

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

Vliv syntetického progestinu etonogestrelu na sekundární pohlavní znaky a histologii gonád živoročky Wingeovy (*Poecilia wingei*)

Autor: Bc. Michal Pech

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

Konzultant diplomové práce: Dipl. Biol. Christoph Steinbach, Ph.D.

Studijní program a obor: Zemědělská specializace, Rybářství a ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník: 2.

České Budějovice, 2019

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě. 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.

Datum:

Podpis studenta:

.....

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval své vedoucí Ing. Haně Kocour Kroupové, Ph.D. a svému konzultantovi Dipl. Biol. Christophu Steinbachovi, Ph.D., za metodické vedení, odbornou pomoc, poskytnuté rady, cenné připomínky a věnovaný čas při vypracování této diplomové práce. Také bych rád poděkoval své rodině a všem, kteří mě během mého studia podporovali a povzbuzovali.

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

Jméno a příjmení: **Bc. Michal PECH**
Osobní číslo: **V17N001P**
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Rybářství a ochrana vod**
Název tématu: **Vliv syntetického progestinu etonogestrelu na sekundární pohlavní znaky a histologii gonád živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*)**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Syntetické progestiny jsou steroidní hormony, které jsou nejen součástí hormonální antikoncepce, ale používají se i při léčbě řady zdravotních problémů. Syntetické progestiny jsou vyráběny s cílem napodobit přírodní hormon progesteron a vázat se tak na progesteronový receptor. Je však známo, že syntetické progestiny mají schopnost interagovat s jadernými (a i membránovými) receptory celé škály dalších steroidních hormonů, a napodobovat tak i jejich účinky. Díky širokému používání léků na bázi progestinů nacházíme jejich rezidua v odpadních vodách, odkud se následně dostávají i do vod povrchových. V povrchových vodách se koncentrace těchto látek pohybují řádově v ng/l, ale bylo prokázáno, že i tyto nízké koncentrace se mohou významně podílet na snížení produkce jiker a rovněž i jiným způsobem negativně ovlivňovat reprodukční funkce ryb. Pohlavní ale i další steroidní hormony hrají zásadní roli téměř ve všech aspektech rozmnožování, včetně reprodukčního chování, a proto je třeba jejich studiu věnovat náležitou pozornost a postupně rozšiřovat znalosti o jejich účincích.

Cílem práce bude zjistit, zda má syntetický progestin etonogestrel vliv na sekundární pohlavní znaky a histologii gonád ryb.

Metodický postup: Jako testovací organismus bude použita živorodka Wingeova (*Poecilia wingei*), která patří mezi akvarijní druhy ryb běžně používané v toxikologických testech. Ryby, samci a samice zvlášť, budou nejdříve po dobu 30 dní vystaveny několika koncentracím etonogestrelu. Po skončení expozice pak budou ryby fotografovány, aby byly zachyceny případné změny zbarvení. Následně budou ryby usmrceny v MS 222 a fixovány v 10% pufovaném formalinovém roztoku pro morfologickou a histologickou analýzu. U vzorků na histologickou analýzu 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 sledovány případné histopatologické změny na gonádách. Vzorky ryb, odebrané pro morfologickou analýzu, budou fotografovány a pomocí digitální analýzy obrazu bude na zhotovených snímcích měřena délka těla všech ryb, dále pak délka řitní ploutve u samic, délka gonopodia u samců a další rozměry těchto částí těla.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby (do 20 stran)**
Rozsah pracovní zprávy: **50-70 stran**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant diplomové práce: **Dipl.-Biol. Christoph Steinbach**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Datum zadání diplomové práce: **5. ledna 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **3. května 2019**


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

L.S.


doc. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 17. ledna 2018

Příloha zadání diplomové práce

Seznam odborné literatury:

- Angus, R.A., McNatt, H.B., Howell, W.M., Peoples, S.D., 2001. Gonopodium development in normal male and 11-ketotestosterone-treated female mosquitofish (*Gambusia affinis*): a quantitative study using computer image analysis. *General and Comparative Endocrinology* 123, 222-234.
- Farrell, A. P., Stevens, E. D., Cech, J. J., Richards, J. G., 2011. *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Academic Press, an imprint of Elsevier, London; Waltham, MA.
- Frankel, T. E., Meyer, M. T., Kolpin, D. W., Gillis, A. B., Alvarez, D. A., Orlando, E. F., 2016a. Exposure to the Contraceptive Progestin, Gestodene, Alters Reproductive Behavior, Arrests Egg Deposition, and Masculinizes Development in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Science & Technology* 50, 5991-9.
- Frankel, T. E., Meyer, M. T., Orlando, E. F., 2016b. Aqueous exposure to the progestin, levonorgestrel, alters anal fin development and reproductive behavior in the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *General and Comparative Endocrinology* 234, 161-9.
- 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. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1163, 187-200.
- Kumar, V., Johnson, A. C., Trubiroha, A., Tumova, J., Ihara, M., Grabic, R., Kloas, W., Tanaka, H., Kroupova, H. K., 2015. The challenge presented by progestins in ecotoxicological research: a critical review. *Environmental Science & Technology* 49, 2625-38.
- Noggle, J.J., Holm, S.E., Gross, T.S., 2010. Masculinization of eastern mosquitofish (*Gambusia*) and exposure to pulp and paper discharge: diminished responses following mill process modifications. *Water Quality Research Journal Of Canada* 45(2), 145-15.
- 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.
- Poeser, F. N., Kempkes, M., Isbrucker, I. J. H., 2005. Description of *Poecilia (Acanthophaelus) wingei* n. sp from the Paria Peninsula, Venezuela, including notes on *Acanthophaelus Eigenmann*, 1907 and other subgenera of *Poecilia* Bloch and Schneider, 1801 (Teleostei, Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Contributions to Zoology* 74, 97-115.
- Zeilinger, J., Steger-Hartmann, T., Maser, E., Goller, S., Vonk, R., Lange, R., 2009. Effects of Synthetic Gestagens on Fish Reproduction. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2663-2670.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Literární přehled.....	10
2.1. Pohlavní soustava ryb (<i>apparatus genitalis</i>).....	10
2.1.1. Prvotní zárodečné buňky v primární gonádě.....	11
2.1.2. Anatomické a morfologické aspekty pohlavní diference.....	13
2.1.3. Samčí pohlavní soustava (<i>apparatus genitalis masculinus</i>).....	14
2.1.3.1. Diference testes	16
2.1.3.2. Spermatogeneze	17
2.1.3.3. Spermioogeneze	22
2.1.3.4. Regulace spermatogeneze a spermioogeneze.....	22
2.1.4. Samičí pohlavní soustava (<i>apparatus genitalis femininus</i>).....	23
2.1.4.1. Diference ovárií	25
2.1.4.2. Oogeneze.....	26
2.1.4.3. Ovulace	29
2.1.4.4. Regulace oogeneze a ovulace.....	31
2.2. Živorodka Wingeova (<i>Poecilia wingei</i>)	32
2.2.1. Pohlavní dimorfismus živorodky Wingeovy (<i>Poecilia wingei</i>)	33
2.2.2. Reprodukční strategie živorodky Wingeovy (<i>Poecilia wingei</i>)	36
2.3. Cizorodé látky ve vodním prostředí	37
2.3.1. Progestiny.....	38
2.3.1.1. Přírodní progestiny.....	38
2.3.1.2. Syntetické progestiny	39
2.3.1.3. Výskyt progestinů ve vodním prostředí	44
2.3.1.4. Rizika spojená s výskytem progestinů ve vodním prostředí	45
3. Materiál a metodika.....	49
3.1. Návrh experimentu.....	49
3.2. Přístroje	50
3.3. Chemikálie	50
3.4. Hodnocení zbarvení samic živorodky Wingeovy (<i>Poecilia wingei</i>) na konci testu....	51
3.5. Měření morfometrických parametrů živorodky Wingeovy (<i>Poecilia wingei</i>).....	51
3.5.1. Měření základních morfometrických parametrů	51
3.5.2. Měření morfometrických parametrů gonopodia a anální ploutve	54

3.5.3.	Hodnocení míry maskulinizace anální ploutve samic	58
3.6.	Histologické zpracování vzorků živorodky Wingeovy (<i>Poecilia wingei</i>)	58
3.7.	Použité statistické metody	66
4.	Výsledky	67
4.1.	Pohlavní dimorfismus živorodky Wingeovy (<i>Poecilia wingei</i>)	67
4.2.	Vliv etonogestrelu na zbarvení samic živorodky Wingeovy (<i>Poecilia wingei</i>)	68
4.3.	Vliv etonogestrelu na morfometrii živorodky Wingeovy (<i>Poecilia wingei</i>)	69
4.4.	Histologie gonád živorodky Wingeovy (<i>Poecilia wingei</i>)	74
5.	Diskuze	77
6.	Závěr	81
7.	Seznam použité literatury	83
8.	Seznam zkratk	92
9.	Abstrakt	94
10.	Abstract	96

