

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

**Vliv syntetických progestinů na vývoj gonád
kapa obecného**

Autor: Vít Profant

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

Konzultant bakalářské práce: Mgr. Jitka Tumová

Dipl. Biol. Christoph Steinbach, Ph.D.

Studijní program a obor: B4103/Zootechnika, Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2017

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že, v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne:

Podpis studenta:

Poděkování

Rád bych poděkoval své vedoucí Ing. Haně Kocour Kroupová, Ph.D., konzultantům Mgr. Jitce Tumové, Dipl. Biol. Christophu Steinbachovi, Ph.D. a v neposlední řadě Ing. Pavlovi Šauerovi za metodické vedení, odbornou pomoc, poskytnuté rady a cenné připomínky při vypracování této bakalářské práce.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Vít PROFANT**
Osobní číslo: **V14B011P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Vliv syntetických progestinů na vývoj gonád kapra obecného**
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Zásady pro vypracování:

Syntetické progestiny jsou steroidní hormony, které mají svými účinky napodobovat přírodní hormon progesteron. Jsou součástí především antikoncepčních a potratových pilulek, ale i jiných preparátů pro hormonální léčbu některých patologických stavů. V důsledku relativně velké spotřeby těchto léčiv se syntetické progestiny a jejich metabolity dostávají do odpadních vod. Díky poměrně vysoké stabilitě uvedených preparátů nedochází na čistírnách odpadních vod k jejich účinnému odstranění a tyto hormony pak vstupují do vod povrchových, kde mohou negativně ovlivňovat reprodukci a další fyziologické funkce vodních organismů. Cílem práce je proto stanovení vlivu syntetických progestinů na vývoj gonád u kapra obecného.

Metodický postup: vliv syntetických progestinů bude hodnocen na základě vyšetření vzorků odebraných z ryb (kapa obecného), které byly v laboratorních podmínkách po dobu několika měsíců vystaveny environmentálním koncentracím vybraných syntetických progestinů. Vliv syntetických progestinů na vývoj gonád bude vyhodnocen na základě histologického vyšetření vzorků exponovaných ryb odebraných *in toto* a také vzorků vyjmutých gonád. U vzorků, které byly po skončení chronického testu uloženy do formalínu, bude nejdříve v případě potřeby provedena jejich dekalifikace, poté dehydratace a později budou zality do parafínu. Z parafinových bločků budou zhotoveny řezy o tloušťce cca 4 μm , které budou obarveny hematoxylinem a eosinem. Na takto připravených histologických řezech budou identifikovány pohlavní buňky, na jejichž základě bude určeno pohlaví exponovaných ryb. Sledovány budou i případné histopatologické změny na gonádách. Pomocí získaných výsledků bude možné zhodnotit vliv syntetických progestinů na poměr pohlaví a míru případného poškození gonád exponovaných ryb.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **30 - 40 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Jitka Tumová**
Neexistující pracoviště
Ostatní konzultanti: **Dipl.-Biol. Christoph Steinbach**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: **11. prosince 2015**
Termín odevzdání bakalářské práce: **5. května 2017**


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 19. ledna 2016

Příloha zadání bakalářské práce

Seznam odborné literatury:

- Hua, J., Han, J., Guo, Y., Zhou, B., 2015. The progestin levonorgestrel affects sex differentiation in zebrafish at environmentally relevant concentrations. *Aquat. Tox.* 166: 1-9.
- Kloas, W., Urbatzka, R., Opitz, R., Würtz, S., Behrends, T., Hermelink, B., Hofmann, F., Jagnytsch, O., Kroupova, H., Lorenz, C., Neumann, N., Pietsch, C., Trubiroha, A., Van Ballegooy, Ch., Wiedemann, C., Lutz, I., 2009. Endocrine disruption in aquatic vertebrates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1163: 187-200. Kumar, V., Johnson, A.C., Triburoha, A., Tumová, J., Ihara, M., Grabic, R., Kloas, W., Tanaka, H., Kroupová, H.K., 2015. The challenge presented by progestins in ecotoxicological research: A critical review. *Environ. Sci. Technol.* 49: 2625-2638.
- Liang, Y.Q., Huang, G.Y., Liu, S.S., Zhao, J.L., Yang, Y.Y., Chen, X.W., Tian, F., Jiang, Y.X., Ying, G.G., 2015. Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of progesterone and norgestrel affects sex differentiation in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 160: 172-179.
- Mazzoni, T.S., Grier, H.J., Quagio-Grassiotto, I., 2010. Germline cysts and the formation of the germinal epithelium during the female gonadal morphogenesis in *Cyprinus carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). *The Anatomical Record* 293: 1581-1606.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 2010. Guidance document on the diagnosis of endocrine-related histopathology in fish gonads. OECD Series on Testing and Assessment No. 123. Paris, France.
- Parmentier, H.K., Timmermans, L.P.M., 1985. The differentiation of germ cells and gonads during development of carp (*Cyprinus carpio* L.). A study with anti-carp sperm monoclonal antibodies. *J. Embryol. Exp. Morph.* 90: 13-32.
- Runnalls, T.J., Beresford, N., Losty, E., Scott, A.P., Sumpter, J.P., 2013. Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish. *Environ. Sci. Technol.* 47: (4): 2077-2084.
- Säfhholm, M., Norder, A., Fick, J., Berg, C., 2012. Disrupted oogenesis in the frog *Xenopus tropicalis* after exposure to environmental progestin concentrations. *Biol. Reprod.* 86: (4): 1-7.
- Zhao, Y., Castiglioni, S., Fent, K., 2015. Synthetic progestins medroxyprogesterone acetate and dydrogesterone and their binary mixtures adversely affect reproduction and lead to histological and transcriptional alterations in zebrafish (*Dani rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 49 (7): 4636-4645.

Obsah:

1. Úvod.....	9
2. Literární přehled.....	10
2.1. Pohlavní soustava ryb (apparatus genitalis).....	10
2.2. Prvotní zárodečné buňky.....	11
2.3. Diferenciace gonád	11
2.4. Samčí pohlavní soustava.....	11
2.4.1. Testikulární diferenciace.....	12
2.4.2. Spermatogeneze	14
2.5. Samičí pohlavní soustava.....	16
2.5.1. Ovariální diferenciace	17
2.5.2. Oogeneze.....	18
2.6. Progestiny.....	19
2.6.1. Vlastnosti a členění syntetických progestinů	20
2.6.2. Výskyt progestinů ve vodním prostředí	22
2.6.3. Vliv syntetický progestinů na ryby	25
2.6.3.1. Vliv syntetických progestinů na gonády ryb.....	26
3. Materiál a metodika.....	28
3.1. Návrh experimentu.....	28
3.1.1. Hmotnost, délka a Fultonův koeficient	29
3.1.2. Ověření koncentrace progestinů.....	29
3.2. Histologické zpracování vzorků.....	29
3.2.1. Chemikálie	29
3.2.2. Přístroje	30
3.2.3 Postup histologického zpracování vzorků.....	30
3.3. Vyhodnocení vzorků	37
3.3.1. Určování pohlaví ryb z histologických preparátů	37

3.3.2. Statistické vyhodnocení	39
4. Výsledky	40
4.1. Koncentrace testovaných látek.....	40
4.2. Kulení a mortalita ryb	40
4.3. Porovnání výživného stavu ryb.....	41
4.4. Poměr pohlaví	43
5. Diskuze	51
6. Závěr.....	55
7. Seznam použité literatury	56
8. Abstrakt	63
9. Abstract.....	64

1. Úvod

V posledních letech se do popředí zájmu toxikologických a environmentálních výzkumů dostávají tzv. mikropolutanty, mezi které patří i farmaka. První hormonální antikoncepce byla uvedena na trh v 60. letech minulém století. Postupem času antikoncepce začala být využívána mnoha ženami po celém světě a v dnešní době je na trhu přítomna obrovská škála různých preparátů. Základní složkou antikoncepčních pilulek jsou syntetické progesteriny, které se do vodního prostředí dostávají s komunálními odpadními vodami, jelikož na čistírnách odpadních vod nedochází k jejich úplné degradaci. Ve vodním prostředí se tyto látky vyskytují v koncentraci dosahujících jednotek až desítek $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, ale i takto nízké koncentrace mohou mít negativní účinky na necílové organismy, jako jsou například ryby. Syntetické progesteriny negativně ovlivňují endokrinní systém organismů, kteří žijí ve vodním prostředí, a z tohoto důvodu jsou zařazovány mezi tzv. endokrinní disruptory (ECDs).

Moje práce byla zaměřena na sledování vlivu syntetických progesterinů na vývoj pohlavních orgánů u kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Tato práce se skládá z literárního přehledu a experimentální části. První část literárního přehledu je zaměřena na vývoj pohlavních orgánů u ryb a druhá část se zabývá výskytem syntetických progesterinů ve vodním prostředí a jejich vlivem na ryby. Cílem této práce bylo především zhodnocení vlivu chronické expozice dvěma vybraným syntetickým progesterinům na poměr pohlaví u testovaného druhu ryby. Získané výsledky mohou pomoci při hodnocení rizika, které představuje výskyt syntetických progesterinů ve vodním prostředí pro ryby.

2. Literární přehled

2.1. Pohlavní soustava ryb (*apparatus genitalis*)

Nejdůležitější funkcí pohlavní soustavy je rozmnožování (Dvořák a kol., 2014). U ryb se vyskytují různé způsoby rozmnožování. Jedná se o gonochorismus, hermafroditismus nebo o unisexuální rozmnožování. Typickým způsobem rozmnožování většiny kostnatých ryb je gonochorismus, kdy jedinec vytváří buď samčí pohlavní orgány, nebo samičí pohlavní orgány a pohlaví se v průběhu života nemění (Devlin a Nagahama, 2002).

Opakem gonochorismu je hermafroditismus. Existuje synchronní nebo asynchronní hermafroditismus (Devlin a Nagahama, 2002). Synchronní hermafroditismus znamená, že u jednoho jedince se vyskytují jak samčí, tak i samičí pohlavní orgány ve stejnou dobu (Baruš a kol., 1995). Příkladem je rivulus mramorovaný (*Rivulus marmoratus*). Asynchronní hermafroditismus je definován jako střídání pohlaví v průběhu života. Je známa protogynie, protandrie a možnost změny pohlaví v obou směrech (Devlin a Nagahama, 2002). Pokud se nejdříve u jedince vytvářejí pouze samičí pohlavní orgány, které se v průběhu života přetvářejí do samčích pohlavních orgánů, tak se jedná o protogynii (Lubzens a kol., 2010). Příkladem protogynie může být mořský kanic (*Mycteroperca microlepis*) (Heppell a kol., 2006). Naopak pokud se nejdříve vytvářejí samčí pohlavní orgány, které se v průběhu života přetvářejí do samičích pohlavních orgánů, tak se jedná o protandrii (Lubzens a kol., 2010), příkladem je pražma královská (*Sparus aurata*). Posledním typem asynchronního hermafroditismu je střídání pohlaví v obou směrech v průběhu ontogeneze, například u štětíčkovce zlatého (*Cirrhilichthys aureus*) (Heppell a kol., 2006).

Vzácnější než hermafroditismus je unisexuální rozmnožování, kdy se v populaci vyskytuje pouze jedno pohlaví (samičí). Mezi unisexuální rozmnožování patří gynogeneze. Gynogeneze je typická pro karase stříbřitého (*Carassius gibelio*), u kterého dochází pouze k aktivaci jiker jiným druhem ryb (Zhou a kol., 2000).

Dále je důležité zmínit pojem intersexualita (intersex). Intersex se projevuje přítomností pohlavně nevyhraněné gonády přechodného typu a často indikuje pohlavní zvrat u druhů, u kterých hermafroditismus není znám (Baruš a kol., 1995).

Pohlavní soustava gonochoristů se skládá z pohlavních orgánů (žláz, gonád) a z vývodních pohlavních cest (Dvořák a kol., 2014). Většinou jsou párové gonády

zavěšené na pobřišnicových řasách v horní polovině tělní dutiny, podél vnějšího okraje ledvin. Pohlavními orgány samců jsou varlata (*testes*) a samičími pohlavními orgány jsou vaječníky (*ovaria*) (Baruš a kol., 1995). Vyústění pohlavních vývodů je mezi řití a řitní ploutví a může být dvojího typu, buď na samostatné pohlavní papile, nebo na urogenitální papile (Dvořák a kol., 2014). Většina kostnatých ryb patří mezi tzv. jikry kladoucí (oviparní) druhy, u kterých dochází k vnějšímu oplození jiker ve vodním prostředí. Vnitřní oplození je u živorodých druhů ryb a bývá méně obvyklé (Lubzens a kol., 2010). Živorodým druhům ryb se v této rešerši věnovat nebudeme.

2.2. Prvotní zárodečné buňky

Z prvotních zárodečných buněk neboli z angličtiny primordial germ cells (PGCs) vznikají haploidní pohlavní buňky, samičí vajíčka nebo samčí spermie. Tyto pohlavní buňky zajišťují přenos genetické informace z jedné generace na druhou. Malé množství nediferencovaných prvotních zárodečných buněk vzniká krátce po oplození vajíčka během brzké fáze embryogeneze (Lubzens a kol., 2010).

2.3. Diferenciace gonád

Nediferencované gonády se v průběhu ontogeneze přetvářejí do ovarií nebo do testes. Diferenciace je řízena geneticky a také různými vlivy prostředí (Nakamura a kol., 1998). Prvotní nediferencované gonády se skládají z kůry a dřene. Během ovariální diferenciace se kůra vyvíjí a dřeň degeneruje, zatímco při testikulární diferenciaci kůra degeneruje a dřeň se vyvíjí (Hoar, 1969).

2.4. Samčí pohlavní soustava

Testes všech obratlovců (od ryb až k savcům) se skládají ze dvou hlavních částí, z intertubulární a tubulární části. Intertubulární část obsahuje Leydigovy buňky, krevní a lymfatické cévy, mastocyty, nervovou tkáň, pojivovou tkáň a vazivový obal tzv. *tunica albuginea* (Koulish a kol., 2002). Tubulární část je omezena bazální laminou, zárodečným epitelem a peritubulárními myoidními buňkami. Zmíněný zárodečný epitel je tvořen pouze dvěma typy buněk, somatickými Sertoliho buňkami a zárodečnými buňkami, které se nacházejí v různých vývojových stádiích. Zárodečné buňky pro přežití v živém organismu potřebují neustálý a blízký kontakt se Sertoliho buňkami, které svým počtem určují spermatogenetickou kapacitu testes a jsou také důležité pro regulaci spermatogeneze (Matta a kol., 2002). Testes u ryb jsou obvykle párové, ale mohou být

částečně spojeny jako například u okouna říčního (*Perca fluviatilis*) (viz Obr. č. 1), nebo úplně spojeny jako je tomu u živorodky duhové (*Poecilia reticulata*) (Billard, 1986).



Obr. č. 1: Částečné spojení testes u okouna říčního (archiv autora)

Parenchym testes u ryb může být dvojího typu. Prvním typem je tzv. hroznovité (acinozní) uspořádání, které se vyskytuje např. u kaprovitých (*Cyprinidae*) a štikovitých (*Esocidae*) (Kaestner, 1991). U tohoto uspořádání se z pruhů zárodečných buněk opakovaným dělením vytvářejí kulovité shluky, které se protahují do délky a uvnitř vzniká dutina, obklopená několika vrstvami spermatogonií (Antychowicz, 1988).

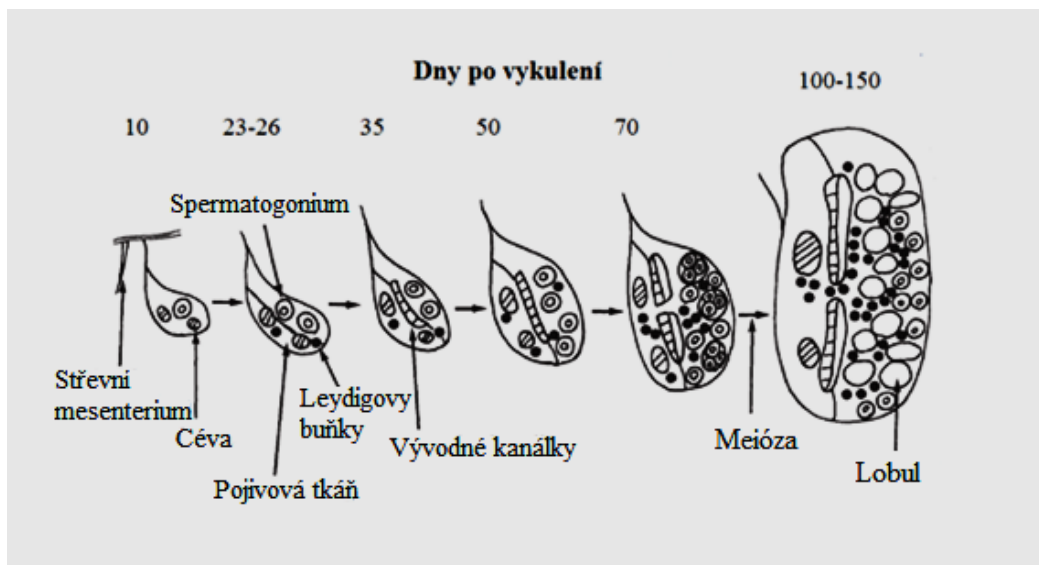
Druhým typem je radiální uspořádání, které se nachází například u okounovitých (*Percidae*). Zmíněné radiální uspořádání vzniká tak, že se epitelové buňky na vnitřní straně zárodečných buněk množí rychleji, a proto v gonádách vznikají radiálně uspořádané páry buněk (Kaestner, 1991; Baruš a kol., 1995).

