

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Společné účinky alfa-zearalenolu a genisteinu na kvalitu
kančích spermií**

Diplomová práce

Autor práce: Martina Šašková

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

Školitel práce: Ing. Petra Folková

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Společné účinky alfa-zearalenolu a genisteinu na kvalitu kančích spermií" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne:

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce doc. MVDr. Radko Rajmonovi, Ph. D. a školitelce práce Ing. Petře Folkové, za jejich odborné vedení, rady a trpělivý přístup. Dále bych na tomto místě ráda vyjádřila dík svým rodičům a přátelům, kteří mě vždy dokázali povzbudit a podpořit při psaní této práce.

Společné účinky alfa-zearalenolu a genisteinu na kvalitu kančích spermií

Souhrn

Alfa-zearalenol a genistein jsou látky s estrogenním účinkem, které se vyskytují v krmivech určených pro zvířata i v potravě lidí. Tyto látky mohou v těle živočichů vyvolat účinky podobné přirozeným hormonům nebo naopak působit proti nim. Tím dochází k hormonálním změnám v organismu, které mohou mít za následek narušení reprodukčních funkcí.

Cílem této práce je ověřit hypotézu, že společné působení alfa-zearalenolu a genisteinu bude vykazovat in vitro rozdílné účinky oproti působení těchto látek jednotlivě.

Pro tento pokus byly používány komerční kančí krátkodobě konzervované inseminační dávky. Spermie byly inkubovány s vybranými koncentracemi zearalenolu, genisteinu nebo obou látek současně.

Motilita spermií byla vyhodnocena metodami CASA. Po 4 hodinové inkubaci byl proveden HOS test a barvení „živé-mrtvé“ pro vyhodnocení životaschopnosti spermií. Veškerá získaná data byla zpracována statistickými metodami.

Konečné výsledky prokazují hypotézu, že společné působení alfa-zearalenolu a genisteinu vykazuje in vitro rozdílné účinky oproti působení těchto látek jednotlivě. Samotný alfa-zearalenol v obou testovaných koncentracích způsobil po 2 hodinové inkubaci výrazné zhoršení motility. Oproti tomu při společném působení obou kontaminantů, se parametry statisticky nelišily od vzorků se samotným genisteinem ani od kontrolních vzorků s ředěným DMSO. Po 4 hodinách inkubace nastal ve výsledných hodnotách všech parametrů pohybu výrazný, ale relativně rovnoměrný pokles, kromě vzorku alfa-zearalenolu (koncentrace 2 μM), který měl tyto hodnoty oproti ostatním výrazně horší.

Výsledky HOS testů neukázaly statisticky významné rozdíly v procentuálním zastoupení živých a mrtvých spermií, leč i zde lze na grafu pozorovat u vzorku alfa-zearalenolu (koncentrace 2 μM) oproti genisteinu i oběma kombinacím výraznější negativní tendence.

Výsledky této práce naznačují, že genistein má schopnost snížit negativní působení alfa-zearalenolu na motilitu kančích spermií.

Klíčová slova: xenoestrogeny, zearalenol, genistein, spermie, interakce

Common effect of alpha-zearalenol and genistein on boar sperm quality

Summary

Alpha-zearalenol and genistein are substances having an estrogenic effect that are present in the feed intended for animals and in human food. In bodies of those animals these substances may induce effects similar to natural hormones or counteract them. This leads to hormonal changes in the organism, which may result in disruption of reproductive function.

The aim of this work is to verify the hypothesis that the combined action of alpha-zearalenol and genistein will have different effects in vitro compared to the action of these agents individually.

Commercial short-term conserved boar insemination doses were used for this experiment. Sperm was incubated with selected concentrations of zearalenol, genistein or both substances simultaneously.

Sperm motility was evaluated through methods CASA. After four hours of incubation, HOS test and coloring „living-dead“ for viability assessment of sperm were performed. The data were processed by statistical methods.

The final results prove the hypothesis that the combined action of alpha-zearalenole and genistein exhibits different effects in vitro compared to the actions of these agents individually. Alfa-zearalenol caused a significant deterioration in motility in both tested concentrations after 2 hours of incubation when used alone. In contrast, in the combined action of both contaminants, the parameters were not statistically different from the samples with genistein alone or from control samples with diluted DMSO. After 4 hours of incubation, significant but relatively uniform decline occurred in the resulting values of all parameters of movement, except for the alpha-zearalenol sample (concentration 2 μM), which had significantly worse values compared to the others.

HOS test results did not show statistically significant differences in the percentage of living and dead sperm, but even here more distinct negative tendencies can be seen in the case of alpha-zearalenol sample (concentration 2 μM), compared to genistein and both combinations in the graph.

These results indicate that genistein has the ability to reduce negative effects of alpha-zearalenol on boar sperm motility.

Key words: xenoestrogens, zearalenole, genistein, sperm, interaction

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíl práce.....	2
3. Literární rešerše	3
3.1. Estrogeny.....	3
3.1.1. Estrogeny endogenní.....	3
3.1.2. Estrogeny exogenní.....	5
3.1.3. Mechanismus působení.....	15
3.1.4. Působení estrogenních látek na spermie	18
4. Materiál a metody	22
4.1. Příprava supernatantu.....	22
4.2. Příprava roztoků kontaminantů	22
4.3. Příprava vlastních vzorků a postup pokusu.....	23
4.4. Stanovení motility – systém CASA	24
4.5. HOS test a barvení	26
4.6. Statistické vyhodnocení dat.....	27
4.7. Potřebné laboratorní vybavení a pomůcky.....	27
5. Výsledky	28
5.1. Parametry pohybu – vyhodnocení motility	28
5.2. Výsledky HOS testu a barvení	34
6. Diskuze	37
7. Závěr	41
8. Použitá literatura	42

1. Úvod

Alfa-zearalenol a genistein patří mezi látky s estrogením účinkem – tzv. exogenní estrogény. Alfa-zearalenol je vedlejším metabolitem vláknitých hub a řadí se tedy mezi mykotoxiny. Genistein patří do skupiny fytoestrogenů, látek vyskytujících se v rostlinách, zejména potom v sójových bobech či jeteli. Jejich strukturní podobnost s endogenními estrogény jim umožňuje navázat se na estrogení receptory a vyvolávat v těle živočichů reakce stejně jako endogenní estrogény. Ačkoli jsou estrogény nepostradatelnou součástí organismu jak samic, tak samců, mohou exogenní estrogény svým působením vyvolat i nepříznivé reakce a narušovat endokrinní rovnováhu.

Do těla se exogenní estrogény dostávají s potravou či vodou a výsledná reakce organismu závisí na koncentraci a druhu přijaté látky, době expozice a také se liší dle vnímavosti daného druhu živočicha, přičemž prasata patří mezi druh velmi citlivý vůči těmto látkám. V poslední době je proto zkoumán zejména negativní vliv exogenních estrogenů na reprodukční funkce prasat, a to jak u samic, tak samců. Pozornost je věnována také ejakulovaným spermii, které mohou být ovlivňovány estrogeními látkami v sekretech samičího pohlavního ústrojí.

Obdobný mechanismus účinku estrogeních látek vede nejen k interakcím s endogenními estrogény, ale i mezi xenoestrogény navzájem.

To poukazuje na důležitost testování různých směsí xenoestrogeních látek, protože je pravděpodobné, že zvířata, stejně jako lidé, jsou přirozeně vystavována více než jedné této estrogení látce a proto tato práce porovnává vliv kombinace alfa-zearalenolu spolu s genisteinem oproti působení těchto látek samostatně.

2. Cíl práce

Zearalenol je účinný metabolit mykotoxinu zearalenonu s estrogenizačními účinky. Podobně genistein je fytoestrogen sóji. Společný výskyt v organismu prasat evokuje otázky související s jejich možnou interakcí při ovlivňování mj. reprodukčních funkcí.

Cílem práce je ověřit hypotézu, že společné působení obou látek bude vykazovat účinky rozdílné od prosté adice efektů těchto látek působících jednotlivě.

3. Literární rešerše

3.1. Estrogeny

Estrogeny jsou všeobecně dobře známé samičí hormony, které řídí jejich reprodukční cykly. Jsou ovšem důležité i v reprodukci samců a řadě dalších systémů, jako je neuroendokrinní, kosterní či imunitní systém. Dále se svým vlivem ve fyziologických procesech podílí také na různých onemocněních včetně obezity, metabolických poruchách, rakovině, osteoporóze či endometrióze (Hamilton a kol., 2014).

Jedná se o biologicky aktivní lipofilní látky, které patří mezi steroidní hormony, což jsou sloučeniny odvozené od cholesterolu. Mají významnou regulační funkci, která je rozdílná v jednotlivých tkáních celého těla.

U živočichů je jejich tvorba situována ve vaječníku, placentě a kůře nadledvin (Reece, 1998) a jejich transport k cílovému orgánu je zajištěn krví. Takto vzniklé estrogeny budeme označovat jako endogenní. Jinak vznikající estrogeny nazýváme exogenními.

Obě tyto skupiny, bez ohledu na místo jejich vzniku, mohou vyvolat v cílové buňce hormonální odezvu.

3.1.1. Estrogeny endogenní

Endogenní estrogeny, jak již bylo uvedeno, jsou přírodní látky vznikající v organismu. Řadíme mezi ně estron, estradiol a estriol.

Sekrece těchto estrogenů je závislá na nadřazených bílkovinných hormonech hypofýzy – konkrétně na FSH (folikuly stimulačním hormonu) a LH (luteinizačním hormonu).

Prekurzorem estrogenů, stejně jako všech ostatních steroidních hormonů, je cholesterol.

Vůbec prvním vzniklým hormonem, vznikajícím před jednotlivými estrogeny, je však progesteron, který se nejprve přemění na 17α -hydroxyprogesteron, ze kterého vznikne androstendion a z něj testosteron. Estrogeny posléze vznikají až zpětnou přeměnou testosteronu na androstendion, který vlivem aromatázy ztratí methyl na 19. uhlíku.

Nejúčinnějším endogenním estrogenem je 17β -estradiol. Méně účinné estrogeny jsou potom estron a estriol. Přičemž estriol je spíše jen metabolitem samotného estronu (Ledvina a kol., 2009).

U samic vznikají takto estrogeny ve vaječniku, placentě a kůře nadledvin (Reece, 1998). V malém množství jsou potom estrogeny také syntetizovány u samců, a to v kůře nadledvin a v Leydigových buňkách varlat. Všechny tyto estrogeny, stejně tak jako ostatní steroidy, mají krátké poločasy rozpadu a rychle ztrácejí svojí biologickou účinnost (okolo 6 minut), a to proto, že jsou v těle pohotově napadány jaterními enzymy, které je rychle inaktivují konjugací. Vzniklé konjugáty jsou ve vodě rozpustné a k jejich vyloučení z organismu dochází žlučí, močí a stolicí (Ledvina a kol., 2009).

Transport estrogenů je v těle zajištěn krví, kde je jich většina navázána na proteinový nosič, známý jako pohlavní hormon vázající globulin (SHBG), který je produkovaný v játrech. Dalších 10-30 % estrogenů se volně váže na albumin, asi 1 % je v krvi volně a velmi malé procento je navázáno na kortikosteroidy vázající globulin.

Ke zvýšení hladiny SHBG v krvi dochází při hypertyreóze, těhotenství a při podávání estrogenů, zatímco kortikoidy, androgeny, progestiny, růstové hormony a inzulin hladiny SHBG v krvi snižují (Speroff a kol., 1999).

Mimo to bylo prokázáno, že hladiny SHBG v plasmě regulují také isoflavony (fytoestrogeny), které *in vitro* vytěšňují z vazebných míst na SHBG 17 β -estradiol i testosteron, čímž narušují transport a rovnováhu těchto steroidů v organismu (Cederroth a kol., 2012).

Estrogeny vyvolávají vývoj pohlavních orgánů, dále zrání zárodečných primordiálních buněk a vývoj sekundárních pohlavních znaků, včetně typické distribuce tělesného tuku. Dále například podněcují činnost kostních osteoblastů, což má za následek dřívější uzavírání epifyzárních štěrbin (růstových plotének) kostí u samic a tedy i nižší výšku jejich těla.

Nedostatečná produkce estrogenů u samice se potom tedy projeví prohloubením osteoporotických změn a zvýšeným rizikem patologických zlomenin, a také stoupá ohrožení aterosklerózou (Ledvina a kol., 2009).

3.1.2. Estrogeny exogenní

Exogenní neboli také environmentální estrogeny jsou ostatní látky, které vykazují estrogenní aktivitu, ale nejsou přirozenou součástí organismu živočichů. Jedná se o rozsáhlou skupinu látek, které se v současné době běžně vyskytují, mimo jiné, například i v povrchových a odpadních vodách.

Podle původu se rozdělují na xenoestrogeny (vznikající z antropogenních zdrojů), fytoestrogeny (rostlinný původ) a mykoestrogeny (produkty některých druhů plísní) (Kujalová a kol., 2007).

Až na vzácné výjimky nejsou xenoestrogeny steroidy. Jedná se o různé typy látek, které mají určité společné strukturní rysy. Vždy jsou to fenoly a jejich molekula je téměř plochá a obsahuje dvojici hydroxylových skupin ve vzdálenosti, která se příliš neliší od vzdálenosti hydroxylů v estradiolu (Lapčík a Stárka, 2004).

Vzhledem k tomu, že exogenní estrogeny většinou imitují hormony, mohou se místo nich také navázat na estrogenní receptory a vyvolávají tak hormonální odezvu stejnou, nebo jinou než endogenní estrogeny. Některé xenoestrogeny na estrogenové receptory působí chemicky a aktivují je, některé je naopak inaktivují, a jiné mohou narušovat metabolismus endogenních estrogenů (Kujalová a kol., 2007).

Mezi xenoestrogeny zahrnujeme širokou škálu látek antropogenního původu, jako jsou například pesticidy, polycyklické aromatické uhlovodíky či polychlorované bifenyly, které jsou schopné napodobit endogenní estrogeny díky své podobné struktuře (Socas-Rodríguez a kol., 2013).

Z pesticidů se konkrétně jedná například o DDT (dichlordifenyltrichloretan - jeden z nejstarších a nejznámějších insekticidů), atrazin (syntetický herbicid) či endosulfan (širokospektrální insekticid).

Dalším významným zdrojem xenoestrogenů jsou farmaceutické preparáty na bázi estrogenů – jako například hormonální antikoncepce, jejíž účinnou látkou je nejčastěji 17 α -ethynylestradiol nebo estradiolvaleran, a dále také specifické léky obsahující například diethylstilbestrol (Kujalová a kol., 2007).

Jako fytoestrogeny označujeme látky rostlinného původu, které vykazují estrogenní aktivitu a mají schopnost vázat se na estrogenní receptory v těle živočichů z důvodu jejich podobnosti s endogenními estrogeny (Speroff a kol., 1999). Mezi neběžnější fytoestrogeny

patří isoflavony (např. genistein, equol, daidzein, biochanin A), lignany (enterodiol, matairesinol), kumestany (kumestrol), laktony, steroly a naringeniny (Kujalová a kol., 2007).

Tyto látky jsou přítomny v mnoha druzích rostlin. V České republice se fytoestrogeny v přírodě vyskytují nejvíce v červeném (lučním) jeteli a vojtěšce v době květu a jejich naklíčených semenech, dále v různých druzích ploštičniku, červené vinné révě, obilninách, jahodách, rybízu nebo česneku (Kaprál a Fajt, 2003).

Mezi nejznámější zdroje bohaté na fytoestrogeny se řadí sojové boby, které obsahují isoflavony, což jsou nejčastěji se vyskytující fytoestrogeny. Zejména se v bobech jedná o genistein (kterému bude věnovaná samostatná kapitola této práce), daidzen (a jejich glukosidy genistin a daidzin) a v malém množství se zde vyskytuje glycitein.

Tyto fytoestrogeny se vyznačují smíšenou estrogenní a antiestrogenní aktivitou, a to v závislosti na cílové tkáni. Rozdíl v těchto aktivitách je způsoben také tím, že sójové fytoestrogeny mají vyšší afinitu k β -estrogennímu receptoru, než-li k α -receptoru (Speroff a kol., 1999).

Například relativní estrogenní účinnost genisteinu je na β -receptoru 30x vyšší než na α -receptoru (Cederroth a kol., 2012).