1. Úvod

V poslední době se předmětem mnoha různých environmentálních studií staly hormonálně aktivní látky, také známé jako endokrinní disruptory, které obvykle patří do skupiny environmentálních mikropolutantů. Jedněmi z nejsilnější endokrinních disruptorů jsou steroidní hormony, mezi něž se řadí i syntetické progestiny. Syntetické progestiny jsou nejen součástí hormonální antikoncepce, ale používají se i při léčbě mnoha různých zdravotních problémů a mají své uplatnění i jako růstové promotory hospodářských zvířat. Syntetické progestiny jsou syntetizovány s cílem napodobit přírodní hormon progesteron a vázat se tak na progesteronový receptor. Je však známo, že mají schopnost interagovat rovněž s jadernými (ale i membránovými) receptory celé škály dalších steroidních hormonů, a napodobovat tak i jejich účinky. Vzhledem k poměrně velké spotřebě léků na bázi progestinů nacházíme jejich rezidua v odpadních vodách, odkud se následně dostávají do vod povrchových. V povrchových vodách se koncentrace těchto látek obvykle pohybují řádově pouze v jednotkách $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, ale bylo prokázáno, že i takto nízké koncentrace se mohou významně podílet na snížení produkce jiker a rovněž i jiným způsobem negativně ovlivňovat reprodukční funkce ryb prostřednictvím narušení endokrinního systému. Pohlavní, ale i další steroidní hormony hrají zásadní roli téměř ve všech aspektech rozmnožování, včetně reprodukčního chování, a proto je třeba jejich studiu věnovat patřičnou pozornost a postupně rozšiřovat znalosti o jejich účincích.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda má syntetický progestin etonogestrel vliv na sekundární pohlavní znaky a histologii gonád ryb. Jako testovací organismus byla použita živorodka Wingeova (*Poecilia wingei*), která patří mezi akvarijní druhy ryb běžně používané v toxikologických testech. Výsledky, které tento experiment přinesl, mohou pomoci při odhadu rizik, které etonogestrel, ale i ostatní syntetické progestiny v životním prostředí představují.

2. Literární přehled

2.1. Pohlavní soustava ryb (*apparatus genitalis*)

Pohlavní soustava ryb je podobně jako u jiných obratlovců členěna do dvou odlišných celků – pohlavní soustavy samčí a samičí. Obě pohlavní soustavy jsou tvořeny pohlavními orgány (gonádami) s vývodnými pohlavními cestami. Vyústění pohlavních orgánů se vyskytuje mezi análním otvorem a anální ploutví, a to buď samostatně na pohlavní papile jako *ostium genitale* nebo na urogenitální papile v *ostium urogenitale* (Dvořák a kol., 2014).

Hlavní funkcí pohlavní soustavy ryb je rozmnožování, které se však v závislosti na druhu ryb liší. Naprostá většina kostnatých ryb (*Teleostei*) patří mezi vejcorodé (oviparní) druhy s odděleným pohlavím (gonochoristé), kdy jedinci tvoří pouze jeden typ gamet (samčí nebo samičí) a jejich pohlaví se během života nemění. Pro tento typ pohlavního rozmnožování je charakteristické vnější oplození (bez kopulace) ve vodním prostředí (Dvořák a kol., 2014; Spurný a kol., 2015). Vnitřní oplození se u ryb objevuje relativně vzácně. Dochází k němu u ryb rozmnožujících se vejcoživorodostí (ovoviviparií), anebo živorodostí (viviparií). Transport spermií u těchto druhů ryb zpravidla zajišťuje pomocný kopulační orgán gonopodium, což je modifikovaná anální ploutev samečů, vyskytující se například u čeledi živorodkovití (*Poeciliidae*) (Dvořák a kol., 2014). Spermie se do pohlavních cest samic obvykle dostávají ve schránkách, tzv. spermatoforech, které jsou v záhybech vejcovodu samice uchovávány a připraveny k opakovatelnému oplodnění, aniž by bezprostředně předtím došlo ke kopulaci. Kupříkladu u gambusií (*Gambusia*) mohou takto uchované spermie vydržet živé půl roku i déle, než dojde k oplození (Baruš a Oliva, 1995).

Opakem gonochorismu je obojohlavnost neboli hermafroditismus, který se ale u ryb vyskytuje velmi zřídka. Hermafroditismus lze rozdělit na synchronní (klasický) a asynchronní (postupný). O synchronní hermafroditismus se jedná, pokud má jedinec ve stejném časovém období gonády samčí i samičí, respektive produkuje jikry a spermie současně a dochází k samooplození (Dvořák a kol., 2014). Tímto způsobem se rozmnožuje například rivulus mramorovaný (*Rivulus marmoratus*) (Cole, 1997). V případě asynchronního hermafroditismu dochází k tomu, že se nejprve vyvíjí jedno

pohlaví, které se po nějaké době přeměňuje na pohlaví druhé. Na základě toho rozlišujeme protandrii, protogynii, rudimentární hermafroditismus a bidirekcionální hermafroditismus. Jestliže se gonáda zpočátku vyvíjí v testes a později se stává vaječníkem, hovoříme o protandrii (Dvořák a kol., 2014). Tato rozmnožovací strategie je typická například pro mořana Schlegelova (*Acanthopagrus schlegeli*) (Wu a kol., 2010). V případě, že je gonáda nejprve vaječníkem a později se mění na testes, jedná se o protogynii (Dvořák a kol., 2014), vyskytující se například u kanice oranžovoskvrnného (*Epinephelus coioides*) (Chen a kol., 2011). Rudimentární hermafroditi jsou jedinci, kteří jsou v mládí hermafroditi, avšak dospívají pouze do jednoho pohlaví, samčího nebo samičího (Dvořák a kol., 2014). Tento způsob vývoje gonád je charakteristický například pro druh *Diplodus capensis* (Richardson a kol., 2010). Jako bidirekcionální hermafrodity pak nazýváme jedince, kteří jsou schopní během ontogeneze změny pohlaví v obou směrech (Dvořák a kol., 2014). Příkladem je hlaváč červenohlavý (*Paragobiodon echinocephalus*) (Sunobe a kol., 2017).

Ojediněle se u ryb může vyskytovat i unisexuální rozmnožování, kdy dochází k produkci pouze samičího pohlaví (gynogeneze). Při tomto způsobu rozmnožování se uplatňuje částečné oplození. K oplození jiker dochází prostřednictvím jiných druhů ryb, jejichž spermie však pouze spustí vývoj zárodku, ale nedochází ke splnutí s jikrou, což vede k tomu, že se líhnou pouze jikernačky (Lampert, 2009). Typickým příkladem ryby s unisexuálním rozmnožováním je karas stříbrný (*Carassius auratus*) (Dvořák a kol., 2014).

V důsledku narušení endokrinního systému ryb vlivem okolního prostředí může také dojít k výskytu tzv. intersexu, tedy stavu, kdy se u ryb s původně odděleným pohlavím (gonochoristé) vyskytují znaky obou pohlaví, tj. například abnormality pohlavních žláz či současný výskyt samčích i samičích pohlavních buněk (Atz, 1964).

2.1.1. Prvotní zárodečné buňky v primární gonádě

Stejně jako u všech obratlovců (*Craniata*) je primární gonáda ryb, tj. gonáda před pohlavní diferenciací, složena jak ze somatických, tak z prvotních zárodečných buněk také označovaných jako prapohlavní buňky, primordiální gonocyty či zkráceně PGC (primordial germ cells, PGC) (Strüssmann a Nakamura, 2002; Sandra a Norma, 2010). Z poměrně malého množství PGC se během rané embryogeneze diferencují pohlavní

buňky – spermie anebo jikry. PGC jsou buňky, jež zajišťují přenos genetické informace mezi generacemi. PGC zpravidla migrují a postupně se soustřeďují v kaudální¹ části trupu, kde společně se somatickými buňkami dají vzniknout základu budoucí nediferencované gonády (Baruš a Oliva, 1995). Po vylíhnutí se obvykle PGC nacházejí obklopené jednou nebo dvěma somatickými buňkami na dorsální² stěně koelomické dutiny³. Následně somatické i zárodečné buňky proliferují tak, aby vytvořily primární, zatím nediferencovanou gonádu. V tomto stadiu je gonáda zpravidla suspendována z dorsální peritoneální stěny tenkou vrstvou somatických buněk. Postupně pak dochází k zvyšování počtu PGC, což zároveň vede k progresivnímu zvětšování gonády (Dietrich a Krieger, 2009). Počet PGC je zpočátku podobně jako u ostatních obratlovců poměrně nízký a dosahuje pouze pár desítek, nanejvýše okolo 100 (Baruš a Oliva, 1995). Po počátečním mitotickém zmnožení PGC vyžívají do spermatogonií (spermatogeneze) anebo oogonií (oogeneze) (Dietrich a Krieger, 2009). Tímto se ukončuje indiferentní etapa vývoje gonád, dochází k cytologické diferenciaci pohlavních buněk a utvářejí se testes nebo ovária (Baruš a Oliva, 1995).

Jedním z nejvýznamnějších znaků, který objektivně posuzuje stav vývoje gonád, je gonadosomatický index (gonadosomatic index, GSI), který lze vypočítat z níže uvedeného vzorce 1. Jeho hodnota se v závislosti na pohlaví značně různí, a proto je zapotřebí tuto hodnotu stanovovat odděleně pro samce a samice (Baruš a Oliva, 1995).

$$GSI = \frac{m_g}{m} \cdot 100 \quad (1)$$

GSI – Gonadosomatický index [%]

m – hmotnost ryby [g]

m_g – hmotnost gonád [g]

¹ Kaudální je anatomický směr od hlavy k ocasní ploutvi.