2.4.1. Testikulární diference

Identifikace raných testes na základě vývojových charakteristik zárodečných buněk je velmi obtížná, jelikož prvotní zárodečné buňky v gonádách, které jsou předurčeny stát se testes, jsou dlouhou dobu v pasivním stádiu vývoje (Nakamura a kol.,

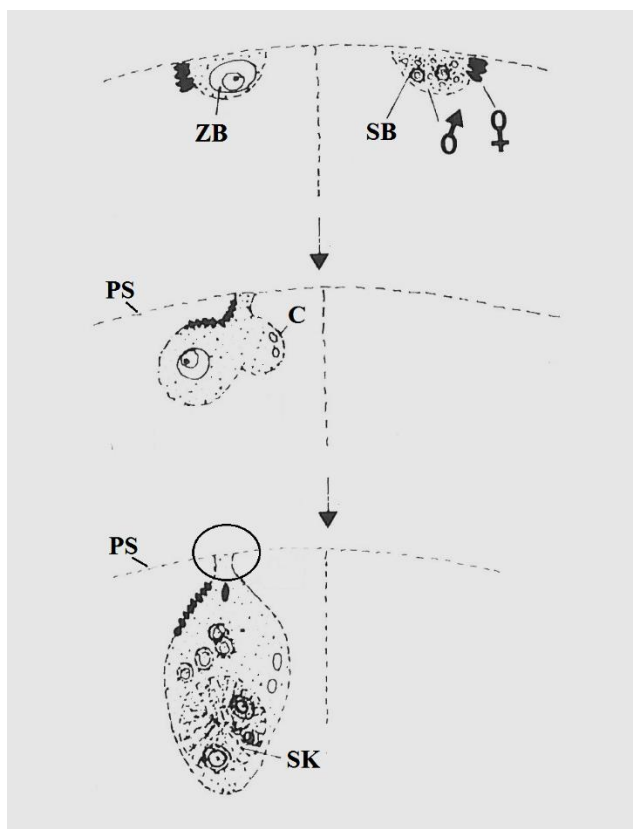
1998). Například u úhoře japonského (*Anguilla japonica*) spermatogeneze probíhá až těsně před katadromní migrací (Satoh a kol., 1962).

U tlamouna nilského (*Oreochromis niloticus*) byl pozorován štěrbinový prostor, který se nacházel od proximální části směrem do centra gonády. Tento prostor byl identifikován jako základ vývodných kanálek varlete (viz Obr. č. 2), proto formování těchto kanálek může být určitým kritériem k určení testikulární diferenciace u tohoto druhu (Nakamura a kol., 1998).



Obr. č. 2: Schematické zobrazení testikulární diferenciace u tlamouna nilského (upraveno podle Nakamura a kol., 1998)

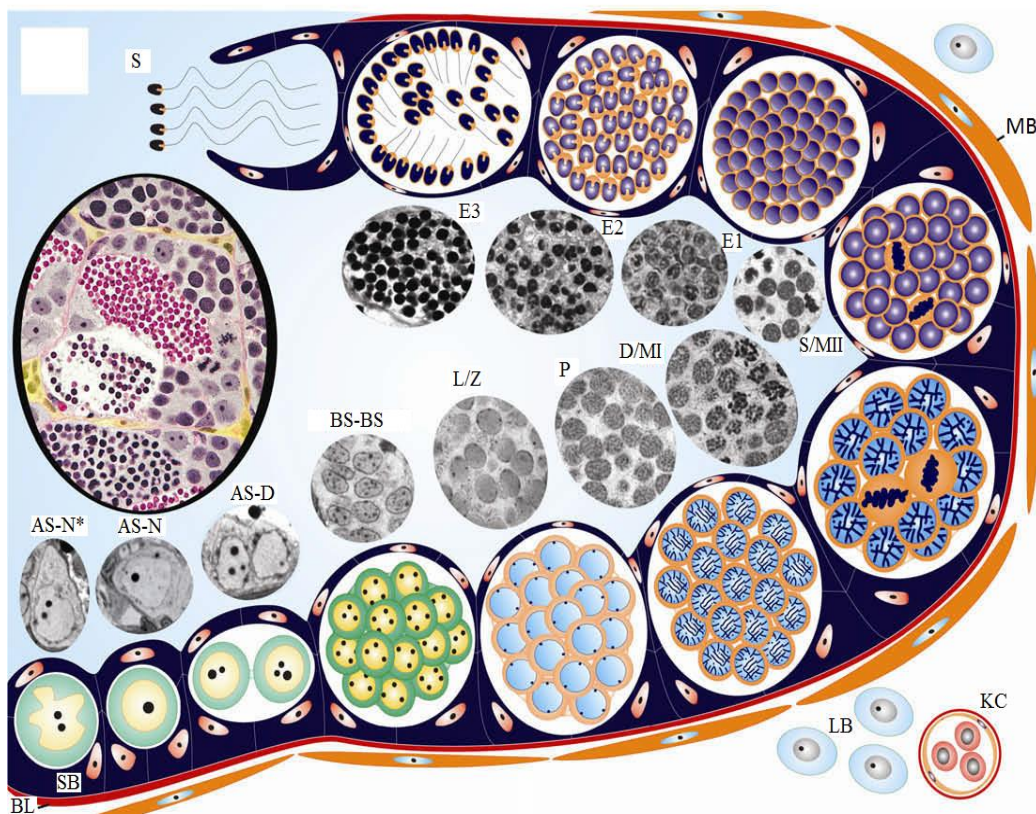
U lososa masu (*Oncorhynchus masu*) a lososa keta (*Oncorhynchus keta*) se u budoucích testes formují krevní vlasečnice u zdánlivých vývodných kanálek, především v proximální a distální části, zatímco u ovarií se vlasečnice objevují především v laterální části (Nakamura, 1978). Tato charakteristika proto může být použita při určování pohlaví u lososů (Nakamura a kol., 1998). Lepori (1980) popisuje testikulární diferenciaci u kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Na Obr. č. 3 je možné vidět jednoduché napojení gonády na peritoneální stěnu, bez vzniku jakékoliv dutiny.



Obr. č. 3: Schematické zobrazení testikulární diferenciace u kapra obecného (upraveno podle Lepori, 1980). Vysvětlivky: (ZB) zárodečné buňky; (SB) somatické buňky; (PS) peritoneální stěna; (C) cévy; (SK) semenotvorné kanálky

2.4.2. Spermatogeneze

V obecném pojetí je spermatogeneze určitý vývojový proces, při kterém malé množství diploidních buněk produkuje velké množství vysoce diferencovaných haploidních buněk (Nóbrega a kol., 2009). Spermatogeneze je rozdílná u blanatých obratlovců (plazi, ptáci, savci) a u bezblanných obratlovců kam patří paryby, ryby a obojživelníci. Jednotlivé fáze spermatogeneze u bezblanných obratlovců jsou znázorněny na Obr. č. 4. Ze zárodečných buněk vznikají nediferencované spermatogonie typu A. Dále probíhá růst a mnoho morfologických změn, díky kterým následně vznikají spermatogonie typu B. Po ukončení mitózy se spermatogonie typu B diferencují do primárních spermatocytů, ze kterých po prvním meiotickém dělení vznikají sekundární spermatocyty. Ze sekundárních spermatocytů vznikají druhým meiotickým dělením spermatidy (Schulz a kol., 2010).

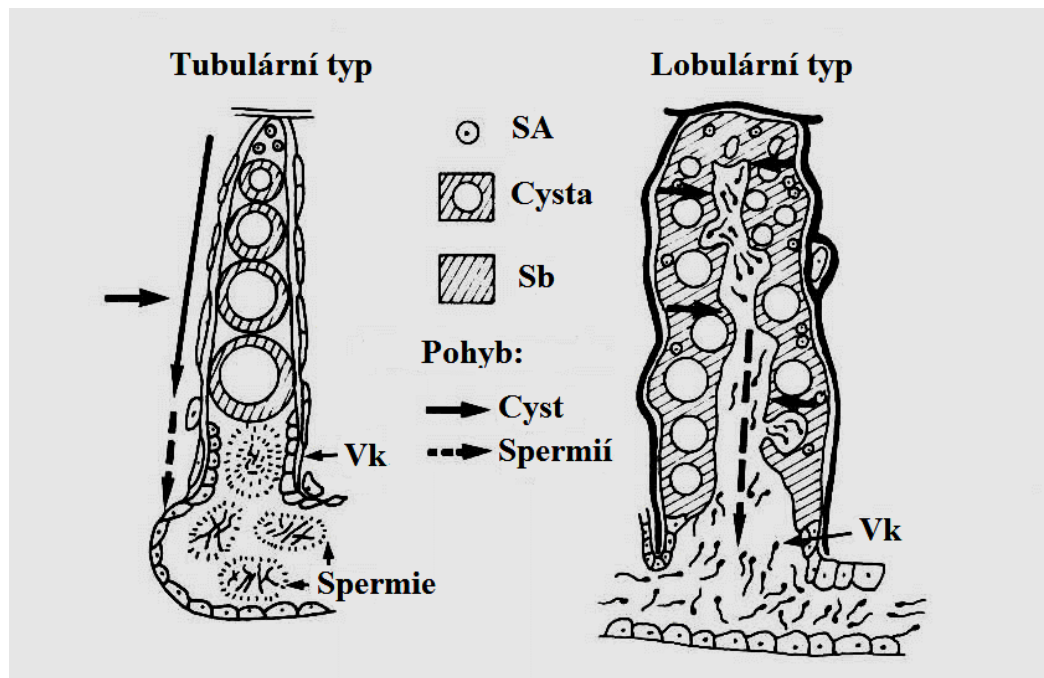


Obr. č. 4: Spermatogeneze u Dánia pruhovaného (upraveno podle Schulz a kol., 2010).
 Vysvětlivky: (BL) bazální lamina; (SB) Sertoliho buňky; (LB) Leydigovy buňky; (KC) cévy;
 (MB) myoidní buňky; (AS-N*) nediferencované spermatogonie typu A (kmenové buňky); (AS-N)
 nediferencované spermatogonie typu A; (AS-N) diferencované spermatogonie typu A; (BS-
 BS) spermatogonie typu B - časné stádium; (L/Z) leptotenní/zygotenní primární spermatocyt;
 (P) pachytenní primární spermatocyt; (D/MII) diplotenní spermatocyt v metafázi I; (D/MII)
 sekundární spermatocyt v metafázi II; (E1) časná spermatida; (E2) středně pokročilá spermatida;
 (E3) zralá spermatida; (S) spermie

U ryb se vykytuje cystický typ spermatogeneze (Callard, 1996). Pro cystický typ je charakteristické, že uvnitř spermatogenetických tubulů tvoří cytoplazmatická membrána Sertoliho buněk cysty, které obklopují synchronně se vyvíjející skupiny zárodečných buněk a zmíněné Sertoliho buňky mají schopnost se množit i u dospělých jedinců ryb (Schulz a kol., 2005).

Podle struktury testes můžeme rozdělit spermatogenezi na tubulární typ nebo na lobulární typ viz Obr. č. 5 (Billard, 1986). V centru varlete se u tubulárního typu vyskytuje velká dutina, ve které jsou uloženy spermie. Okolo této dutiny se nalézají tubuly, které směřují od dutiny směrem k obvodu varlete (Billard, 1972). Ve vrcholech těchto tubulů se soustřeďují zárodečné buňky a nediferencované spermatogonie. Časná

stádia spermatogonii tvoří cysty, které v průběhu spermatogeneze postupují do centra varlete. Tubulární typ testes byl popsán například u živorodky duhové (Billard, 1986). U lobulárního typu pojivová tkáň vytváří nepravidelné tubuly, které jsou lemovány epitelem se Sertoliho buňkami a zárodečnými buňkami. Lobulární typ má spermatogonie typu A okolo lobulů, zatímco u tubulárního typu se vyskytují spermatogonie typu A pouze ve vrcholcích tubulů, jak již bylo zmíněno. Během spermatogeneze cysty sestupují přímo do středu lobulů. Na konci spermatogeneze jsou spermie uvolňovány do lobulárních lumenů, ze kterých se dostávají do vývodných kanálků testes (Billard, 1972; Billard, 1982). Lobulární typ testes se vyskytuje u většiny kostnatých ryb, například u kaprovitých a lososovitých (Billard, 1986).



Obr. č. 5: Schematické zobrazení dvou typů struktury testes, tubulární typ u živorodky duhové a lobulární typu u pstruha (upraveno podle Billard, 1986). Vysvětlivky: (SA) spermatogonie typu A; (Sb) Sertoliho buňky; (Vk) vývodné kanálky

2.5. Samičí pohlavní soustava

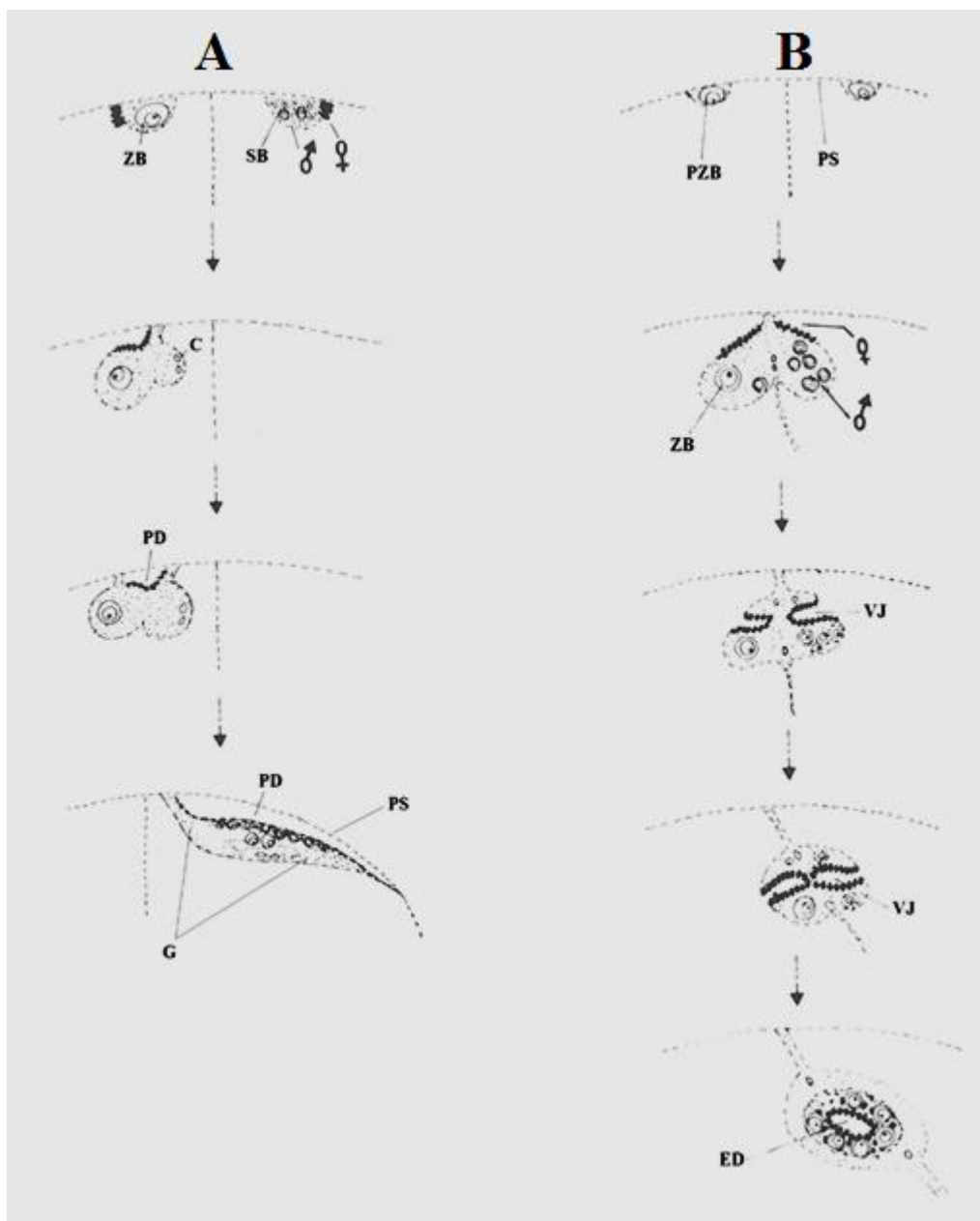
Samičími pohlavními orgány jsou ovaria, která produkují samičí pohlavní buňky, u ryb známé jako jikry (Dvořák a kol., 2014). Ovaria se v tělní dutině zakládají párovitě, ale u mnoha druhů ryb je v dospělosti viditelná určitá asymetrie. Uvnitř ovarii se vyskytují přepážky, které mohou být postaveny příčně jako např. u okouna a candáta, nebo jsou postaveny podélně jako např. u makrely a tresky (Baruš a kol., 1995).

