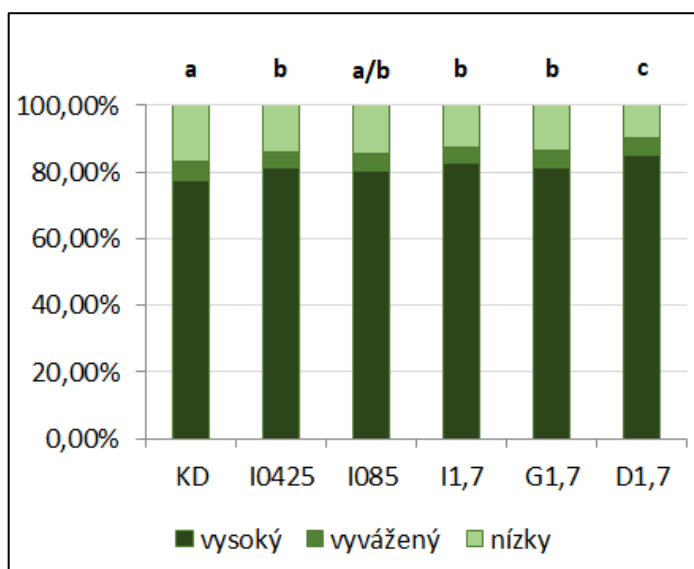
2. hodina	nepohyblivé	str. rýchle + rýchle
KD	16,65 <sup>a</sup>	51,31 <sup>a</sup>
I0425	17,24 <sup>a</sup>	46,55 <sup>a</sup>
I085	17,59 <sup>a</sup>	46,65 <sup>a</sup>
I1,7	15,93 <sup>a</sup>	50,94 <sup>a</sup>
G1,7	12,40 <sup>b</sup>	49,94 <sup>a</sup>
D1,7	15,64 <sup>a</sup>	55,76 <sup>a</sup>



Graf 3 - Percentuálne zastúpenie jednotlivých subpopulácií spermíí po 2 hodinách inkubácie v jednotlivých vzorkách. Nad skupinami uvedené rozdielne indexy (a-c) naznačujú štatisticky významné rozdiely medzi vzorkami pri použití hladiny významnosti  $p = 0,01$ .

## 5.2 Vplyv izoflavónov na mitochondriálny membránový potenciál spermii

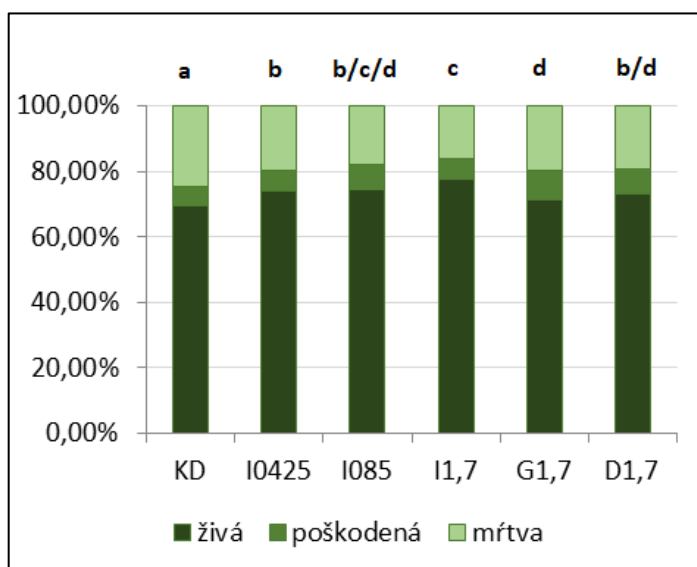
Kontrolná vzorka sa líšila od všetkých vzoriek okrem koncentrácie I085 (vid'. graf 4). Mala nižší počet spermii s vysokým MMP, čím bol zvýšený podiel spermii s nízkym MMP, zatiaľ čo mala najväčší podiel spermii s vyváženým MMP. Vplyv koncentrácie daidzeínu D1,7 sa prejavil u mitochondriálneho membránového potenciálu podobne ako u motility, a to svojimi pozitívnymi účinkami, kedy mal najväčší podiel spermii s vysokým MMP a tým najnižší podiel spermii s nízkym MMP oproti ostatným vzorkám, čím sa od nich významne štatisticky líšil. Genisteín mal oproti kombináciám a daidzeínu väčší podiel spermii s vyváženým MMP, štatisticky však tento rozdiel nebol významný. Voči daidzeínu bol však štatisticky významný nakoľko mal menšie zastúpenie spermii s vysokým MMP a tým tak vyšší podiel spermii s nízkym MMP. Kombinácia izoflavónov I0425, I085 a I1,7 boli odlišné od ostatných vzoriek menším podielom spermii s vyváženým MMP. Pri nižších koncentráciách I0425 a I085 bol sledovaný väčší podiel spermii s nízkym MMP oproti koncentrácii I1,7.



Graf 4 - Percentuálne zastúpenie spermii v vysokým, vyváženým a nízkym MMP vo vzorkách po 2 hodinách inkubácie. Nad skupinami uvedené rozdielne indexy (a-c) označujú štatisticky významné rozdiely medzi vzorkami pri použití hladiny významnosti  $p = 0,05$ .

### 5.3 Vplyv izoflavónov na viabilitu spermií

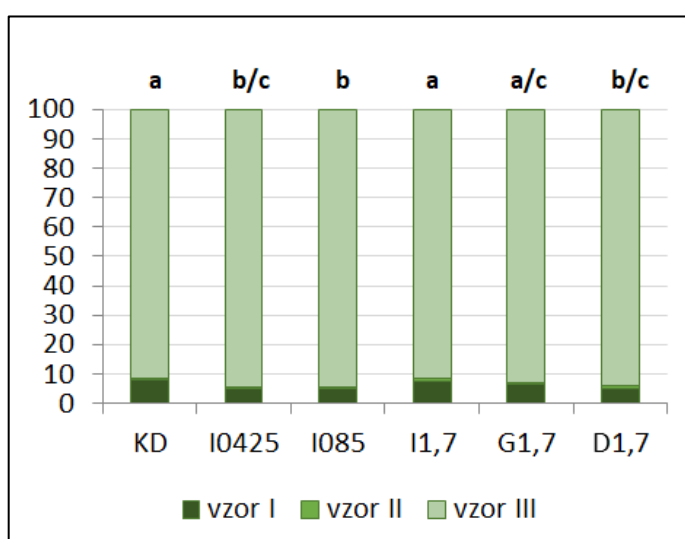
Nasledujúci graf 5. znázorňuje percentuálny podiel živých, poškodených a mŕtvych spermií v jednotlivých vzorkách s obsahom testovaných látok po 2 hodinách inkubácie. Vzorka s kontrolou sa významne líšila oproti ostatným vzorkám, pričom mala najvyššie zastúpenie mŕtvych spermií. Najnižší počet mŕtvych spermií bol naopak pri najvyššej koncentrácii izoflavónov I1,7, čím sa táto vzorka líšila od ostatných okrem koncentrácie I085 s ktorou sa štatisticky nelíšila. Podiel jednotlivých kategórií nebol štatisticky významný u koncentrácii genisteínu a daidzeínu, pričom tieto dve vzorky mali najväčšie zastúpenie poškodených spermií. Nižšie koncentrácie kombinácii izoflavónov I0425 a I085 sa od seba štatisticky nelíšili ako to bolo pri mitochondriálnom membránovom potenciály.