Fytoestrogeny se do těla živočichů dostávají z potravy při její fermentaci střevními bakteriemi. Dochází k jejich přeměně na rozpustnější struktury a k následnému vstřebání s ostatními složkami potravy. Střevní mikroflóra se různí u jednotlivých živočichů a liší se tím tedy i schopnost vstřebávání jednotlivých fytoestrogenů (Hampl a Lapčík, 1996).

Obecně je působení fytoestrogenů na lidský organismus hodnoceno pozitivně. Přisuzují se jim preventivní účinky proti rakovině, antioxidační efekt, kardioprotektivní vlastnosti, ochranné účinky před osteoporózou apod.

Proto je na místě zvýšená pozornost např. v případě výzkumu karcinogenity, kde by fytoestrogeny mohly ovlivnit výsledky těchto prací, protože sójová mouka je součástí krmných diet nejen u hospodářských zvířat, kde by mohl výskyt genisteinu ovlivnit reprodukci, ale také je součástí diet pro zvířata laboratorní (Cardoso a Báó, 2007).

Při konzumaci přiměřeného množství potravin bohatých na fytoestrogeny se není třeba obávat odezvy organismu na estrogenní stimulaci, protože fytoestrogeny disponují relativně nízkou estrogenní aktivitou (cca 1000 krát menší než je aktivita estradiolu), obecně jsou rozpustnější než ostatní látky s estrogenním účinkem a nekumulují se ve tkáních (Kujalová a kol., 2007). Ovšem ono přiměřené množství je druhově odlišné a v některých případech může i jejich relativně nízká estrogenní aktivita účinně působit v organismu (Kaprál a Fajt, 2003).

První pozorování fytoestrogenního vlivu na reprodukci bylo pozorováno u ovcí již v roce 1940, kdy bylo zjištěno, že ovce pasoucí se na pastvině s hojným výskytem jetele lučního, trpí syndromem neplodnosti. Tyto ovce byly vystaveny vysoké hladině formononetinu, což je isoflavon přítomný v jeteli (Cederroth a kol., 2012). Tento syndrom se označuje jako tzv. jetelová nemoc a má za následek nezabřezávání či aborty s návratem do přetrvávající říje u ovcí a snížení plodnosti u beranů (Lapčík a Stárka, 2004).

Nicméně například ovlivnění plodnosti nebylo zjištěno u krav, klisen ani u lidí (Kaprál a Fajt, 2003).

Další skupinou exogenních estrogenů jsou mykoestrogeny, které patří do skupiny mykotoxinů, což jsou sekundární metabolity produkované vláknitými houbami, a jsou obecně považovány za toxické látky. Tyto metabolity nemají zjevnou funkci pro normální metabolismus hub. Jejich produkce je zahájena zejména, i když ne výlučně, v čase, kdy houba dosáhne své zralosti. Často se vyskytují v produktech, jako jsou ořechy, kukuřice, rýže či obiloviny, které jsou kontaminovány na poli při sklizni nebo během skladování (Bezerra da Rocha a kol., 2014). Mykotoxiny se většinou v plodinách nevyskytují samostatně, ale spíše naopak. Analýzy pro výskyt toxinů prokazují, že například pšenice či kukuřice je ze 75 % kontaminována více než jedním mykotoxinem, a 42 % vzorků (pšenice, kukuřice, sója, ječmen a rýže) je kontaminováno dvěma a více mykotoxiny (Wang a kol., 2014).

K expozici mykotoxinům dochází tedy buď přímo příjmem kontaminovaných produktů, anebo také nepřímo, a to prostřednictvím konzumace produktů živočišného původu (mléko, vejce apod.). Některé studie totiž dokazují, že mykotoxiny přítomné v kontaminovaném krmivu mohou procházet přes bачor krávy a dostat se tak až do mléka. Nejvíce je v mléce sledovaný aflatoxin M1, pro který je Evropskou unií stanovený limit, ovšem studie potvrzují přítomnost i dalších mykotoxinů, pro které limity stanoveny nejsou. Jedná například o jiné aflatoxiny, fumonisin B1, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenon a jeho deriváty (Flores-Flores a kol., 2015).

Toxikogenní druhy hub se vyskytují ve všech hlavních taxonomických skupinách hub. Nejznámější jsou však metabolické produkty jen některých rodů, jako například rodu *Aspergillus* (aflatoxin, ochratoxin, patulin, aj.), *Penicillium* (kyselina penicilinová, citrilin, aj.) či *Fusarium* (T-2toxin, zearalenon, deoxynivalenol, nivalenol aj.). Různé kmeny jednoho druhu hub mohou produkovat více než jeden typ mykotoxinu, ale některé kmeny toxikogenních druhů nemusí mykotoxiny produkovat vůbec (Betina, 1990).

Vzhledem k tomu, že se mykotoxiny vyskytují zpravidla ve směsích, je obtížné předem určit jejich účinky. Této důležité problematice se stále věnují toxikologické studie, které zkoumají vzájemné interakce mykotoxinů a zkoumají, jestli jejich společný výskyt vede k antagonismu či synergii (Wang a kol., 2014).

Účinky jednotlivých mykotoxinů jsou různé a liší se dále druhovou vnímavostí živočicha. Sledovat potom lze účinky cytotoxické, neurotoxické, imunosupresivní, teratogenní, mutagenní, karcinogenní, kancerostatické či právě estrogení.

Příkladem těchto tzv. mykoestrogenů je zearalenon a s ním jeho deriváty α -zearalenol a β -zearalenol. Největší estrogení účinky projevuje z těchto mykotoxinů alfa-zearalenol, zatímco původní zearalenon má účinky nižší a srovnatelné s beta-zearalenolem (Filannino a kol., 2011).

Zearalenon je toxin produkovaný plísněmi *Fusarium*. Klasifikace zearalenonu jako toxin je někdy považována jako nevhodný, protože i když se jedná o biologicky aktivní látku, je zřídka kdy toxický.

Svoji chemickou strukturou se zearalenon a jeho deriváty podobají 17- β -estradiolu (Bezerra da Rocha a kol., 2014). Tato vlastnost je považována za příčinu jejich schopnosti vyvolávat estrogení reakce. Samotný 17- β -estradiol ovšem nepůsobí stejně. Například při inkubaci se spermii nezpůsobuje předčasnou akrozomální reakci, zatímco alfa- i beta-zearalenol jí způsobí (Filannino a kol., 2011).

Zearalenon se také někdy používá jako růstový hormon pro hospodářská zvířata – nikoli však v Evropské unii, kde je toto využití zakázáno (Kujalová a kol., 2007; Flores-Flores a kol., 2015).

Derivát tohoto mykoestrogenu alfa-zearalenol byl součástí pokusu k této práci, a proto mu bude věnován bližší pohled.

Zearalenol

Alfa-zearalenol je účinný metabolit mykotoxinu zearalenonu, který má, jak bylo řečeno, estrogenizační účinky. Jedná se tedy o estrogenní mykotoxin produkovaný hlavně plísní *Fusarium roseum* (Svobodová a kol., 2008). Mezi další producenty tohoto mykotoxinu patří např. *Fusarium graminearum*, *F. nivale*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. lateritium*, *F. culmorum*, *F. equiseti* či *F. solani* (Betina, 1990).

Zearalenon a jeho deriváty mají strukturní podobnost s 17β -estradiolem, a proto po vazbě s estrogenními receptory vyvolávají hormonální odezvu nebo narušují aktivitu endogenních estrogenů (Benzoni a kol., 2008).

K tvorbě tohoto toxinu dochází převážně před sklizní a jeho tvorbu podporuje vysoká vlhkost a střídající se vysoké a nízké teploty. Tento toxin je stabilní ve vnějším prostředí (Svobodová a kol., 2008). Výskyt zearalenolu v sadbě je téměř vždy spojen s ostatními fusariovými mykotoxiny, jako jsou například trichotheceny a fumonisiny (Havránková a Ovesná, 2012).

Fusárie kolonizují nejčastěji sadby kukuřice, ječmene, ovsu, pšenice a čiroku (Betina, 1990), a jejich následným zkrmováním se tedy produkty těchto hub dostávají do organismu živočichů.

Zearalenon je dobře a rychle vstřebatelný v gastrointestinálním traktu. V játrech je metabolizován pomocí 3- α (β)-hydroxysteroidní dehydrogenázy na alfa- a beta-zearalenol. Zearalenon a jeho metabolity jsou potom konjugovány glukuronidy a sírany (Benzoni a kol., 2008). Produkty této konjugace jsou vylučovány močí a výkaly. Koncentrace těchto látek v moči a výkalech jsou závislé na dávce tohoto toxinu a nejsou obvykle detekovatelné dříve než za dva týdny po příjmu toxinu.

V organismu působí mykotoxin stejně jako endogenní estrogen, který vzhledem ke své struktuře podobné estradiolu aktivuje estrogenní receptory ve tkáních pohlavních orgánů, což je základem pro rozvoj příznaků estrogenismu. Následkem estrogenní zpětné vazby na podvěsek mozkový dochází ke snížení plazmatických koncentrací FSH, a tím například k inhibici zrání folikulů a ovulace (Svobodová a kol., 2008).

Kromě estrogenní aktivity vykazuje tento mykotoxin účinky hepatotoxické, cytotoxické, imunotoxické, hematotoxické a genotoxické. Zearalenon byl také klasifikován jako karcinogen. Navíc je jaterní metabolizací vzniklý α -zearalenol třikrát až čtyřikrát estrogenně účinnější než původní zearalenon (Wang a kol., 2014).

Mezi nejcitlivější známý druh vůči tomuto toxinu patří prase (Benzoni a kol., 2008). U prasnic způsobují dávky 3-5 mg/kg krmiva infertilitu, dávky 20 mg/kg krmiva přijímaného po zapuštění narušují implantaci a způsobují embryonální odúmrtí. Zearalenol přechází do mléka prasnic a přispívá tak k estrogennímu působení na selata (zvětšení dělohy, otok pochvy a struků, nekróza struků, edematózní infiltrace na břicho aj).

U mladých kanců způsobují dostatečně vysoké dávky v krmivu atrofii varlat, snížení libida a také zhoršení kvality semene. Dále při podání těchto mykotoxinů můžeme pozorovat otoky prepucia, zvětšení mléčné žlázy a snížení libida. Kvalita semene je negativně ovlivněna při dávkách nad 30 mg/kg krmiva (Svobodová a kol., 2008).

Každý z fusariových mykotoxinů ovlivňuje pravděpodobně určitou funkci spermatických buněk. Hlavní metabolit zearalenonu u prasat α -zearalenol prokazuje větší aktivitu v denuraci chromatinu spermií. Zearalenon ovlivňuje i v nízkých koncentracích zejména životaschopnost spermií. Zatímco β -zearalenol ovlivňuje výhradně parametry motility (Benzoni a kol., 2008).

Starší kanci zůstávají neovlivnění do množství 200 mg/kg v krmivu. Po odstranění kontaminovaného krmiva dochází obvykle k vymizení nepříznivých účinků a obnově normálních reprodukčních funkcí u obou pohlaví (Svobodová a kol., 2008).

Vliv alfa-zearalenolu na motilitu spermií byl také prokázán například u hřebců, zejména s ohledem na snížení procentuálního zastoupení spermií s progresivním pohybem, zatímco beta-zearalenol a zearalenon jen snižovaly průměrnou rychlost spermií po dráze, ale neměnily způsob pohybu. Alfa- i beta-zearalenol dále vyvolal předčasnou akrozomální reakci, zatímco zearalenon nikoliv. V této studii došlo k ovlivnění motility po dvou hodinách inkubace u všech tří mykotoxinových kontaminantů pouze v nejvyšší testované koncentraci (0,1 mM) (Filannino a kol., 2011).

Genistein

Genistein patří mezi fytoestrogeny, tedy přirozeně se vyskytující složky rostlin, které vyvolávají u živočichů účinky podobné estrogenům. Nejbohatší potravinové zdroje této látky jsou luštěniny, obilí a nejznámější je sója, kde je genistein jednou z hlavních bioaktivních látek.

V rostlinách se hladiny fytoestrogenů, a isoflavonů obecně, mění v závislosti na prostředí, kdy stres (např. nedostatek vody či živin) působí na jejich produkci stimulačně a rostlinu chrání. Tyto rostlinné látky potom mohou poskytnout varování o zhoršení životních podmínek také například savcům, kteří tak mohou zahájit obranou reakci ještě v době, kdy jsou podmínky stále příznivé (Cederroth a Nef, 2009), a zahájit například migraci za pastvou. Takto vzniklé isoflavony mohou také poskytovat zdravotní výhody svým konzumentům a Cederroth a Nef (2009) ve své studii dodávají, že genistein a daidzein zprostředkovávají většinou svých biologických účinků modulaci savčích enzymů a receptorových drah, které jsou zapotřebí při reakci na stresové situace.

Tento jev se nazývá hormeze, která je definována jako aplikace potenciálně škodlivého faktoru v nízkých dávkách na živé organismy, jejímž důsledkem je vyvolání odezvy na stres (Shama a Andlerson, 2005), a funguje tedy svým způsobem jako očkování.

Obsah genisteinu a ostatních isoflavonů v sóje i dalších rostlinách je velmi variabilní v závislosti na odrůdě, podmínkách prostředí a vegetačním období (Jefferson a kol., 2007). Například v sóje byly pozorovány až trojnásobné změny v celkovém obsahu isoflavonů u stejného kultivaru, v závislosti na různých geografických podmínkách, kde docházelo k rozdílu v kolísání teplot, světelných podmínkách, sucha, živin v půdě a výskytu škůdců (Cederroth a Nef, 2009).

V případě využití sóji (či dalších vikvovitých rostlin, nebo např. jetele lučního) v krmné dávce zvířat nebo potravě lidí, může tedy docházet k dotování organismu pravidelnými dávkami isoflavonů, mezi které genistein patří. Epidemiologická a experimentální data ukazují, že konzumace těchto rostlin může chránit lidský organismus před kardiovaskulárními onemocněními a snížit rizika rakoviny prsu, prostaty či endometria. Pro zvířata se běžně používá sójová mouka jako komerčně dostupný zdroj bílkovin a jsou tedy neustále vystavena hormonálně aktivním látkám v ní obsažených. Proto jsou účinky isoflavonů u zvířat hojně zkoumány, a tyto studie jsou zaměřeny zejména na potenciální nepříznivé účinky na reprodukční trakt a chování zvířat (Cardoso a Bão, 2007).

Jak bylo zmíněno, genistein soutěží s endogenními estrogény o vazbu na estrogenní receptor, a jeho afinita je při tom výrazně silnější k receptoru β nežli k α -receptoru.

Genistein ovšem může ovlivňovat organismus i prostřednictvím jiných mechanismů, než je vazba na receptor a to včetně inhibice enzymů (aromatázy, tyrosin kinázy a DNA topoizomerázy), dále zvýšením syntézy SHBG (globulin vázající pohlavní hormony) a také antioxidantů (Nagao a kol., 2001).

Tak jako ostatní fytoestrogeny se genistein do těla živočichů dostává z potravy při její fermentaci střevními bakteriemi. Ve střevech dochází k jeho přeměně na rozpustnější struktury a následnému vstřebání s ostatními složkami potravy (Hampl a Lapčík, 1996).

Metabolismus isoflavonů je poměrně složitý (Cederroth a Nef, 2009). Střevní bakteriální β -glukosidázy zajišťují konverzi biologicky neaktivních β -D-glukosidů – genistinu a s ním se v sóje vyskytujícího daizinu – na aktivní aglykony – genistein a daidzein a právě pouze až tyto látky mohou být vstřebány ve střevech (Cederroth a kol., 2001).

Daidzein může být dále metabolizován na equol a O-demetyangolensin, a genisten na p-ethyl fenol, a právě tyto látky jsou hlavními isoflavony cirkulující v krvi a moči většiny zvířat i lidí. U hlodavců je hlavním cirkulujícím metabolitem equol, který u nich představuje až 70-90% všech cirkulujících isoflavonů. Oproti hlodavcům je například pouze 30% lidí schopno daidzein metabolizovat na equol (Cederroth a Nef, 2009). Tyto rozdíly v metabolismu mohou in vivo způsobovat odlišné výsledky v reakcích organismu na podání isoflavonů, protože není dostatečně prozkoumán jejich vzájemný účinek.

Samotný genistein je podle Merck indexu prakticky nerozpustný ve vodě a v biofarmaceutickém klasifikačním systému se řadí do IV.třídy (nízká rozpustnost a propustnost). Proto je ve fyziologických podmínkách a při standardním pH střev málo vstřebatelný, což omezuje jeho biologickou dostupnost z potravy (Wang a kol., 2015).