2.5.1. Ovariální diferenciace

U medaky japonské (*Oryzias latipes*) se uvádí, že se ve zdánlivých ovariích po vykulení jedince nachází větší počet zárodečných buněk, než je tomu u zdánlivých testes. Navíc mitóza a meióza probíhají dříve u ovarií, než u testes (Nakamura a kol., 1998). Také u geneticky určených samic medaky japonské probíhá mitóza zárodečných buněk ještě před vykulením jedince, zatímco u geneticky určených samců k mitóze nedojde, dokud celková délka těla jedince nedosáhne 6,5 cm (Ornitake, 1972). Větší počet zárodečných buněk u zdánlivých ovarií byl pozorován také u tlamouna mosambického (*Oreochromis mossambicus*) a pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), ale i u dalších druhů kostnatých ryb. Obecně se tedy akceptuje, že před počátkem ovariální diferenciace dochází ke zvýšení počtu zárodečných buněk (Nakamura a kol., 1998).

Na začátku pohlavní diferenciace u dánia pruhovaného (*Brachydanio rerio*) se v gonádách vyskytují pouze oocyty (Takahashi, 1977). Následně u poloviny jedinců oocyty v gonádách degenerují a mizí, dochází k rozvoji testikulární tkáně, stroma a gonády se diferencují do testes. Tento jev je označován jako juvenilní hermafroditismus. Juvenilní hermafroditismus byl popsán i u parmičky čtyřvousé (*Barbus tetrazona tetrazona*) nebo u lososa masu (*Oncorhynchus masou*), a proto premeiotické oocyty nejsou spolehlivým parametrem při určování pohlaví u těchto druhů ryb (Nakamura a kol., 1998).

U tlamouna mosambického a karase stříbřitého, ale i u dalších druhů ryb, je počátek oogeneze spojen s formováním ovariální dutiny (Nakamura, 1978; Lepori, 1980). Ovariální dutina může vznikat různými způsoby (Nakamura a kol., 1998). Na Obr. č. 6 A je znázorněn vznik parovariální dutiny u kapra obecného (Lepori, 1980). Tato dutina se vyskytuje v prostoru mezi gonádou a peritoneální stěnou. (Nakamura a kol., 1998). Naopak u okouna říčního dochází ke vzniku endovariální dutiny viz Obr. č. 6 B. Endovariální dutina se nachází, jak název napovídá, uvnitř gonády (Lepori, 1980).

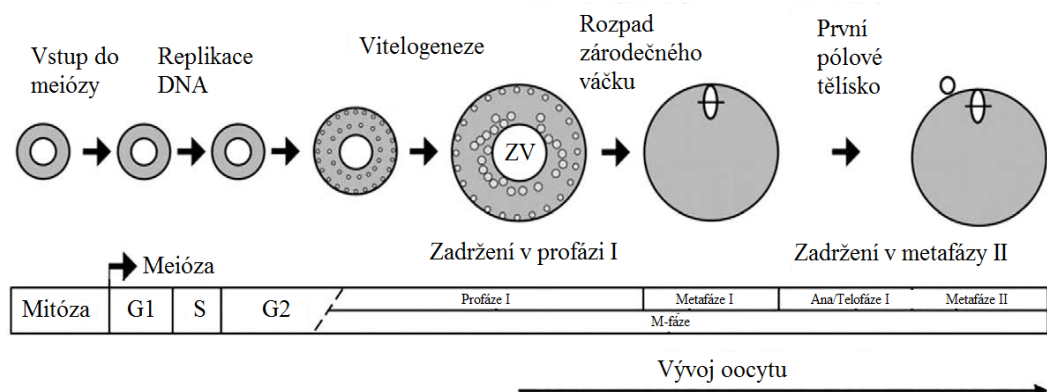


Obr. č. 6: (A) Schematické zobrazení vzniku parovariální dutiny u krapa obecného. Vysvětlivky: (ZB) zárodečné buňky; (SB) tělní buňky; (C) céva; (PD) parovariální dutina; (PS) peritoneální stěna; (G) gonáda. (B) Schematické zobrazení vzniku endovariální dutiny u okouna říčního. Vysvětlivky: (PZB) primární zárodečné buňky; (PS) peritoneální stěna; (ZB) zárodečné buňky; (VJ) vaječnicková jamka; (ED) endovariální dutina (upraveno podle Lepori, 1980).

2.5.2. Oogeneze

Oogeneze je proces, při kterém dochází k vytváření samičích pohlavních buněk neboli vajíček. Vývoj vajíček probíhá uvnitř ovariálních folikulů. Tento proces je velmi složitý a je doprovázen masivními strukturálními a funkčními změnami (Cerdá a kol., 2008a,b). Na začátku oogeneze jsou prvotní zárodečné buňky, které se formují do

oogonií. Oogonie se vyvíjejí uvnitř primordiálního ovariálního folikulu a následně vzniká primární oocyt, který vstupuje do meiózy I. Po vstupu do meiózy I je oocyt zadržen v profázi I. Během této fáze (vitelogeneze) dochází k růstu oocytu a uvnitř se shromažďuje RNA a energetické rezervy, které jsou důležité pro budoucí vývoj embrya (Lubzens a kol., 2010). Vitelogeneze je obecně popisována jako inkorporace vitelogenního proteinu, lipidů a vitamínů do oocytu (Le Menn a kol., 2007). Obnovení meiózy je spojeno s rozpadem zárodečného váčku a po prvním meiotickém dělení vznikají dvě buňky odlišné velikosti. Menší buňka je první pólóvé tělísko, které degeneruje a větší buňka, označována jako sekundární oocyt, je zadržena v metafázi druhého meiotického dělení. Vývoj oocytu je znázorněn na Obr. č. 7. K ovulaci dochází až na konci procesu dozrávání oocytů, kdy se sekundární oocyt přesune do ovariálního lumenu nebo do abdominální dutiny (záleží na druhu). Zde dochází k druhému meiotickému dělení a vzniká haploidní vajíčko (ovum) a druhé pólóvé tělísko, které také degeneruje (Lubzens a kol., 2010).



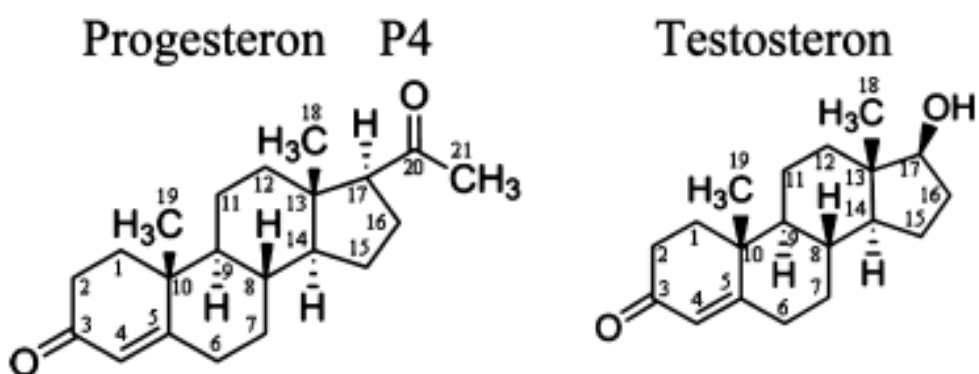
Obr. č. 7: Schematické zobrazení vývoje oocytu u kostnatých ryb (upraveno podle Lubzens a kol., 2010). Vysvětlivky: (G1) první fáze růstu; (S) syntetická fáze; (G2) druhá fáze růstu; (ZV) zárodečný váček

2.6. Progestiny

Progestiny jsou důležitou složkou orální antikoncepce, ale využívají se i k léčbě různých patologických stavů (Kumar a kol., 2015), a to k hormonální substituční terapii, prevenci předčasného porodu, nebo u hormonálních onemocnění jako je například endometrióza (Zhao, 2015). Dále mají význam v živočišné výrobě, kde jsou využívány například v USA a Číně jako růstové promotory u dobytka (Fent, 2015), nebo k řízení reprodukci (Liang a kol., 2015).

2.6.1. Vlastnosti a členění syntetických progestinů

Syntetické progestiny patří mezi steroidní hormony (Fent, 2015) a svými účinky napodobují přírodní hormon progesteron, který je jediným přírodním progestinem u lidí (Besse a Garric, 2009). Přírodním progestinem u ryb je například 17,20 β -dihydroxypregn-4-en-3-an nebo 17,20 β ,21-trihydroxy-pregn-4-en-3-an. Progesteron u ryb nemá tak významnou roli jako u lidí (Scott a kol., 2010). Syntetické progestiny jsou strukturně odvozeny od ženského hormonu progesteronu P4, nebo od mužského hormonu testosteronu (Sitruk-Ware a Nath, 2010). Viz Obr. č. 8. Relativně nedávno se začal vyrábět také derivát spironolaktonu pod označením drospirenon (Kumar a kol., 2015).



Obr. č. 8: Základní struktura progesteronu P4 a testosteronu (upraveno podle Kumar a kol., 2015)

Progesteronové deriváty můžeme rozdělit na pregnany a norpregnany, zatímco deriváty z testosteronu na estrany a gonany (Sitruk-Ware a Nath, 2010). Rozdělení progesteronových a testosteronových derivátů viz Tab. č. 1.

Z hlediska historického vývoje syntetických progestinů můžeme tyto látky rozdělit do několika skupin, progestiny první, druhé, třetí a čtvrté generace. Progestiny první generace byly syntetizovány v 50. letech minulého století. Jednalo se o deriváty testosteronu, které měly nežádoucí androgenní efekt, tedy aktivitu mužského pohlavního hormonu (Barták, 2006). První orální antikoncepce obsahovala progestin první generace, jmenovitě to byl norethynodrel (Dhont, 2010). Progestiny druhé generace, kam patří levonorgestrel nebo noresthisteron, jsou také deriváty testosteronu, ale vykazují menší androgenní efekt než progestiny první generace. Progestiny třetí generace, někdy označované jako neandrogenní progestiny, mají mít minimální androgenní aktivitu. Stále se ale jedná o deriváty testosteronu. Příkladem progestinu třetí generace je gestoden (Barták, 2006), nebo desogestrel (Runnals a kol., 2013). Progestiny čtvrté generace

vznikaly v průběhu posledních let a jsou někdy nazývané jako ideální progestiny, tedy bez androgenní aktivity. Do čtvrté generace progestinů patří drospirenon, nomegestrol acetát nebo nestoron (Sitruk-Ware a Nath, 2010).

Tab. č. 1: Členění a příklady vybraných syntetických progestinů (upraveno podle Kumar a kol., 2015; Genazzani a kol., 2000)

Strukturní odvození	Skupina	Progestin	Zkratka
<u>Progesteron</u>	Pregnan	Medroxyprogesteron acetát	MPA
		Medroxyprogesteron	MEP
		Chlormadinon acetát	CMA
		Cyproteron acetát	CPA
	Norpregnan	Nomegestrol acetát	NGA
		Nestoron	NES
		Trimegeston	TRI
<u>Testosteron</u>	Estran	Ethisteron	ETH
		Norethisteron	NET
		Norethisteron acetát	NEA
		Ethinodiol diacetát	EDA
		Dienogest	DIE
	Gonan	Levonorgestrel	LNG
		Dydrogesteron	DDG
		Norelgestromin	NGMN
		Desogestrel	DSG
		Norgestimat	NTE
		Gestoden	GES
	<u>Spironolakton</u>		Drospirenon

Progestiny působí zejména na mozek (hypothalamus, podvěsek mozkový) a reprodukční orgány (Fent, 2015). Účinky progestinů na organismus lidí jsou zprostředkovány zejména interakcí s progesteronovými receptory (PR) (Thomas a kol., 2004). Nežádoucím účinkem syntetických progestinů je interakce s jinými receptory jako

jsou: androgenní (AR), estrogenní (ER), glukokortikoidní (GR), nebo mineralokortikoidní (MR) receptory (Kumar a kol., 2015). Biologická aktivita některých vybraných syntetických progestinů u lidí je shrnuta v Tab. č. 2. Zmíněné syntetické progestiny čtvrté generace se vážou především na progesteronový receptor a s dalšími receptory interagují minimálně (Sitruk-Ware a Nath, 2010).

Principem hormonální antikoncepce je ovlivnění činnosti vaječníků skrze pozměněnou produkci gonadotropních hormonů, jmenovitě luteinizačního (LH) a folikulostimulačního (FSH), které jsou produkovány podvěskem mozgovým (Barták, 2006). Orální antikoncepce obsahuje kombinaci syntetického estrogenu ethinylestradiolu (EE2) a syntetického progestinu (Runnalls a kol., 2013). Existují různé kombinace syntetických progestinů se syntetickým estrogenem, ale dávka progestinů je vždy vyšší (až 100x) v porovnání s estrogenem (Zeilenger, 2009).

Tab. č. 2: Vybrané syntetické progestiny a jejich biologická aktivita u lidí (upraveno podle Schindler a kol., 2003; Kumar a kol., 2015)

Progestin	Aktivita					
	PR	ER	Anti-ER	AR	Anti-AR	GR
Chlormadinon acetát	+	-	+	-	+	+
Cyproteron acetát	+	-	+	+/-	+	+
Medroxyprogesteron	+	-	+	+	+/-	+
Nomegestrol acetát	+	-	+	-	+	-
Norethisteron	+	+	+	+	+/-	-
Levonorgestrel	+	+/-	+	+	-	-
Norgestimát	+	-	+	+	-	-
Gestoden	+	+/-	+	+	-	+/-
Drospirenon	+	-	+	-	+	-

Vysvětlivky: (+) aktivní; (-) neaktivní; (+/-) literatura se neshoduje; (PR) progesteronová; (ER) estrogenní; (Anti-ER) anti-estrogenní; (AR) androgenní; (Anti-AR) anti-androgenní; (GR) glukokortikoidní

2.6.2. Výskyt progestinů ve vodním prostředí

Progestiny se dostávají do komunálních odpadních vod v důsledku relativně velké spotřeby různých léčiv (především orální antikoncepce) obsahující tyto hormony. Na čistírnách odpadních vod nedochází k jejich účinnému odstranění, a proto se progestiny

(Zhao a kol., 2015) a jejich metabolity dostávají až do vodního prostředí (Besse a Garric, 2009). Celosvětová spotřeba syntetických progestinů není přesně známá, ale byly provedeny odhady spotřeb některých sloučenin v konkrétních evropských zemích (Kumar a kol., 2015). Spotřeba syntetických progestinů se mezi jednotlivými zeměmi liší. Například ve Švýcarsku v roce 2010 byla největší spotřeba drospirenonu (okolo 90 kg), cyproteronu acetátu (cca 50 kg) a dydrogesteronu (cca 36 kg) (Fent, 2015). Ve Francii v roce 2004 vykazoval největší spotřeba cyproteron acetát (cca 822 kg), dydrogesteron (cca 745 kg) a chlormadidon acetát (cca 385 kg) (Besse a Garric, 2009).

Koncentrace syntetických progestinů se v odpadních vodách pohybuje v rozmezí od několika jednotek až do stovek ng.l^{-1} (Fent, 2015). Například ve Španělsku byl levonorgestrel detekován v koncentracích 0,2-16,1 ng.l^{-1} na přítocích do čistírny odpadních vod (ČOV) a na odtoku z ČOV v koncentraci 0,2-4 ng.l^{-1} (López de Alda a kol., 2002). Dále v Malajsii byla u norethisteronu zaznamenána koncentrace až 188 ng.l^{-1} ve vyčištěné odpadní vodě, přičemž norethisteron patřil v té době mezi pět nejvíce konzumovaných progestinů v této zemi (Al-Odaini a kol., 2010). Další koncentrace syntetických progestinů v odpadních vodách jsou uvedeny v Tab. č. 3. Chang a kol. (2011) poukazují na to, že koncentrace progestinů na přítoku v porovnání s koncentracemi na odtoku některých čistíren odpadních vod nebyly příliš rozdílné. Na druhé straně v Pekingu byly hodnoty progestinů v odtékající vody z čistírny odpadních vod mnohem menší než v přitékající vodě. Docházelo zde k odstranění progestinů s účinností až 90 %.

V povrchové vodě byly často detekovány koncentrace podobné těm, které byly zaznamenány ve vyčištěné odpadní vodě. Jednalo se zpravidla o koncentrace dosahující jednotek až desítek ng.l^{-1} , ale někdy jsou i větší (Fent, 2015), například v Malajsii byla naměřena koncentrace levonorgestrelu až 213 ng.l^{-1} (Al-Odaini a kol., 2013). Dále koncentrace norethisteronu se v povrchové vodě v Malajsii pohybovala v rozsahu pod mezí detekce až po 2,9 ng.l^{-1} (Vulliet a kol., 2008). V jezeře Balaton a řece Zala v Maďarsku byly zjištěny koncentrace levonorgestrelu 0,85-3,40 ng.l^{-1} a drospirenonu 0,26-4,30 ng.l^{-1} (Avar a kol., 2016). Další informace o koncentracích syntetických progestinů v povrchových vodách jsou uvedené v Tab. č. 3.

Tab. č. 3: Koncentrace vybraných syntetických progestinů v odpadních a povrchových vodách.