Graf 5 - Percentuálne zastúpenie živých, poškodených a mŕtvych spermií vo vzorkách po 2 hodinách inkubácie. Nad skupinami uvedené rozdielne indexy (a-d) označujú štatisticky významné rozdiely medzi vzorkami pri použití hladiny významnosti  $p = 0,05$ .

## 5.4 Vplyv izoflavónov na kapacitáciu spermií

Percentuálny podiel jednotlivých kapacitačných vzorov vo vzorkách je uvedený v grafe 6. pričom je zrejmé, že nízke koncentrácie izoflavónov I0425 a I085 spolu s daidzeínom sa významne nelíšili a disponovali oproti ostatným vzorkám vysokým podielom spermií s vysokým stupňom kapacitácie (vzor III). Kontrolná vzorka nevykazovala štatisticky významný rozdiel voči koncentrácii izoflavónov I1,7 a genisteínu. Zároveň bol u týchto vzoriek zastúpený najväčší podiel spermií s nízkym stupňom kapacitácie (vzor I).



Graf 6 - Percentuálne zastúpenie spermií s nízkym, stredným a vysokým stupňom kapacitácie po 1 hodine inkubácie. Nad skupinami uvedené rozdielne indexy (a-d) označujú štatisticky významné rozdiely medzi vzorkami pri použití hladiny významnosti  $p = 0,05$ .

## 6 Diskusia

Na základe nami zistených výsledkov experimentov môžeme potvrdiť vplyv izoflavónov, genisteínu a daidzeínu na hodnotené vlastnosti spermií nielen pri samostatnom pôsobení týchto látok ale aj pri ich kombinácii.

Po 1. hodine inkubácie vykazoval jak genisteín tak daidzeín o koncentrácii 1,7  $\mu\text{M}$  protektívne účinky, ktoré sa potvrdili následne po 2. hodine inkubácie. Podobne ako v našom prípade Krejčárková a kol. (2017) vo svojej publikácii uvádzajú taktiež zrejmy stimulačný účinok genisteínu na motilitu spermií pri koncentráciách 1  $\mu\text{M}$  v porovnaní s kontrolou po dvoch a štyroch hodinách inkubácie. Tí istí autori však uvádzajú, že pri koncentráciách vyšších ako 2,5  $\mu\text{M}$  genisteín pôsobil inhibične na motilitu spermií. Kim et al (2014) publikovali, že genisteín pri koncentrácii 1, 50 dokonca aj 100  $\mu\text{M}$  vykazoval pozitívne účinky na motilitu spermií po troch aj šiestich hodinách inkubácie oproti kontrolnej vzorke, ktorá oproti genisteínu poklesla už po 3 hodinách inkubácie. Je však potrebné poukázať na odlišnosť v metodickom hodnotení motility, kedy autori použili subjektívne hodnotenie, ktoré mohlo výsledky skresliť oproti objektívnemu hodnoteniu, ktoré sme použili my.

Čo sa týka kombinácie izoflavónov v koncentráciách 0,425 a 0,85  $\mu\text{M}$  došlo po 2 hodinách inkubácie k zvýšeniu podielu nepohyblivých spermií jak oproti kontrole tak voči samostatnému pôsobeniu týchto látok. Najvyššia testovaná koncentrácia kombinácie izoflavónov o 1,7  $\mu\text{M}$  sa významne nelíšila od kontroly. Je zaujímavé však, že Eumkeb et al. (2016) poukazujú na významný synergický účinok týchto dvoch izoflavónov na motilitu myších spermií. Túto odlišnosť mohla spôsobiť nielen rozdielnosť druhu ale taktiež príjem izoflavónov prostredníctvom krmiva v koncentrácii 0,2 + 0,2 mg/kg.

Naopak Mitchell et al. (2001) u mužov suplementovaných denne počas 2 mesiacov dávok s obsahom 40 mg izoflavónov zahrňujúcich genisteín, daidzeín a glycitein nedošlo k výraznej zmene parametrov spermií, vrátane motility. I keď sa tieto práce metodicky líšia od tej našej je zrejmé, že spoločné pôsobenie izoflavónov môže významne vplývať na motilitu spermií.

U mitochondriálneho membránového potenciálu spermií sme pozorovali významné rozdiely medzi kontrolou a samotným pôsobením genisteínu a daidzeínu, ktorí sa líšili vyšším zastúpením spermií s vysokým MMP, zatiaľ čo Skibińska et al. (2016) pri testovaní ľudských spermií nezaznamenali žiadne významné rozdiely medzi kontrolou a samotným pôsobením genisteínu o koncentrácii 0,01 – 100  $\mu\text{M}$  po 2 hodinách inkubácie.

S našim metodickým postupom sa viac stotožňovala štúdia Kim et al. (2014), ktorý zisťovali vplyv genisteínu na parametre kančích spermíí o koncentrácii 1, 50 a 100  $\mu\text{M}$ . Inkubácia prebiehala 15 minút pri 37°C bez prístupu svetla. Po troch hodinách bol viditeľný mierne vyšší podiel spermíí s vysokým MMP pri koncentrácii genisteín 1  $\mu\text{M}$  voči kontrole. Podobne aj v našich výsledkoch mierne prevyšovalo zastúpenie spermíí s vysokým MMP u genisteínu v porovnaní s kontrolou po 2 hodinách inkubácie.

Daidzeín sa pri samotnom pôsobení líšil vysokým zastúpením (84,85 %) spermíí s vysokým MMP a tým aj najnižším zastúpením (9,95 %) spermíí s nízkym MMP od všetkých testovaných koncentrácií vrátane kontrolnej vzorky. Aj keď doposiaľ nie je metodicky podobná štúdia zaoberajúca sa vplyvom daidzeínu na mitochondriálny membránový potenciál spermíí, Yuan et al. (2017) zistili protektívny účinok 3'-daidzeín sulfonátu sodného odvodeného od daidzeínu na mitochondriálne funkcie po mozgovej ischémii u potkanov.