Střevní mikroflóra se různí u jednotlivých živočichů a liší se tím tedy i schopnost vstřebávání jednotlivých fytoestrogenů (Hampl a Lapčík, 1996).

Nežádoucí účinky fytoestrogenů na reprodukci jsou známy řadu let – již zmíněný syndrom jetelové nemoci u ovcí. Ovšem další výzkumy ukazují, že poruchy se vyskytují napříč různými druhy živočichů.

Například i u gepardů v zajetí, kteří vykazovali sníženou plodnost v době, kdy byli krmeni stravou na sójové bázi. Po nahrazení sójové bílkoviny za bílkovinu kuřecí došlo k obnovení normálních reprodukčních funkcí (Jefferson a kol., 2007).

Stejně jako u ostatních xenoestrogenních látek, jsou tedy i účinky genisteinu předmětem hojného výzkumu. Nejčastěji se prověřuje jeho negativní vliv na reprodukční zdraví nebo naopak pozitiva jako například prevence nádorů.

U lidí i zvířat některá experimentální data například ukazují, že konzumace stravy, která je bohatá na isoflavony, mezi které genistein patří, může snížit riziko rakoviny prsu, prostaty a dalších tkání.

Genistein se pokusně také jevil jako silný inhibitor tyrosin kinázy, která moduluje diferenciaci tkání, proliferaci buněk a růst a vývoj neoplazií v různých cílových tkáních. Tyto studie byly zaměřeny sice na genistein, ale je pravděpodobné, že preventivní účinnosti vůči rakovině se dosahuje spíše směsí sójových isoflavonů, nežli samostatně izolovaným genisteinem (Faqi a kol., 2004).

Účinky genisteinu také závisí na věku, ve kterém je pacient jeho vlivu vystaven. Například u potkanů byla studována indukovaná rakovina mléčné žlázy. Pokud byly samice vystaveny genisteinu v době před pubertou, tak bylo rozvoji rakoviny zabráněno. Ovšem při aplikaci genisteinu v prenatálním období se rakovina rozvinula (Jefferson a kol., 2007).

Ve studii, zaměřené na neonatální vliv genisteinu na reprodukční poruchy u potkanů, bylo například zjištěno, že u samic potkana došlo k dysfunkci postpubertálních reprodukčních schopností, ale u samců k žádným významným změnám nedošlo. Je také pravděpodobné, že časné neonatální vystavení potkanů genisteinu vede k narušení estrálního cyklu samic v dospělosti.

V pokusu byl genistein podáván perorálně v dávkách 12.5, 25, 50 a 100 mg/kg a byl zkoumán jeho následný vliv v pubertě. Oproti kontrole byla hmotnost jak samic, tak samců nižší. Plodnost samic byla narušena při nejvyšších dávkách, ovšem u samců nebyla ani při těchto dávkách fertilita ovlivněna. Rovněž nebyly oproti kontrole patrné změny v počtu spermií ani v koncentracích testosteronu. U samic byly dále prokazatelné histopatologické změny na vaječnicích a v děloze, ovšem u samců opět nebyly žádné změny potvrzeny (Nagao a kol., 2001).

Cílem jiné studie bylo zjistit, jaký má vliv dlouhodobá konzumace sóji nebo sójových isoflavonů na reprodukční trakt samců králíků. Porovnávány byly morfologické změny reprodukčních orgánů, kvalita spermatu, věk nástupu puberty a sexuálního chování králíků. Výsledky práce ale neprokázaly významné odlišnosti od kontrolní skupiny. A závěrem tedy bylo, že dlouhodobý příjem sóji nemá u samců králíků žádné negativní dopady na reprodukci (Cardoso a Báó, 2007).

V další studii bylo prokázáno, že nízká koncentrace genisteinu způsobila urychlení kapacitace a ztrátu akrozomu u lidských spermií in vitro (Cederroth a kol., 2001).

Kapacitace spermií zahrnuje fyziologické změny, které musí spermie prodělat v samičí reprodukční soustavě – či in vitro a získá tak schopnost proniknout a oplodnit oocyt. V tomto složitém procesu dochází ke změnám koncentrací vápníku, fosforylaci proteinů a změnám na membráně spermie (Ded a kol., 2010).

Významná změna postihuje také akrozom, ve kterém se utvoří kanálky pro uvolnění hyaluronidázy a proteolytických enzymů. Tyto látky jsou nezbytné pro oplození oocytu (Reece, 1998) a uvolní se při navázání na zonu pellucidu.

Pokud ovšem k této reakci dojde in vivo vlivem genisteinu předčasně, mohla by vést ke zvýšení počtu spermií, které nejsou schopné oplodnit oocyt. Dřívější ztráta akrozomu totiž způsobuje neschopnost spermie navázat se na zonu pellucidu oocytu, a právě tato vazba je podmínkou úspěšného oplození (Cederroth a kol., 2001).

Také pro posouzení teratogenní a fetální toxicity bylo provedeno několik studií. Při testování in vitro na potkaních embryích byly použity dávky genisteinu v koncentracích v rozmezí od 1 do 100 $\mu\text{g/ml}$. V dávkách od 10 $\mu\text{g/ml}$ a více byly pozorovány malformace u všech embryí. Oproti tomu ovšem při dvou studiích in vivo, při aplikaci genisteinu orálně, nebyly teratogenní účinky prokázány. V těchto studiích byl genistein podáván denně v dávkách 0, 5, 50, 100 a 500 mg, nebo 0, 20, 150 a 1000 mg/kg hmotnosti březí samice. Při nejvyšší dávce byly pozorovány toxické účinky na samici, které vedly ke snížení hmotnosti mláďat a jejich zvýšené úmrtnosti, ale nebyly zaznamenány žádné malformace, pouze drobné skeletální změny. Tyto studie vedly k závěru, že genistein nemá teratogenní potenciál in vivo, ale vzhledem k toxicitě pro březí samice se považuje denní dávka od 100 mg/kg jako nepříznivá pro vývoj embryí (McClain a kol., 2007).

Genistein rovněž vykazuje rozdílné účinky v závislosti na přítomnosti fyziologických hladin estradiolu. V pokusu, kde byly sledovány buněčné linie v přítomnosti 1 nM estradiolu, což je fyziologická hladina u žen v plodném věku, působil genistein na buňky anti-estrogenně. Zatímco při hladině estradiolu 0,01 nM, což je hladina vyskytující se u žen v menopauze, fungoval genistein jako aditivní agonista (Hwang a kol., 2006).

Výzkum působení genisteinu také přinesl zjištění, že kombinace genisteinu s jinými endokrinními disruptory (= exogenní látky, které napodobují hormony a narušují hormonální funkce) způsobuje zvýšení negativního vlivu na spermie.

To poukazuje na důležitost testování různých směsí xenoestrogenních látek, protože je pravděpodobné, že zvířata, stejně jako lidé, jsou přirozeně vystavována více než jedné této estrogenní látce (Fraser a kol., 2006).

3.1.3. Mechanismus působení

Aby mohlo dojít k reakci tkáně na estrogenní stimulaci, je nezbytná přítomnost charakteristického receptoru pro tento hormon v cílových buňkách, který umožní spuštění buněčné odezvy.

Jelikož jsou estrogeny látky lipofilní, mohou snadno difundovat skrze plazmatickou membránu do buněčné cytoplazmy, a proto se jejich receptory nachází uvnitř buňky. Estrogen se tedy naváže na tento specifický receptor, čímž vznikne vazba, která následně může zahájit regulaci aktivity enzymů.

Tyto estrogenní receptory jsou genově regulační proteiny, které se nacházejí v buňce v neaktivním stavu. Při navázání hormonů na receptory se změní jejich konformace, která následně umožní vazbu na odpovídající sekvenci v DNA, což vede k zahájení či inhibici transkripce vybraného souboru genů (Alberts a kol., 2005).

Samotný biologický efekt estrogenu je zprostředkovaný dvěma známými isoformami estrogenového receptoru – estrogenovým receptorem alfa a beta (Acconcia and Kumar, 2005).

U lidí tyto isoformy kontrolují klíčové fyziologické funkce u různých orgánových systémů, jako je reprodukční, kosterní, kardiovaskulární či centrální nervová soustava, a také u specifických útvarů, jako je rakovinná tkáň prsu, varlete či nadvarlete (Paterni a kol., 2014).

Tyto dvě isoformy se liší svým prostorovým uspořádáním, dále geny, kterými jsou kódovány a liší se i molekulární hmotností – u člověka má receptor alfa hmotnost okolo 66 kDa, zatímco beta zhruba 54 kDa.

Nejvýznamnější rozdíly, spočívají v selektivní tkáňové expresi těchto dvou receptorů, které určují odlišnou aktivitu estrogenů v jednotlivých tkáních (Luconi a kol., 2002).

Estrogenní receptor alfa je přítomen především v mléčné žláze, děloze, vaječnicích (buňky theky), kostech, játrech, tukové tkáni, hypotalamu, hypofýze a v samčích reprodukčních orgánech (varle, nadvarle, prostata – ve výstelce). Tato isoforma má větší vliv na mléčnou žlázu a dělohu, a dále na zachování kosterní rovnováhy a regulaci metabolismu.

Naproti tomu receptor beta se vyskytuje především v epitelu prostaty, tukové tkáni, močovém měchýři, vaječniku (granulózní buňky), tlustém střevě, plicích a imunitním

systemu. Zdá se, že tato isoforma má také hlubší vliv na centrální nervový a imunitní systém. Obecně působí proti receptoru alfa a podporuje hyperproliferační tkáň jako je rakovina prsu či dělohy (Paterni a kol., 2014).

Diferenciální exprese alfa a beta receptorů v organismu je dále komplikována možností způsobit rozdílnou reakci na stejný estrogen ve stejné tkáni, kdy může estradiol na receptoru alfa stimulovat transkripci genu, zatímco na receptoru beta tuto transkripci inhibovat (Speroff a kol., 1999).

Oba tyto receptory se skládají z pěti strukturních domén, mezi které patří aminoterminální doména (A/B-doména), DNA vazebná doména (DBD, C-doména), pantová oblast (D-doména), ligand - hormon vázající doména (LBD, E-doména) a karboxil-terminální doména (F-doména). Domény C a E vykazují mezi receptory alfa i beta vysokou míru homologie (viz tabulka 1), ale A/B, D a F domény jsou odlišné (Hamilton a kol., 2014).

Doména	Homologie receptoru α a β
A/B doména	17,5 %
DNA - vazebná doména	97 %
Pantová oblast	30 %
Ligand - vazebná doména	59,1 %
F-doména	17,9 %

Tabulka 1: Srovnání homologie estrogenových receptorů dle domén (Speroff a kol., 1999)

Estrogenní receptory se vyskytují převážně v jádře buňky a to i bez nutnosti navázání hormonu na tomto receptoru, na rozdíl například od androgenních či kortikoidních hormonů, kde je jaderná absorpce závislá na vazbě s ligandem. Estrogenní receptor tedy neustále kyvadlově difunduje ven z jádra do cytoplasmy odkud je opět rychle transportován zpět. Pokud dojde k narušení tohoto transportu, jsou receptory v cytoplasmě rychle degradovány. Tento transportní proces narušují například antagonisté estrogenů.

Receptor je do navázání estrogenu neaktivním komplexem, který obsahuje řadu proteinů, včetně proteinu tepelného šoku. Tento protein se jeví jako rozhodující pro udržení receptoru v neaktivním stavu a také pro zajištění správné přepravy receptoru přes membránu. Samotný receptor se nemůže navázat na molekulu DNA, dokud nedojde ke spojení se steroidním hormonem, který způsobí uvolnění proteinů tepelného šoku a umožní dimerizaci.

Po navázání hormonu na ligand vazebnou doménu dále dochází ke konformačním změnám. Tato doména obsahuje pro navázání ligandu poměrně velkou dutinu, která je větší

než molekula estradiolu a umožňuje tak přijetí velkého množství různých ligandů. Na stejném vazebném místě se tedy váže jak estradiol, tak raloxifen či tamoxifen, ovšem výsledný konformační tvar je u každého ligandu mírně odlišný. Tento nově vzniklý tvar je důležitým faktorem pro stanovení přesné zprávy přenášené na gen (Speroff a kol., 1999).

Konečnou buněčnou odpovědí po stimulaci cytoplasmatického receptoru estrogenem je tedy proteosyntéza a celý proces nazýváme genomickým. Ovšem buněčná reakce je v tomto případě relativně pomalá, a pohybuje se v řádech hodin (Hamilton a kol., 2014).

Nicméně některé účinky estrogenů jsou zapotřebí okamžitě a proto musí fungovat i nongenomické mechanismy, které zajistí rychlou buněčnou odezvu. Děje se tak přes membránové receptory a mezi takto zprostředkované reakce zahrnujeme změny transportu sodíku a vápníku přes membrány, nervové efekty a některé reakce oocytů a spermií. I tyto membránové receptory se liší pro jednotlivé steroidní hormony a rovněž pro jednotlivé reagující buňky (Speroff a kol., 1999).

Pro studium receptorů lze v současné době díky genovým technologiím například využít model myši, která má narušené geny pro estrogenový receptor α a/nebo β .

Pozorováním bylo zjištěno, že samice s narušenými geny pro receptor α jsou neplodné z důvodu hypoplasmatické dělohy a hyperemických vaječnicků, které jsou bez žlutých tělísek v důsledku přetrvávající stimulace luteinizačním hormonem, která nastává vlivem ztráty negativní zpětné vazby. Mléčná žláza těchto samic se v pubertě nezvětšuje, ale zůstává v původním elementárním stavu. Samci s těmito narušenými geny jsou rovněž neplodní. Vyskytuje se u nich testikulární atrofie a dilatace semenných kanálků, která vede ke snížené spermatogenezi a inaktivním spermiím.

Samice, které nemají funkční gen pro receptor β , vykazují subfertilitu a jejich folikuly nepravidelně ovulují, což vede ke snížení velikostí vrhů. Samci mají plodnost zachovalou beze změn.

V případě vyblokování genu pro oba estrogenové receptory, jsou samice neplodné a samci vykazují dilataci semenných kanálků s nedostatečnou tvorbou spermií. Krom toho mají samice unikátní fenotyp vaječnicků, který se vyznačuje postpubertální transdiferenciací granulóznic buněk na buňky, které ve vaječnicku vytváří kanálky a jejich vlastnosti jsou velice podobné buňkám Sertoliho, které se přirozeně vyskytují pouze ve varlatech (Hamilton a kol., 2014).

3.1.4. Působení estrogenních látek na spermie

Estrogeny mají v samčí reprodukci zásadní roli a jsou nezbytné pro dosažení plodnosti, protože spermatogeneze je částečně pod kontrolou estrogenů (Carreau a kol., 2011a).

Cílené inaktivace genu pro estrogenový receptor α u myších samců způsobuje vážné zhoršení spermatogeneze a dozrávání spermií v nadvarlatech (Balasior a kol., 2001).

Jak již bylo zmíněno, je všeobecně známo, že u samců se estrogeny běžně vytváří v kůře nadledvin a v Leydigových buňkách (Ledvina a kol., 2009).

Toto platí například pro kance, zatímco u hřebce jsou pravděpodobně dalším zdrojem estrogenu také zárodečné buňky.

Ve varlatech hlodavců jsou ovšem estrogeny také vytvářeny nevratnou přeměnou androgenů pomocí aromatázy, která se nachází na endoplasmatickém retikulu u téměř všech typů varlečních buněk. U jelena, bizona a černého medvěda bylo zjištěno, že se aromatáza schopná tvořit estrogeny nachází v somatických a zárodečných buňkách. U člověka produkují estradiol Leydigovy a Sertoliho buňky, a aromatázy jsou také exprimovány v nezralých zárodečných buňkách (Carreau a kol., 2011a). Estrogen, který vzniká v těchto dalších buňkách, ať už se jedná o spermatocyty, buňky zárodečné či somatické, je rovnocenný estrogenu vznikajícímu v Leydigových buňkách (Carreau a kol., 2011b).

U potkanů bylo prokázáno, že estrogeny kontrolují spermatogenezi v oblasti počtu gonocytů a dozrávání spermií. Také bylo zjištěno, že podávání estradiolu podporuje vývoj spermatogonií po ozáření varlat, a stejně tak zvyšuje počet spermatogonií při podání samcům potkanů po narození. Také diferenciaci spermatid je do značné míry pod vlivem estrogenu, zatímco pro elongaci spermatid je nezbytný androgen. Kromě role estrogenů během různých fází spermatogeneze je také předpokládána jejich účast v závěrečné fázi diferenciaci spermií (Carreau a kol., 2011a).