Progestin	Přítok ČOV (ng.l⁻¹)	Odtok ČOV (ng.l⁻¹)	Povrchová voda (ng.l⁻¹)	Odkaz
LNG	NA	NA	38	Al-Odaini a kol., 2010
	28,6	6,7	3,7	Liu a kol., 2011
	59	9,2	NA	Liu a kol., 2011
	74,3	8,1	7,5	Qiao a kol., 2009
	NA	NA	5,3 a 7	Vulliet a kol., 2008
	NA	NA	3,6	Vulliet a kol., 2008
NET	205 a 70	53	ND	Viglino a kol., 2008
	<0,2-8,9	NA	NA	Petrovic a kol., 2002
	NA	NA	2	Vulliet a kol., 2011
	NA	NA	2,7-2,8	Vulliet a kol., 2008
MPA	0,21 a 2,42	0,03 a 0,42	ND	Chang a kol., 2008
	6,42	NA	1-5	Amman a kol., 2014
	NA	2,42	0,9	Liu a kol., 2014
	NA	NA	34	Chang a kol., 2009
	NA	15	1	Kolodziej a kol., 2003

Vysvětlivky: (LNG) levonorgestrel; (NET) norethisteron; (MPA) medroxyprogesteron acetát; (ND) pod mezí detekce; (NA) neanalyzováno

2.6.3. Vliv syntetický progestinů na ryby

Syntetické progestiny se dostávají do vodního prostředí a mohou tak negativně působit na vodní organismy (Hua a kol., 2015), ale doposud bylo jen několik těchto látek testováno ohledně jejich možných účinků na ryby (Runnalls a kol., 2013). U raných vývojových stádiích ryb expozice syntetickým progestinům ve vodě negativně ovlivňuje vývoj gonád, což vede ke změně poměrů pohlaví (Fent, 2015). Expozice některých syntetických progestinů i při velmi malých koncentracích několika ng.l^{-1} může ovlivňovat plodnost, reprodukci a reprodukční chování u dospělců mnoha druhů ryb (Kolodziej a kol., 2003; Kumar a kol., 2015; Fent, 2015). Některé syntetické progestiny s androgenní aktivitou mohou také způsobovat maskulinizaci u samic, tzn. vývoj sekundárních pohlavních znaků typických pro samce (Bain a kol., 2015). Mezi progestiny, u kterých již bylo prokázáno, že způsobují maskulinizaci samic patří levonorgestrel, gestoden, norethisteron a desogestrel (Zeilinger a kol., 2009; Runnalls a kol., 2013; Paulos a kol., 2010). Expozice gestodenu nebo desogestrelu v koncentraci $> 1 \text{ ng.l}^{-1}$ a 100 ng.l^{-1} v uvedeném pořadí, po dobu 21 dní způsobovala maskulinizaci u samic jelečka velkohlavého (*Fathead minnow*) (Runnalls a kol., 2013). Zeilinger a kol. (2009) zdokumentovali, že 21 denní expozice levonorgestrelu v koncentraci $> 0,8 \text{ ng.l}^{-1}$ také způsobovala maskulinizaci u jelečka velkohlavého. Příklady dalších účinků syntetických progestinů jsou uvedené v Tab. č. 4.

Tab. č. 4: Účinky vybraných syntetických progestinů

Progestin	Druh	LOEC (ng.l ⁻¹)	Pohlaví, věková skupina	Doba trvání	Účinky (na)	Odkaz
Levonorgestrel	Jeleček velkohlavý	0,8	Samice	21 dní	Snížení plodnosti	Zeilinger a kol., 2009
Levonorgestrel	Jeleček velkohlavý	86,9 a 462	Embryo	28 dní	Přežití a růst	Overturf a kol., 2014
Norethisteron	Jeleček velkohlavý	1	Samice	21 dní	Snížení plodnosti	Paulos a kol., 2010
Norethisteron	Medaka japonská	25	Samice	28 dní	Snížení plodnosti	Paulos a kol., 2010
Gestoden	Jeleček velkohlavý	1	Samice	21 dní	Snížení plodnosti	Runnalls a kol., 2013
Drospirenon	Jeleček velkohlavý	6500	Samice	21 dní	Snížení plodnosti	Zeilinger a kol., 2009
Desogestrel	Jeleček velkohlavý	1000	Samice	21 dní	Snížení plodnosti	Paulos a kol., 2010

Vysvětlivky: (LOEC) nejnižší koncentrace testované látky, při které jsou pozorovány účinky

2.6.3.1. Vliv syntetických progestinů na gonády ryb

Jak již bylo zmíněno, tak progestiny výrazně ovlivňují vývoj gonád a ve výsledku pak poměr pohlaví u ryb (Fent, 2015). Expozice dydrogesteronu (1263 ng.l⁻¹) a směsi medoxyprogesteronu acetátu s dydrogesteronem o koncentraci 432 a 1663 ng.l⁻¹ (v uvedeném pořadí) trávající 21 dnů snížila počty oocytů v ovulační fázi v ovarích ve srovnání s kontrolou u dospělců dánia pruhovaného (*Danio rerio*). Expozice stejné směsi a dydrogesteronu o 89 ng.l⁻¹ zvýšila množství zralých spermatocytů v testes exponovaných ryb ve srovnání s kontrolou (Zhao a kol., 2015).

Experiment autorů Liang a kol. (2015), ve kterém byl testován vliv norgestrelu na poměr pohlaví u dánia pruhovaného, ukázal, že koncentrace testované látky ≥ 34 ng.l⁻¹

zvýšily procentuální zastoupení samců na 100 %. Expozice norgestrelu probíhala od 20. do 60. dne po oplození jiker, po 60. dni byly ryby přemístěny do čisté vody bez přítomnosti testované látky a pohlaví ryb bylo určováno až 140. den po oplození. Je nutné zmínit, že norgestrel je racemická směs, kde jen jedna složka je biologicky aktivní a druhá nikoliv. Biologicky aktivní složkou je zde levonorgestrel. Hua a kol. (2015) který exponoval dánia přímo levonorgestrem v koncentraci větší než 10 ng.l^{-1} , opět pozoroval 100% zastoupení samců v pokusných skupinách. V tomto případě expozice probíhala v období od oplození jiker až do 63. dne po oplození.

Dalším příkladem je experiment autorů Svensson a kol. (2016), kde bylo dáanio pruhované exponované levonorgestrelu a progesteronu. Cílem bylo zjistit, jak se budou lišit účinky testovaných látek v závislosti k délce expozice a věku dánia pruhovaného. Při koncentraci levonorgestrelu $\geq 5,5 \text{ ng.l}^{-1}$ a expozici začínající 20. den a končící 80. den po oplození, bylo již 50. den po oplození pozorováno 100 % samců v exponovaných skupinách a 80. den po oplození byly výsledky stejné. Naopak stejná expozice progesteronu, látky bez androgenního účinku, nezpůsobila žádné výrazně změny v poměru pohlaví v testovaných skupinách 50. ani 80. den po oplození. Z výsledků bylo zřejmé, že po 50. dni od oplození už nedochází k ovlivnění poměru pohlaví v porovnání s 80. dnem po oplození.

3. Materiál a metodika

V prostorách Laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie (LVTI) na VÚRH ve Vodňanech (FROV JU) byl proveden chronický test na kapru obecném (*Cyprinus carpio*), který byl vystaven působení dvou různých syntetických progestinů (gestodenu, drospirenonu) a jejich vzájemné kombinaci. Test trval 160 dnů a probíhal od stádia váčkového plůdku až do období, kdy došlo k vývoji pohlavních orgánů. Váčkový plůdek byl získán z Genetického rybářského centra ve Vodňanech (VÚRH, FROV JU).

Samotný experiment byl prováděn pracovníky laboratoře Vodní toxikologie a ichtyopatologie, zejména Mgr. Jitkou Tumovou a Ing. Pavlem Šauerem. Má role v experimentu spočívala především ve zpracování histologických vzorků, konkrétně řezání těl ryb na mikrotomu, zalévání vzorků do parafinových bločků a pomoci v ostatních krocích histologického zpracování.

3.1. Návrh experimentu

Ryby byly v chronickém testu rozděleny do pěti pokusných skupin ve dvou opakováních. Do každé skupiny bylo nasazeno 200 ks oplozených jiker. První kontrolní skupina byla chována v čisté ředící vodě bez přítomnosti progestinů. Jako ředící voda byla použita dechlorovaná voda z vodovodního řádu. Druhá kontrolní skupina byla chována v ředící vodě s rozpouštědlem DMSO (dimethylsulfoxid) o koncentraci $5 \mu\text{l.l}^{-1}$. Do pokusných skupin byly dávkovány progestiny rozpuštěné v DMSO, aby se docílilo lepšího rozpuštění testovaných látek (testované látky mají lipofilní charakter). Z tohoto důvodu byla zahrnuta kontrolní skupina s DMSO, aby byl vyloučen efekt samotného rozpouštědla. Třetí skupina ryb byla vystavena působení gestodenu v koncentraci 2 ng.l^{-1} a čtvrtá skupina drospirenonu v koncentraci 2 ng.l^{-1} . Poslední, pátá skupina (Mix) byla vystavena směsi gestodenu a drospirenonu, kde každá látka dosahovala koncentrace 2 ng.l^{-1} .

První měsíc byly ryby chovány ve skleněných krystalizačních miskách a poté byly přeloveny do skleněných lahví s objemem lázně 2-3 litry. Za měsíc a půl následoval přesun do skleněných akvárií, kde se objem lázně postupně zvyšoval ze 100, na 200 až 300 litrů vzhledem k růstu ryb. Jednalo se o semistatické systémy, kde docházelo k výměně lázně každých 24 hodin. Od 6. dne byly ryby krmeny *ad libitum* dvakrát denně žábřonožkou solnou (*Artemia salina*), postupně se přecházelo na granulovanou potravu. Posledních 60 dnů byla předkládána pouze granulovaná potravu bez žábřonožky solné.

V průběhu testu byla denně evidována mortalita ryb, kulení, teplota vody, pH vody a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Průměrná teplota vody byla 21 °C, pH vody se pohybovalo okolo 7,7 a koncentrace rozpuštěného kyslíku okolo 98,7 % nasycení. Po 160-ti dnech byly ryby usmrceny vyšší dávkou anestetika (fenoxyethanolu), následně byly změřeny a zváženy. Břišní dutina ryb byla částečně otevřena a ocasní část těla byla odstraněna. Poté byly ryby uloženy do 10% roztoku pufrovaného formalínu (*in toto*).

3.1.1. Hmotnost, délka a Fultonův koeficient

Délka těla (*longitudo corporis*) ryb byla měřena pomocí posuvného měřítka a hmotnost ryb byla zaznamenávána na laboratorních předvážkách se zaokrouhlením na jedno desetinné číslo. Ze zjištěných délek a hmotností byl vypočítán Fultonův koeficient podle vzorce viz níže.

Fultonův koeficient: $K_f = \frac{m}{DT^3} \cdot 100$, kde **m** je hmotnost těla (g) a **DT** je délka těla (cm).

3.1.2. Ověření koncentrace progestinů

Vzorky lázně pro ověření koncentrace testovaných látek byly náhodně odebrány 6x v průběhu testu z každé skupiny. Odběry byly prováděny po obnově lázně (cca do 0,5 hodiny po aplikaci progestinů do akvárií) a po 24 hodinách před výměnou staré lázně za novou. Koncentrace testovaných látek byla měřena pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) ve spolupráci s Laboratoří environmentální chemie a biochemie (ECHB) na VÚRH ve Vodňanech (FROV JU).

3.2. Histologické zpracování vzorků

3.2.1. Chemikálie

Chemikálie použité v experimentu:

- Aceton: Penta, čistý
- Dekalcifikační roztok: VWR Prolabo Chemicals, Roztok kyseliny mravenčí
- Eosin: Diapath, Alkoholový roztok 0,5 %
- Ethanol absolutní: Penta, p.a., 100%
- Ethanol histologický: Diapath, Histoalkohol 99,7-99,9 %
- Hematoxylin (Mayerův): Diapath
- Lepidlo: Histolab, Pertex, Montovací médium pro světelnou mikroskopii

- Parafín: Bamed, Histowax 56-58 °C
- Pufrovací roztok (Scott's tap water)
- Xylen: Penta, p.a., směs izomerů

3.2.2. Přístroje

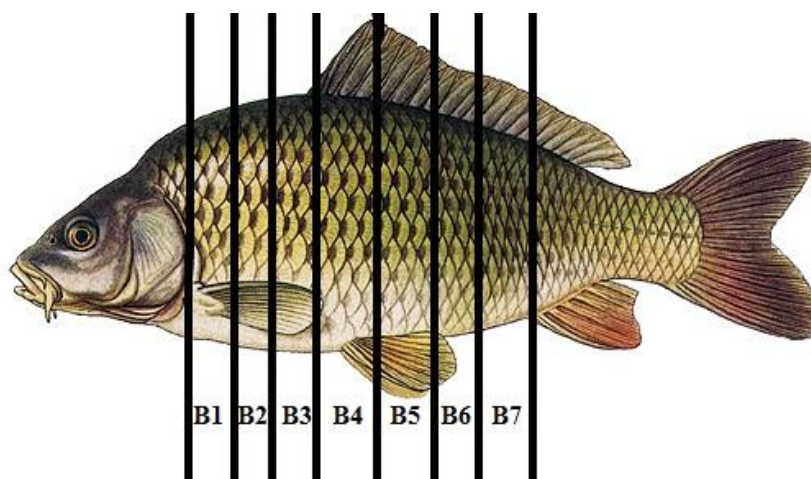
Přístroje použité v experimentu:

- Barvicí automat: Sakura, 1452
- Mikrotom: Diapath Galileo
- Sušárna: Thermostat, Ekom BT50
- Tkáňový procesor: Bamed
- Topná deska: Sakura, 1452
- Vodní lázeň: Medite, TFB 55
- Zalévací linka: Leica, EG 1150H

3.2.3 Postup histologického zpracování vzorků

Histologické zpracování těl ryb probíhalo v následujících krocích: dekalifikace, dehydratace, zalévání do parafinových bločků, řezání pomocí mikrotomu a barvení řezů hematoxylinem a eosinem.

Na začátku histologického procesu byly ryby přemístěny z 10% formalínu do dekalifikačního roztoku. Dekalifikační roztok způsobí odvápnění kostí, které následně změknou. Díky dekalifikaci je poté možné jednotlivé vzorky snadněji řezat pomocí mikrotomu. Po dvou hodinách dekalifikačního procesu byli jednotliví jedinci manuálně rozřezáni na části B1 až B7 podle velikosti jedince tak, aby tloušťka jednotlivých kusů těl nepřesahovala 0,6 cm – viz Obr. č. 9. Chtěli jsme tak dosáhnout úplné dekalifikace.



Obr. č. 9: Řezy těla kapra obecného pro histologické zpracování (upraveno podle autora)

V průběhu řezání se zmíněné části uzavíraly do popsaných histologických kazet a znovu se vkládaly do dekalciфикаčního roztoku. Dekalcifikace trvala celkově 24 hodin. Po 24 hodinách byly vzorky opláchnuty ve vodě, nebo v 30% ethanolu. Následovala dehydratace vzorků pomocí ethanolu o různých koncentracích, acetonu, xylenu a nakonec parafinu – viz Tab. č. 5. Celý proces dehydratace trval vždy 10 hodin a 30 minut.

Tab. č. 5: Průběh dehydratace (upraveno podle standardního protokolu používaného v Histologické laboratoři LVTI, VÚRH Vodňany)

Pozice	Roztok	Doba (h:m)
1	Ethanol 30%	00:20
2	Ethanol 50%	01:00
3	Ethanol 70%	01:20
4	Ethanol 80%	01:00
5	Ethanol 96%	00:20
6	Ethanol 100%	01:00
7	Aceton	00:30
8	Xylen I	00:20
9	Xylen II	00:40
10	Xylen III	01:00
11	Parafín	01:00
12	Parafín	02:00
	Celkový čas zpracování	10:30

Po dehydrataci byly vzorky postupně zalévány do parafinových bločků – viz Obr. č. 10. Orientace tkáně v parafinovém bločku byla zvolena tak, aby bylo možné řezat ve směru od ventrální k dorzální části těla, a to především z důvodu co nejmenšího poškození vnitřních orgánů.



Obr. č. 10: Jednotlivé části těla kapra obecného zalité v parafinových bločcích (archiv autora)

Před samotným řezáním byly parafinové bločky nejdříve chlazeny v mrazničce po dobu cca 5 minut. K řezání byl použit poloautomatický mikrotom (viz Obr. č. 11) a tloušťka řezů byla nastavena na 4,5 μm . Nejčastěji byly řezány části B2, B3, nebo B4 (viz Obr. č. 12), jelikož v těchto částech se předpokládalo uložení gonád. Z vybraného bločku se prováděly zpravidla čtyři řezy.



Obr. č. 11: Mikrotom (archiv autora)



Obr. č. 12: Parafínový bloček upevněný v mikrotomu (archiv autor)

Histologické řezy byly poté pomocí pinzety přemístěny do vodní lázně (viz Obr. č. 13), kde docházelo k vyhlazování a napnutí řezu (viz Obr. č. 14). Teplota vodní lázně se pohybovala okolo 40 °C.



Obr. č. 13: Vodní lázeň (archiv autora)



Obr. č. 14: Řez umístěný ve vodní lázni (archiv autora)

Z vodní lázně byly řezy přeneseny na popsaná laboratorní sklíčka a následně se sklíčka pokládala na topnou desku, kde docházelo k fixaci vzorku na sklíčko (viz Obr. č. 15). Teplota desky byla nastavena na cca 40 °C.



Obr. č. 15: Topná deska (archiv autora)

Poté byla sklíčka z topné desky postupně přemístěna do stojánu viz Obr. č. 16. Před samotným barvením byl stojánek dán na 2 hodiny do sušárny (56 °C), aby došlo k odstranění parafínu.