Spoločné pôsobenie izoflavónov v rôznych koncentráciách sa vzájomne nelíšilo, avšak najväčšia testovaná koncentrácia izoflavónov vykazovala najväčší podiel spermíí s vysokým MMP oproti nižším koncentráciám a kontrole.

V prípade vplyvu genisteínu na viabilitu spermíí sme zistili štatisticky významné rozdiely voči kontrole, ktorá obsahovala menšie zastúpenie životaschopných spermíí. Oproti našim výsledkom Macías-García et al. (2015) nezistili žiadne štatisticky významné rozdiely medzi jednotlivými koncentraciami genisteínu (10 - 800  $\mu\text{M}$ ) v porovnaní s kontrolou v životaschopnosti žrebčích spermíí po rozmrazení. Rovnaké závery publikovali Hinsch et al. (2000) s použitým mrazeným býčím ejakulátom s testovanou koncentraciou genisteínu 2  $\mu\text{g/ml}$ . U myši došlo k posilneniu životaschopnosti spermíí vo všetkých skupinách ošetrovaných intraperitoneálnym injekčným podaním genisteínu (0, 1, 2 a 3 mg/kg) počas 30 dní v publikovanej štúdii Jaliliho et al. (2016). Odlišnosť výsledkov mohla vyplývať z odlišnosti jednotlivých druhov a metódik použitých v jednotlivých schémach experimentov.

Podobne ako genisteín aj daidzeín sa štatisticky významne líšil od kontroly a vo svojej koncentrácii 1,7  $\mu\text{M}$  tak pôsobil stimulačne na viabilitu spermíí. Han et al. (2003), ktorí vo svojej štúdii testovali vplyv troch rôznych dávok daidzeínu na viabilitu spermíí suplementáciou pubertálnych myši počas 21 dní zistili, že pri najnižšej dávke 5 mg/kg došlo k zlepšeniu kvality spermíí, nakoľko pri vyšších dávkach 100 a 1000 mg/kg nezistili žiadny vplyv daidzeínu na spermie.

Pri kombinácii genisteínu a daidzeínu sme sledovali podobné výsledky ako v prípade viability. Najvyššia testovaná koncentrácia izoflavónov obsahovala najväčšie zastúpenie

živých spermii, pričom obe nižšie testované koncentrácie mali menšie zastúpenie živých spermii oproti I1,7. Všetky koncentrácie sa však štatisticky líšili od kontroly. I keď nemáme porovnateľné výsledky iných štúdií, Yuan et al. (2010) testovali prostredníctvom krmiva vplyv sójových izoflavónov na reprodukčné parametre u čínskych mini prasiatok. Vo svojich výsledkoch zistili, že krmna dávka obohatená o 250 ppm izoflavónov zvýšila jednotlivé parametre, zatiaľ čo pri vyšších koncentráciách (500 ppm) došlo k zníženiu hladiny LH a testosterónu v sére a taktiež počet ranných a neskorých apoptotických zárodočných buniek v semenníkoch. Aj tu sa prejavil vyššie spomenutý synergický účinok týchto dvoch izoflavónov.

Vplyv genisteínu o koncentrácii 1,7  $\mu\text{M}$  na kapacitáciu sa v našom prípade nepotvrdil, vzhľadom na štatistickú nevýznamnosť v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Vo všetkých vzorkách bol pozorovaný vysoký podiel spermii s vysokým stupňom kapacitácie, čo mohlo byť spôsobené hodinovou inkubáciou.

Mohamed et al. (2011) sledovali už po 15 minútach inkubácie pri 39°C kapacitáciu a akrozómovú reakciu spermii vo všetkých testovaných koncentráciách (0.001 – 100  $\mu\text{M}$ ) v porovnaní s kontrolou. Následne po 30 minútach došlo k poklesu podielu kapacitovaných spermii avšak podiel spermii s akrozómálnou reakciou sa zvýšil. Za rovnakých podmienok pozorovali stimulačné účinky genisteínu a ďalších EDC vo svojej práci Ryu et al. (2014), ktorý porovnávali účinky genisteínu na kapacitáciu kančích, býčích a myších spermii. V závere uvádzajú, že kančie spermie vykazovali najväčšiu citlivosť voči testovaným koncentráciám a ďalej odporúčajú testovanie kančích spermii *in vitro* pre bližšie preverenie vplyvu endokrinných disruptorov.

Fraser et al. (2006) uvádzajú podobne ako predchádzajúci autori, že genisteín pôsobil stimulačne na ľudské spermie. Taktiež zisťovali či má daidzeín rovnako stimulačný vplyv na kapacitáciu a akrozómovú reakciu ľudských spermii, pomocou myší ako modelu. Spermie myší boli počas 35 minút inkubované pri koncentrácii 10 a 100 nmol/l daidzeínu. Ukázalo sa, že daidzeín má rovnako stimulačné účinky ako genisteín. Rovnaké účinky daidzeínu sme pozorovali v našich výsledkoch, kedy dokonca vykazoval väčší percentuálny podiel spermii s vysokým kapacitačným stupňom oproti genisteínu.

Fraser et al. (2006) ďalej uvádzajú, že genisteín v kombinácii s nonyfenolom výrazne zvýšil podiel kapacitovaných spermii v porovnaní samotného pôsobenia týchto zlúčenín. Rovnaké výsledky spoločného pôsobenia sme zaznamenali aj my, kedy kombinácie s nižšou koncentráciou I0425 a I085 vykazovali najvyšší podiel spermii s vysokým stupňom

kapacitácie, čím sa štatisticky líšili od kontrolnej vzorky a kombinácie izoflavónov s koncentráciou 1,7 $\mu$ M. Treba však vziať do úvahy odlišnú kombináciu testovaných látok a metodický postup.

Z našich zistených výsledkov a uvedených publikácií, ktoré pojednávajú o pôsobení izoflavónov na reprodukčný trakt zvierat, je zrejmý pozitívny vplyv v samostatnom pôsobení týchto látok ako aj v ich spoločnej kombinácii pri nižších koncentráciách. Je však potrebné ďalej skúmať spoločné pôsobenie týchto látok na reprodukčný trakt zvierat ako aj ich pohlavné bunky, nakoľko je evidentné, že sa správajú rozdielne v závislosti k pomeru a vzhľadom na druhovú špecifickosť živočíchov. Podľa našich výsledkov je očividné, že spoločné kombinácie genisteínu a daidzeínu v nižších koncentráciách sa správali podobne vo všetkých testoch ako aj samotné pôsobenie genisteínu a daidzeínu. To môžeme potvrdiť vzhľadom k tomu, že testy pre jednotlivé parametre spermií neboli aplikované na rovnakej vzorke ejakulátu a prebiehali v odlišných dňoch.