Navíc estradiol a xenoestrogeny v nízkých dávkách stimulují savčí spermie ke kapacitaci, akrozomální reakci a zvyšují fertilizační schopnost in vitro, přičemž účinek xenoestrogenů se jeví jako silnější než účinky endogenního estradiolu.

V současné době je pozitivní i negativní působení xenoestrogenů na spermie hojně zkoumáno (Aquila at De Amicis, 2014) a například studie vlivu isoflavonoidů přináší rozporuplné výsledky.

Zatímco některé zprávy nevykazují nález reprodukčních vad, jiné hlásí variabilní persistentní fenotypové abnormality a poruchy reprodukčního chování. Příkladem může být

snížení hmotnosti varlat a/nebo jejich velikosti, snížení spermatogeneze, snížení hladin FSH a testosteronu, menší genitální vzdálenost či agresivní chování (Cederroth a kol., 2012).

Příkladem může být konkrétní studie zabývající se právě vlivem sójových isoflavonů na varlata a reprodukční funkce myších samců. V této práci bylo zjištěno, že samci, kteří přijímali v krmné dávce sóju, vykazují normální reprodukční chování i plodnost, ale že zároveň došlo ke snížení počtu haploidních zárodečných buněk ve varlatech. S tímto faktem koreluje také 25 % snížení počtu spermií v nadvarleti a 21 % snížení velikosti vrhu. Dále krmení sójovou bílkovinou vedlo ke snížení velikosti semenných váčků, ale bez vlivu na jejich proteolytickou aktivitu (Cederroth a kol., 2010).

Ovšem tyto poruchy byly většinou dočasné po dobu vystavení isoflavonoidům v případě studií na dospělých jedincích. U samců hlodavců jsou výrazné negativní účinky na produkci spermií pozorovány pouze při celoživotní expozici fytoestrogenům (Cederroth a kol., 2012).

Jiná studie zkoumala účinky sójového mléka na samce kosmanů bělovousých. Kosmani byli v neonatálním věku krmeni tímto mlékem a v 6 týdnech věku u nich byla pozorována snížená hladina testosteronu (Sharpe a kol., 2002). Žádné významné účinky na průběh puberty nebo negativní ovlivnění plodnosti v dospělosti nebyly pozorovány u tohoto druhu (Tan a kol., 2006).

Další výzkum u samců potkanů prokázal, že podávání bisfenolu A (syntetický xenoestrogen) způsobuje nárůst poškozené DNA ve spermiích, snížení denní produkce spermií a také snížení jejich motility (Tiwari at Vanage, 2013).

Po měsíčním subkutánním podání estrogenní látky estradiol-benzoát v dávce 40 μg na kg tělesné hmotnosti (3x týdně) sedmi týdenním potkanům bylo zjištěno, že na konci pokusu došlo ke snížení relativní hmotnosti jejich varlat, nadvarlat i semenných váčků ve srovnání s kontrolou. Estradiol-benzoát způsobil toto snížení hmotnosti o 31 % (u kmene Fischer) a 73% (u kmene Wistar). V ocasu nadvarlete nebyly pozorovány téměř žádné spermie u obou pozorovaných kmenů potkanů v tomto pokusu. Dále bylo pozorováno drastické snížení průměru semenných kanálků, retence spermatid a celkově narušené pochody spermatogeneze spolu s atrofiemi semenotvorného epitelu (Hossaini a kol., 2003).

Z rozdílných výsledků v této studii v rámci dvou kmenů potkanů je patrné, že výzkum vlivu estrogenních látek na samčí reprodukční schopnosti je ztížen také rozdílnou vnímavostí nejen u námi sledovaného druhu, nýbrž i kmene. Jak je však ze studie patrné, došlo v obou sledovaných případech po aplikaci estrogenní látky k narušení reprodukčních procesů, ovšem míra negativity se liší dle kmene potkana (Aquila at De Amicis, 2014).

Zearalenon a jeho derivát α -zearalenol ovlivňují také u dospělých myších samců kvalitu spermií, plodnost a dále koncentraci testosteronu v séru. Výsledkem pokusů, při kterých byli myši samci vystaveni působení těchto látek, bylo zjištění zvýšeného počtu morfologicky abnormálních spermií a výrazného snížení počtu živých spermií. Dále byl u těchto samců pozorován snížený výskyt spermií s přítomným akrozomem, snížení tělesné hmotnosti a snížení relativní váhy nadvarlete. Oplozovací schopnost spermií těchto samců byla evidentně narušena, což prokázal výrazný pokles zabřezávání samic po páření s těmito samci a také zvýšené resorpce plodů (Yang a kol., 2007).

U kančů byly rovněž prokázány negativní účinky těchto dvou mykotoxinů na spermie. Pokusně byly zředěné kančí spermie *in vitro* inkubovány jednotlivě se třemi koncentracemi (125, 187.5 a 250 μ M) alfa-zearalenolu a zearalenonu.

Z výsledků bylo prokázáno, že oba kontaminanty, s výjimkou nejnižší koncentrace alfa zearalenolu, výrazně negativně ovlivňují hodnoty parametrů motility, životaschopnost spermií a také způsobují časnou akrozomální reakci. Dále bylo zjištěno, že vliv mykotoxinů je závislý na dávce a době jejich působení, a také že zvyšující se koncentrace kontaminantu zvyšuje pokles hodnot parametrů motility (Tsamakidis a kol., 2006).

Jiná studie také prokazuje, že již malé množství zearalenonu (0,15 μ g/l vody tedy cca 25 ng/kg ž.hm.) významně snižuje koncentrace spermií, a to dokonce téměř o 40 %. V této studii bylo ovšem zjištěno, že nižší koncentrace zearalenonu má na kvalitu spermií větší vliv než dávka vysoká.

Jedním z možných vysvětlení tohoto je fakt, že zearalenon působí na hormonální úrovni, a je známo, že nízká koncentrace hormonů může působit stimulačně, zatímco koncentrace vyšší antagonisticky či dokonce nemusí prokázat žádný účinek (Zatecka a kol., 2014).

U kančích spermií lze pozorovat negativní efekt mykotoxinů s estrogením působením, které ve vysokých dávkách způsobují například narušení akrozomální reakce (Aquila at De Amicis, 2014).

U spermií hřebce došlo po 2 hodinové expozici rovněž k předčasné akrozomální reakci vlivem působení alfa- nebo beta-zearalenolu v koncentraci 0,1 mM. Zatímco kontaminant zearalenon nebo 17- β -estradiol na akrozom vliv neprokázal. Rovněž motilita byla kontaminanty zhoršena u všech vzorků, ale bylo zjištěno, že pouze alfa-zearalenol způsobil procentuální pokles spermií s progresivním pohybem za hlavičkou (Filannino a kol., 2011).

Xenoestrogeny, jak již bylo řečeno, se mohou vázat na estrogení receptory, které jsou přítomny na membráně spermií, stejně jako endogenní estrogeny a mohou zde působit jako

agonisté či jako antagonisté. Reakce spermií je tedy velmi proměnlivá a závisí na přidané látce, jejím množství, koncentraci a celkové době trvání působení této látky (El-Sayed a kol., 2011).

4. Materiál a metody

Pro tento pokus byly používány kančí komerční krátkodobě konzervované inseminační dávky. Tyto byly získány z inseminační stanice kanců Nová ves společností PROAGRO Nymburk a.s. Při transportu a během pokusu před samotnou inkubací byly dávky uloženy v klimaboxu při teplotě 17 °C.

Pro vlastní vyšetření byly vzorky ejakulátu ředěny tekutou frakcí dávky (supernatant), dle experimentální varianty obohacenou o kontaminant rozpuštěný v DMSO: kontrolní vzorek „K“ (bez kontaminace), kontrolní vzorek s DMSO „KD“ (DMSO ředěné supernatantem v poměru 1:24), vzorek „ α -ZOL 2“ (2 μ M α -zearalenolu), vzorek „GEN 2“ (2 μ M genisteinu), vzorek „ α -ZOL 1“ (1 μ M α -zearalenolu), vzorek „GEN 1“ (1 μ M genisteinu), vzorek „ α -ZOL+GEN 1“ (1 μ M α -zearalenolu + 1 μ M genisteinu) a vzorek „ α -ZOL+GEN 0,5“ (0,5 μ M α -zearalenolu + 0,5 μ M genisteinu). Tyto vzorky byly inkubovány v lázni při teplotě 38 °C a hodnoceny po 2 a 4 hodinách.

4.1. Příprava supernatantu

Pro jednotlivé pokusy byl připravován vždy čerstvý supernatant. Jeho příprava spočívá ve stočení dvou eppendorfek s množstvím 1ml ejakulátu dvakrát v centrifuze. Nejprve při rychlosti otáček 1500/s – po uplynutí doby 10 minut se do nových eppendorfek odebere supernatant v množství 750 μ l. Následuje další centrifugace 10 minut při rychlosti otáček 10 000/s. Nakonec se odebere finální supernatant do jedné nové eppendorfky v množství 500 μ l z každé stočené eppendorfky.

Ve výsledku byl tedy získán 1ml supernatantu, který byl využit pro ředění pracovních roztoků kontaminantů.

4.2. Příprava roztoků kontaminantů

Pro samotný pokus byla nutná příprava roztoků kontaminantů, jejichž účinky byly v rámci pokusu hodnoceny.

Zásobní roztok P2 pro genistein i α -zearalenol byl uložen v mrazáku. Pracovní roztok P1 vznikl rozpuštěním 10 μ l P2 v množství 10 μ l DMSO (dimethylsulfoxid).

Finální roztoky vznikly ředěním zásobních roztoků spolu se supernatantem.

V případě obou kontaminantů byl postup ředění obdobný. Roztok F2 vznikl zředěním 5 μ l P2 spolu se 120 μ l supernatantu a jeho výsledná koncentrace byla 2 μ M daného kontaminantu. A roztok F1 vznikl ředěním 5 μ l P1 spolu se 120 μ l supernatantu a jeho výsledná koncentrace byla 1 μ M daného kontaminantu.

Jako třetí finální roztok byl připraven roztok DMSO, který byl využit jako kontrola účinků tohoto ředidla na spermie. Jeho příprava spočívala ve zředění DMSO a supernatantu v poměru 1:24, tedy 5 μ l DMSO se spolu se 120 μ l supernatantu.

4.3. Příprava vlastních vzorků a postup pokusu

Příprava vlastních vzorků pro tento pokus spočívala v rozpipetování inseminační dávky v objemu 955 μ l do jednotlivých eppendorfek, které zůstávaly ve stojanu v klimaboxu.

Následně se postupně vzorek nechal inkubovat (reaktivovat) ve vodní lázni při 38 °C po dobu 4 minut. Po této inkubaci byl vzorek nasnímán systémem CASA a teprve potom se přidal kontaminant dle schématu (tabulka 2).

Vzorek	Kontaminant
α -ZOL 2	50 μ l F2 α -ZOL
GEN 2	50 μ l F2 GEN
α -ZOL 1	50 μ l F1 α -ZOL
GEN 1	50 μ l F1 GEN
α -ZOL + GEN 1	25 μ l F2 α -ZOL + 25 μ l F2 GEN
α -ZOL + GEN 0,5	25 μ l F1 α -ZOL + 25 μ l F1 GEN
KD	50 μ l DMSO (ředěný)

Tabulka 2: Přehled vzorků kontaminantů

Po kontaminaci byl vzorek vrácen do lázně a za stejných podmínek jako při reaktivaci pokračovala inkubace.

Od času přidání kontaminantu bylo po 2 hodinách u každého vzorku provedeno 2. snímání, a následně po 4 hodinách snímání poslední.

Tento postup byl opakován 16 pokusných dní, ale jeden den byl z celkového vyhodnocení vyřazen z důvodu nestandardních výsledků u kontroly v nulté hodině.

4.4. Stanovení motility – systém CASA

Pro objektivní vyhodnocení motility spermií byl využit systém CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Jedná se o poloautomatickou počítačovou metodu.

Pro snímání byl vzorek o objemu cca 5 μ l aplikován na osmi komorové Leja sklíčko, které bylo, stejně jako ostatní pomůcky, vyhřáté na 38 °C. Sklíčko bylo následně umístěno na vyhřevnou destičku stolku mikroskopu a bylo provedeno snímání softwarem NIS-Elements.

Z každého vzorku bylo provedeno snímání šesti video sekvencí o délce 5 sekund.

Pomocí systému CASA byly u spermií stanoveny následující parametry:

- VCL (curvilinear velocity) - rychlost hlavičky na skutečné dráze, průměrná rychlost mezi body měření v μ m/s.
- VAP (average-path velocity) - rychlost hlavičky na napřímené dráze (odvozena matematickou úpravou VCL) a slouží k plynulejšímu vyjádření pohybu.
- VSL (straight-line velocity) - rychlost hlavičky na přímé dráze, mezi výchozím a konečným bodem měření.
- ALH (amplitude of lateral head displacemant) – maximální šířka oscilace hlavičky, odvozena z VLC a VAP, odráží pohyb bičíku.
- WOB (wobble) - stupeň oscilace skutečné dráhy kolem její napřímené dráhy vyjádřený v procentech, vycházející ze vztahu $VAP/VCL \times 100$.
- STR (straightness) - přímost napřímené dráhy v procentech, ze vztahu $VSL/VAP \times 100$

Podle změřených a vypočítaných parametrů jsou spermie rozděleny do jednotlivých kategorií. Jedná se o kategorie spermií s chybou trajektorií, cirkulárním pohybem, nelineárním pohybem, přímočarým pohybem, nepohyblivé, lokálně pohyblivé, pomalé a rychlé (Věžník a kol., 2004).

Tyto kategorie rozlišuje systém CASA pomocí vzorce, kterým určíme limity pro zařazení do dané kategorie. Tyto limity se různí například dle vyšetřovaného živočišného druhu.

Pro pokusy s kancí se v laboratoři využil v systému CASA vzorec tento:

```
=CONCATENATE(KDYŽ(A(20<VAP;Rad<15;WOB<40);"chybná trajektorie";""));"";  
KDYŽ(A(20<VAP;Rad<15;40<WOB);"cirkulární";""));"";  
KDYŽ(A(20<VAP;15<Rad;STR<70);"nelineární";""));"";  
KDYŽ(A(20<VAP;15<Rad;70<STR);"přímočaré ";""));"";  
KDYŽ(VAP<5;"nepohyblivé";  
KDYŽ(VAP<20;"lokálně pohyblivé";  
KDYŽ(VAP<60;"pomalé ";  
KDYŽ(VAP<300;"rychlé ")"))))
```

4.5. HOS test a barvení

Po posledním snímání, tedy po uplynutí 4 hodinové inkubace byl proveden HOS test. Hypoosmotic swelling test = HOS test prokazuje stav membrány stanovením její semipermeability. U intaktních spermií vlivem hypoosmotických podmínek dochází průnikem vody a zvětšováním buněčného objemu ke stáčení bičíků. Stav spermií se dále hodnotil pomocí barvení na „živé-mrtvé“. Jedná se o barvení, které diferencuje vyšetřované spermie na jedince s nenarušenou povrchovou membránou a skupinu spermií se změnami permeability povrchových membrán v důsledku porušené jejich integrity dochází ke změnám interakce s použitým barvivem. (Věžník a kol., 2004).

Hypoosmotický roztok citrátu sodného a fruktózy je uchováván v eppendorfkách (v množství 1 ml) v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Před použitím byly eppendorfky s roztoky rozmrazeny v množství odpovídajícímu počtu vzorků – tedy 7 roztoků.

Pracovní postup byl proveden standardně dle metodiky Věžník a kol, 2004. Tyto roztoky byly tedy následně umístěny do vodní lázně o teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Do nich byly potom jednotlivě přidávány vzorky v množství $100\text{ }\mu\text{l}$, kterým skončila 4 hodinová inkubace, a po jemném promíchání se nechaly inkubovat v lázni dalších 30 minut. Po uplynutí inkubace se ze vzorku odebralo $20\text{ }\mu\text{l}$ na hodinové sklíčko umístěné na vyhřívané ploténce a k němu se následně přidalo $20\text{ }\mu\text{l}$ eosinu. Tento roztok 30 vteřin promíchával a potom se přidalo $2 \times 20\text{ }\mu\text{l}$ nigrosinu. Z takto vzniklého roztoku se odebralo $20\text{ }\mu\text{l}$, a byl proveden nátěr na podložní sklo. Ten byl po zaschnutí vyhodnocován mikroskopicky.