² Dorsální je anatomický směr od páteře k hřbetní ploutvi.

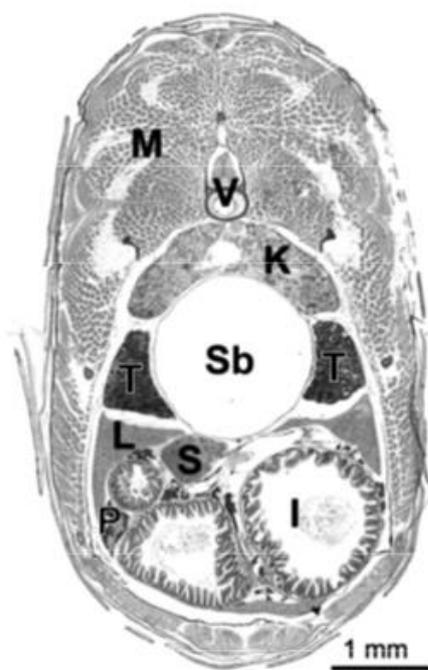
³ Koelomická dutina, také nazývaná jako pravá tělní dutina, je dutina vytvářející se při vývoji mnohých živočichů. Je obklopená buňkami mezodermálního původu a je v ní uložena řada životně důležitých orgánů.

2.1.2. Anatomické a morfologické aspekty pohlavní diferenciaci

Pohlavní diferenciaci je období, během něhož se primární nediferencovaná gonáda přetváří do příslušného pohlaví, tedy do testes nebo ovárií (Dietrich a Krieger, 2009). Diferenciaci budoucích klíčových elementů, tj. PGC a formování funkčních ovárií či testes nastává během rané embryogeneze. Dále dochází k tvorbě zárodečného hřebenu a k migraci PGC do základů budoucí gonády (Strüssmann a Nakamura, 2002). Nediferencované gonády většiny kostnatých ryb se v této době skládají z PGC a somatických buněk, přičemž druhé zmíněné jsou tvořeny dvěma buněčnými složkami – kůrou (*cortex*) a dřeně (*medulla*). Kůra pochází z peritoneální stěny a dřeň z mezonefrické či interrenální blastemy (Nakamura a kol., 1998). Tento dvojí embryologický původ somatických buněk, známý jako kortikomedulární antagonismus má zcela zásadní vliv na proces diferenciaci pohlaví. Převaha jedné buněčné složky somatických buněk určuje, zda vzniknou testes nebo ovária (Strüssmann a Nakamura, 2002). Testikulární diferenciaci je podmíněna vývojem dřene a degenerací kůry, zatímco k ovariální diferenciaci dochází pouze v případě, že se vyvíjí kůra a dřeň degeneruje (Nakamura a kol., 1998). U některých druhů ryb může být pohlavní diferenciaci řízena specifickými geny, například genem DMY, který je typický pro medaku japonskou (*Oryzias latipes*) a medaku zakřivenou (*Oryzias curvinotus*) (Sandra a Norma, 2010). Období, v jakém k pohlavní diferenciaci dochází (embryonální, larvální, post – larvální, juvenilní), se u různých druhů ryb liší. U živorodky duhové (*Poecilia reticulata*) dochází k diferenciaci pohlaví během embryonální až larvální fáze, zatímco například u kapra obecného (*Cyprinus carpio*) nastává diferenciaci pohlaví v průběhu juvenilní etapy. Délka trvání procesu pohlavní diferenciaci na rozdíl od období, kdy k diferenciaci dochází, závisí kromě druhu také na parametrech okolního prostředí, jako je teplota, dostupnost krmiva či stres. V pozdějších stádiích vývoje se pohlavní charakteristiky vyvíjejí zejména v souvislosti s vylučováním specifických steroidních hormonů z testes a ovárií. Působení těchto hormonů následně vede k expresi typických znaků pro dané pohlaví (Dietrich a Krieger, 2009).

2.1.3. Samčí pohlavní soustava (*apparatus genitalis masculinus*)

Pohlavní orgány samců (mlíčáků) se nazývají varlata (*testes, orchis*) (Dvořák a kol., 2014). U většiny kostnatých ryb (*Teleostei*) jsou testes párové, mírně zploštělé podlouhlé orgány bělavé barvy, produkující samčí pohlavní buňky – spermie (Uribe a kol., 2014). Nacházejí se v horní části peritoneální dutiny⁴, podél vnějších okrajů ledvin a po obou stranách plynového měchýře (Spurný a kol., 2015), kde jsou zavěšeny na pobřišnicových řasách (duplikaturách peritonea) (Dvořák a kol., 2014). Jejich umístění u dospělého dánia pruhovaného (*Danio rerio*) je zobrazeno na obrázku 1.



Obrázek 1 Umístění testes u dospělého dánia pruhovaného (*Danio rerio*). M – svalovina; V – obratle; K – ledviny; Sb – plynový měchýř; T – testes; L – játra; S – slezina; P – slinivka; I – střevo (Dietrich a Krieger, 2009)

Testes mohou také druhotně srůst do jednoho celku, jako je tomu například u okouna říčního (*Perca fluviatilis*) (Dvořák a kol., 2015) nebo u živorodky duhové (*Poecilia reticulata*) (Billard, 1986; Uribe a kol., 2014). Eventuálně mohou být spojeny pouze podél jejich zadních segmentů, což je typické pro některé druhy z čeledi

⁴ Peritoneální dutina, běžně známá jako dutina břišní je největší tělní dutinou. Název je odvozen od peritonea – tenké, lesklé a průsvitné blány, která vystýlá vnitřek dutiny břišní.

živorodkovitých (Dietrich a Krieger, 2009). Existují také ryby (např. *Tomeurus gracilis*), u kterých se vyskytují pouze jednoduché nepárové testes (Uribe a kol., 2014). Velikost testes a jejich obsah se v závislosti na fázi reprodukčního cyklu, ve kterém se nachází, značně liší (Genten a kol., 2009). Plně dozrálá testes jsou bělavě zbarvená a v době tření se několikanásobně zvětšují. U některých druhů ryb mohou představovat až 10 % tělesné hmotnosti. Naopak v nepříznivých podmínkách ke tření se mohou varlata sezónních druhů ryb zmenšit na malý, snadno přehlédnutelný orgán (Dietrich a Krieger, 2009). Celkové množství spermatu při výtěru závisí především na velikosti ryby a také na tom, jestli se jedná o rybu s jednorázovým (více spermatu) či vícerázovým výtěrem (méně spermatu) (Baruš a Oliva, 1995).

Z hlediska vnitřní struktury se testes kostnatých ryb od vyšších obratlovců poněkud liší, jsou stále tvořena semenotvornými kanálky, které propojují vmezežené vazivo. Samotná testes jsou tvořena parenchymem a centrálním kanálkem, na nějž navazují postranní kanálky a vácčky. Ve vácčích se tvoří ze zárodečných buněk spermatogonie, z kterých postupně vznikají spermie. Pohlavní buňky jsou odváděny odvodnými kanálky (*ductuli efferentes testis*), které jsou od močových cest oddělené. Vývody se spojují v chámovod (*ductus deferens*), jenž ústí do *sinus urogenitalis*. Chámovod může ústít navenek buď samostatně anebo společně s močovodem. Výše zmíněný parenchym varlat lze u ryb rozdělit na dvě formy (Dvořák a kol., 2014).

Prvním typem je stavba s hroznovitým neboli acinózním uspořádáním, jež můžeme najít například u čeledí kaprovitých (*Cyprinidae*), štikovitých (*Esocidae*) či sledřovitých (*Clupeidae*). U tohoto typu z pruhů zárodečných buněk opětovným dělením vznikají kulovité shluky, které se protahují do délky a uvnitř se vytváří dutina, která je obklopená několika vrstvami spermatogonií. Druhým typem jsou testes s radiální strukturou parenchymu, což je typické například pro čeleď okounovitých (*Percidae*). Tvoří se tím způsobem, že se epitelové buňky naléhající na vnitřní stranu zárodečných buněk zmnožují rychleji, čímž dochází ke vzniku radiálně uspořádaných párů buněk. Tyto páry se po určité době spojují a ze zárodečných buněk vznikají spermatogonie (Dvořák a kol., 2014).

2.1.3.1. Diferenciace testes

Identifikovat rané gonády jako budoucí testes prostřednictvím vývojových charakteristik zárodečných buněk je poměrně obtížné, neboť zárodečné buňky v budoucích testes jsou dlouhou dobu v neaktivní fázi (Nakamura kol., 1998), podstatně déle než u ovárií (Dietrich a Krieger, 2009). Zatím není znám jediný případ, kdy by došlo nejprve k diferenciaci testes a poté až k diferenciaci ovárií (Sandra a Norma, 2010). K přechodu ze spermatogonií na spermatocyty, například u lososa masu (*Oncorhynchus masou*), dojde až v okamžiku zahájení jeho anadromní migrace⁵. Podobně je tomu i u úhoře japonského (*Anguilla japonica*), kdy spermatogeneze započíná v souvislosti s jeho katadromní migrací⁶. U dvou druhů tilapie – tilapie nilské (*Oreochromis niloticus*) a tilapie mosambické (*Oreochromis mossambicus*) dochází ke spermatogenezi přibližně po 50 – 70 dnech od vykolení (Nakamura a kol., 1998), zatímco u samic oogeneze nastává už po zhruba 20 dnech po vylíhnutí, přičemž doba nástupu oogeneze je závislá na různých faktorech, zejména na okolní teplotě (Srisakultiew, 1993).