## 7 Záver

Na záver môžeme zhodnotiť, že v prípade samotného pôsobenia genisteínu o koncentrácii 1,7  $\mu\text{M}$  boli pozorované protektívne účinky na motilitu spermií už po 1 hodine inkubácie, ktoré pretrvali aj po 2 hodinách. Rovnako ako genisteín aj daidzeín vykazoval v porovnaní medzi 1. a 2. hodinou inkubácie protektívne účinky v koncentrácii 1,7  $\mu\text{M}$ . Vplyv týchto látok sa prejavil aj na mitochondriálnom membránovom potenciály a viabilite spermií, kde rovnako ako pri motilite vykazovali stimulačný účinok. Daidzeín mal na kapacitáciu stimulačné účinky no v prípade genisteínu, ktorý mal síce vyššie percento kapacitovaných spermií oproti kontrole sa štatistická významnosť nepotvrdila.

V prípade spoločného pôsobenia genisteínu a daidzeínu na motilitu spermií nebol zistený žiadny významný vplyv v jednotlivých koncentráciách po 1. a 2. hodine inkubácie. Spoločný vplyv izoflavónov na mitochondriálny membránový potenciál a viabilitu sa prejavil pozitívnym účinkom vo všetkých sledovaných koncentráciách, pričom najvyššia testovaná koncentrácia 1,7  $\mu\text{M}$  prevyšovala nižšie testované koncentrácie. V poslednom teste nižšie koncentrácie izoflavónov (0,425 a 0,85  $\mu\text{M}$ ) stimulovali kapacitáciu spermií avšak pri vyššej koncentrácii 1,7  $\mu\text{M}$  nedošlo k významnému vplyvu na kapacitáciu spermií.

Z vyššie uvedených záverov výsledkov práce tak môžeme potvrdiť stanovenú prvú hypotézu, že izoflavóny sóje vo zvolených koncentráciách pozitívne ovplyvňujú pohyblivosť, mitochondriálnu aktivitu, vitalitu a kapacitáciu spermií a zároveň vyvrátiť druhú hypotézu, že sa účinky kombinácie oboch izoflavónov líšia od pôsobenia porovnateľných koncentrácií týchto látok jednotlivito.

Doteraz publikované štúdie na spermiách rôznych druhov zvierat a človeka boli porovnateľné s našimi výsledkami na kančích spermiách v *in vitro* podmienkach pri použití nízkych koncentrácií izoflavónov, čím sme poukázali na vplyv týchto látok na reprodukciu prasíat pôsobením *in vivo*.

## 8 Použitá literatura

- Abou-Haila, A., Tulsiani, D. R. P. 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 485 (1). 72 – 81.
- Adams, N. R., Sanders, M. R. 1998. Persistent infertility in ewes after prolonged exposure to oestradiol-17 beta. *Journal of Reproductive Fertility*. 84 (1). 373 – 378.
- Agnihotri, K. S., Agrawai, K. A., Hakim, A. B., Vishwakarma, L. A., Narender, T., Sachan, R., Sachdev, M. 2016. Mitochondrial membrane potential (MMP) regulates sperm motility. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 52 (9). 953 – 960.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Ituh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y. (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 262 (12). 5592–5595 .
- Allen, N. E., Appleby, P. N., Davey, G. K., Key, T. J. 2001. Soy milk intake in relation to serum sex hormone levels in British men. *Nutrition and Cancer*. 41 (1-2). 41 – 46.
- Althouse, G. C., Hopkins, S. M. 1995. Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. *Therigenology*. 43 (3). 595 – 603.
- Amaral, A., Lourenco, B., Marques, M., Ramalho-Santos, J. 2013. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction: The Journal of the Society for Reproduction and Fertility*. 146 (5). 1741 – 7899.
- Baber, R. 2010. Phytoestrogens and postreproductive health. *Maturitas*. 66 (4). 344-349.
- Banerjee, S., Li, Y., Wang, Z., Sarkar, H. F. 2008. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Letters*. 269 (2). 226 – 242.
- Bannwart, C., Adlercreutz, H., Fotsis, T., Wähala, K., Hase, T., Brunow, G., 1984. Identification of O-desmethylangolensin, a metabolite of daidzein, and of matairesinol. *Finnish Chemistry Letters*. 4. 120–125.

- Beck, V., Rohr, U., Jungbauer, A. 2005. Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy ?. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 94 (5). 499 – 518.
- Bedell, S., Nachtigall, M., Naftolin, F. 2014. The pros and cons of plant estrogens for menopause. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 139. 225 – 236.
- Belcher, S. M., Zsarnovszky, A. 2001. Estrogenic Actions in the Brain: Estrogen, Phytoestrogens and Rapid Intracellular Signaling Mechanisms. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 299 (2). 408 – 414.
- Bennetts, HW., Underwood, EJ., Shier, FL. 1946. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust J Agric Res*. 22 (1). 2 - 12.
- Biggers, D. J., Curnow, H. D. 1954. Oestrogenic Activity of Subterranean Clover. *Department of Veterinary Physiology*. 58 (2). 278 - 282.
- Bingam, S. A., Atkinson, C., Liggins, J., Bluck, L., Coward, A. 1998. Phyto-oestrogens: where are we now ?. *British Journal of Nutrition*. 79 (5). 393 – 406.
- Bonet, S., Casas, I., Holt, V. W., Yeste, M. *Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends*. 2013. Springer Science & Business Media. p. 632. ISBN: 9783642350481.
- Bowey, E., Adlercreutz, H., Rowland, I. 2002. Metabolism of isoflavones and ligans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food and Chemical Toxicology*. 41 (5). 631 – 636.
- Brezezińska-Slebodzińska, E., Slebodziński, A. B., Pietras, B., Wieczorek, G. 1995. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biological Trace Element Research*. 47 (1-3). 69 – 74.
- Casanova, M., You, L., Gaido, K. W., Arcibeque-Engle, S., Janszen, D. B., Heck H. A. 1999. Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicological Sciences*. 51 (2). 236 – 244.