Na nátěru bylo vždy počítáno 200 spermií a rozlišovaly se čtyři kategorie – bílé hlavičky spermie se stočeným bičíkem, bílé hlavičky spermie s rovným bičíkem, červené hlavičky s rovným bičíkem a červené hlavičky se stočeným bičíkem. Přičemž stočený bičík s bílou hlavičkou značí živou spermii a rovný s červenou hlavičkou mrtvou spermii.

Počty jednotlivých spermií v kategorii byly zaznamenány a převedeny na procenta.

4.6. Statistické vyhodnocení dat

Získaná data byla převedena do tabulky programu Microsoft Office Excel a vyhodnocena v programu Statistica CZ, verze 12. Ke statistickému zhodnocení parametrů pohybu byla využita metoda více faktorové analýzy rozptylu ANOVA a pro podrobnější výsledky byl využit post-hoc Schéffeho test. Hladina významnosti byla nastavena na hodnotu $p=1 \times 10^{-6}$.

Pro vyhodnocení HOS testu byla využita metoda jedno faktorové analýzy rozptylu a rovněž Schéffeho test.

4.7. Potřebné laboratorní vybavení a pomůcky

Laboratorní technika:

- Klimabox (Selko Praha s.r.o) - termobox
- MiniSpin (Eppendorf) – centrifuga
- Grant Instruments SUB6 – vodní lázeň
- histologická vyhřívaná ploténka (VD2)
- mikroskop Eclipse E600 (Nikon, Japonsko), vybavený vyhřívací destičkou a objektivem Ph 1 BM 10x s negativním fázovým kontrastem a kamerou Digital Sight DS - 2MBW (Nikon, Japonsko)
- počítač se softwarem NIS - Elements 3.1 (Laboratory Imaging, s. r. o., Praha)

Laboratorní pomůcky:

- sada pipet a jednorázové špičky různých objemů
- mikroskopavky Eppendorf a stojan
- osmikomorová skříčka Leja® (kapacita jedné komůrky 1 μ l, hloubka komůrek 20 μ m)

Chemikálie:

- destilovaná voda
- ethanol
- alfa zearalenol
- genistein
- DMSO - dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich spol. s. r. o.)

5. Výsledky

Po ukončení pokusů bylo statisticky vyhodnoceno působení jednotlivých kontaminantů v 0., 2. a 4. hodině, které se projevilo změnami ve vybraných parametrech pohybu (VCL, VAP, VSL a AHL) a také ve změnách v počtu spermií v jednotlivých kategoriích pohybu (rychlé, pomalé, přímočaré, lokálně pohyblivé a nepohyblivé).

5.1. Parametry pohybu – vyhodnocení motility

V nulté hodině byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v případě parametrů VCL a VAP (viz graf 1 a 2). Jinak byly v čase 0. hodiny hodnoty parametrů i kategorií pohybu bez významných rozdílů.

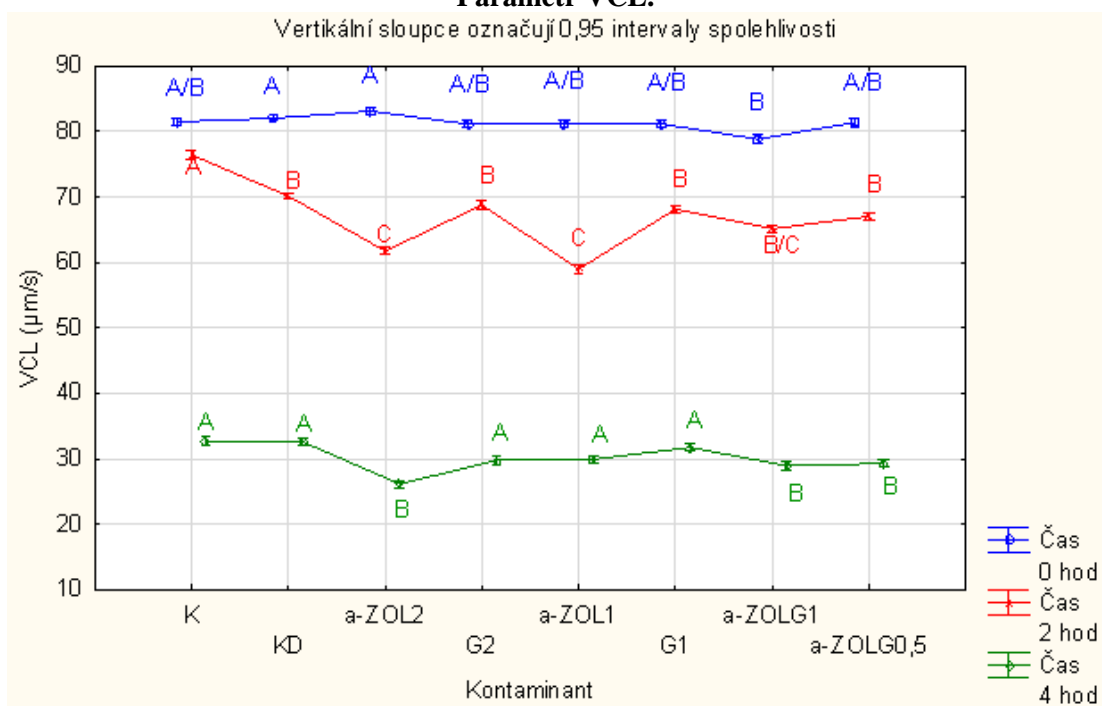
Po dvouhodinové inkubaci byl u většiny případů zaznamenán statisticky významný pokles hodnot parametrů pohybu. Tento pokles nenastal u vzorku K, G2, α -ZOLG1 v parametru VSL, kde vůči nulté hodině ke statisticky významným změnám nedošlo (graf 3). Také v parametru ALH nebyly u kontrolního vzorku v porovnání s nultou hodinou statisticky významné rozdíly a hodnoty dokonce vzrostly (graf 4). Nejvýraznější poklesy hodnot jsou u všech parametrů patrné v případě kontaminace α -zearalenolem (α -ZOL2 a α -ZOL1), kdy vzorek α -ZOL1 vykazuje vůbec největší pokles.

V případě jednotlivých kategorií pohybu došlo k pozvolnému zhoršení oproti nulté hodině. Lze zde pozorovat mírný statisticky nevýznamný nárůst podílu nepohyblivých spermií, a to opět zejména u vzorků α -ZOL2 a α -ZOL1 (graf 9). Dále je u těchto dvou vzorků patrný pokles podílu přímočarých a rychlých spermií (grafy 7 a 5).

Ve srovnání s nultou hodinou došlo po čtyřhodinové inkubaci u všech parametrů i vzorků ke značnému propadu hodnot. Největší pokles lze sledovat u vzorku α -ZOL2 v parametrech VCL a AHL (graf 1 a 4).

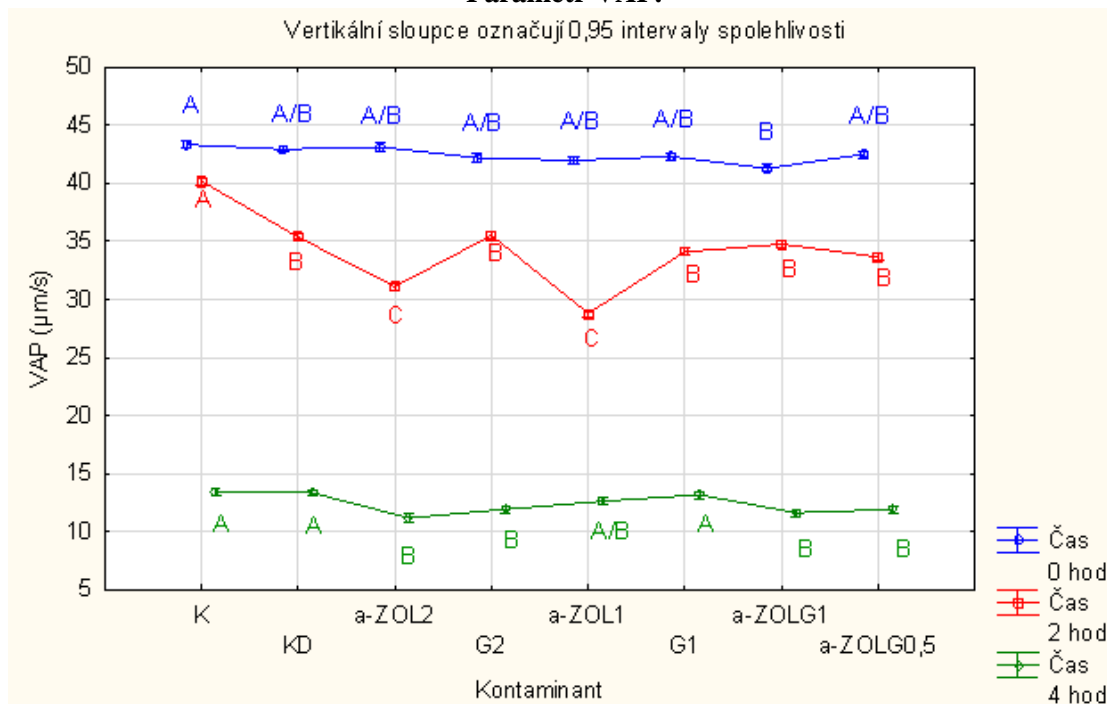
Dle očekávání došlo k výraznému nárůstu podílu nepohyblivých spermií, nejvíce potom u vzorků α -ZOL2 a α -ZOL1 (graf 9). U těchto dvou vzorků je také patrný pokles podílu lokálně pohyblivých spermií (graf 8). Naopak v kategorii přímočarých spermií došlo u těchto vzorků k nárůstu (graf 7). Vůči dvouhodinové inkubaci došlo poklesu podílu rychlých spermií a zároveň k vyrovnání jejich počtu v rámci všech vzorků v dané hodině (graf 5).

Graf 1: Vliv společného působení α -zearalenolu a genisteinu na motilitu kančích spermií. Parametr VCL.



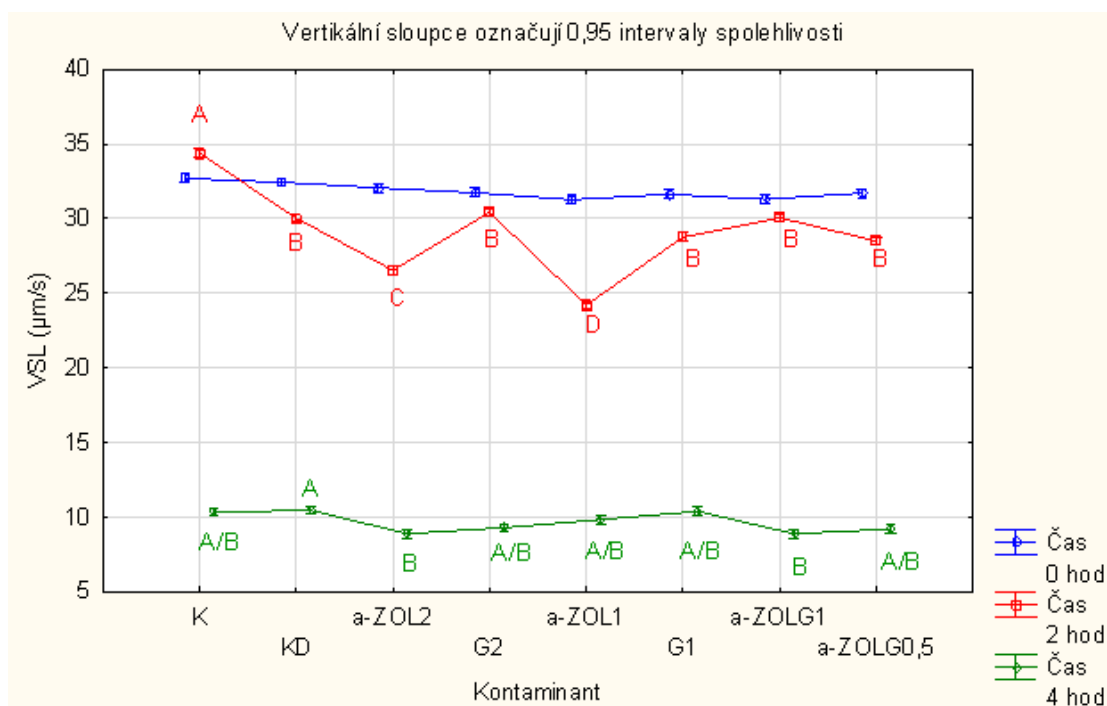
Hodnoty označené různými indexy stejné barvy vykazují statisticky významné rozdíly na hladině významnosti $p < 1 \times 10^{-6}$.

Graf 2: Vliv společného působení α -zearalenolu a genisteinu na motilitu kančích spermií. Parametr VAP.



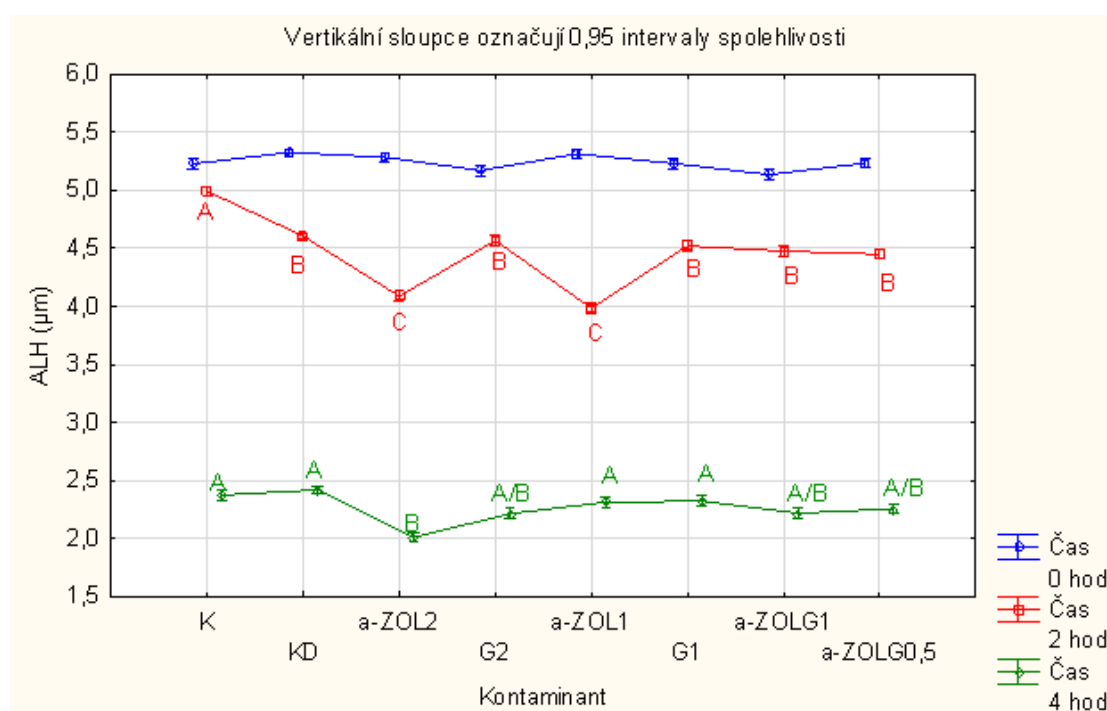
Hodnoty označené různými indexy stejné barvy vykazují statisticky významné rozdíly na hladině významnosti $p < 1 \times 10^{-6}$.