Obr. č. 16: Stojánek se vzorky

Barvení vzorků hematoxylinem a eosinem probíhalo v barvicím automatu. Proces barvení je popsán v Tab. č. 5. Celý proces barvení trval přibližně 1,5 hodiny. Obarvené vzorky byly překryty krycím sklíčkem, které bylo fixováno pomocí lepidla. Konečný zpracovaný vzorek je na Obr. č. 17.



Obr. č. 17: Výsledné histologické preparáty (archiv autora)

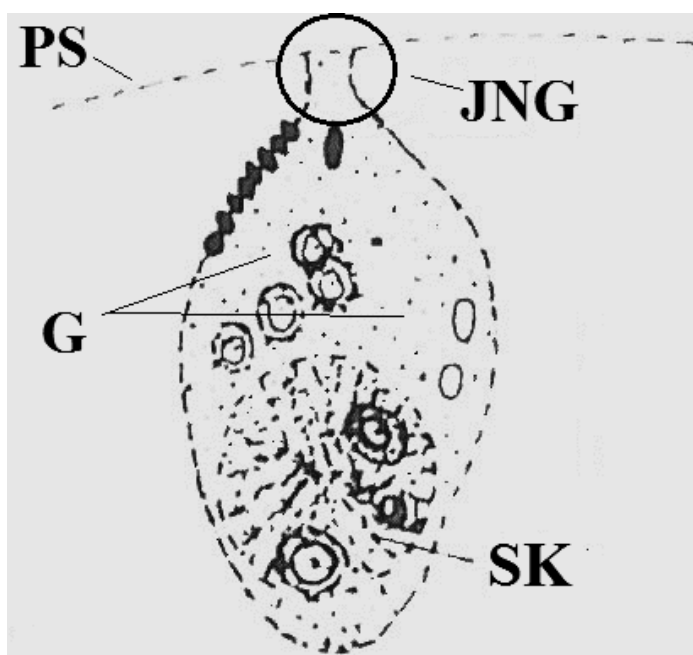
Tab. č. 6: Proces barvení (upraveno podle standardního protokolu používaného v Histologické laboratoři LVTI, VÚRH Vodňany)

Pozice	Roztok	Doba (m:s)
15	Xylen	10:00
16	Xylen	10:00
17	Xylen	10:00
18	Ethanol 100%	05:00
19	Ethanol 96%	05:00
20	Ethanol 80%	05:00
23	Destilovaná voda	00:30
1	Hematoxylin	15:00
2	Destilovaná voda	00:30
3	Pufrovací roztok	04:00
4	Destilovaná voda	00:30
5	Eosin	01:00
6	Destilovaná voda	00:02
7	Ethanol 80%	02:00
8	Ethanol 96%	02:00
12	Xylen	10:00
13	Xylen	10:00

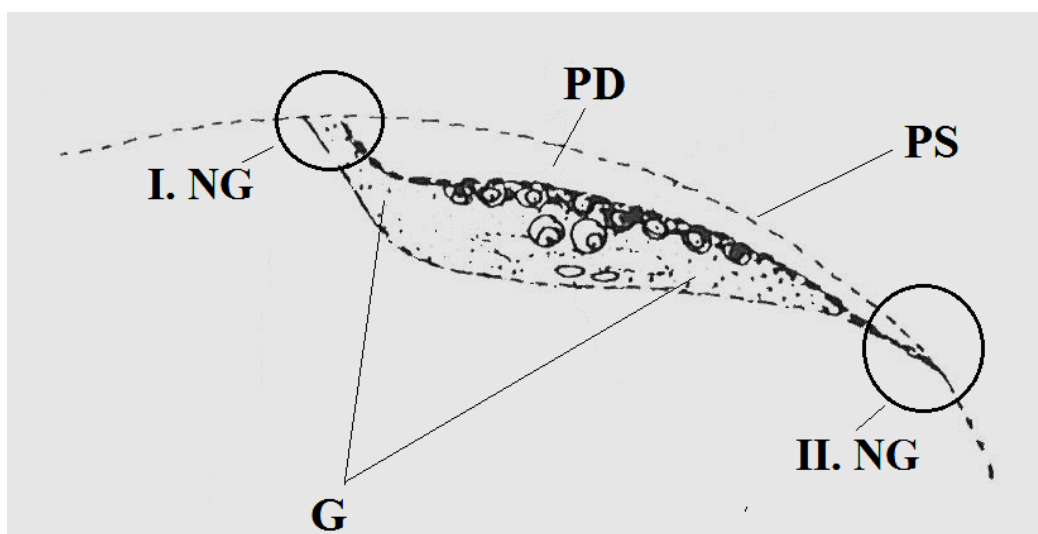
3.3. Vyhodnocení vzorků

3.3.1. Určování pohlaví ryb z histologických preparátů

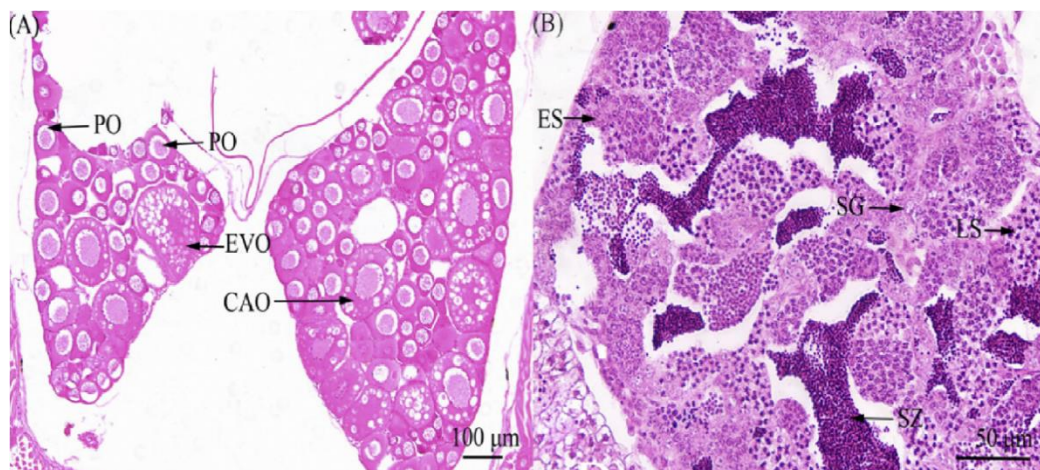
Histologické preparáty byly vyhodnocovány pomocí světelného mikroskopu (Olympus BXE). Pohlaví ryb bylo určováno podle znaků testikulární nebo ovariální diferenciace popsaných v práci Lepori (1980). U raných testes bylo možné vidět jednoduché napojení gonády na peritoneální stěnu (viz. Obr. č. 18), zatímco u raných ovarií bylo dvojí napojení gonády na peritoneální stěnu a tzv. parovariální dutina (viz. Obr. č. 19). Tam, kde to bylo možné, byly identifikovány i pohlavní buňky – viz Obr. č. 20, kde jsou zobrazeny pohlavní buňky v ovariích a testes u dánia pruhovaného (*Danio rerio*) (Hua kol., 2015). Vybrané vzorky byly foceny pomocí fotoaparátu (Olympus 600 IS) umístěného na mikroskopu (Olympus BXE) a počítače, s využitím programu analýza obrazu Quick photo micro 2.3.



Obr. č. 18: Schematické zobrazení testikulární diferenciace u kapra obecného (upraveno podle Lepori, 1980). Vysvětlivky: (G) gonáda; (JNG) jednoduché napojení gonády; (PS) peritoneální stěna; (SK) semenotvorné kanálky



Obr. č. 19: Schematické zobrazení ovariální diferenciace u kapra obecného (upraveno podle Lepori, 1980). Vysvětlivky: (G) gonáda; (I. NG) první napojení gonády; (II. NG) druhé napojení gonády; (PD) parovariální dutina; (PS) peritoneální stěna



Obr. č. 20: Histologické řezy ovarií a testes u dánía pruhovaného (*Danio rerio*) (upraveno podle Hua kol., 2015). Vysvětlivky: (A) Část ovarií po 63 dnech po oplození, (B) Část testes po 63 dnech po oplození. (PO) primární oocyt; (CAO) oocyt ve stádiu kortikálních alveol; (EVO) oocyt na počátku vitelogeneze (SG) spermatogonie; (ES) spermatocyt – časné stádium; (LS) spermatocyt – pokročilé stádium; (SZ) spermie

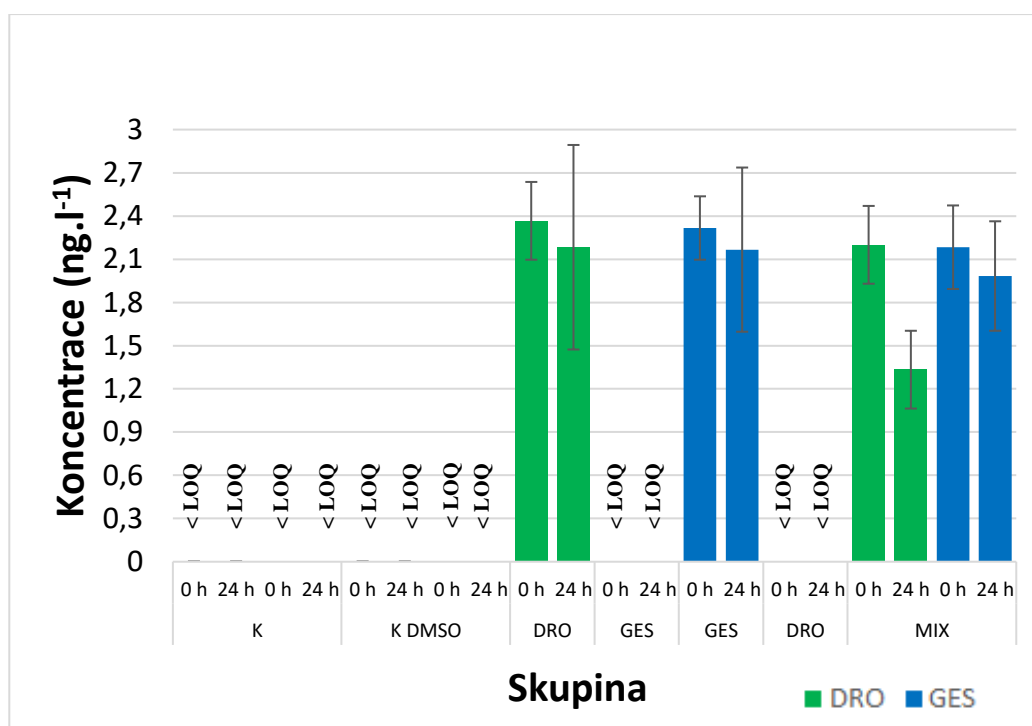
3.3.2. Statistické vyhodnocení

Výsledky byly vyhodnoceny v programu Statistica 12. Pro vyhodnocení poměru pohlaví byl použit Pearsonův chí kvadrát test. Rozdíly v hmotnosti, délce a Fultonově koeficientu mezi jednotlivými skupinami byly vyhodnoceny pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) a Tukey-HSD testu pro nestejně N.

4. Výsledky

4.1. Koncentrace testovaných látek

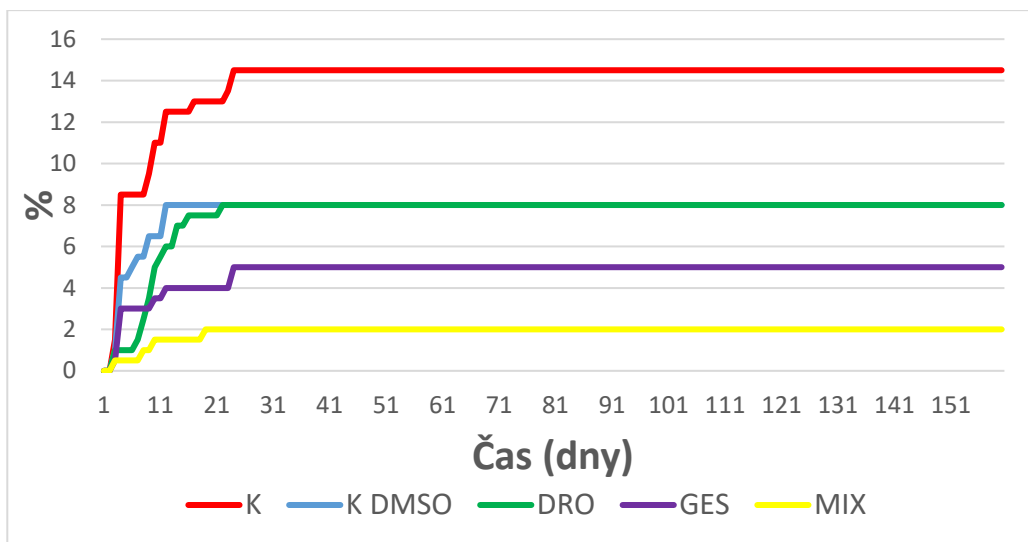
V grafu č. 1 jsou prezentovány průměrné koncentrace testovaných látek v jednotlivých skupinách. Pokles koncentrace pod 80 % byl zaznamenán pouze ve skupině Mix, konkrétně u drospirenonu. Pokles mohl být způsoben částečnou akumulací této látky do ryb, nebo degradací.



Graf č. 1: Koncentrace testovaných látek ve vodě těsně po výměně lázně (čas 0 h) a po 24 hodinách těsně před výměnou lázně za novou (čas 24 h). Uvedené koncentrace jsou prezentovány jako průměry a jejich směrodatné odchylky ($n_{\min} = 6$). Vysvětlivky: (K) kontrolní skupina; (K DMSO) kontrolní skupina s rozpouštědlem; (DRO) drospirenon; (GES) gestoden; (MIX) směs drospirenonu a gestodenu; (LOQ) mez stanovitelnosti

4.2. Kulení a mortalita ryb

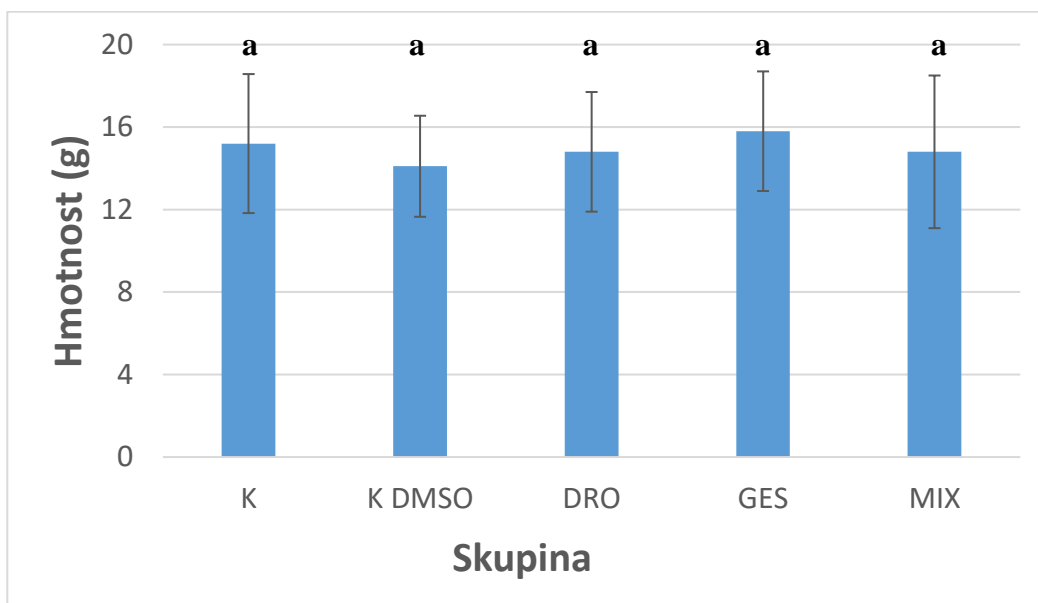
Mezi skupinami nebyl signifikantní rozdíl v čase kulení ryb. Kulení probíhalo mezi třetím až pátým dnem. Na grafu č. 1 je zobrazena kumulativní mortalita v jednotlivých skupinách. Mortalita nepřesáhla 14,5 % a nebyl zde signifikantní rozdíl mezi skupinami.



Graf č. 2: Kumulativní mortalita. Vysvětlivky: (K) kontrolní skupina; (K DMSO) kontrolní skupina s rozpouštědlem; (DRO) drospirenon; (GES) gestoden; (MIX) směs drospirenonu a gestodenu

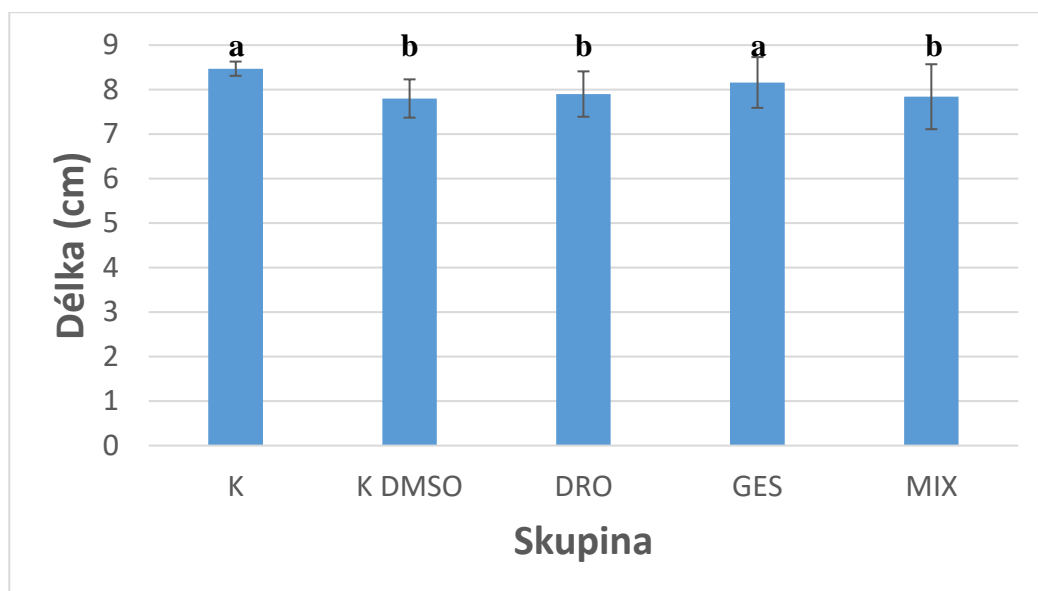
4.3. Porovnání výživného stavu ryb

Statistické vyhodnocení hmotnosti ryb pomocí ANOVy na zvolené hladině významnosti $p < 0,05$ neukázalo rozdíl mezi pokusnými skupinami. Graf č. 3 ukazuje průměry hmotností ryb v jednotlivých skupinách.