K identifikaci budoucích testes během morfologické diferenciace pohlaví lze použít uspořádání somatických buněk, které je často pohlavně specifické. Pro budoucí testes je charakteristický rozvětvený prostor vyčnívající z proximální⁷ oblasti gonády směrem do centrální stromální⁸ oblasti gonády, který byl pozorovaný například u tilapie nilské (Nakamura a Takahashi., 1973). Tento prostor se později stává základem pro vývodný kanálek, jenž je výsledkem procesu testikulárního vývoje a je ho proto možno využít k spolehlivému určení pohlaví (Strüssmann a Nakamura, 2002). Schematické vyobrazení testikulární diferenciace u tilapie nilské je znázorněno na obrázku 2. U lososa masu se rozvětvený prostor vývodného kanálku objevuje po 35 dnech od vylíhnutí, což ukazuje, že se varle morfologicky začalo odlišovat už od tohoto věku. Dalším typickým znakem pro rané testes jsou krevní kapiláry nacházející se v proximální a distální oblasti,

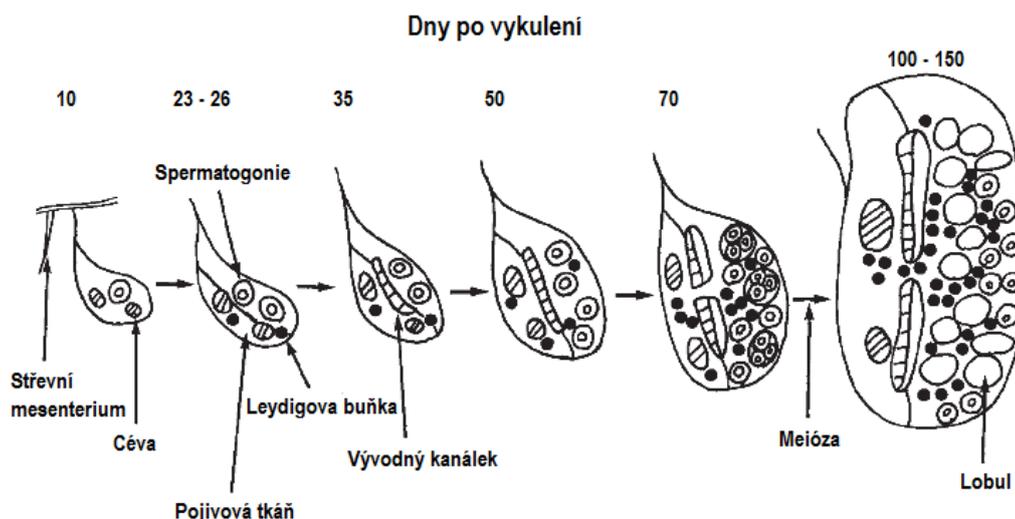
⁵ Anadromní migrace je migrace z mořské vody do sladké za účelem rozmnožování.

⁶ Katadromní migrace je migrace ze sladké vody do mořské za účelem rozmnožování.

⁷ Proximální je anatomický směr směřující blíže k trupu.

⁸ Stromální oblast gonády neboli stroma, je podpůrná tkáň tvořená buňkami mezenchymálního původu, především vazivem.

zatímco u ovarií se objevují v laterální⁹ části (Nakamura a kol., 1974). U živorodky duhové (*Poecilia reticulata*) je možné rané testes rozpoznat podle výskytu agregací stromálních buněk v hilární oblasti¹⁰. Tyto buňky se později vyvíjejí do chámovodu a testikulárního intersticia. Agregace stromálních buněk tedy signalizuje pravděpodobný počátek diferenciacie testes u živorodých druhů ryb (Takahashi, 1974).



Obrázek 2 Schematické zobrazení testikulární diferenciacie u tilapie nilské (*Oreochromis niloticus*) (převzato a upraveno z Nakamura a kol., 1998)

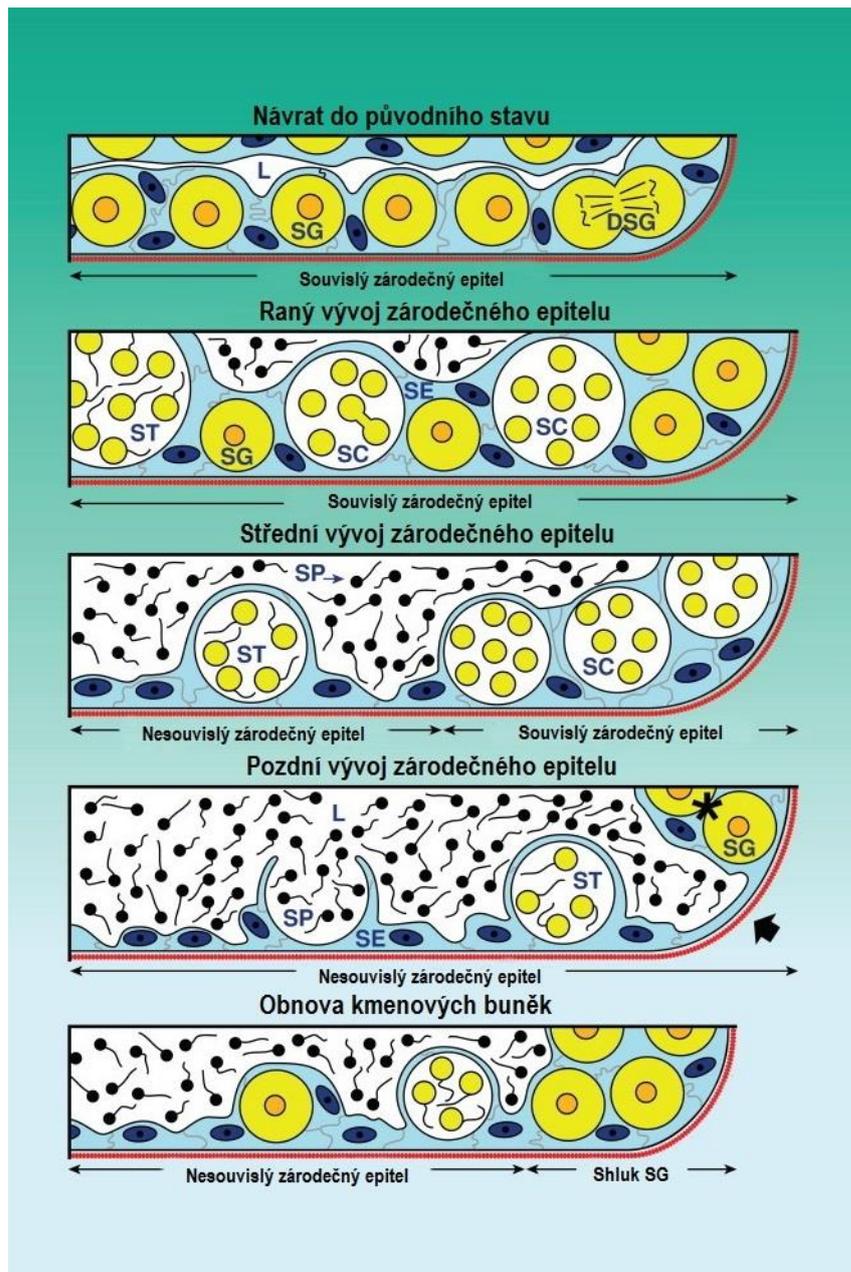
2.1.3.2. Spermatogeneze

Během procesu spermatogeneze probíhají zárodečné buňky několika cytologickými stadii (Genten a kol., 2009). Zárodečné buňky lokalizované v zárodečném epitelu tubulární stěny testes jsou relativně velké buňky (12 – 16 μm) s eozinofilní granulární cytoplasmou a sférickým jádrem ve střední poloze obsahující jemný zrnitý diploidní chromatin. Každá primární spermatogonie prochází řadou mitotických dělení, aby vytvořila skupinu sekundárních spermatogonií seskupujících se do cyst. Vývoj jednotlivých pohlavních buněk v cystách a celkové množství spermii v nich je řízeno Sertoliho buňkami (Genten a kol., 2009; Uribe a kol., 2014). Cystický typ spermatogeneze je typický kromě ryb i pro obojživelníky (*Amphibia*). Tvorba cyst je

⁹ Laterální je anatomický směr od roviny střední k bokům.