**Graf 3: Vliv společného působení α -zearalenolu a genisteinu na motilitu kančích spermií.
Parametr VSL.**



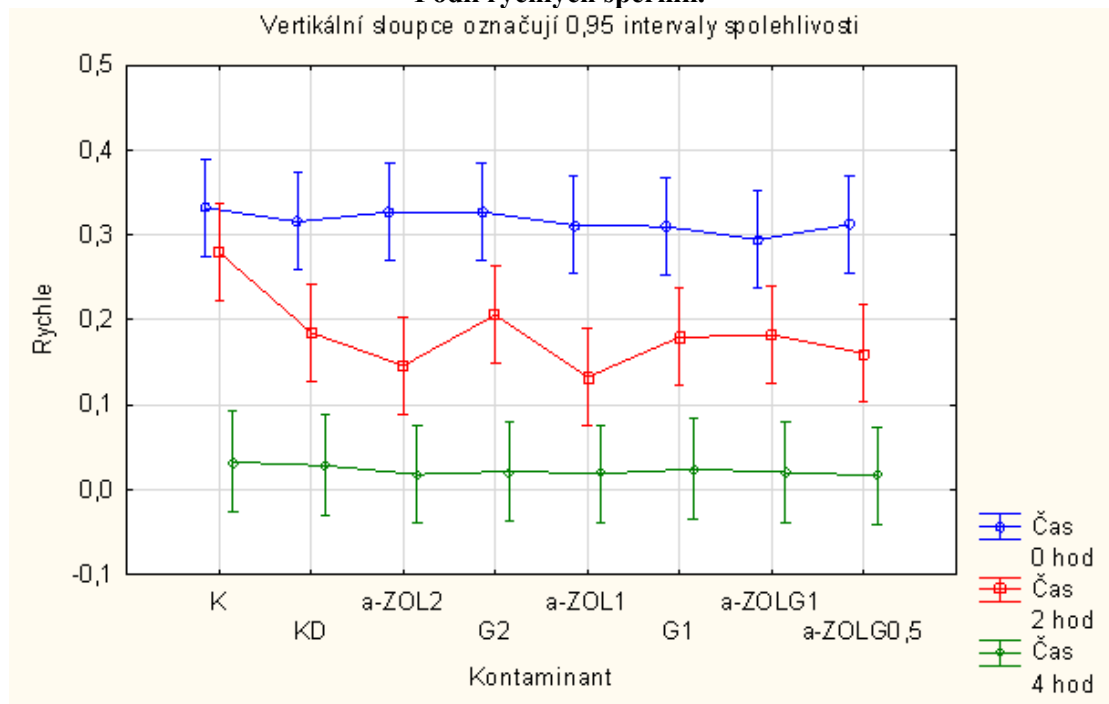
Hodnoty označené různými indexy stejné barvy vykazují statisticky významné rozdíly na hladině významnosti $p < 1 \times 10^{-6}$.

**Graf 4: Vliv společného působení α -zearalenolu a genisteinu na motilitu kančích spermií.
Parametr ALH.**

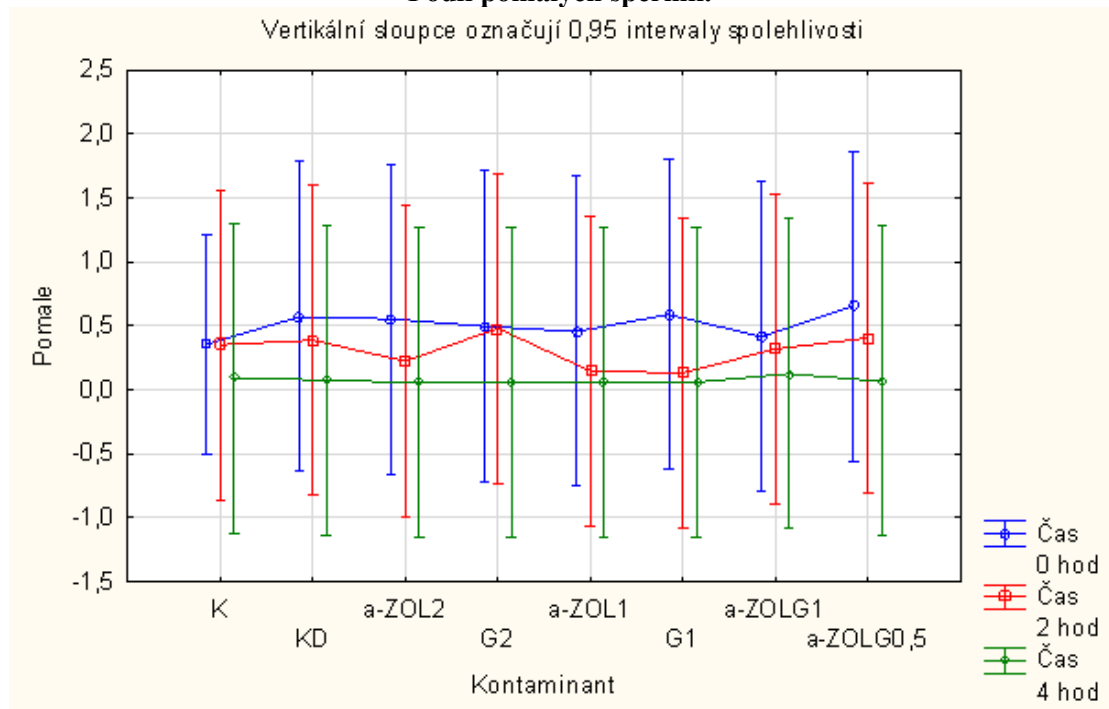


Hodnoty označené různými indexy stejné barvy vykazují statisticky významné rozdíly na hladině významnosti $p < 1 \times 10^{-6}$.

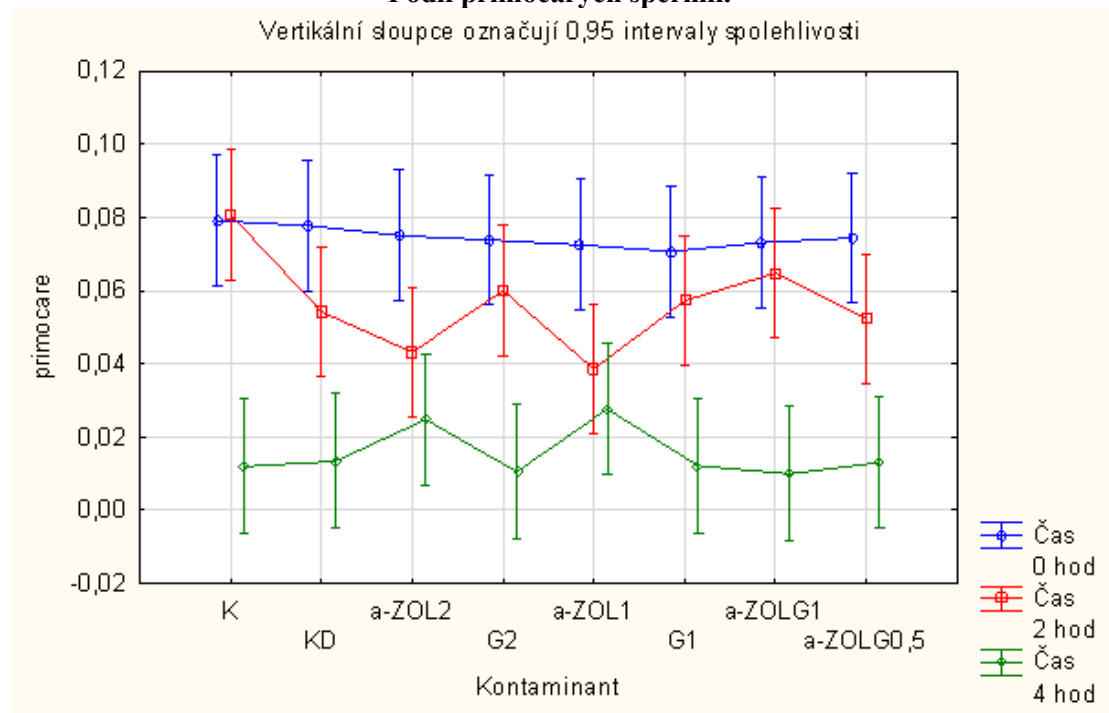
**Graf 5: Vliv společného působení α -zearalenolu a genisteinu na motilitu kančích spermií.
Podíl rychlých spermií.**



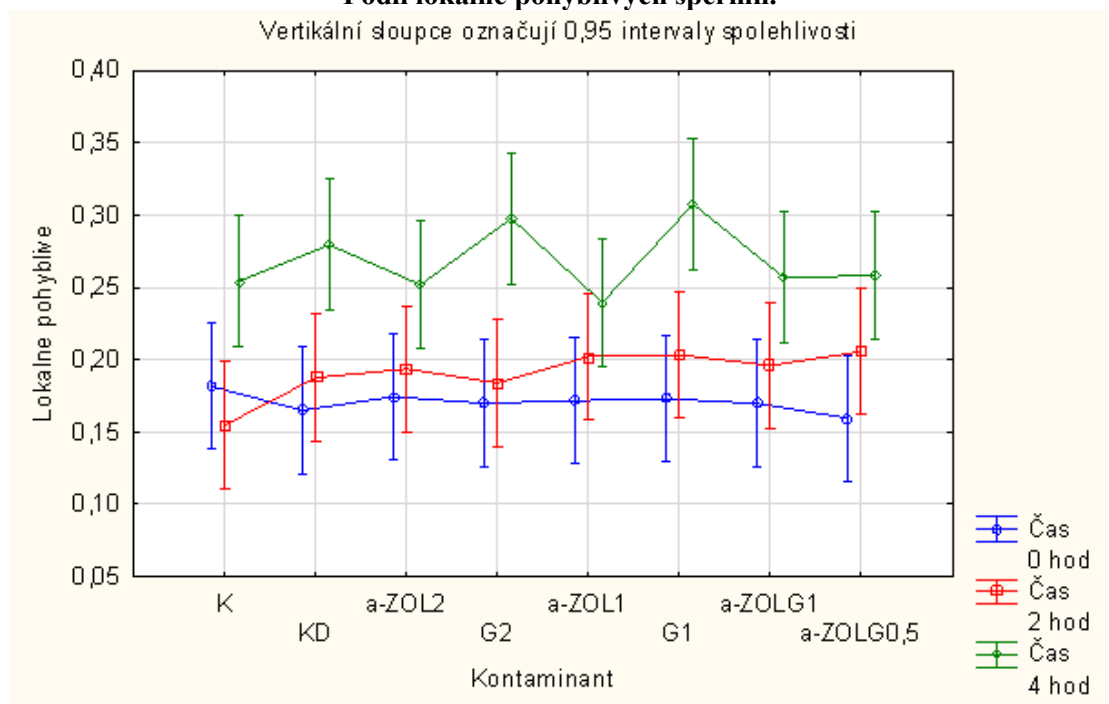
**Graf 6: Vliv společného působení α -zearalenolu a genisteinu na motilitu kančích spermií.
Podíl pomalých spermií.**



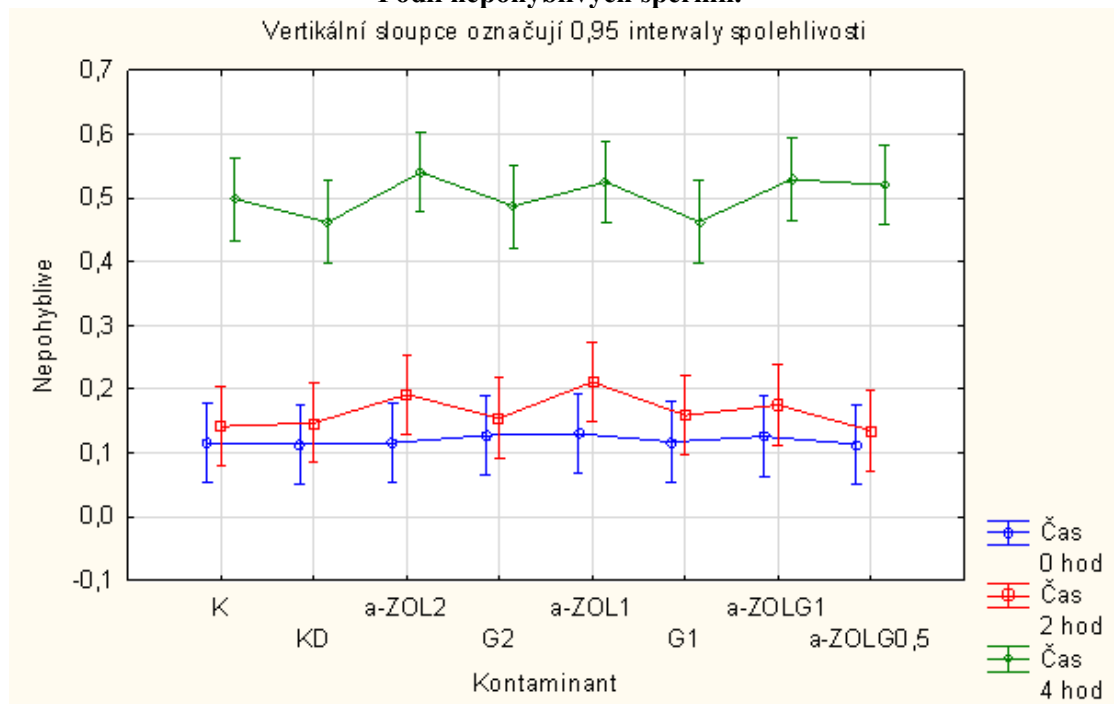
**Graf 7: Vliv společného působení α -zearalenolu a genisteinu na motilitu kančích spermií.
Podíl přímočarých spermií.**



**Graf 8: Vliv společného působení α -zearalenolu a genisteinu na motilitu kančích spermií.
Podíl lokálně pohyblivých spermií.**



**Graf 9: Vliv společného působení α -zearalenolu a genisteinu na motilitu kančích spermií.
Podíl nepohyblivých spermií.**



5.2. Výsledky HOS testu a barvení

V testu na životaschopnost spermií, byly hodnoceny čtyři kategorie – první dvě kategorie byly dané reakcí spermií na hypoosmotické prostředí, a druhé dvě kategorie rozdělovaly živé a mrtvé spermie v rámci HOS testu v kombinaci s následným barvením.

Kategorie určené reakcí v rámci HOS testu, rozdělují spermie dle stavu membrány jejich bičíku, bez ohledu na jejich barvu. Stočený bičík značí, že u něj došlo k reakci na hypoosmotické prostředí a jeho membrána není narušena. Taková spermie je zařazena do kategorie reagujících (graf 10). Rovný bičík potom označuje spermii nereagující (graf 12).

Kategorie spermií dle HOS testu v kombinaci s barvením, odlišují užší skupinu spermií, které splnily podmínky obou technik navzájem, pro rozlišení na živé či mrtvé spermie.

Do kategorie živých spermií v rámci HOS testu s barvením byly tedy zařazeny jen ty, které prokázaly jednak reakci na hypoosmotické prostředí a zároveň u nich nedošlo k reakci s barvivem. Jejich bičík byl tedy stočený a hlavička zůstala bílá (graf 11).

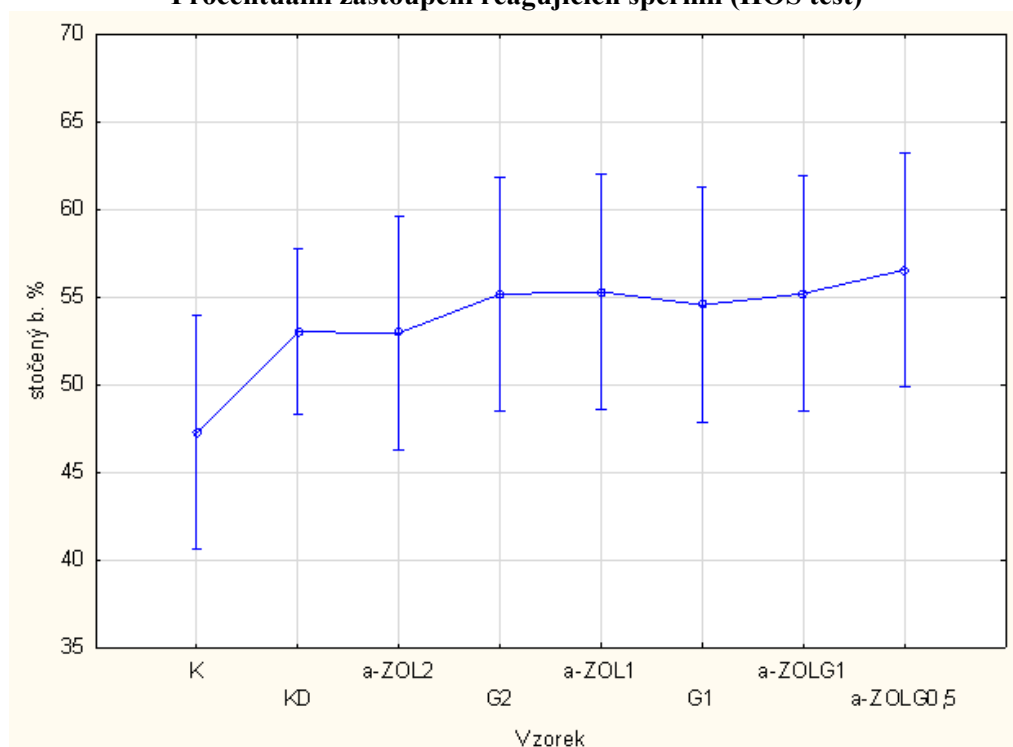
Do kategorie mrtvých byly naopak zařazeny ty spermie, které nereagovaly na hypoosmotické prostředí a zároveň u nich došlo k reakci s barvivem. Jejich bičíky byly tedy rovné a hlavičky červené (graf 13).