- Cederroth, R. Ch., Auger, J., Zimmermann, C., Eustache, F., Nef, S. 2009. Soy, phytoestrogens and male reproductive function: a review. *International Journal of Andrology*. 33 (2). 304 – 316.
- Cederroth, R. Ch., Zimmermann, C., Nef, S. 2012. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 355 (2). 192 – 200.
- Cerolini, S., Maldjian, A., Surai, P., Noble, R. 2000. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science*. 58 (1-2). 99 – 111.
- Clarkson, T. B. 2011. The role of soy isoflavones in menopausal health: report of North American Menopause Society/Wulf H. Utian Translational Science Symposium in Chicago, IL (October 2010). *Menopause*. 18 (7). 732 – 753.
- Committee on Toxicity. 2003. Phytoestrogens and health. Committee on Toxicity Report. [online] p. 441. [cit. 2017 – 10 - 20] dostupné z : <https://cot.food.gov.uk/sites/default/files/cot/phyto-report0503.pdf>
- Damstra, T. 2003. Endocrine Disrupters: The Need for a Refocused Vision. *Toxicological Sciences*. 74 (2). 231 – 232.
- Ded, L., Dostalova, P., Dorosh, A., Dvorakova-Hortova, K., Peknicova, J. 2010. Effect of estrogens on boar sperm capacitation *in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 8 (1). 87.
- Ded, L., Sebkova, N., Cerna, M., Elzeinova, F., Dostalova, P., Peknicova, J., Dvorakova-Hortova, K. 2013. *In vivo* exposure to 17 $\beta$ -estradiol triggers premature sperm capacitation in cauda epididymis. *The Journal of the Society for Reproduction and Fertility*. 145 (3). 255 – 263.
- Dinsdale, C. E., Ward, E. W. 2010. Early Exposure to Soy Isoflavones and Effects on Reproductive Health: A Review of Human and Animal Studies. *Nutrients*. 2 (11). 1156 – 1187.
- Dixon, A. R., Ferreira, D. 2002. Genistein. *Phytochemistry*. 60 (3). 205 – 211.
- Dixon, A. R. Phytoestrogens. 2004. *Annual Review of Plant Biology*. p. 225-261. ISSN 1543-5008.

- Eumkeb, G., Tanphonkrang, S., Sirichaiwetchakoon, K., Hengpratom, T., Naknarong, W. 2016. The synergy effect of daidzein and genistein isolated from *Butea superba* Roxb. on the reproductive system of male mice. *Natural Product Research*. 31 (6). 672 – 675.
- Farah, O. I., Cuiling, L., Jiaojiao, W., Huiping, Z. 2013. Use of Fluorescent Dyes for Readily Recognizing Sperm Damage. *Journal of Reproduction & Fertility*. 14 (3). 120 – 125.
- Farmer, C., Palin, M. F., Gilani, G. S., Weiler, H., Vignola, M., Choudhary, R. K., Capuco, A. V. 2010. Dietary genistein stimulates mammary hyperplasia in gilts. *Animal*. 4 (3). 454 – 465.
- Fialová, S. 2012. Fytoestrogény a ich využitie v menopauze. *Praktické lekárnictvo*. 2 (4). 150–154.
- Ford, J. A., Clark, S. G., Walters, E. M., Wheeler, M. B., Hurley, W. L. 2006. Estrogenic effects of genistein on reproductive tissues of ovariectomized gilts. *Journal of Animal Science*. 84 (4). 834 – 842.
- Fraser, L., Gorszezaruk, K., Strzezek, J. 2001. Relationship Between Motility and Membrane Integrity of Boar Spermatozoa in Media Varying in Osmolality. *Reproduction in Domestic Animals*. 36 (6). 325 – 329.
- Fraser, R. L., Beyret, E., Milligan R. S., Adeoya-Osiguwa, A. 2006. Effects of estrogenic xenobiotics on human and mouse spermatozoa. *Human Reproduction*. 21 (5). 1184 – 1193.
- Frémont, L. 2000. Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*. 66 (8). 663 – 673.
- Galeati, G., Vallorani, C., Bucci, D., Bernardini, Ch., Tamanini, C., Parmeggiani, A., Marcella S. 2010. Daidzein does affect progesterone secretion by pig cumulus cells but it does not impair oocytes IVM. *Theriogenology*. 74 (3). 451 – 457.
- Gallon, F., Marchetti, C., Jouy, N., Marchetti, P. 2006. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertility and Sterility*. 86 (5). 1526-1530.
- Gamčík, P., Kozumplík, J., Mesaroš, P., Schvarc, F., Vlček, Z., Zibrin, M. *Andrológia a umelá inseminácia hospodárskych zvierat*. 1992. Príroda. Bratislava. 299 s. ISBN: 80-07-00540 – 4.

- Ganai, A. A., Farooqi, H. Bioactivity of genistein: A review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 76. 30 – 38.
- Gu, L., House, E. S., Prior, L. R., Fang, N., Ronnis, J. J. M., Clarkson, B. T., Wilson, E. M., Badger, M. T. 2006. Metabolic Phenotype of Isoflavones Differ among Female Rats, Pigs, Monkeys, and Women. *The Journal of Nutrition*. 136 (5). 1215 – 1221.
- Hafez, E. S. E. (ed.), Hafez, B. (ed.). 2013. *Reproduction in farm animals*. 7th Edition. Wiley-Blackwell. p. 509. ISBN: 978-1-118-71028-9.
- Hagele, W., Hinsch, E., MüllerSchlosser, F. 1998. The influence of phytoestrogen genistein on sperm function. *Tierärztliche Umschau*. 53. 437 – 441.
- Han, Z. Y., Wang, G. L., Chen, W., Zhang, L. J. 2003. Effects of daidzein on sperm quality, testis gain and testosterone in mice. *National Journal of Andrology*. 9 (8). 556 - 8.
- Harris, H. A., 2007. Estrogen Receptor- $\beta$ : Recent Lessons from *in Vivo* Studies. *Molecular Endocrinology*. 21 (1). 1 – 13.
- Harrison, R. A. P., Vickers, S. E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journals of Reproduction & Fertility Ltd*. 88 (1). 343 – 352.
- Hashem, N. M., Soltan, Y. A., 2016. Impacts of phytoestrogens on livestock production: A review. *Egypt. Journal of Nutrition and Feeds*. 19. 81 – 89.
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., Gustafsson, J. 2007. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiological Reviews*. 87 (3). 905 – 931.
- Hess, R. A. 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1 (1). 52.
- Hinsch, K. D., Aires, V., Hägele, W., Hinsch, E. 2000. *In vitro* test for Essential sperm functions using the phyto-oestrogens genistein as a test substance. *Andrologia*. 32 (4-5). 225 – 231.
- Chang, Y., Nair, M., 1995. Metabolites of daidzein and genistein by intestinal bacteria. *Journal of Natural Products*. 58 (12). 1892–1896.