¹⁰ Hilární oblast leží na zadní straně testes, kam ústí semenotvorné kanálky (*tubuli seminiferi contorti*) a kde vstupují i vystupují cévy varlete.

zahájena, když jsou spermatogonie obklopeny Sertoliho buňkami. Během spermatogeneze se zvětšuje počet zárodečných buněk i počet Sertoliho buněk. Seskupení buněk, které je výsledkem rozdělení původních zárodečných buněk, udržují konzistentní stadium vývoje v cystách. Sekundární spermatogonie jsou menší (9 – 12 μm) než primární spermatogonie s menšími, ale přesto velkými, lehce bazofilními sférickými jádry s diploidními chromozomy a malou cytoplazmou. Následně v cystách, stejně jako u všech obratlovců, dochází k prvnímu meiotickému dělení sekundárních spermatogonií, během něhož dochází k replikaci homologních chromozomů a vzniku primárních spermatocytů, nacházející se v první fázi meiózy, tj. profázi I. Primární spermatocyty mají rostoucí bazofilní jádra, jejichž velikost je ještě menší (8 – 12 μm) než velikost sekundárních spermatogonií. Primární spermatocyty následně vstupují do metafáze I, anafáze I a telofáze I, během nichž vznikají sekundární spermatocyty, což jsou malé buňky o průměru 4 – 7 μm se sférickým jádrem a vláknitými chromozomy, které jsou připraveny k okamžitému vstupu do druhého dělení meiózy. Během druhého dělení pak postupují od profáze II k metafázi II, anafázi II a telofázi II, a výsledkem jsou haploidní kulovité spermatidy se sférickým jádrem o velikosti 2 – 4 μm , které se stále nacházejí uvnitř cyst (Uribe a kol., 2014). Sekundární spermatocyty jsou zpravidla viděny méně často než primární spermatocyty, jelikož se po krátké mezifázi mezi dvěma meiózami rychle rozdělí na spermatidy (Schulz a kol., 2010). Schéma znázorňující období spermatogeneze je znázorněno na obrázku 3.

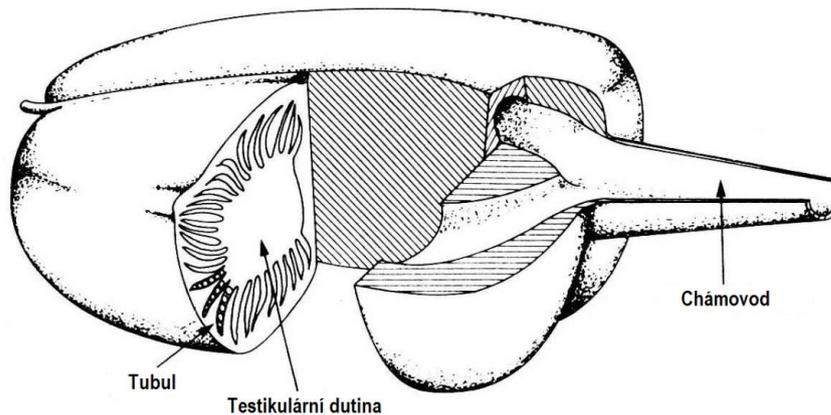


Obrázek 3 Schéma znázorňující vývoj pohlavních buněk v zárodečném epitelu během ročního reprodukčního cyklu. L – lobulární lumen; SE – Sertoliho buňky; SG – spermatogonie; DSG – dělení spermatogonie; SC – spermatocyty; ST – spermatidy; SP – spermie (převzato a upraveno z Uribe a kol., 2014)

V intersticiu testes, respektive mezi cystami se také nacházejí malé počty polymorfních Leydigových buněk se sférickými jádry a eozinofilní cytoplazmou. Leydigovy buňky prodělávají největší rozvoj těsně před a během reprodukčního období, kdy produkují steroidní hormony, prostřednictvím nichž ovlivňují zrání spermii (Genten

a kol., 2009). Celý proces spermatogeneze a následné spermiogeneze je u některých ryb sezónní, a u jiných se jedná o více či méně kontinuální proces (Takashima a Hibiya, 1995).

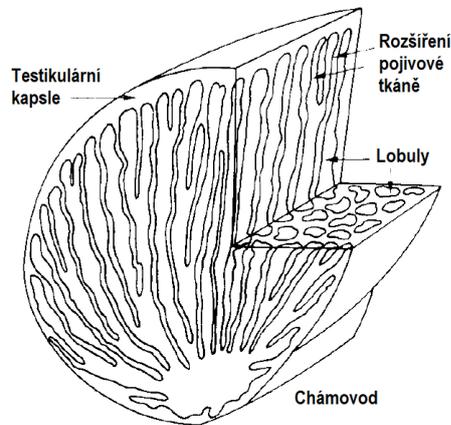
Z hlediska morfologické struktury testes a procesu spermatogeneze je rozlišován tubulární a lobulární typ testes (Billard, 1986; Takashima a Hibiya, 1995). U tubulárního typu se ve středu testes vytváří rozsáhlá dutina, kde se ukládají spermie, které jsou seskupené do svazků nazývaných spermatofory. Jednotlivé tubuly jsou orientovány od centrální dutiny směrem k periférii testes, přičemž zárodečné buňky a kmenové spermatogonie se nacházejí pouze ve vrcholcích těchto tubulů. Odtud se spermatogonie organizují do cyst, ve kterých probíhá jejich vývoj a postupně migrují do centra testes. Tubulární typ testes je obecně typický pro živorodé druhy ryb jako je kupříkladu živorodka duhová (Billard, 1986). Testes živorodky duhové jsou zobrazeny na obrázku 4.



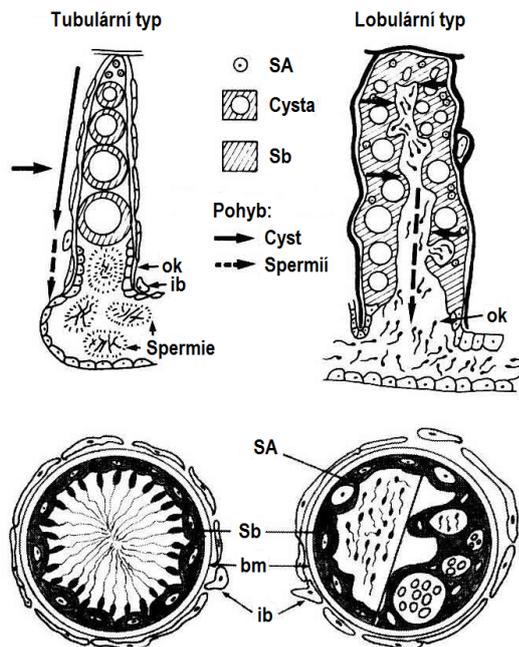
Obrázek 4 Tubulární typ testes u živorodky duhové (*Poecilia reticulata*) (převzato a upraveno z Billard, 1986)

U lobulárního typu utváří pojivová tkáň nepravidelné lobuly, které jsou obklopeny zárodečným epitelem. Spermatogonie, respektive cysty, se u tohoto typu nacházejí podél celé délky lobulů, zatímco u tubulárního typu se vykytují pouze ve vrcholcích tubulů. V průběhu spermatogeneze se cysty pohybují mírně směrem ke středu lobulů, kde se na konci spermatogeneze spermie uvolňují do sestupných kanálek v lobulech, z nichž se následně dostávají do odvodných kanálek testes. Složitost struktury lobulárních testes se u různých druhů liší, poněvadž rozšíření pojivové tkáně se může více či méně překrývat. Lobulární typ testes je typický pro většinu kostnatých ryb,

například pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (Billard, 1986), jehož testes jsou zobrazeny na obrázku 5. Na obrázku 6 jsou znázorněny a porovnány testes tubulárního typu živorodky duhové a lobulárního typu pstruha duhového.



Obrázek 5 Lobulární typ testes u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (převzato a upraveno z Billard, 1986)



Obrázek 6 Schematické znázornění a porovnání dvou typů testikulární struktury kostnatých ryb tj. tubulárního typu u živorodky duhové (*Poecilia reticulata*) vlevo nahoře a lobulárního typu u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) vpravo nahoře. Vlevo dole: příčný řez spermatickou cystou. Vpravo dole: příčný řez lobulem – vlevo: stádium pohlavního klidu, vpravo: probíhající spermatogeneze. SA – spermatogonie typu A (primární); Sb – Sertoliho buňky; ok – odvodné kanálky; ib – intersticiální buňky; bm – bazální membrána (převzato a upraveno z Billard, 1986)

2.1.3.3. Spermioogeneze

Poslední fází, která následuje po procesu spermatogeneze je spermioogeneze, během které nedochází k dělení, ale k morfologické transformaci spermatid na spermie, nejmenší spermatogenní buňky o velikosti menší než 2 μm (Johnson a kol., 2010). Tento proces je charakterizován významnými morfologickými změnami spojenými s tvorbou hlavy spermii, eliminací cytoplazmy, kondenzací chromatinu, vytvoření bičíku (Genten a kol., 2009) a případně u některých druhů ryb jako jsou jeseterovití (*Acipenseridae*) se vznikem akrozomu. V rámci pokračující spermioogeneze se jádra spermatid postupně zmenšují, přičemž chromatin vykazuje rostoucí stupeň kondenzace. Struktura a velikost spermii se mezi kostnatými rybami značně liší (Uribe a kol., 2014). V průběhu spermioogeneze také dochází k rozpadu cyst a spermie zaplňují sestupné kanálky lobulů. Později se dostávají do odvodných kanálků, přičemž v této době nastává kapacitace spermii, respektive jejich závěrečné zrání, během něhož dochází ke koncentrování spermatu v odvodných kanálcích, chámovodu či semenných váčcích (*vesiculae seminales*). U některých druhů ryb, jako je tomu například u živorodky duhové, může docházet k současnému zrání všech spermii, které jsou poté vypouštěny jako balíčky spermii (tzv. spermatozeugmata) do sestupných kanálků lobulů a následně jejich odvodných kanálků (Genten a kol., 2009).