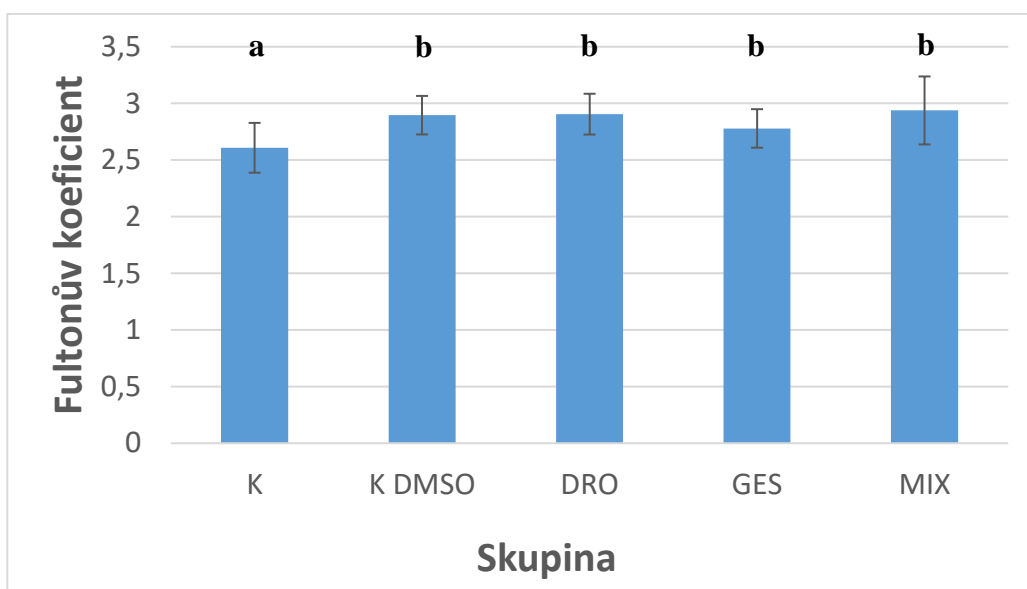
Graf č. 3: Hmotnost ryb. Uvedené hodnoty jsou prezentovány jako průměry a jejich směrodatné odchylky ($n_{\min} = 12$). Vysvětlivky: (K) kontrolní skupina; (K DMSO) kontrolní skupina s rozpouštědlem; (DRO) drospirenon; (GES) gestoden; (MIX) směs drospirenonu a gestodenu

Statistické vyhodnocení délky ryb na zvolené hladině významnosti $p < 0,05$ ukázalo rozdíl mezi skupinami. Rozdíl byl mezi kontrolní skupinou a ostatními skupinami, kromě skupiny gestoden. Na grafu č. 4 můžeme vidět, že největší průměrné hodnoty byly zaznamenány kontrolní skupině.



Graf č. 4: Délka ryb. Uvedené hodnoty jsou prezentovány jako průměry a jejich směrodatné odchylky ($n_{\min} = 12$). Vysvětlivky: (K) kontrolní skupina; (K DMSO) kontrolní skupina s rozpouštědlem; (DRO) drospirenon; (GES) gestoden; (MIX) směs drospirenonu a gestodenu

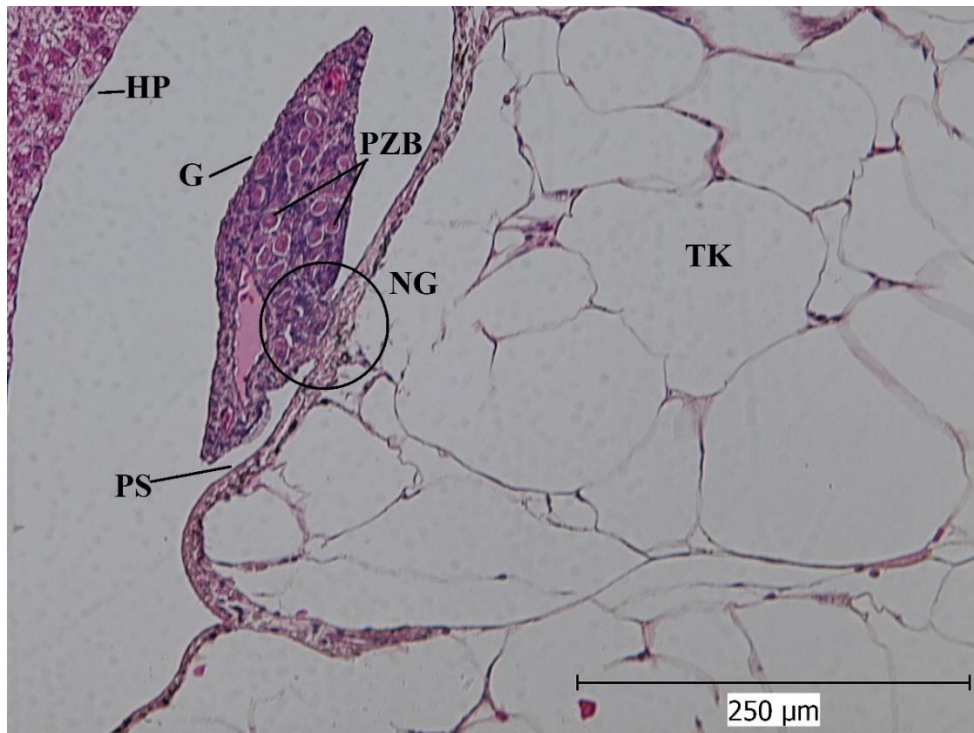
Statistického vyhodnocení Fultonova koeficientu pomocí ANOVy na zvolené hladině významnosti $p < 0,05$ ukázalo, že je rozdíl mezi kontrolní skupinou a ostatními skupinami, včetně kontrolní skupiny s DMSO. Graf č. 5 ukazuje průměry Fultonova koeficientu jednotlivých skupin a z tohoto grafu je zřetelné, že největší rozdíl mezi průměrnými hodnotami byl mezi kontrolní skupinou a skupinou exponovanou gestodenu a drospirenou (Mix).



Graf č. 5: Fultonův koeficient. Uvedené hodnoty jsou prezentovány jako průměry a jejich směrodatné odchylky ($n = 12$). Vysvětlivky: (K) kontrolní skupina; (K DMSO) kontrolní skupina s rozpouštědlem; (DRO) drospirenon; (GES) gestodenu; (MIX) směs drospirenonu a gestodenu

4.4. Poměr pohlaví

U raných vývojových stádií kapra obecného bylo problematické určit pohlaví na základě pohlavních buněk, a proto jsme se zaměřili na způsob napojení gonády k peritoneální stěně. Na Obr. č. 21 je viditelné jednoduché napojení gonády na peritoneální stěnu u samce kapra obecného (*Cyprinus carpio*). U samice je zřetelné dvojí napojení gonády na peritoneální stěnu, parovariální dutina a formování primárních oocytů (viz Obr. č. 22 a 23).



Obr. č. 21: Testes kapra obecného (archiv autora). Vysvětlivky: (G) gonáda; (HP) hepatopankreas; (NG) napojení gonády na peritoneální stěnu; (PS) peritoneální stěna; (PZB) primární zárodečné buňky; (TK) tuková tkáň



Obr. č. 22: Ovaria kapra obecného (archiv autora). Vysvětlivky: (C) céva; (G) gonáda; (HP) hepatopankreas; (NP) napojení gonády; (PD) parovariální dutina; (PO) primární oocyt; (PS) peritoneální stěna; (ST) svalová tkáň (TK) tuková tkáň



Obr. č. 23: Ovaria kapra obecného (archiv autora). Vysvětlivky: (C) céva; (G) gonáda; (PO) primární oocyt; (PS) peritoneální stěna; (TK) tuková tkáň

V každé testované skupině se objevil minimálně jeden intersex. Jako intersex byl identifikován jedinec, který měl napojení gonády na peritoneální stěnu, které odpovídalo jednomu pohlaví, ale uvnitř gonády byly identifikovány pohlavní buňky opačného pohlaví. Dále za intersex byli považováni jedinci, u nichž každý z páru gonád vykazoval znaky jiného pohlaví.

Na Obr. č. 24 je intersex ze skupiny exponované drospirenonu. Napojení gonády na peritoneální stěnu není typické, jako je tomu u samice na Obr. č. 22, ale přesto je viditelná parovariální dutina. Vznik této dutiny je typický pro ovaria, ale uvnitř gonády se vyskytují samčí pohlavní buňky (spermatidy) signalizující intersex, což je i lépe viditelné na Obr. č. 25.

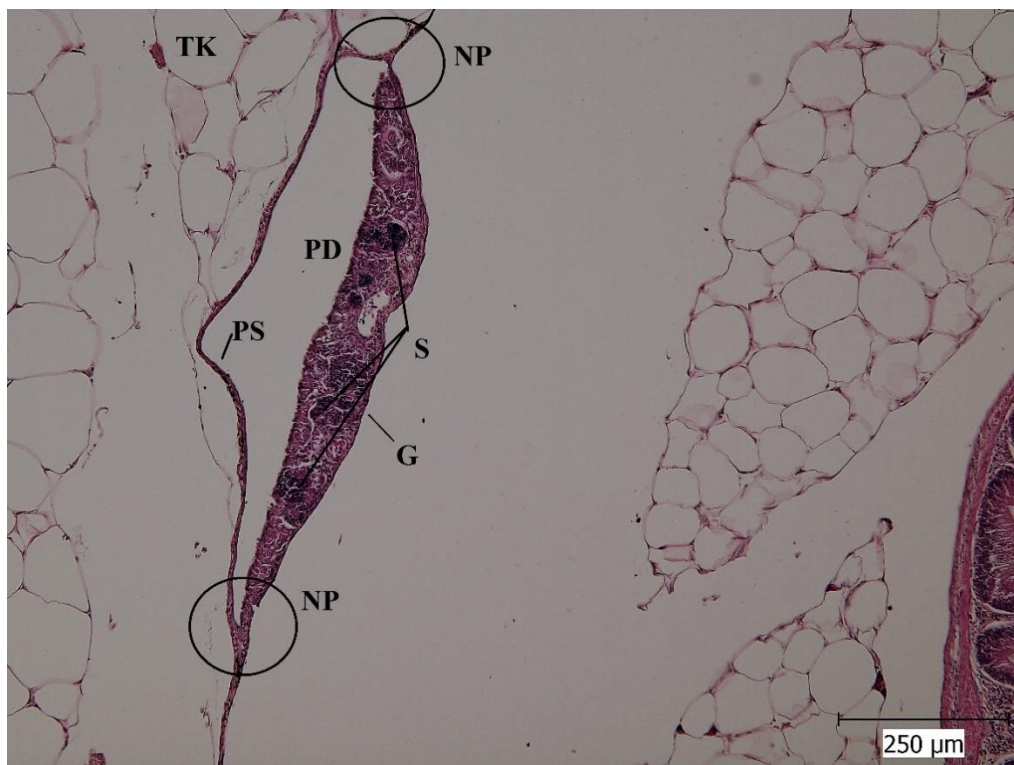


Obr. č. 24: Příklad intersexu ze skupiny exponované drospirenonu (archiv autora).
 Vysvětlivky: (G) gonáda; (NP) napojení gonády; (PD) parovariální dutina; (PS) peritoneální stěna; (S) spermatocyt se spermatidami (samčí pohlavní buňky); (ST) svalová tkáň; (TK) tuková tkáň

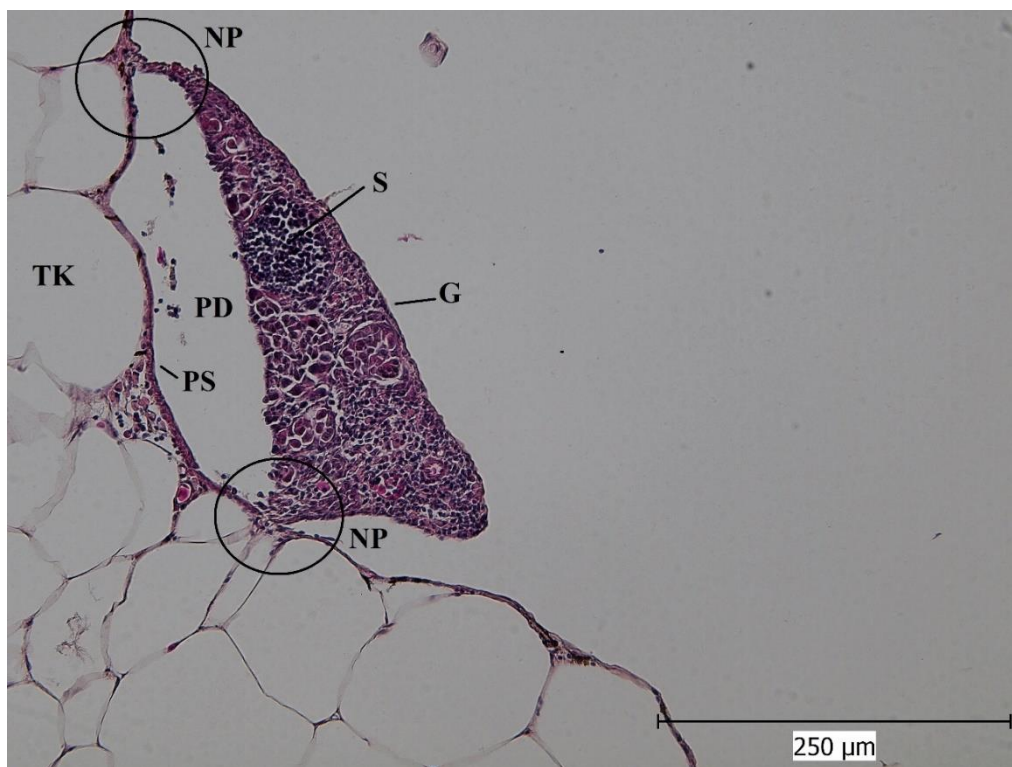


Obr. č. 25: Příklad intersexu ze skupiny exponované drospirenonu (archiv autora).
 Vysvětlivky: (G) gonáda; (NP) napojení gonády; (PD) parovariální dutina; (PS) peritoneální stěna (S) spermatocyt se spermatidami (samčí pohlavní buňky); (TK) tuková tkáň

Další příklad intersexu, ze skupiny exponované gestodenu, je na Obr. č. 26. Zde můžeme vidět zřetelné dvojí napojení gonády na peritoneální stěnu, podlouhlý tvar gonády a parovariální dutinu, což jsou typické znaky pro ovaria. Intersex byl identifikován na základě samčích pohlavních buněk uvnitř této gonády. Podobný příklad, a to ryby exponované gestodenu a drospirenonu (Mix), je na Obr. č. 26, kde je opět dvojí napojení gonády a vznik parovariální dutiny typické pro samici. Uvnitř této gonády ale opět dochází k formování samčích pohlavních buněk, a navíc tvar gonády není typický pro samici.