- Chavarro, E. J., Toth, L. T., Sadio, M. S., Hauser, R. 2008. Soy food and isoflaone intake in relation to semen quality parameters among men from an infertility clinic. *Human Reproduction*. 23 (11). 2584 – 2590.
- Idaomar, M., Guerin, J. F., Lornage, J., Czyba, J. C. 1989. Stimulation of Motility and Energy Metabolism of Spermatozoa From Asthenozoospermic Patients by 17 $\beta$ -Estradiol. *Archives of Andrology*. 22 (3). 197 – 202.
- Jalili, C., Ahmadi, S., Roshankhah, S., Salahshoor, M. 2016. Effect of Genistein on reproductive parameter and serum nitric oxide level in morphine-treated mice. *International Journal of Reproductive BioMedicine*. 14 (2). 95 – 102.
- Jefferson, N. W., Padilla-Banks, E., Newbold, R. R. 2007. Disruption of the developing female reproductive system by phytoestrogens: Genistein as an example. *Molecular Nutrition & Food Research*. 51 (7). 832 – 844.
- Jefferson, N. W., Patisaul, B. H., Williams, J. C. 2012. Reproductive Consequences of Developmental Phytoestrogen Exposure. *Reproduction*. 143 (3). 247 – 260.
- Jiang, C. X., Pan, L. J., Feng, Y., Xia, X. Y., Huang, Y. F. 2008. High-dose daidzein affects growth and development of reproductive organs in male rats. *National Journal of Andrology*. 14 (4). 351 – 355.
- Keung, M. W., Vallee, L. B. 1993. Daidzin and daidzein suppress free-choice ethanol intake by Syrian Golden hamsters. *Proceedings of the National Academy of Science of th United States of America*. 90 (21). 10008 – 10012.
- Kim, T., Yuh, I., Park, I., Cheong H., Kim, J., Park, Ch., Yang, B. 2014. Effects of Quercetin and Genistein on Boar Sperm Characteristics and Porcine IVF Embryo Developments. *Journal of Embryo Transfer*. 29 (2). 141 – 148.
- Knight, D. C., Eden J. A. 1995. Phytoestrogens – a short review. *Maturitas*. 22 (3). 167 - 175.
- Kuiper, G. G., Lemmen, G. J., Carlsson, B., Corton, Ch. J., Safe, H. S., Saag, T. P., Burg, B., Gustafsson, J. 1998. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor  $\beta$ . *Endocrinology*. 139 (10). 4252 – 4263.

- Kurz, A., Viertel, D., Herrmann, A., Müller, K. 2005. Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction. *Society for Reproduction and Fertility*. 130 (5). 615 - 626.
- Ickowicz, D., Finkelstein, M., Breitbart, H. 2012. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian Journal of Andrology*. 14 (6). 816 – 821.
- Lagari, V., Levis, S. 2014. Phytoestrogens for menopausal bone loss and climacteric symptoms. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 139. 294 – 301.
- Lee, J. H., Renita, M., Fioritto, R. J., St. Matrin, S. K., Schwartz, S. L., Vodovotz, Y. 2004. Isoflavone characterization and antioxidant activity of Ohio soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (9). 2647 – 2651.
- Lee, S., Lee, J. 2009. Effects of oven-drying, roasting, and explosive puffing process on isoflavone distribution in soybeans. *Food Chemistry* 112 (2). 316 – 320.
- Lewis, R. W., Brooks, N., Milburn, G. M., Soames, A. 2003. The effects of the phytoestrogen genistein on the postnatal development of the rat. *Toxicology Sciences*. 71 (1). 74 – 83.
- Liggins, J., Bluck, L. J. C., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W. A., Bingham, S. A. 2000. Daidzein and genistein contents of vegetables. *British Journal of Nutrition*. 84 (5). 717 – 725.
- Liu, K. 1997. *Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization*. International Thomson Publishing Asia. p. 532. ISBN: 978-1-4615-1763-4.
- Louda, F. *Inseminace hospodářských zvířat se základy biotechnických metod*. Česká zemědělská univerzita. 2001. Praha. 225 s. ISBN: 80-213-0702-1.
- Lu, L. J., Anderson, K. E., Grandy, J. J., Nagamani, M. 1996. Effects of Soya Consumption for One Month on Steroid Hormones in Premenopausal Women: Implications for Breast Cancer Risk Reduction. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 5(1). 63 – 70.
- Luconi, M., Forti, G., Baldi, E. 2002. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanism of action and clinical implications for male reproduction. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 80 (4 -5). 369 – 381.



- Lundh, O. J. T., Pettersson I. H., Martinsson, A. K. 1990. Comparative levels of free and conjugated plant estrogens in blood plasma of sheep and cattle fed estrogenic silage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38 (7). 1530–1534.
- Luño, V., López-Úbeda, R., García-Vázquez, F. A., Gil, L., Matás, C. 2013. Boar sperm tyrosine phosphorylation patterns in the presence of oviductal epithelial cells: *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo*. *Reproduction*. 146 (4). 315 – 324.
- Macías-García, B., Guimarães, T., Lopes, G., Rocha, A., González-Fernández, L. 2015. Effect of genistein addition to equine sperm freezing extender. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 66 (4). 241 – 248.
- Maharjan, S., Masahide, O., Masashi, T., Hoseki, J., Sakai, Y. 2014. Mitochondrial impairment triggers cytosolic oxidative stress and cell death following proteasome inhibition. *Scientific reports*. 4. 5896.
- Marchetti, C., Jouy, N., Leroy-Martin, B., Defosse, A., Formstecher, P., Marchetti, P. 2004. Comparison of four fluorochromes for detection of inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Human Reproduction*. 19 (10). 2267 – 2276.
- Marchetti, C., Obert, G., Defosse, A., Formstecher, P., Marchetti, P. 2002. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Human Reproduction*. 17 (5). 1257 – 1265.
- Martini, M. C., Dancisak, B. B., Haggans, C. J., Thomas, W., Slavin J. L. 1999. Effects of soy intake on sex hormone metabolism in premenopausal women. *Nutrition and cancer*. 34 (2). 133 – 139.
- Maskarinec, G., Williams, A. E., Inouye, J. S., Stanczyk, F. Z., Franke, A. A. 2002. A randomized isoflavon intervention among premenopausal women. 11 (2). 195 – 201.
- Massányi, L., 1991. *Funkčná morfológia spermie*. Bratislava: Slovenská akadémia vied, 1991. 191 s. ISBN: 80-224-0149-8.
- Mazumder, R. A., Hongsprabhas, P. 2016. Genistein as antioxidant and antibrowning agents in *in vivo* and *in vitro*: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 82. 379 – 392.