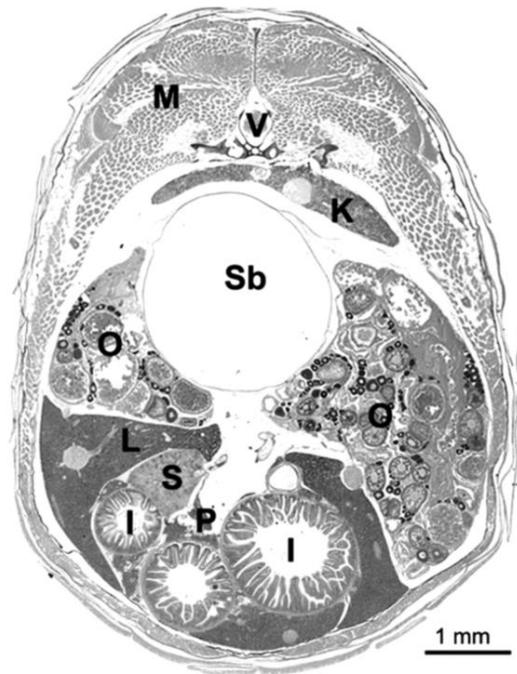
2.1.3.4. Regulace spermatogeneze a spermioogeneze

Celý proces spermatogeneze od spermatogoniální obnovy kmenových buněk, přechod spermatogonií do meiózy, množení Sertoliho buněk až po vznik spermii je podobně jako u ostatních obratlovců komplexní proces regulovaný neuroendokrinním systémem. Spermatogeneze probíhá ve specifickém biochemickém prostředí definovaném Sertoliho buňkami, jejichž vývoj souvisí s vývojem zárodečných buněk. Sertoliho buňky obklopují zárodečné buňky, komunikují s nimi a oddělují je od ostatních somatických tkání permeabilní membránou. Tyto interakce mezi Sertoliho buňkami a zárodečnými buňkami jsou řízeny neuroendokrinní osou: hypothalamus – hypofýza – testes (Uribe a kol., 2014). Spermatogeneze je stimulována gonadotropiny, hormony vylučovanými hypofýzou, jejichž produkce je řízena gonadotropiny

uvolňujícími hormony (gonadotropin releasing hormones, GnRH), které se vytvářejí v hypotalamu (Schulz a kol., 2010). V počátečních stádiích spermatogeneze hraje hlavní roli především folikuly stimulující hormon (follicle stimulating hormon, FSH), který řídí zmnožování Sertoliho buněk a má také vliv na produkci hlavního androgenního hormonu, 11-ketotestosteronu (11-KT) (Uribe a kol., 2014). 11-ketotestosteron spolu s růstovými faktory jako jsou například inzulinu podobné růstové faktory (IGF-I, IGF-II, insulin-like growth factor) nebo s aktiviny, stimuluje spermatogenezi (Nóbrega a kol., 2015). V pozdních stádiích vývoje pohlavních buněk je významný zejména luteinizační hormon (Luteinizing hormone, LH), neboť se prostřednictvím progesterinů podílí na spermiogenezi a spermiaci (Uribe a kol., 2014).

2.1.4. Samičí pohlavní soustava (*apparatus genitalis femininus*)

Pohlavními orgány samic (jikernaček) jsou vaječníky (*ovária*) a produkují samičí pohlavní buňky – vajíčka, u ryb známé jako jikry (Dvořák a kol., 2014). Jikry podle druhu mohou vykazovat variabilitu ve velikosti i tvaru, přičemž velikost je ovlivněna zejména množstvím výživného žloutku (Baruš a Oliva, 1995). Samičí rozmnožovací soustava kostnatých ryb, na rozdíl od savců, je vysoce variabilní, neboť zahrnuje celou řadu reprodukčních modelů jako například již zmíněná viviparie či ovoviviparie. Vaječníky většiny kostnatých ryb mají strukturu dutého, párového orgánu, nacházejícího se v dorsální části peritoneální dutiny, kde jsou připojeny k hřbetnímu peritoneu (např. dánío pruhované). Umístění ovárií u dospělého dánía pruhovaného je zobrazeno na obrázku 7.



Obrázek 7 Umístění ovárií u dospělého dánia pruhozaného (*Danio rerio*). M – svalovina; V – obratle; K – ledviny; Sb – plynový měchýř; O – ovaria; L – játra; S – slezina; P – slinivka; I – střevo (Dietrich a Krieger, 2009)

U některých druhů ryb jako je například medaka japonská (*Oryzias latipes*) se ovšem vyskytují pouze nepárová ovária (Dietrich a Krieger, 2009), popřípadě párové uspořádání ovárií během raného ontogenetického vývoje splyne do jednoho samostatného nepárového celku, k čemuž dochází kupříkladu u živorodkovitých nebo okouna žlutého (*Perca flavescens*) (Baruš a Oliva, 1995). Zcela vyvinutá ovária, naplněná zralými jikrami, mohou v některých případech představovat více než 50 % tělesné hmotnosti ryb. V případě nevhodných podmínek ke tření se ovária stejně jako testes mohou zmenšit na malý a nevýrazný orgán (Parenti a Grier, 2004). Výsledné množství jiker při výtěru je podobně jako u spermatu závislé jednak na velikosti ryby a samozřejmě také na tom, zda se jedná o rybu s jednorázovým výtěrem (více jiker), kdy dochází k synchronnímu dozrávání oocytů anebo o rybu s vícerázovým výtěrem (méně jiker), u kterých dochází k asynchronnímu dozrávání oocytů (Baruš a Oliva, 1995).

Ovária jsou rozdělena vazivovými přepážkami, které jsou obvykle postaveny napříč (ostnoploutví, *Perciformes*), avšak u některých taxonů i podélně (makrelovití, *Scombridae* či treskovití, *Gadidae*). V ováriích vznikají uvnitř folikulů ze zárodečných buněk oogenie a z nich pak postupně jikry. Dozrálé jikry jsou po ovulaci odváděny do

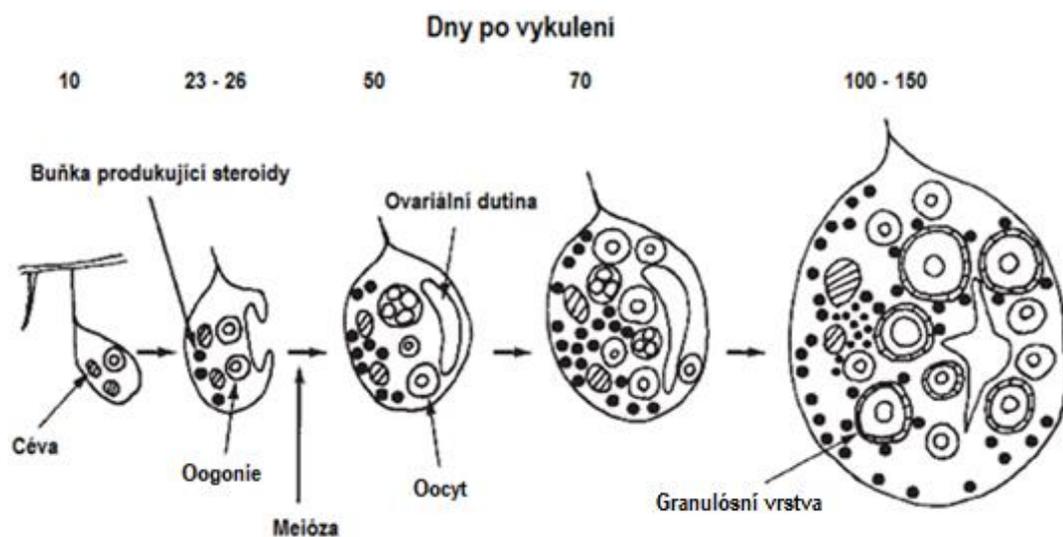
primitivního vejcovodu (*oviductus*), jenž se u ryb vytváří srůstem peritoneálních duplikatur obalujících ovárium. U čeledi lososovití (*Salmonidae*), chrupavčítí (*Chondrostei*) anebo úhořovití (*Anguillidae*) jsou vejcovody omezeny na velice krátké nálevky, které ústí na *ostium genitale* za řitním otvorem. Samice ryb, které své jikry vypuzují přímo do vejcovodů, se označují jako cystovarijní (kostnaté ryby), zatímco samice uvolňující jikry v důsledku prasknutí stěny ovária do tělní dutiny se označují jako gymnovarijní (chrupavčítí) (Dvořák a kol., 2014). Histologické vyšetření tkáně ovárií u některých druhů ryb, například z čeledi kaprovitých (*Cyprinidae*), odhaluje jikry ve všech fázích vývoje i degenerace, což je způsobeno tím, že oocyty během reprodukčního období nedozrávají souběžně. Naopak u lososovitých druhů ryb, které synchronizují reprodukci všech životaschopných oocytů v jediném okamžiku, může být vývojové stádium, v němž se oocyty nacházejí, jednotnější (Genten a kol., 2009).