Z grafů jsou patrné jen statisticky nevýznamné rozdíly. Jedná se o mírné navýšení procentuálního zastoupení živých spermií u vzorků s kontaminantem ve srovnání s kontrolou. A naopak samozřejmě snížení procentuálního zastoupení mrtvých spermií u vzorků s kontaminantem oproti kontrole. Nejnižší procento živých spermií vykazoval kromě kontroly také vzorek α -ZOL2 v rámci HOS testu v kombinaci s barvením.

Rozdíl mezi procenty reagujících spermií v rámci samotného HOS testu a živých spermií v rámci HOS testu s následným barvením, je pravděpodobně způsoben 30 minutovou inkubací vzorků, během které došlo k rovnoměrnému zvýšení podílu mrtvých spermií, bez ohledu na kontaminant.

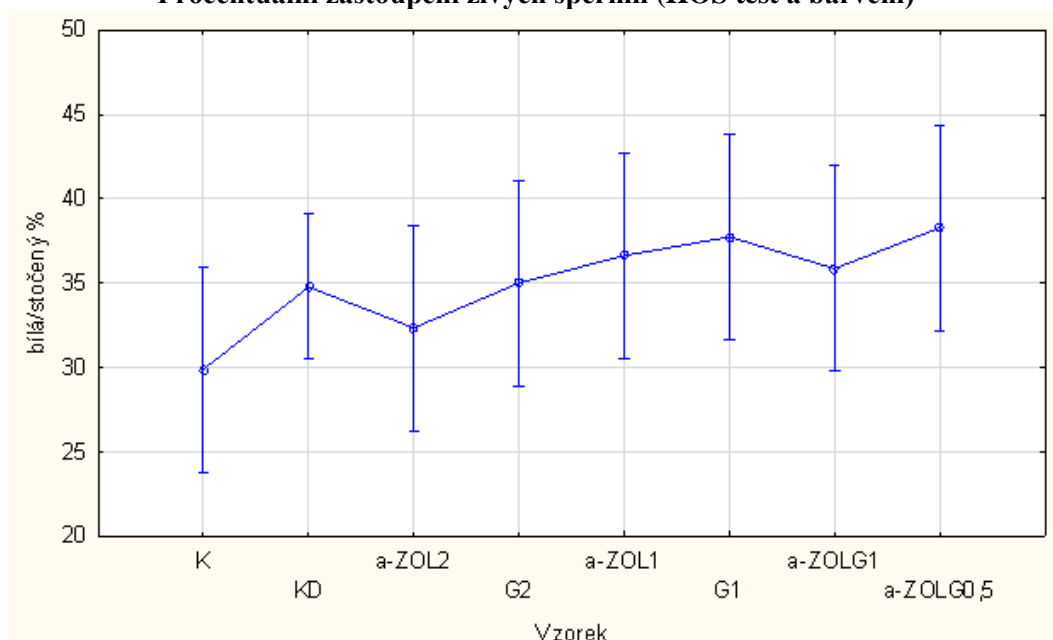
Konečné výsledky HOS testů v kombinaci s barvením, ani samotných HOS testů v našich pokusech neprokázaly žádné statisticky významné ovlivnění životaschopnosti spermií pokusnými kontaminanty.

Graf 10: Vliv společného působení α -zearalenolu a genisteinu na přežitelnost kančích spermií. Procentuální zastoupení reagujících spermií (HOS test)



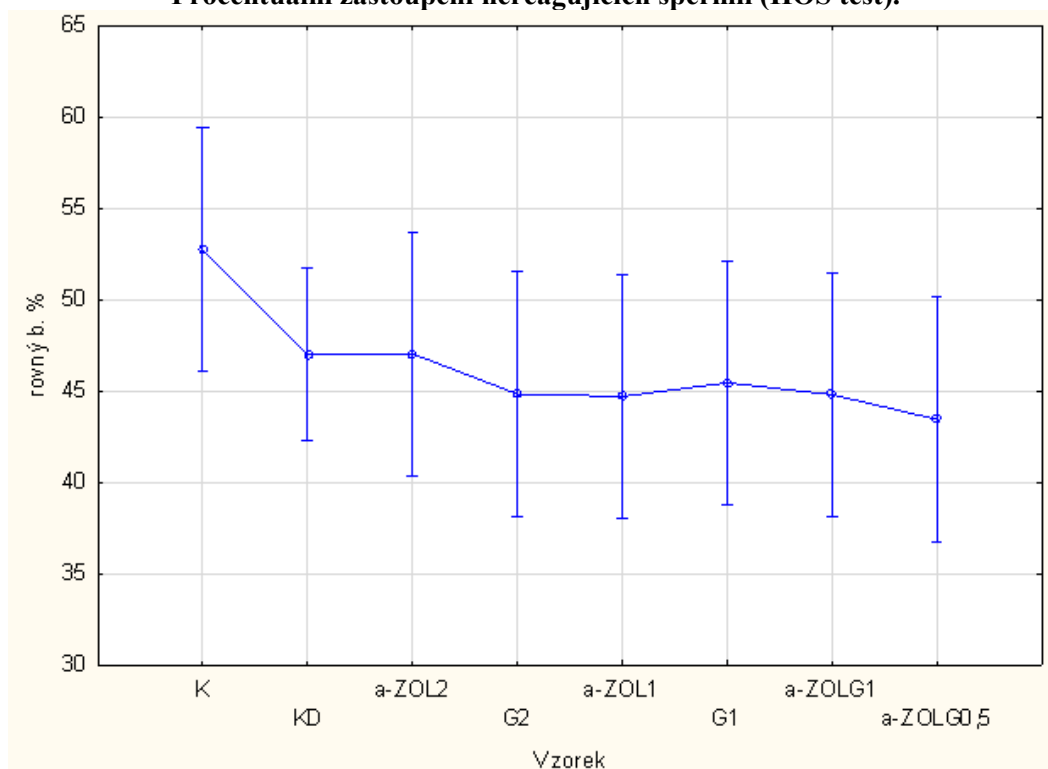
Hodnoty nevykazují žádné statisticky významné rozdíly na hladině významnosti $p < 0,05$.

Graf 11: Vliv společného působení α -zearalenolu a genisteinu na přežitelnost kančích spermií. Procentuální zastoupení živých spermií (HOS test a barvení)



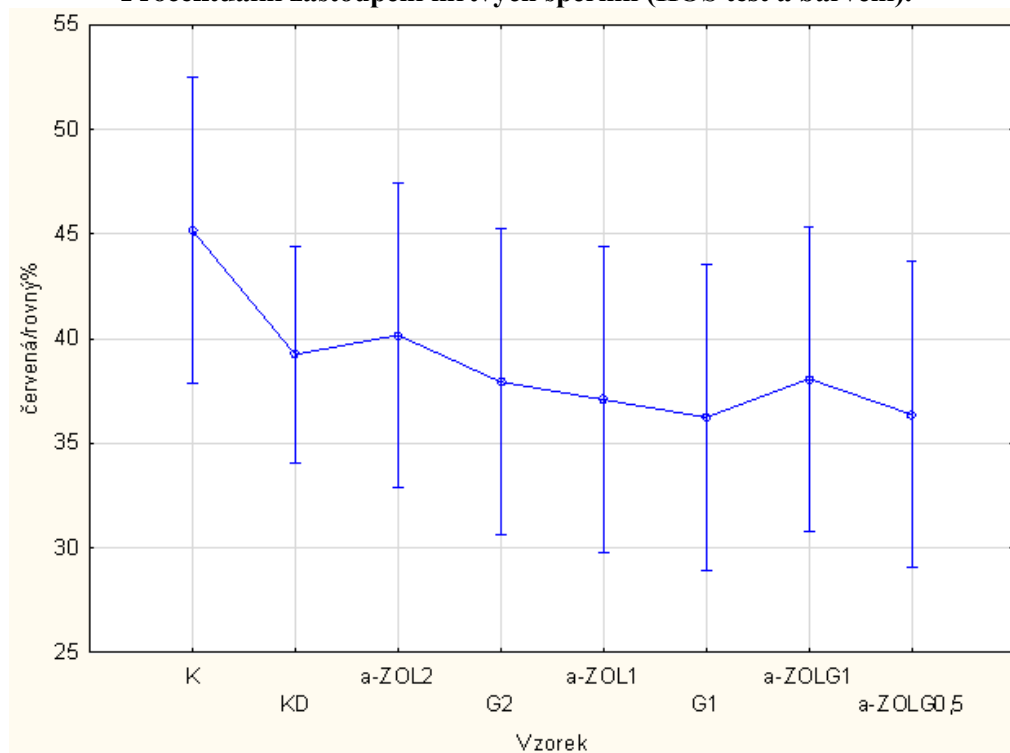
Hodnoty nevykazují žádné statisticky významné rozdíly na hladině významnosti $p < 0,05$.

Graf 12: Vliv společného působení α -zearalenolu a genisteinu na přežitelnost kančích spermií. Procentuální zastoupení nereagujících spermií (HOS test).



Hodnoty nevykazují žádné statisticky významné rozdíly na hladině významnosti $p < 0,05$.

Graf 13: Vliv společného působení α -zearalenolu a genisteinu na přežitelnost kančích spermií. Procentuální zastoupení mrtvých spermií (HOS test a barvení).



Hodnoty nevykazují žádné statisticky významné rozdíly na hladině významnosti $p < 0,05$.

6. Diskuze

Výsledky získané v rámci pokusů realizovaných pro tuto práci je patrný negativní vliv na motilitu kančích spermií u obou zkoumaných kontaminantů.

Po 2 hodinové inkubaci došlo v tomto pokusu ke zhoršení hodnot parametrů pohybu u všech vzorků v porovnání s kontrolou.

Nejvýraznější negativní účinek prokázal v obou koncentracích alfa-zearalenol. Statisticky významný pokles hodnot parametrů pohybu, oproti ostatním vzorkům, nastal u parametrů VCL, VAP, VSL a ALH. Mezi oběma koncentracemi alfa-zearalenolu nebyl v těchto parametrech statistický rozdíl kromě parametru VSL, kdy vykazoval vzorek s nižší koncentrací (α -ZOL 1) horší výsledek.

Rovněž kategorie pohybu, vycházející z parametrů pohybu, ukazují po 2 hodinové inkubaci výraznější zhoršení u α -zearalenolu.

Působením zearalenolu v reprodukci se zabývá například Benzoni a kol. (2008), který uvádí, že u prasat vykazuje alfa-zearalenol aktivitu v denaturaci chromatinu spermií. A dále, že i v nízkých koncentracích ovlivňuje životaschopnost spermií, což naše práce ovšem neprokázala.

Jiná studie se zaměřuje na působení tří estrogenních mykotoxinů na motilitu spermií u hřebců. Z jejich výsledků vyplývá, že kromě α -zearalenolu, snižují parametry pohybu také mykoestrogeny β -zearalenol a zearalenon. V této studii došli k závěru, že α -zearalenol vykazuje nejvyšší negativní účinky na motilitu, v porovnání s β -zearalenolem a zearalenonem, které mají účinky mezi sebou srovnatelné (Filannino a kol., 2011).

In vitro účinky zearalenonu a alfa-zearalenolu zkoumal také Tsamakidis a kol. (2006), jehož výsledky rovněž potvrzují negativní vliv těchto látek na kančí spermie, a také zjistil, že zvyšování koncentrace kontaminantu způsobuje větší pokles hodnot parametrů motility. V této práci ovšem nejsou v hodnotách parametrů pohybu patrné výrazné rozdíly mezi oběma koncentracemi.

Účinky samotného genisteinu na spermie jsou, podle studie Park a kol. (2011), závislé na koncentraci tohoto kontaminantu a délce jeho působení. Působení genisteinu v koncentraci 0,001-1 μ M nevykazovalo po 15 minutové inkubaci žádné účinky na kapacitaci myších spermií, zatímco koncentrace 10-100 μ M genisteinu způsobila významné snížení procenta kapacitovaných spermií. Vliv na akrozomální reakci nebyl po 15 minutové inkubaci

pozorován u žádné koncentrace, ale v případě 30 minutové inkubace došlo ke zvýšení procenta spermií s předčasnou akrozomální reakcí v případě koncentrací 0,1-100 μM .

Účinky genisteinu na motilitu spermií, v této práci, nevykazovaly po 2 hodinové inkubaci statisticky významné rozdíly mezi oběma koncentracemi (1 μM a 2 μM), ani od kontroly s DMSO. Statisticky významné zhoršení bylo patrné pouze ve srovnání s čistou kontrolou, ale tyto hodnoty byly vždy výrazně lepší, než u vzorků s alfa-zearalenolem.

Kombinace α -zearalenolu spolu s genisteinem po 2 hodinové inkubaci prokázala v této práci v obou koncentracích lepší hodnoty parametrů pohybu, než α -zearalenol samotný a zároveň nebyly prokázány statisticky významné rozdíly v porovnání těchto hodnot se vzorkem genisteinu v obou koncentracích.

Oproti tomu ve studii, která se zabývala působením kombinace zearalenonu a genisteinu, vykazovaly výsledky po 2 hodinové inkubaci vyrovnané hodnoty mezi oběma kontaminanty a jejich kombinacemi, ale po 4 hodinové inkubaci byly u kombinace zearalenonu s genisteinem zjištěny pravděpodobně dokonce protektivní účinky. Výsledné hodnoty sledovaných parametrů byly v těchto pokusech srovnatelné s kontrolou, a vykazovaly tak hodnoty výrazně lepší než u kontaminantů působících samostatně. Tento efekt nastal ovšem pouze při nízké koncentraci těchto látek v kombinaci (genistein 0,5 μM + zearalenon 0,5 μM), silnější koncentrace (genistein 1 μM + zearalenon 1 μM) vykazovala naopak nejhorší hodnoty (Folková, 2013).

Tyto výsledky, kdy genistein působí protektivně, pravděpodobně dokládají fakt, že isoflavony, které vznikají v rostlinách zejména při stresových podmínkách prostředí, mohou v první řadě poskytovat zdravotní přínosy pro živočichy. Pozitivní účinky sledoval ve své studii například Hwang a kol. (2006), který se zabýval účinků isoflavonů na buněčné linie v závislosti na hladinách estradiolu. V případě, kdy byly hladiny estradiolu fyziologické, působil genistein anti-estrogenně, ale při nízkých hladinách estradiolu (hladiny odpovídající menopauze u žen) působil jako estrogen.

Genistein tedy mění své účinky v závislosti na přítomnosti dalších látek a také na podmínkách, ve kterých se nachází. V přítomnosti alfa-zearalenolu, v našem pokusu, byl genistein například schopen vyrovnat jeho negativní vliv na propad hodnot u parametrů pohybu.

Reprodukčními poruchami způsobenými kombinací genisteinu a zearalenonu se také zabývá například studie zaměřená na proliferaci buněk v reprodukčních orgánech předpubertálních prasniček, kterým byla krmná dávka kontaminována zearalenonem a posléze

obohacena sójovými isoflavony. Výsledky práce prokazují, že isoflavony v dávce 600 mg/kg potlačí negativní účinek zearalenonu v dávce 2 mg/kg. Ovšem společné působení obou látek v dávce 0,5 mg/kg zvýšilo hmotnost reprodukčních orgánů ve srovnání se samostatným působením zearalenonu v dávce 0,5 mg/kg (Wang a kol., 2010).

Vzájemné působení kontaminantů je tedy rovněž odlišné v závislosti na jejich koncentraci.

Výsledky této diplomové práce však vykazují po 2 hodinové inkubaci lepší hodnoty parametrů u obou kombinací α -zearalenolu a genisteinu, oproti samotnému α -zearalenolu, bez ohledu na jejich koncentraci. Negativní působení těchto dvou kontaminantů, se tedy v rámci tohoto výzkumu nesčítalo, ale genistein působil v obou kombinacích proti negativnímu vlivu alfa-zearalenolu.