- Messina, F., Guqlielmini, G., Curini, M., Orsini, S., Gresele, P., Marcotulio, M. C. 2015. Effect of substituted stilbenes on platelet function. *Filoterapia*. 105. 228 – 233.
- McLachlan, A. J., Tilghman, L. S., Burrow, E. M., Bratton, R. M. 2012. Environmental signaling and reproduction: A comparative biological and chemical perspective. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 354 (1-2). 60 – 62.
- McVey, J. M., Cooke, M. G., Curran, A. H. I. 2004. Increased serum and testicular androgen levels in F1 rats with lifetime exposure to soy isoflavones. *Reproductive Toxicology*. 18 (5). 677 – 685.
- Menzel, V. A., Hinsch, E., Hägele, Wollfgang, Hinsch K. 2007. Effect of genistein on acrosome reaction and zona pellucida binding independent of protein tyrosine kinase inhibition in bull. *Asian Journal of Andrology*. 9 (5). 650-658.
- Miláčková, I. 2015. Genistein - rozporuplná molekula zo sóje. *Liečivé rastliny*. 15 (5). [online]. Dostupné z : <http://www.liecive.herba.sk/index.php/archiv/liecive-rastliny-2015/331-liecive-rastliny-5-2015/1522-genistein-rozporuplna-molekula-zo-soje>
- Mitchell, H. Julie, Cawood, E., Kinniburgh, D., Provan, A., Collins, R. Andrew, Irvine, D. Stewart. 2001. Effect of a phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males. *The Biochemical Society and the Medical Research Society*. 100 (6). 613 – 618.
- Moravcová, J., Kleinová, T. Phytoestrogeny ve výživě – přinášejí užitek nebo riziko? 2002. *Chemické listy*. 96 (5). 282-289.
- Moutsatsou, P. 2007. The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones*, 6 (3). 173 – 193.
- Murkies, L. A., Wilcox, G., Davis, R. S. 1998. Phytoestrogens. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 83 (2). 297 – 303.
- Murray, M. J., Meyer, W. R., Lessey, B. A., Oi, R. H., DeWire, R. E., Fritz, M. A. 2003. Soy protein isolate with isoflavones does not prevent estradiol-induced endometrial hyperplasia in postmenopausal women: a pilot trial. *Menopause*. 10 (5). 456 – 464.
- Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K., Ono, H. 2001. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reproductive Toxicology*. 15 (4). 399 – 411.

- Neil, J. D. (ed.) 2006. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. volume 1. 3rd edition. Elsevier Academic Press. Amsterdam. p. 1726. ISBN: 0125154011.
- Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., Gustafsson, J. 2001. Mechanisms of Estrogen Action. 81 (4). 1535 – 1565.
- Noakes, D., Parkinson, T., England, G. 2001. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Saunders Ltd. p. 864. ISBN: 9780702037122.
- Nynca, A., Jablonska, O., Slomczynska, M., Petroff, K. B., Ciereszko, E. R. 2009. Effects of phytoestrogen daidzein and estradiol on steroidogenesis and expresion of estrogen receptors in porcine luteinized granulosa cells from large follicles. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 60 (2). 96 – 105.
- Oborná, I., Fingerová, H., Březinová, J. *Fytoestrogeny v gynekologickej praxi*. 2007. *Interní medicína pro praxi* . 9(10). 459 – 461.
- Osheroff, J. E., Visconti, P. E., Valezuela, J. P., Travis, A. J., Alvarez, J., Kopf, G. S. 1999. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Molecular Human Reproduction*. 5 (11). 1017 – 1026.
- Ososki, L. A., Kennelly, J. E. 2003. Phytoestrogens: a Review of the Present State of Research. *Phytotherapy Research*. 17 (8). 845 – 869.
- Patisaul, B. H., Jefferson, W. 2010. The pros and cons of phytoestrogens. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 31 (4). 400 – 419.
- Pfitscher, A., Reite, E., Jungbauer, A. 2008. Receptor binding and transactivation activities of red clover isoflavones and their metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 112 (1-3). 87 – 94.
- Reece, W. O. 1998. *Fyziologie domácích zvířat*. Grada Publishing 1998. vydání 1. 456 s. ISBN: 80-7169-547-5.
- Rice, S., Whitehead, A. S. 2008. Phytoestrogens oestrogen synthesis and breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 108 (3 -5). 85 – 186.

Retana-Márquez, S., Hernández, H., Flores, A. J., Muños-Gutiérrez, M., Duarte, G., Vielma, J., Rodríguez, F. G., Fernández, G. I., Keller, M., Delgadillo, A. J. 2012. Effects of phytoestrogens on mammalian reproductive physiology. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 15 (1).

Ruffenach, S. Sperm Capacitation. 2009. citované [14.2.2018]. online dostupné z: <https://embryo.asu.edu/pages/sperm-capacitation>

Rozeboom, K. J. Evaluating Boar Semen Quality. 2000. citované [14.2.2018]. online dostupné z: [https://projects.ncsu.edu/project/swine\\_extension/publications/factsheets/812s.htm](https://projects.ncsu.edu/project/swine_extension/publications/factsheets/812s.htm)

Rozman, K. K., Bhatia, J., Calafat, A. M., Chambers, Ch., Culty, M., Etzel, R. A., Flaws, J. A., Hansen, D. K., Hoyer, P. B., Jeffery, E. H., Kesner, J. S., Marty, S., Thomas, J. A., Umbach, D. 2006. NTP – CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of genistein. *Birth Defect Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. 77 (6). 485 – 638.

Ryu, Do-Yeal, Kim, Y., Lee, J., Rahman, M. S., Kwon, W., Yoon, S., Pang, M. 2014. Capacitation and acrosome reaction differences of bovine, mouse and porcine spermatozoa in responsiveness to estrogenic compounds. *Journal of Animal Science and Technology*. 56 (1). 26.

Sakamuru, S., Attene-Ramon, M., Xia Menghang. 2017. Mitochondrial Membrane Potential Assay. *Methods of Molecular Biology*. 17-22.

Santell, R. C., Chang, Y. C., Nair, M. G., Helferich, W. G. 1997. Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *Journal of Nutrition*. 127 (2). 263 - 269.

Sebkova, N., Cerna, M., Ded, L., Peknicova, J., Dvorakova-Hortova, K. 2012. The slower the better: how sperm capacitation and acrosome reaction is modified in the presence of estrogens. *Reproduction*. 143 (3). 297 - 307.