2.1.4.1. Diferenciace ovárií

Jak již bylo zmíněno, k ovariální diferenciaci většiny zkoumaných kostnatých ryb (gonochoristů) dochází podstatně dříve, než k testikulární diferenciaci (Dietrich a kol., 2009). Výjimkou je ale kupříkladu tilapie mosambická a tilapie nilská vykazující simultánní vývoj u obou pohlaví (Strüssmann a Nakamura, 2002). Za počátek ovariální diferenciaci lze považovat charakteristické změny jako je nástup intenzivního mitotického dělení primárních zárodečných buněk, jejich následný vstup do meiózy a proliferace somatických buněk s charakteristickým uspořádáním, které nakonec vede k vytvoření ovariální dutiny (Sandra a Norma, 2010).

Průběh ovariální diferenciaci byl sledován u několika druhů ryb. Například u tilapie mosambické či pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) bylo prokázáno, že jedním z podstatných znaků ovariální diferenciaci je rychlý nárůst a celkově vyšší počet zárodečných buněk před meiotickým dělením ve srovnání s testikulární diferenciací (Nakamura a kol., 1998). U medaky japonské bylo zjištěno, že mitóza zárodečných buněk se u samic uskutečňuje ještě před vylíhnutím, zatímco u samců mitóza nezapočne, pokud celková délka těla ryby nedosáhne minimálně 6,5 cm (Ornitake, 1972). U dánia pruhovaného se na počátku ovariální diferenciaci v budoucích pohlavních žlázách vyskytují pouze oocyty, které zhruba u poloviny jedinců v důsledku

apoptózy¹¹ degenerují a zmizí. Následně pak u nich dochází k rozvoji testikulární tkáně a gonády se diferencují na testes. Tento jev, označovaný jako juvenilní hermafroditismus, byl kromě dánia pruhovaného prokázán například u parmičky čtyřpruhé (*Puntigrus tetrazona*) a lososa masu. Díky tomuto jevu není u těchto druhů ryb výskyt oocytů spolehlivým kritériem pro identifikaci raných ovárií (Nakamura a kol., 1998). Schematické vyobrazení ovariální diferenciace u tilapie nilské je znázorněno na obrázku 8.



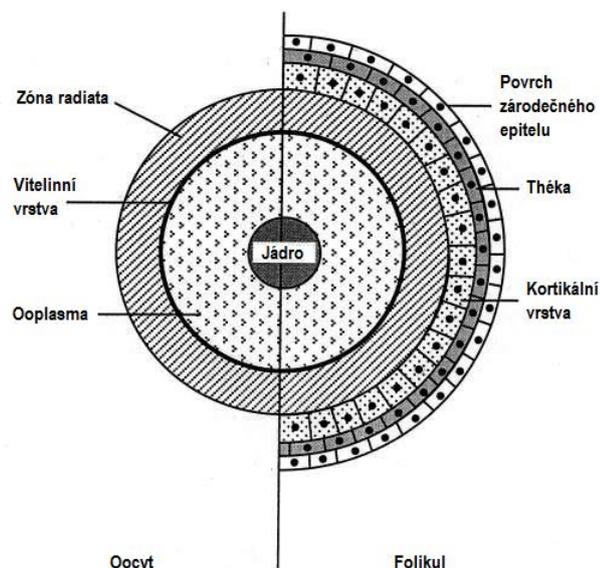
Obrázek 8 Schematické zobrazení ovariální diferenciace u tilapie nilské (*Oreochromis niloticus*) (převzato a upraveno z Nakamura a kol., 1998)

2.1.4.2. Oogeneze

Oogeneze je proces, během něhož dochází ke vzniku samičích pohlavních buněk (jiker). Samotný průběh oogeneze může být rozdělen podle hlavních morfologických charakteristik růstu do tří základních fází – previtellogenní, vitellogenní a fáze zrání oocytů. Nejprve dochází k formování primárních oogonií z prvotních zárodečných buněk, po kterém následuje mitotické dělení primárních a posléze sekundárních oogonií. Většina kostnatých ryb má folikulární typ pohlavních buněk, což znamená, že oogonie jsou obaleny primárním folikulem, který později nahrazuje sekundární folikul, zvaný Gráfův (Genten a kol., 2009). Pro oogonie je charakteristické relativně velké

¹¹ Apoptóza je jeden z hlavních typů programované buněčné smrti.

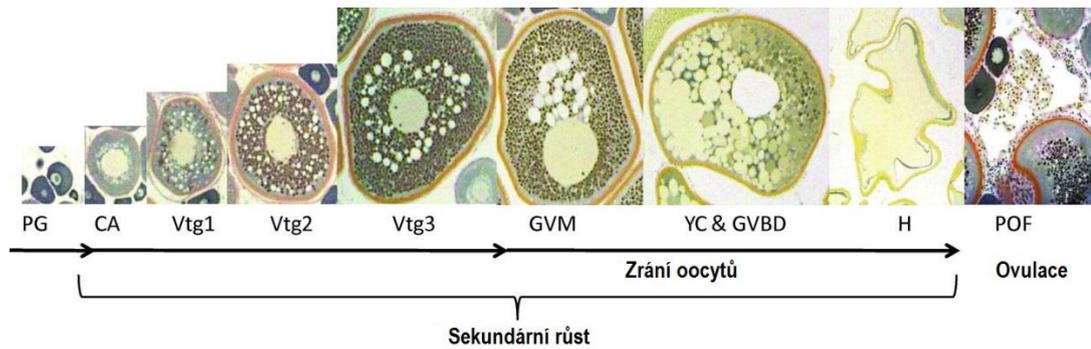
jádro a minimální množství cytoplazmy (Johnson a kol., 2010). Ze sekundárních oogonií následně vzniká oocyt I. řádu, který vstupuje do profáze 1. meiotického dělení, během níž je zadržán a dochází k jeho růstu (Nakamura a kol., 2011), který je regulován 17- β -estradiolem (E2). Uvnitř oocytu I. řádu se poté shromažďuje ribozomální ribonukleová kyselina (ribosomal ribonucleic acid, rRNA), mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid, mRNA) a syntetizují se glykoproteiny, jež se později formují do kortikálních granulí. Dále také dochází k tvorbě oocytárních lipidů, které jsou pro vývoj budoucího embrya velice důležité. Oocyty I. řádu jsou v této době obklopeny jednou vrstvou folikulárních buněk (Patiño a Sullivan, 2002). Poté následuje vitellogenní fáze, během níž dochází k produkci vitelogeninu (Vtg), což je glykofosfolipoprotein (Kishida a Specker, 1993), který je syntetizován v játrech a transportován cévním systémem. Syntéza vitelogeninu je u lososovitých ryb indukována produkcí FSH, zatímco u teplomilných druhů ryb a převážné většiny ostatních ryb je vitelogeneze způsobena produkcí LH (Patiño a Sullivan, 2002). Vitelogenin následně slouží jako prekurzor pro vznik žlutkového proteinu, hlavního zdroje živin během raného vývoje ryb (Kishida a Specker, 1993). Folikul s oocytem se v tomto období skládá z několika vrstev zahrnujících povrch zárodečného epitelu, théku, kortikální vrstvu, zónu radiata a rosolovitou vrstvu budoucího vajíčka označovanou jako vitelinní vrstva (Patiño a Sullivan, 2002). Jednotlivé vrstvy jsou zobrazeny na obrázku 9.



Obrázek 9 Schéma folikulu a oocytu (převzato a upraveno z Johnson a kol., 2010)

V průběhu výše uvedeného období prochází oocyty několika po sobě jdoucími vývojovými stadii, během nichž postupně rostou. To zahrnuje mimo zmíněných oogonií chromatinové jaderné oocyty, perinukleolární oocyty, kortikální alveolární oocyty, raně vitelogenní oocyty, pozdně vitelogenní oocyty a na konci celého procesu zralé oocyty. Chromatinové jaderné oocyty jsou oproti oogoniím včetně jádra o něco větší a obsahují více cytoplazmy. Následující perinukleární oocyty jsou charakteristické výskytem tmavých skvrn v cytoplasmě, avšak u pozdních perinukleolárních oocytů se v cytoplasmě mohou objevovat malé čisté nebo amfofilní vakuoly. Pro kortikální alveolární oocyty je příznačný výskyt kortikálních alveol v ooplazmatu. Také je v tomto období poměrně dobře viditelný chorion a perifolikulární buňky lze poměrně snadno vizualizovat. Rané vitelogenní oocyty jsou typické svým centralizovaným vzhledem sférických vitelogeních žlutkových granulí, zatímco pozdní vitelogenní oocyty se vyznačují zvýšenou akumulací vitelogeních granulí. V tomto stádiu také začíná jádro migrovat k obvodu buňky (Johnson a kol., 2010).