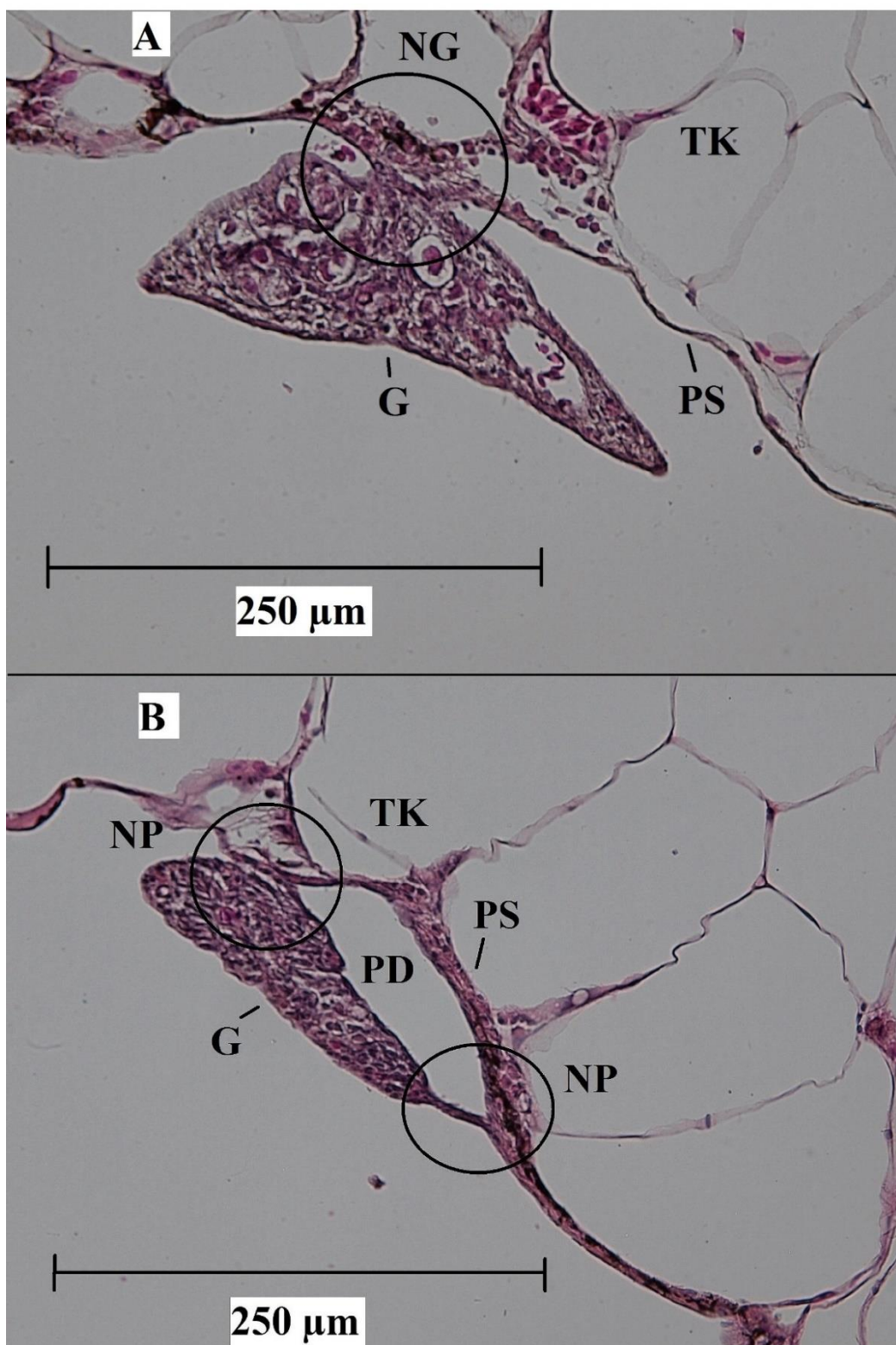


Obr. č. 26: Příklad intersexu ze skupiny exponované gestodenu (archiv autora).
 Vysvětlivky: (G) gonáda; (NP) napojení gonády; (PD) parovariální dutina; (PS) peritoneální stěna; (S) spermatocysty (se samčími pohlavními buňkami); (TK) tuková tkáň



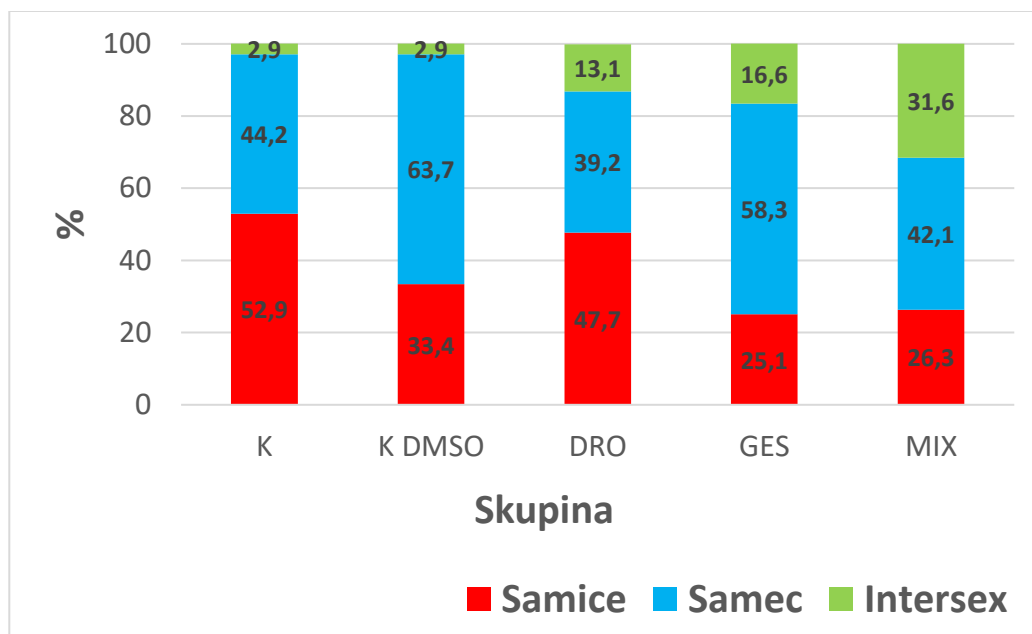
Obr. č. 27: Příklad intersexu ze skupiny exponované gestodenu a drospirenonu (Mix) (archiv autora). Vysvětlivky: (G) gonáda; (NP) napojení gonády; (PD) parovariální dutina; (PS) peritoneální stěna; (S) spermatocysty (se samčími pohlavními buňkami); (TK) tuková tkáň

V některých případech byl intersex identifikován na základě rozdílného napojení gonád u jednoho jedince. Takový příklad je na Obr. č. 28, obrázky A i B pocházejí z jedné ryby, konkrétně ze skupiny vystavené gestodenu a drospirenonu (Mix). Gonáda na Obr. č. 28 A, byla identifikována jako samčí, jelikož zde je jednoduché napojení na peritoneální stěnu bez vzniku parovariální dutiny. Druhá gonáda na Obr. č. 28 B byla identifikována jako samičí, na základě dvojího napojení gonády na peritoneální stěnu a vzniku parovariální dutiny. Z tohoto důvodu byl jedinec označen za intersex.



Obr. č. 28: Příklad intersexu ze skupiny exponované gestodenu a drosipirenonu (Mix) (archiv autora). Vysvětlivky: (A) Testes kapra obecného, (B) Ovaria kapra obecného. (G) gonáda; (NG) napojení gonády (samec); (NP) napojení gonády (samice); (PD) parovariální dutina; (PS) peritoneální stěna; (TK) tuková tkáň

Poměr pohlaví v jednotlivých testovaných skupinách je zobrazen v grafu č. 6. Z grafu je zřejmé, že největší procento intersexů bylo ve skupině exponované zároveň gestodenu a drospirenonu (Mix).



Graf č. 6: Poměr pohlaví. Vysvětlivky: (K) kontrolní skupina; (K DMSO) kontrolní skupina s rozpouštědlem; (DRO) drospirenon; (GES) gestodenu; (MIX) směs drospirenonu a gestodenu

Statistické vyhodnocení (Pearsonův chí kvadrát test) poměru pohlaví na zvolené hladině významnosti $p < 0,05$ prokázalo signifikantní rozdíl mezi kontrolou s DMSO a skupinou exponovanou gestodenu a drospirenonu (Mix), kde se hodnota p rovnala 0,014. Rozdíl byl i mezi kontrolou a skupinou exponovanou zároveň gestodenu a drospirenonu (Mix) (s hodnotu $p = 0,0083$). Na druhé straně mezi kontrolou a kontrolou s DMSO, ani mezi ostatními testovanými skupinami nebyl statisticky signifikantní rozdíl.

5. Diskuze

Tato bakalářská práce byla zaměřena na zjištění vlivu syntetických progestinů na vývoj gonád u kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Vývoj gonád u kapra obecného je popsán jen v několika málo publikacích jako například Takashima a Davies (1980) nebo Lepori (1980).

Takashima a Davies (1980) ve své práci uvádějí, že u kapra obecného je někdy možné rozpoznat pohlaví již po dvou měsících od vykulení, ale při teplotě vody 21,7-23,5 °C je pohlaví zpravidla rozpoznatelné až po čtyřech měsících. Po této době byla v jejich experimentu zhruba jedna polovina jedinců podle přítomných oocytů a počáteční oogeneze identifikována jako samice. Druhá polovina jedinců byla označena za samce podle probíhající spermatogeneze. Náš pokus trval 160 dnů od vykulení při průměrné teplotě vody 21 °C, a i přesto u velké většiny identifikovaných samic nebylo možné pozorovat oocyty, nebo počátek oogeneze. Podobné to bylo při určování samců, kde spermatogeneze také nebyla u většiny ryb pozorována. Z tohoto důvodu bylo pohlaví ryb v našem experimentu určováno především podle typických znaků rané testikulární nebo ovariální diferenciaci popsaných v práci Lepori (1980). U raných testes bylo viditelné jednoduché napojení gonády na peritoneální stěnu, zatímco u raných ovarii bylo dvojí napojení gonády na peritoneální stěnu a tzv. parovariální dutina.

Důvodů, proč nebylo možné identifikovat většinu jedinců podle pohlavních buněk, může být více. Jedním z nich je nižší teplota vody, při které probíhal náš pokus, protože teplota vody má významný vliv na vývoj a diferenciaci zárodečných buněk v gonádách u ryb (Nakamura a kol., 1998). Dalšími faktory, které by teoreticky mohly ovlivnit vývoj gonád, jsou velikost a výživný stav ryb. Takashima a Davies (1980) ale uvádějí, že velikost u ryb stejného věku nemá vliv na vývoj a diferenciaci gonád u kapra obecného.

Na konci našeho experimentu byly zaznamenány hmotnosti a délky ryb v jednotlivých skupinách, na základě těchto údajů byl následně spočítán Fultonův koeficient. Statistické vyhodnocení hmotnosti neukázalo rozdíl mezi skupinami, ale statisticky významný rozdíl byl v délce ryb, a to mezi kontrolní skupinou a ostatními exponovanými skupinami, kromě skupiny exponované gestodenu. Fultonův koeficient ukázal rozdíl mezi kontrolou a pokusnými skupinami, což bylo i statisticky potvrzeno. Na základě dat Fultonova koeficientu můžeme tvrdit, že ryby z pokusných skupin měly paradoxně lepší výživný stav než ryby z kontrolní skupiny.

Předpokládá se, že do vodního prostředí se dostávají různé syntetické progestiny, ale do dnešní doby byl zkoumán výskyt ve vodním prostředí a vliv na vodní organismy pouze u zhruba poloviny z nich (Fent, 2015). Z těchto důvodů je k dispozici stále velmi málo informací a je zapotřebí provádět další studie (Runnals a kol., 2013). Obecně progestiny působí ve vodním prostředí jako endokrinní disruptory (ECDs). ECDs mají schopnost ovlivňovat endokrinní systém exponovaných organismů včetně ryb. Ovlivněna bývá především rozmnožovací soustava a funkce štítné žlázy (Kloas a kol., 2009). U ryb byly doposud popsány účinky progestinů na vývoj gonád, gametogenezi, poměr pohlaví, vývoj sekundárních pohlavních znaků, plodnost, růst a přežití (Fent, 2015).

Negativní účinky progestinů na vývoj a diferenciaci gonád byly poměrně dobře zdokumentovány například u dánia pruhovaného (*Danio rerio*) nebo medaky japonské (*Oryzias latipes*). Na druhé straně informace o účincích progestinů na ryby, které jsou ekonomicky významné a produkované v akvakultuře, jako je například kapr obecný v České republice, nejsou dostupné.

Kiparissis a kol. (2003) testovali vliv tříměsíční expozice cyproteronu acetátu, látky s anti-androgenní aktivitou, na vývoj gonád u medaky japonské. Experiment byl zahájen první den po vykulení. Koncentrace testované látky byly poměrně vysoké, a to 1 a 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Přesto tato expozice statisticky neovlivnila poměr pohlaví v testovaných skupinách ve srovnání s kontrolou. V našem experimentu expozice drospirenonu, který je také řazen mezi látky s anti-androgenní aktivitou, rovněž neovlivnila poměr pohlaví v porovnání s kontrolní skupinou. Liang a kol. (2014) provedli experiment, ve kterém se mimo jiné zaměřili na vliv norgestrelu na poměr pohlaví u dánia pruhovaného. Expozice norgestrelu probíhala od 20. do 60. dne po oplození jiker. Po 60. dni byly ryby přemístěny do čisté vody bez přítomnosti testované látky a pohlaví ryb bylo určováno až 140. den po oplození. V pokusných skupinách, kde byly ryby vystaveny norgestrelu v koncentraci $> 34 \text{ ng.l}^{-1}$, došlo ke zvýšení procentuálního zastoupení samců až na 100 %. Nižší koncentrace (4 ng.l^{-1}), která byla řádově srovnatelná s koncentracemi syntetických progestinů použitých v našem experimentu (2 ng.l^{-1}), však statisticky signifikantní vliv na poměr pohlaví v porovnání s kontrolní skupinou neměla. U ryb exponovaných gestodenu, který patří k látkám s androgenní aktivitou, jako již zmiňovaný norgestrel, došlo v našem experimentu k mírnému zvýšení počtu samců v porovnání s kontrolou, rozdíl však také nebyl statisticky významný. Na základě dat z experimentu autorů Liang a kol. (2014) lze předpokládat, že v případě vyšší koncentrace gestodenu by mohl být vliv na poměr pohlaví výrazně vyšší než při koncentraci 2 ng.l^{-1} . Podobné výsledky byly

popsány v experimentu od autorů Hua a kol. (2015) s levonorgestrel, který patří mezi látky s významnou androgenní aktivitou. (Levonorgestrel patří mezi jednu ze dvou složek racemické směsi, kde jedna složka je biologicky aktivní (levonorgestrel) a druhá nikoliv, tato směs se označuje jako již zmiňovaný norgestrel) Délka expozice byla 63 a 142 dní od oplození jiker. Koncentrace levonorgestrelu 1 ng.l^{-1} zvýšila počty samců po 63 i 142 dnech experimentu, ale statistický rozdíl v poměru pohlaví ve srovnání s kontrolní skupinou opět nebyl statisticky významný. Na druhé straně koncentrace levonorgestrelu $> 10 \text{ ng.l}^{-1}$ zvýšila procentuální zastoupení samců na 100 % po 63 i 142 dnech experimentu.

Ve většině studií byl testován účinek pouze jednoho progestinu, ačkoliv se progestiny ve vodním prostředí vyskytují v různých směsích a informace o účincích těchto směsí na ryby jsou stále velmi omezené. První publikace zaměřené na toto téma se začaly objevovat až v posledních několika letech. Zucchi a kol. (2014) například testovali vliv 14-ti denní expozice směsi drospirenonu a progesteronu na oogenezi u dospělců dánia pruhovaného. Expozice směsi drospirenonu a progesteronu o koncentraci 3118 a 123 ng.l^{-1} (v uvedeném pořadí) v porovnání s kontrolou, statisticky významně snížila počtu oocytů v pozdní fázi vitelogeneze. Dalším příkladem bylo testování účinku směsi medroxyprogesteronu acetátu a dydrogesteronu o koncentraci 432 a 1663 ng.l^{-1} v uvedeném pořadí (Zhao a kol., 2015). Expozice trvala 21 dní a byly sledovány histologické změny v ovariích u dospělců dánia pruhovaného. Tato směs výrazně zvýšila počty oocytů v ovulační fázi v porovnání s kontrolou, a i zde byl statistický rozdíl signifikantní.

V našem experimentu byl zaznamenán poměrně velký počet intersexů. Například Hua a kol. (2015) v experimentu s dániem pruhovaným identifikovali pouze jeden intersex, a to při koncentraci levonorgestrelu 100 ng.l^{-1} po 142denní expozici. V našem případě byl zaznamenán největší podíl intersexů ve skupině exponované současně gestodenu a drospirenonu (Mix), kde jejich procentuální podíl dosahoval 31,6 %. Ve skupině exponované drospirenonu byl procentuální podíl 13,1 % a ve skupině exponované gestodenu 16,6 %. Můžeme předpokládat, že větší podíl intersexů byl způsoben poměrně nízkou koncentrací testované látky, která nedokázala způsobit úplný zvrát pohlaví, jako by tomu mohlo být u vyšších koncentrací. Na druhou stranu v experimentu autorů Hua a kol. (2015) nebyl zdokumentován žádný intersex při nejnižší testované koncentraci levonorgestrelu (1 ng.l^{-1}). Jiné poznatky přinesl experiment zaměřený na vliv tříměsíční expozice cyproteronu acetátu u medaky japonské od autorů

Kiparissis a kol. (2003) (viz předchozí text výše), kde identifikovali intersex v koncentraci 1 a 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ s procentuálním podílem 1,3 a 3,6 % v uvedeném pořadí. Tato studie jako první ukázala, že expozice látky (cyproteron acetát) s anti-androgenní aktivitou může způsobovat intersex u ryb. Náš experimentu také identifikoval intersex s procentuálním podílem 13,1 % ve skupině exponované drospirenonu, který patří mezi látku s anti-androgenní aktivitou, a to již při koncentraci testované látky 2 ng.l^{-1} .