Setchell, R. D. K., Brown, M. N., Lydeking-Olsen, E. 2002. The Clinical Importance of the Metabolite Equol – A Clue to the Effectiveness of Soy and Its Isoflavones. *The Journal of Nutrition*. 132 (12). 3577 – 3584.

- Setchell, R. D. K., Clerici, C. 2010. Equol: History, Chemistry, and Formation. *The Journal of Nutrition*. 140 (7). 1355 – 1362.
- Schmitt, E., Dekant, W., Stopper, H. 2001. Assaying the estrogenicity of phytoestrogens in cells of different estrogen sensitive tissues. *Toxicology in Vitro*. 15 (4-5). 433 – 439.
- Silvestre, A. M., Vicente-Fiel, S., Raga, E., Salvador, I., Soler, C., Yániz, L. J. 2015. Effect of genistein added to bull semen after thawing on pronuclear and sperm quality. *Animal Reproduction Science*. 163. 120 – 127.
- Simoncini, T., Mannella, P., Fornari, L., Caruso, A., Varone, G., Genezzani, R. A. 2004. Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids*. 69 (8-9). 537 – 542.
- Singh, S., Shaul, P. W., Gupta, P. D. 2002. Conventional estrogen receptors are found in the plasma membrane of vaginal epithelial cells of the rat. *Steroids*. 67 (9). 757 – 764.
- Smital, J. 2009. Effects influencing boar semen. *Animal Reproduction Science*. 110 (3 - 4). 335 – 346.
- Skibińska, I., Jendraszak, M., Borysiak, K., Jędrzejczak, P., Kotwicka, M. 2016. 17 $\beta$ -estradiol and xenoestrogens reveal synergistic effect on mitochondria of human sperm. *Ginekologia Polska*. 87 (5). 360 – 366.
- Srivastava, N., Pande, M. 2017. *Protocols in Semen Biology*. 1st edition. Springer Verlag. Singapore. p. 288. ISBN: 9811051992.
- Sun, M., Ye, Y., Xiao, L., Rahman, K., Xia, W., Zhang, H. 2016. Daidzein: A review of pharmacological effects. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*. 13 (3). 117 - 132.
- Sureda, A., Silva, S. A., Sánchez-Machado, I. D., López-Cervantes, J., Daglia, M., Nabavi, F. S., Nabavi, M. S. 2017. Hypotensive effects of genistein: From chemistry to medicine. *Chemico-Biological Interactions*. 268. 37 – 46.
- Szalay, J. 2015. What Are Flavonoids. *Live Science Contributor*. Online [26. 11. 2017].  
Dostupné z: <https://www.livescience.com/52524-flavonoids.html>

Šťastný, P., Šťastná, D. Všeobecná reprodukcia zvierat. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre. prvé vydanie. Nitra. 2015. 159 s. ISBN: 9788055213071.

Thomas, P., Dong, J. 2006. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by enviromental estrogens: A potencial novel mechanism of endocrine disruption. *Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology*. 102 (1-5). 175 – 179.

Thurston, L. M., Watson, P. F., Mileham, A. J., Holt, W. V. 2001. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *Journal of Andrology*. 22 (3). 382 – 94.

Tiemann, U., Schnieder, F., Vanselow, J., Tomek, W. 2007. In vitro exposure of porcine granulosa cells to the phytoestrogens genistein and daidzein: Effects on the biosynthesis of reproductive steroid hormones. *Reproductive Toxicology*. 24 (3-4). 317 – 325.

Unfer, V., Casini, M. L., Costabile, L., Mignosa, M., Geril, S., DiRenzo, G. C. 2004. Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blinded, placebocontrolled study. *Fertility & Sterility*. 82 (1). 145 – 148.

Vavrečka, J., Mareš, P., Zeman, L. Sója pro prasata ve výkrmu. 2005. Sborník z konference „Perspektivy sóji v ČR“. 63 – 66.

Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Přinosilová, P. Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy. 2004. Brno. 197 s. ISBN: 80 – 86895 – 01 - 7.

Weihua, Z., Andersson, S., Cheng, G., Simpson, E. R., Warner, M., Gustafsson, J. 2003. Update on estrogen signaling. *Federation of European Biochemical Societies*. 546 (1). 17 – 24.

West, L. G., Birac, M. P., Pratt, E. D. 1978. Separation of the isomeric isoflavones from soybeans by high – performance liquid chromatograph. *Journal of Chromatography* 150 (1). 266 – 268.

Whitehead, S. A., Lacey, M. 2003. Phytoestrogens inhibit aromatase but not 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) type 1 in human granulosa-luteal cells: evidence for FSH induction of 17-beta-HSD. *Human Reproduction*. 18 (3). 487 – 494.

- Whitten, L. P., Naftolin, F. 1998. Reproductive actions of phytoestrogens. 12 (4). 667 – 690.
- Wolf, L. P., Martins, M. R., Bedone, A. J., Monteiro, I. M. 2006. Endometrial evaluation in menopausal women after six month of isoflavones. 52 (6). 419 – 423.
- Wisniewski, A. B., Klein, S. L., Lakshmanan, Y., Gerhart, J. P. 2003. Exposure to genistein during gestation and lactation demasculinies the reproductive system in rats. *Journal of Urology*. 169 (4). 1582 – 1586.
- Witorsch, J. R. 2002. Endocrine Disruptors: Can Biological Effects and Enviromental Risks Be Predicted ?. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 36 (1). 118 – 130.
- Woclawek-Potocka, I., Mannelli, Ch., Boruszewska, D., Kowalczyk-Zieba, I., Waśniewski, T., Skarzyński, J. D. 2013. Diverse Effects of Phytoestrogens on the Reproductive Performance: Cow as a Model. *International Journal of Endocrinology*.
- Yeung, H.Y. B., Wan, T. H., Law, Y.S. A., Wong, K.C. Ch. 2011. Endocrine disrupting chemicals: Multiple effects on testicular signaling and spermatogenesis. *Spermatogenesis I*. 1 (3). 231 – 239.
- Yuan, X. X., Zhang, B., Li, L. L., Xiao, C. W., Fan, J. X., Geng, M. M., Yin, Y. L. 2012. Effects of soybean isoflavones on reproductive parameters in Chinese mini-pig boars. *Journal of animal science and biotechnology*. 3(1). 31.
- Yuan, W., Chen, Q., Zeng, J., Xiao, H., Huang, Z., Li, X. 2017. 3'- Daidzein sulfonate sodium improves mitochondrial functions after cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neural Regeneration Research*. 12 (2). 235 - 241.