Po 4 hodinové inkubaci nastal víceméně rovnoměrný propad parametrů pohybu u všech vzorků, ovšem i zde byly statistické rozdíly u vzorků s α -zearalenolem. Kategorie pohybu naznačují po 4 hodinové inkubaci nárůst přímočarých spermií u α -zearalenolu, ale tento nárůst nebyl statisticky významný. Kategorie lokálně pohyblivých spermií po 4 hodinové inkubaci poukazují na navýšení jejich hodnot u vzorků genisteinu, zatímco α -zearalenol i jeho kombinace s genisteinem se neliší od vzorku kontroly, ale i zde se nejedná o statisticky významné rozdíly. Vzhledem k výraznému zhoršení hodnot u všech vzorků je pro posuzování působení kontaminantů na spermie pravděpodobně vhodnější využít výsledků získaných po 2 hodinové inkubaci.

Výsledky HOS testů v těchto pokusech provedených po 4 hodinové inkubaci, stejně jako v jiných diplomových pracích zaměřených pouze na genistein (Hlavová, 2014) či alfa-zearalenol (Kostenko, 2013), opět neprokázaly statisticky významné rozdíly vlivu jednotlivých kontaminantů a jejich koncentrací na životaschopnost spermií. Konečné procentuální zastoupení živých i mrtvých spermií u jednotlivých vzorků se statisticky nelišilo od vzorku kontrolního. Neprůkaznost odlišností vůči kontrole mohla být způsobena příliš dlouhou inkubací a subjektivním vyhodnocením jednotlivých HOS testů, které mohlo vést k nepřesným výsledkům.

Potřeba zkoumat společné účinky kontaminantů vyplývá ze skutečnosti, že jejich výskyt nebývá přirozeně v krmné dávce samostatný.

Ve své studii Fraser a kol. (2006) uvádí, že kombinace genisteinu s jinými látkami, které napodobují endogenní estrogény, způsobuje navýšení negativního ovlivnění spermií.

Je proto nezbytné, zabývat se touto problematikou komplexně a nejen z pohledu jediného kontaminantu. Wang a kol. (2014) ve své studii například uvádí, že pokud je kontaminována kukuřice, pšenice či sója, je tato kontaminace ze 75 % způsobena více než jedním mykotoxinem.

Také je do budoucna důležité zabývat se působením smíšených xenoestrogeních kontaminantů u různých živočichů, a to z důvodu jejich odlišné druhové vnímavosti.

7. Závěr

Po vyhodnocení výsledků bylo zjištěno, že samotný zearalenol v obou testovaných koncentracích způsobil po 2 hodinové inkubaci výrazné zhoršení motility. Oproti tomu při společném působení obou kontaminantů, se parametry statisticky nelišily od vzorků se samotným genisteinem ani od kontrolních vzorků s ředěným DMSO.

Po 4 hodinách inkubace nastal ve výsledných hodnotách všech parametrů pohybu výrazný, ale relativně rovnoměrný pokles, kromě vzorku zearalenolu (koncentrace 2 μM), který měl tyto hodnoty oproti ostatním výrazně horší. Výrazný propad všech hodnot ukazuje na narušení pohybu spermií spíše vlivem délky inkubace, nežli účinkem samotných kontaminantů. Z těchto důvodů je pro posuzování působení kontaminantů na spermie pravděpodobně vhodnější využít výsledků získaných po 2 hodinové inkubaci.

Výsledky HOS testů neprokázaly statisticky významné rozdíly v procentuálním zastoupení živých a mrtvých spermií, leč i zde lze na grafu pozorovat u vzorku zearalenolu (koncentrace 2 μM) oproti genisteinu i oběma kombinacím určité negativní tendence.

Při srovnání hodnot parametrů motility spermií u samotného alfa-zearalenolu s hodnotami u kombinace obou kontaminantů je patrné, že genistein má v takové kombinaci schopnost snižovat negativní působení alfa-zearalenolu. Konečné výsledky této práce tedy potvrzují hypotézu, že společné působení alfa-zearalenolu a genisteinu vykazuje in vitro rozdílné účinky oproti působení těchto látek jednotlivě.

8. Použitá literatura

- Acconcia, F., Kumar, R. 2006. Signaling regulativ of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer Letters*. 238:1-14.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2005. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing. Praha. 740 s. ISBN: 8090290620.
- Aquila, S., De Amicis, F. 2014. Steroid receptors and their ligands: Effects on male gamete functions. *Experimental Cell Research*. Volume 328, Issue 2, p. 303-313.
- Balasinor, N., Parte, P., Gill-Sharma, M.K., Juneja, H.S. 2001. Effect of tamoxifen on sperm fertilising ability and preimplantation embryo development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 178, p. 199-206.
- Benzoni, E., Minervini, F., Giannoccaro, A., Fornelli, F., Vigo, D., Visconti, A. 2008. Influence of in vitro exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality. *Reproductive Toxicology*. Volume 25, Issue 4, p. 461-467.
- Betina, V. 1990. *Mykotoxíny chémie – biológia – ekológia*. Bratislava Alfa. 284 s. ISBN: 8005006314
- Bezerra da Rocha, M.E., Oliveira Freire, F., CH., Feitosa Maia, F., E., Florindo Guedes, M., I., Rondina, D. 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*. Volume 36, Issue 1, p. 159-165.
- Cardoso, J.R., Bão, S.N. 2007. Effect of chronic exposure to soy meal containing diet or soy derived isoflavones supplement on semen production and reproductive system of male rabbits. *Animal Reproduction Science*. Volume 97, Issue 3-4, p. 237-345.
- Carreau, S., Bouraima-Lelong, H., Delalande, C. 2011a. Estrogens – new players in spermatogenesis. *Reproductive Biology*. Volume 11, Issue 3, p. 174-193.
- Carreau, S., Bois, C., Zanatta, L., Silva, F.R.M.B., Bouraima-Lelong, H., Delalande, C. 2011b. Estrogen signaling in testicular cells. *Life Sciences*. Volume 89, Issues 15-16, p. 584-587.

- Cederroth, Ch. R., Auger, J., Zimmermann, C., Eustache, F., Nef, S. 2001. Soy, phyto-oestrogens and male reproductive function: a review. *International Journal of andrology*. 33. p. 304-316.
- Cederroth, Ch.R., Nef, S. 2009. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Volume 304, Issues 1-2, p. 30-42.
- Cederroth, Ch.R., Zimmermann, C., Beny, J.L, Schaad, O., Combepine, Ch., Descombes, P., Doerge, D.R., Pralong, F.P., Vassalli, J.D., Nef, S. 2010. Potential detrimental effects of a phytoestrogen-rich diet on male fertility in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Volume 321, Issue 2, p. 152-160.
- Cederroth, Ch. R., Zimmermann, C., Nef, S. 2012. Soy, phyto-oestrogens and their impact on reproductive health. *Molecular and cellular endocrinology*. Volume 355, Issue 2, p. 192-200.
- Ded, L., Dostalova, P., Dorosh, A., Dvorakova-Hortova, K., Peknickova, J. 2010. Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reproductive Biology and endocrinology*. 87 (8), p. 87-98.
- El-Sayed A. Mohamed, Yoo-Jin Park, Won-Hee Song, Dong-Ha Shin, Young-Ah You, Buom-Yong Ryu, Myung-Geol Pang. 2011. Xenoestrogenic compounds promote capacitation and an acrosome reaction in porcine sperm. *Theriogenology*. Volume 75, Issue 6, p. 1161-1169.
- Faqi, A.S., Johnson, W. D., Morrissey, R. L., McCormick, D.L. 2004. Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. *Reproductive Toxicology*. Volume 18, Issue 4, p. 605-611.
- Fillanino, A., Stout, T.A.E., Gadella, B.M., Sostaric, E., Pizzi, F., Colenbrander, B., Dell'Aquila, M.E., Minervini, F. 2011. Dose-response effects of estrogenic mycotoxins (zearalenone, alpha- and beta-zearalenol) on motility, hyperactivation and the acrosome reaction of stallion sperm. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 9 (134), p. 10.
- Flores-Flores, M.E., Lizarraga, E., López de Cerain, A., González-Peñas, E. 2015. Presence of mycotoxins in animal milk: A review. *Food Control*. Volume 53, p. 163-176.

- Folková, P. 2013. Společné účinky zearalenonu a genisteinu na kvalitu kančích spermií. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 89 s.
- Fraser, L. R., Beyret, E., Milligan, S. R., Adeoya-Osiguwa, S. A. 2006. Effect of estrogenic xenobiotics on human and mouse spermatozoa. *Human Reproduction*. 21(5), p. 1184-1193.
- Hamilton, K.J., Arao, Y., Korach, K.S. 2014. Estrogen hormone physiology: Reproductive findings from estrogen receptor mutant mice. *Reproductive Biology*. Volume 14, p. 3-8.
- Hampl, R., Lapčík, O. 1996. Jíte rádi flavonoidy? *Vesmír* [online]. 75 (125). [cit. 2015 – 01 - 30]. Dostupné z: < <http://casopis.vesmir.cz/clanek/jite-radi-flavonoidy>>
- Havránková, H., Ovesná, J. 2012. Geny biosyntézy trichothecenů u rodu *Fusarium*. *Chemické listy* [online]. 106, s. 818-825. [cit. 2014 – 11 - 18]. Dostupné z: <www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_09_818-825.pdf>
- Hossaini, A., Dalgaard, M., Vinggaard, A.M., Pakarinen, P., Larsen, J.J. 2003. Male reproductive effects of octylphenol and estradiol in Fischer and Wistar rats. *Reproductive Toxicology*. Volume 17, Issue 5, p. 607-615.
- Hlavová, A. 2014. Účinky genisteinu na kvalitu kančích spermií. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 55 s.
- Hwang, Ch.S., Kwak, H.S., Lim, H.J., Lee, S.H., Kang, Y.S., Cho, T.B., Hur, H.G., Han, K.O. 2006. Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: They can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Volume 101, Issues 4-5, p.246-253.
- Jefferson, W. N., Padilla-Banks, E., Newbold, R.R. 2007. Disruption of the female reproductive system by the phytoestrogen genistein. *Reproductive Toxicology*. Volume 23, Issue 3, p. 308-316.
- Kaprál, A., Fajt, T. 2003. Estrogeny v životním prostředí a jejich význam v klimakterické medicíně. *Praktická gynekologie* 4/03, s. 10-13.

Kostenko, A., 2013. Vliv alfa-zearalenolu na kvalitu kančích spermií. Diplomová práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 46 s.

Kujalová, H., Sýkora, V., Pitter, P. 2007. Látky s estrogením účinkem ve vodách. Chemické listy [online]. 101, s. 706-712. [cit. 2014 – 11 - 18]. Dostupné z: <www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_09_706-712.pdf>

Lapčík, O., Stárka, L. 2004. Rostlinné estrogény a menopauza. Vesmír [online]. 83 (531). [cit. 2015 – 01 - 30]. Dostupné z: <<http://casopis.vesmir.cz/clanek/roslinne-estrogeny-a-menopauza>>

Ledvina, M., Cerman, J., Stoklasová, A., 2009. Biochemie pro studující medicíny. 2.vydání. Praha, Karolinum, 568 s. ISBN: 9788024614144.

Luconi, M., Forti, G., Baldi, E. 2002. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. Volume 80, Issues 4-5, p. 369-381.

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. Volume 15, Issue 4, p. 399-411.

McClain, R.M., Wolz, E., Davidovich, A., Edwards, J., Bausch, J. 2007. Reproductive safety studies with genistein in rats. Food and Chemical Toxicology. Volume 45, Issue 8, p.1319-1332.

Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J.A., Minutolo, F. 2014. Estrogen receptors alpha and beta: Subtype-selective ligands and clinical potential. Steroids. Volume 90, p. 13-29.

Park, Y.J., El-Sayed A. Mohamed, Kwon, W.-S., You, Y.-A., Ryu, B.-Y., Pang, M.-G. 2011. Xenoestrogenic chemicals effectively alter sperm function behavior in mice. Reproductive Toxicology. Volume 32, Issue 4, p. 418-424.

- Reece, W.H.O. 1998. Fyziologie domácích zvířat. Grada. Praha. 456 s. ISBN: 8071695475
- Shama, G., Alderson, P. 2005. UV hormesis in fruits: a concept ripe for commercialisation. Trends in Food Science and Technology. Volume 16, Issue 4, p. 128-136.
- Sharpel, R.M, Martin, B., Morris, K., Greig, I., McKinnel, Ch., McNeilly, A.S., Walker, M. 2002. Infant feeding with soy formula milk: effects on the testis and on blood testosterone levels in marmoset monkeys during the period of neonatal testicular activity. Human Reproduction. Volume 17, Issue 7, p. 1692-1703.
- Socas-Rodríguez, B., Asensio-Ramos, M., Hernández-Borges, J., Herrera-Herrera, A.V., Rodríguez-Delgado, M.A. 2013. Chromatographic analysis of natural and synthetic estrogens in milk and dairy products. TrAC Trends in Analytical Chemistry. Volume 44, p.58-77.
- Speroff, L., Glass, R.H., Kase, N.G. 1999. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility Sixth dition. Lippincott Williams & Wilkins. p. 1170. ISBN: 0683303791
- Svobodová, Z., Bezděková, B., Dvořák, R., Dvořáková, D., Grymová, V., Hauptman, K., Jahn, P., Jekl, V., Juranová, R., Knotek, Z., Knotková, Z., Konrád, J., Kroupová, H., Kulíková, L., Ludvíková, E., Máchová, J., Modrá, H., Pavlata, L., Pechová, A., Pízová, M., Svoboda, Ma., Svoboda, Mi., Suchý, P. Taras, L., Titěra, D., Tukač, V., Veselý, V., Vršková, D. 2008. Veterinární toxikologie v klinické praxi. 1. Vydání. Profi Press, s. r. o., Praha. 256 s. ISBN 9788086726274.
- Tan, K.A.L., Walker, M., Morris, K., Greig, I., Mason, J.I., Sharpe. R.M. 2006. Infant feeding with soy formula milk: efeects on puberty progression, reproductive function and testicular cell numbers in marmoset monkeys in adulthood. Human Reproduction. Volume 21, Issue 4, p.896-904.
- Tsakmakidis, I.A., Lymberopoulos, A.G., Alexandropoulos, C., Boscós, C.M., Kyriakis, S.C. 2006. In vitro effect of zearalenone and alpha-zearalenol on boar sperm characteristics and acrosome reaction. Reproduction in Domestic Animals. Volume 41, Issue 5, p. 394-401

Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Přinosilová, P. 2004. Repetitorium spermatologie a andrologie, metodiky spermatoanalýzy. Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno. 197 s. ISBN: 8086895017.

Wang, D.F., Zhang, N.Y., Peng, Y.Z., Qi, D.S. 2010. Interaction of zearalenone and soybean isoflavone on the development of reproductive organs, reproductive hormones and estrogen receptor expression in prepubertal gilts. *Animal Reproduction Science*. Volume 122, Issue 3-4, p. 317-323.

Wang, H.W., Wang, J.Q., Zheng, B.Q., Li, S.L., Zhang, Y. D., Li, F.D., Zheng, N. 2014. Cytotoxicity induced by ochratoxin A, zearalenone, and α -zearalenol: Effect of individual and combined treatment. *Food and Chemical Toxicology*. Volume 71, p. 217-224.

Wang, S.-T., Fang, T.-F., Hsu, Ch., Chen, Ch.-H., Lin, Ch.-J., Su, N.-W. 2015. Biotransformed product, genistein 7-O-phosphate, enhances the oral bioavailability genistein. *Journal of Functional Foods*. Volume 13, p. 323-335.

Yang, J. Y., Wang, G. X., Liu, J. L., Fan, J. J., Cui, S. 2007. Toxic effect of zearalenone and its derivatives α -zearalenol on male reproductive system in mice. *Reproductive Toxicology*. Volume 24, Issue 3-4, p. 381-387.

Zatecka, E., Ded, L., Elzeinova, F., Kubatova, A., Dorosh, A., Margaryan, H., Dostalova, P., Korenkova, V., Hoskova, K., Peknicova, J. 2014. Effect of zearalenone on reproductive parameters and expression of selected testicular genes in mice. *Reproductive Toxicology*. Volume 45, p. 20-30.