Z porovnání našich výsledků s výsledky získanými autory Kiparissis a kol. (2003) a Hua a kol. (2015) můžeme usuzovat, že u jedinců kapra obecného způsobuje intersex expozice syntetickým progestinům v jednotkách ng.l^{-1} , zatímco u medaky japonské nebo dánia pruhovaného intersex způsobuje expozice syntetickým progestinům ve stovkách ng.l^{-1} . Z fyziologického hlediska, když porovnáme kapra obecného, dánio pruhované a medaku japonskou, je výrazný rozdíl v délce vývoje pohlavních orgánů, dosažení pohlavní zralosti a délky života. Kapor obecný pohlavně dospívá ve věku 3-4 let, dánio pruhované pohlavně dospívá ve věku 4-5 měsíců a medaka japonská pohlavně dospívá již ve věku 2-3 měsíců. Doba, kdy dochází k přeměně primárních zárodečných buněk na pohlavní buňky, popřípadě délka ovariální, nebo testikulární diference je u kapra obecného podstatně delší, než je tomu u dánia pruhovaného, nebo medaky japonské. Lze tedy předpokládat, že výskyt intersexů v experimentu s kaprem obecným je způsoben i tímto faktorem.

Tento experiment potvrdil, že expozice syntetickým progestinům, a především jejich směsi má vliv na vývoj gonád a poměr pohlaví u kapra obecného. Zároveň můžeme předpokládat, že výskyt těchto látek ve vodním prostředí představuje pro ryby určité riziko. Z tohoto důvodu bude zapotřebí v provádět další studie se zaměřením na tuto problematiku.

6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo sledovat vliv syntetických progestinů na vývoj gonád u kapra obecného (*Cyprinus carpio*).

Expozice směsi drospirenonu a gestodenu (Mix) měla signifikantní vliv na poměr pohlaví a výskyt intersexů v porovnání s kontrolními skupinami. Koncentrace testovaných látek se pohybovala v jednotkách ng.l^{-1} , podobné hodnoty jiných progestinů byly analyzovány i v povrchových vodách. Můžeme tedy předpokládat, že v některých povrchových vodách může docházet k ovlivnění průběhu ontogeneze a vývoje gonád u necílových organismů, jako jsou ryby nebo jiné organismy.

V dnešní době je výskyt farmak ve vodním prostředí chápán jako obrovský problém pro budoucnost a není známo, jak velký dopad to může mít na celý ekosystém. Na čistírnách odpadních vod nedochází k úplně degradaci těchto látek, a proto se dostávají až do vodního prostředí. Zde vidíme zásadní problém, se kterým se v budoucnosti můžeme potýkat. I z těchto důvodů je nutné získávat další poznatky o výskytu syntetických progestinů a jejich účincích na necílové organismy. Je zapotřebí provádět další experimenty se směsmi látek, které odrážejí skutečné hodnoty z povrchových vod. Jako testované organismy, konkrétně v případě ryb, by neměly být používány jen krátkověké akvarijní druhy ryb, jako například dánío pruhované (*Danio rerio*), ale i hospodářsky významné a dlouhověké druhy ryb, mezi které patří kapr obecný.

7. Seznam použité literatury

- Al-Odaini, N.A., Zakaria, M.P., Yaziz, M.I., Surif, S., 2010. Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 6791–6806.
- Al-Odaini, N.A., Zakaria, M.P., Yaziz, M.I., Surif, S., Kannan, N., 2013. Occurrence of synthetic hormones in sewage effluents and Langat River and its tributaries Malaysia. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 93, 1457–1469.
- Ammann, A.A., Macikova, P., Groh, K.J., Schirmer, K., Suter, M.J.F., 2014. LC–MS/MS determination of potential endocrine disruptors of cortico signalling in rivers and wastewaters. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 7653–7665.
- Antychowicz, J., 1988. Anatomia, fizjologia i elementy hodowli kapri oraz pstragow. ART, Olsztyn, Poland, 223 pp.
- Avar, P., et al., 2016. HPLC-MS/MS analysis of steroid hormones in environmental water samples. *Drug Test. Anal.* 8, 124–128.
- Bain, P.A., Ogino, Y., Miyagawa, S., Iguchi, T., Kumar, A., 2015. Differential ligand selectivity of androgen receptors α and β from Murray–Darling rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 212, 84–91.
- BARTÁK, Alexandr., 2006. Antikoncepce: druhy antikoncepce, hormony, když všechno selže. Praha: Grada. ISBN 80-247-1351-9.
- Baruš, V., Oliva, O., 1995. Fauna ČR a SR. Mihulovci (Petromyzontes) a ryby (Osteichthyes) (1). Academia, Praha, 624 s.
- Besse, J.P. a Garric, J., 2009. Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environmental Pollution*, Elsevier, 157 (12), 3485–3494.
- Billard, R., Jalabert, B., 1972. Les cellules de Sertoli des poissons Téléosttéens. I. Etude ultrastructurale. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 12, 19-32.

- Billard, R., Fostier, A., Weil, C., Breton, B., 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39, 65-79.
- Billard, R., 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species (1). *Reproduction Nutrition Development*, 26 (4), pp. 877-920.
- Callard, G.V., 1996 Endocrinology of Leydig cells in nonmammalian vertebrates. In: Payne, A.H., Hardy, M.P., Russell, L.D. (Eds.), *The Leydig Cell*. Cache River Press, Vienna, IL, USA, pp. 308-311.
- Cerdá, J., Bobe, J., Babin, P.J., Admon, A., Lubzens, E., 2008a. Functional genomics and proteomics approaches for the study of gamete formation and viability in farmed finfish. *Rev. Fish. Sci.* 16, 58–72.
- Cerdá, J., Mercadé, J., Lozano, J.J., Manchado, M., Tingaud-Sequeira, A., Astola, A., Infante, C., Halm, S., Viñas, J., Castellana, B., Asensio, E., Cañavate, P., Martínez-Rodríguez, G., Piferrer, F., Planas, J.V., Prat, F., Yúfera, M., Durany, O., Subirada, F., Rosell, E., Maes, T., 2008b. Genomic resources for a commercial flatfish, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): EST sequencing, oligo microarray design, and development of the Soleamold bioinformatic platform. *BMC Genom.* 9, 508.
- Devlin, R.H., Nagahama Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191-364.
- Dhont, M., 2010. History of oral contraception, *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care* 15, 12-18.
- Dvořák, P., 2014. *Anatomie a fyziologie ryb*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, ISBN 978-80-87437-80-3, pp. 113-116.
- Fent, K., 2015. Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystem: Concentration, effect and risk assessment. *Environment International* 84, 115-130.

- Genazzani, A.R., Petraglia F., Artini, P.G., 2000. Advances in gynecological endocrinology: the proceedings of the plenary sessions of the 8th World Congress of Gynecological Endocrinology, Florence, Italy. Boca Raton: Parthenon Pub. Group, 2002. ISBN 184214071.
- Heppell, S.S., Heppell, S.A., Coleman, F.C., Koenig, C.C., 2006. Models to compare management options for a protogynous fish. *Ecological Applications* 16(1):238-49.
- Hua, J., Han, J., Guo, Y., Zhou, B., 2015. The progestin levonorgestrel affects sex differentiation in zebrafish at environmentally relevant concentrations *Aquat. Toxicol.*, 166, pp. 1–9.
- Chang, H., Wan, Y., Hu, J., 2009. Determination and source apportion of five classes of steroid hormones in urban rivers. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7691–7698.
- Chang, H., Wan, Y., Wu, S., Fan, Z., Hu, J., 2011. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: comparison to estrogens. *Water Res.* 45, 732–740.
- Chang, H.; Wu, S.; Hu, J.; Asami, M.; Kunikane, S., 2008. Trace analysis of androgens and progestogens in environmental waters by ultra-performance liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1195 (1–2), 44–51.
- Kaestner, A., 1991. *Lehrbuch der speziellen Zoologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany, 498 pp.
- Kiparissis, Y., Metcalfe, T.L., Balch, G.C., Metcalfe, C.D., 2003. Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 63, 391–403.
- Kloas W, Urbatzka R, Opitz R, Wurtz S, Behrends T, Hermelink B, Hofmann F, Jagnytsch O, Kroupova H, Lorenz C, Neumann N, Pietsch C, Trubiroha A, Van Ballegooy C, Wiedemann C, Lutz I (2009) Endocrine disruption in aquatic vertebrates. *Ann N Y Acad Sci* 1163:187–200.

- Kolodziej, E.P., Gray, J.L., Sedlak, D.L., 2003. Quantification of steroid hormones with pheromonal properties in municipal wastewater effluent. *Environmental Contamination & Toxicology* 22, 2622-2629.
- Koulish, S., Kramer, C.R., Grier, H.J., 2002. Organization of the male gonád in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Lambridae). *J. Morphol.* 254, 292-311.
- Kumar, V., Johnson, C.A., Trubiroha, A., Tumová, J., Ihara, M., Grabic, R., Kloas, W., Tanaka, H., Kroupová, K.H., 2015. The challenge presented by progestins in ecotoxicological research: A critical review, *Environmental Science and Technology* 49, 2625-2638.
- Le Menn, F., Cerdá, J., Babin, P.J., 2007. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In: Babin, P.J. (Ed.), *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Application*. Springer, The Netherlands, pp. 1–37.
- LEPORI, N. G., Sex differentiation, hermaphroditism, and intersexuality in vertebrates including man. Padua: Piccin Medical Books, 1980. ISBN 8821207471, pp. 13-26.
- Liang, Y.Q., Huang, G.Y., Liu, S.S., Zhao, J.L., Yang, Y.Y., Chen, X.W., Tian, F., Jiang, Y.X., Ying, G.G., 2015. Long-term exposure to environmentally relevant concentrations of progesterone and norgestrel affects sex differentiation in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol.* 2015, 160:172–9.
- Liu, Z., Ogejo, J. A., Pruden, A., Knowlton, K. F., 2011. Occurrence, fate and removal of synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: A review. *Sci. Total Environ.*, 409 (24), 5149–5161.
- López de Alda, M.J., Gil, A., Paz, E., Barceló, D., 2002. Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography–electrospray-mass spectrometry. *Analyst* 127, 1299–1304.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerda, J., 2010. Oogenesis in teleost: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology* 165. 367-389.

- Matta, S.L., Vilela, D.A., Godinho, H.P., Franca, L.R., 2002. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cells numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinology* 143, 970-937.
- Nakamura, M., 1978. Morphological and experimental studies on sex differentiation of the gonad in several teleost fishes. Ph.D. thesis. Hokkaido University, Hokkaido, Japan.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X.T., Nagahama, Y., 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *The Journal of Experimental Zoology* 281, 362-372.
- Nóbrega, R.H., Batlouni, S.R., Franca, L.R., 2009. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 197–206.
- Ornitake, K., 1972. Morphological studies of normal sex-differentiation and induce sex-reversal process of gonads in the medaka, *Oryzias latipes*. *Annot. Zool. Jpn.*, 45:159-169.
- Overturf, M.D., Overturf, C.L., Carty, D.R., Hala, D., Huggett, D.B., 2014. Levonorgestrel exposure to fathead minnows (*Pimephales promelas*) alters survival growth, steroidogenic gene expression and hormone production. *Aquat. Toxicol.* 148, 152–161.
- Paulos, P., Runnalls, T. J., Nallani, G., La Point, T., Scott, A. P., Sumpter, J. P. & Huggett, D. B., 2010. Reproductive responses in fathead minnow and Japanese medaka following exposure to a synthetic progestin, Norethindrone. *Aquatic Toxicology*, 99 (2), 256-262.
- Petrovic, M.; Solé, M.; López De Alda, M. J.; Barceló, D., 2002. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21 (10), 2146–2156.

- Qiao, Y.; Yang, H.; Wang, B.; Song, J.; Deng, A., 2009. Preparation and characterization of an immunoaffinity chromatography column for the selective extraction of trace contraceptive drug levonorgestrel from water samples. *Talanta* , 80 (1), 98–103.
- Scott, A.P., Sumpter JP, Stacey N. 2010. The role of the maturation-inducing steroid, 17,20b-dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: A review. *J Fish Biol* 76, 183–224.
- Schindler, A.E., Campagnoli, C., Druckmann, R., Huber, J., Pasqualini, J.R., Schweppe, K.W., Thijssen, J.H.H., 2003. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas* 46 (Suppl. 1), S7–S16.
- Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.J., Le Gac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura ,T., 2010. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165, 390-411.
- Schulz, R.W., Menting, S., Bogerd, J., Franca, L.R., Vilela, D.A.R., Godinho, H.P., 2005. Sertoli cell proliferation in the adult testis: evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol. Reprod.* 73, 891-898.
- Sitruk-Ware, R.. a Nath, A., 2010. The use of newer progestins for contraception. *Contraception.* 82, 410–417.
- Svensson, J., Mustafa, A., Fick, J., Schmitz, M., Brunström B., 2016. Developmental exposure to progestins causes male bias and precocious puberty in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 177, 316-323.
- Runnalls, T.J., Beresford, N., Losty, E., Scott, A.P., Sumpter, J.P., 2013. Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish. *Environ. Sci. Technol.* 47, 2077–2084.
- Takashima, F. a Davies, R.P., 1980. Sex differentiation in common carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of the Tokyo University of Fisheries*, Vol. 66, NO. 2, p. 191-199.
- Thomas, P., Pang, Y., Zhu, Y., Detweiler, C., Doughty, K., 2004. Multiple rapid progestin actions and progestin membrane receptor subtypes in fish. *Steroids* 69, 567–573.

- Viglino, L.; Aboufadi, K.; Prevost, M.; Sauve, S., 2008. Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. *Talanta*, 76 (5), 1088–1096
- Vulliet, E., Cren-Olivé, C., 2011. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environ. Pollut.* 159, 2929–2934.
- Vulliet E., Wiest L, Baudot R., Grenier-Loustalot M.F., 2008. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1210, 84–91.
- Zeilinger, J., Steger-Hartmann, T., Maser, E., Goller, S., Vonk, R., Länge, R., 2009. Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2663–2670.
- Zhao, Y., Castiglioni, S., Fent, K., 2015. Synthetic progestins medroxyprogesterone acetate and dydrogesterone and their binary mixtures adversely affect reproduction and lead to histological and transcriptional alterations in zebrafish (*Danio rerio*) *Environ. Sci. Technol.*, 49, pp. 4636–4645.
- Zhou, L., Wang Y., Gui J.F., 2000. Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) as revealed by RAPD assays. *Journal of Molecular Evolution*, 51, 498–506.
- Zucchi, S., Mirbahai, L., Castiglioni, S., Fent, K., 2014. Transcriptional and physiological responses induced by binary mixtures of drospirenone and progesterone in zebrafish (*Danio rerio*) at environmental concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 48 (6), 3523-3531.

8. Abstrakt

Tato bakalářská práce byla zaměřena na sledování vlivu syntetických progestinů na vývoj gonád u ryb. V laboratorních podmínkách byl proveden 160. denní chronický test na kaprovi obecném (*Cyprinus carpio*). Ryby byly rozděleny do pěti pokusných skupin. První, kontrolní skupina byla chována v čisté ředící vodě bez přítomnosti progestinů. Druhá, kontrolní skupina byla chována v ředící vodě s rozpouštědlem DMSO (dimethylsulfoxid). Třetí skupina ryb byla vystavena působení gestodenu v koncentraci 2 ng.l^{-1} a čtvrtá skupina drospirenonu v koncentraci 2 ng.l^{-1} . Poslední, pátá skupina (Mix) byla vystavena současně gestodenu a drospirenonu, kde každá látka dosahovala koncentrace 2 ng.l^{-1} . Do pokusných skupin byly dávkovány progestiny rozpuštěné v DMSO, aby se docílilo jejich lepšího rozpouštění. Vliv syntetických progestinů na vývoj gonád byl vyhodnocen na základě histologického vyšetření vzorků exponovaných ryb odebraných *in toto*.

Ve skupinách exponovaných jednotlivým syntetickým progestinům se poměr pohlaví ryb a procentuální podíl intersexů statisticky významně nelišil od kontrolních skupin. Expozice směsi drospirenonu a gestodenu (Mix) ale již statisticky signifikantní vliv měla. Byl zaznamenán především poměrně vysoký procentuální podíl intersexů, který dosahoval až 36,6 %. Výskyt intersexů signalizoval zvrát pohlaví v průběhu ontogeneze u exponovaných ryb.

Klíčová slova: drospirenon, endokrinní disruptory, gestoden, gonády, kapr obecný, syntetické progestiny

9. Abstract

This paper was focused on effect of synthetic progestins on gonadal development in fish. A 160-day chronic test on common carp (*Cyprinus carpio*), was run under laboratory conditions. The fish was divided into five experimental groups. The first control group included clear diluted water without any occurrence of progestins. The second control group was kept in diluted water with dissolving agent DMSO (dimethylsulfoxide). The third group of fish was exposed to gestogene at a concentration level of 2 ng.l^{-1} and the fourth group was exposed to drospirenone at a concentration level of 2 ng.l^{-1} . The last group (Mix) was exposed to gestogene and drospirenone simultaneously, where both substances corresponded to the concentration of 2 ng.l^{-1} . The experimental groups were dosed with progestins dissolved in DMSO, since they have lipophilic nature. The determination of the influence of synthetic progestins on the gonadal development was based on histological examination of the exposed fish samples *in toto*.

There was any significant difference in fish sex ratio and in percentage of intersex occurrence between the groups that were exposed to individual synthetic progestins and the control groups. However, the exposure of the mixture of drospirenone and gestogene (Mix) showed a significant difference. Primarily, a high percentage of intersex was detected with the number reaching 36.6 %. The occurrence of intersex suggested a twist in sex of exposed fish through ontogenesis.

Keywords: drospirenone, endocrine disruptors, gestodene, gonads, common carp, synthetic progestins