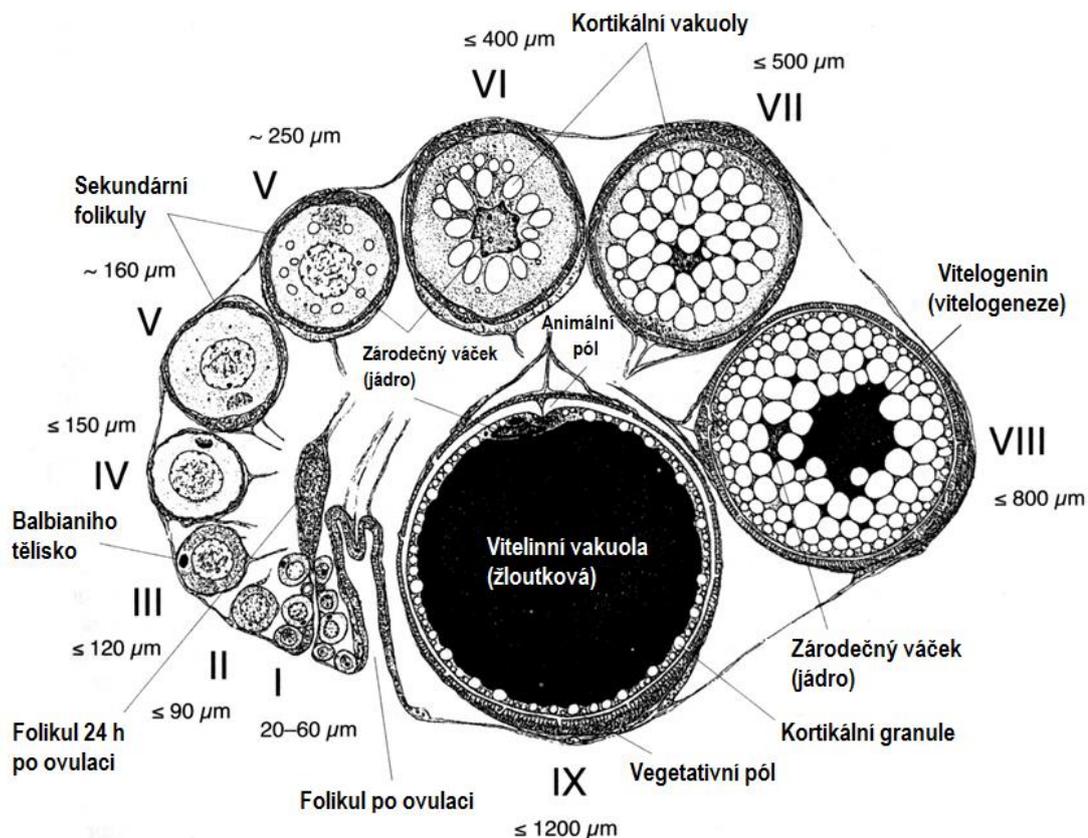
Následně začíná zrání oocyty, které je indikováno zmíněnou periferní migrací jádra směrem k animálnímu pólu a rozpuštěním jaderné membrány (Patiño a Sullivan, 2002; Johnson a kol., 2010). Zrání oocytů je řízeno především LH, který se naváže na receptor v théce a započne tvorbu tzv. hormonu indukujícího dozrávání (maturation inducing hormone, MIH). U lidí má tuto úlohu hormon progesteron (P4), zatímco pro ryby je podstatně důležitější 17,20 β -dihydroxypregn-4-en-3-on (17,20 β -P) nebo u některých druhů 17,20 β ,21-trihydroxy-pregn-4-en-3-on (17,20 β ,21-P) (Scott a kol., 2010). LH taktéž znovu spouští proces meiózy (Patiño a Sullivan, 2002), který je doprovázen rozpadem zárodečného váčku. Po dokončení prvního meiotického dělení vzniká první polárního tělísko, které degeneruje na oocyt II. řádu, u něhož dochází k zadržení druhého meiotického dělení v metafázi II (Lubzens a kol., 2010). K následujícímu obnovení meiózy II u ryb a obojživelníků dochází až po navázání MIH na membránu oocytů prostřednictvím membránového receptoru pro MIH (membrane MIH receptor, mMIHR). MIH je obecně považován za nezbytný a dostatečný signál k opětovnému spuštění procesu meiózy u kostnatých ryb. Zprostředkovávat ho však může i řada jiných faktorů jako jsou například již zmíněné inzulinu podobné růstové faktory, aktiviny, serotonin či epidermální růstový faktor (epidermal growth factor, EGF) (Patiño a Sullivan, 2002). Obecný pohled na vývoj oocytů během období sekundárního růstu je znázorněn na obrázku 10.



Obrázek 10 Vývoj oocytů v období sekundárního růstu. PG – oogonie v primárním růstu; CA – kortikální alveolární oocyty; Vtg – vitelogeneze, kterou lze v souvislosti s rozsahem žloutkových globulí nebo trombocytů v ooplazmě rozdělit na primární (Vtg1), sekundární (Vtg2) a terciární (Vtg3); GVM – migrace zárodečných váčků; YC – koalescence žloutku; GVBD – zánik zárodečných váčků; H – hydratace; POF – postovulační folikuly (převzato a upraveno z Lowerre-Barbieri a kol., 2011)

2.1.4.3. Ovulace

Poslední fází vývoje jikry je ovulace, která je řízena pomocí MIH a prostaglandinů. Samotný proces ovulace se skládá z prasknutí zralého folikulu s oocytem II. řádu (tj. Gráfova folikulu) a procesu vypuzení vajíčka do vejcovodu a následně do vnějšího prostředí, kde dochází k oplodnění doprovázeném dokončením druhé meiózy a vyloučením druhého polárního tělíska (Patiño a Sullivan, 2002). Prasknuté folikuly, jež jsou také známé jako postovulační, zůstávají v ováriích až do té doby, než dojde k jejich resorpci (Lowerre-Barbieri a kol., 2011). Průběh oogeneze u medaky japonské je zobrazen na obrázku 11.



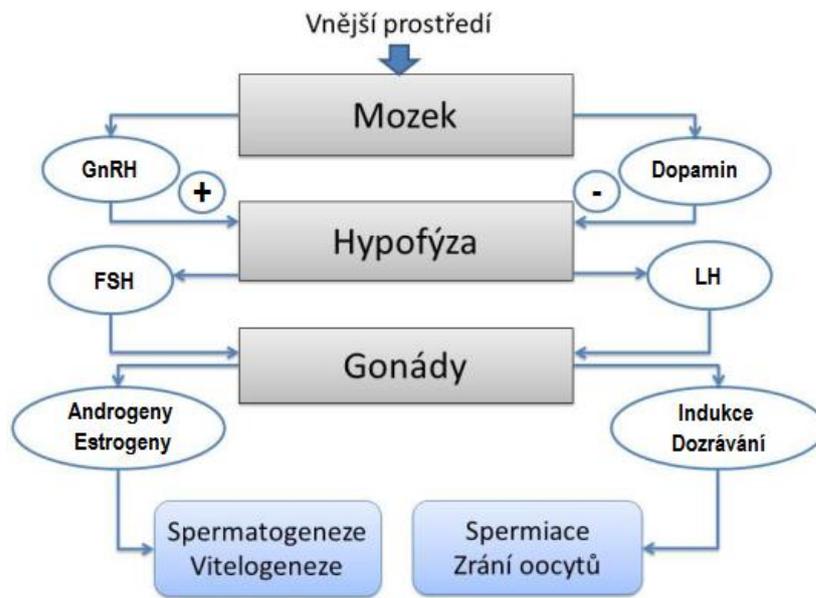
Obrázek 11 Příklad oogeneze u medaky japonské (*Oryzias latipes*) (převzato a upraveno z Takashima a Hibiya, 1995)

U ryb s vnitřním oplodněním se jikry zadržují v těle samice, kde dochází k jejich oplodnění. Následně jsou pak z těla vypuzovány buď oplodněné jikry (ovoviviparie) anebo přímo vykulený plůdek (viviparie). Vnitřní oplodnění se vyskytuje u živorodkovitých a řady dalších ryb z různých čeledí (Genten a kol., 2009). Viviparní druhy na rozdíl od ovoviviparních druhů zpravidla nemají žloutek a jejich výživa je zajišťována mateřským organismem. Pro viviparní druhy ryb jsou také typická různá specifika v oblasti reprodukční biologie, jako je například vývoj embrya několik týdnů po oplození v dutém vaječniku, který se stává vysoce vaskulárním a jeho epitel uvolňuje živiny potřebné pro vývoj embryí (Chester-Jones a kol., 2013). Existuje samozřejmě i řada dalších morfologických a funkčních adaptací, a to jak u mateřského organismu, tak i embryí, přičemž tyto adaptace jsou zaměřené především na usnadnění přenosu živin a kyslíku od matky do embrya a na specifické mechanismy související s likvidací metabolických odpadů. Takovéto pozoruhodné strukturální úpravy se vyskytují

například u čeledi Gudeovitých (*Goodeidae*) (Genten a kol., 2009). U jiných druhů zase nedochází k ovulaci vůbec a oplodnění probíhá přímo ve folikulu, který se později transformuje na vyživovací strukturu označovanou jako folikulární pseudoplacenta (Chester-Jones a kol., 2013).

2.1.4.4. Regulace oogeneze a ovulace

U samic stejně jako u samců je proces oogeneze a ovulace regulovaný neuroendokrinním systémem, konkrétně osou hypothalamus-hypofýza-ovária. Jak již bylo uvedeno výše, ke zrání oocytů dochází prostřednictvím LH, který stimuluje buňky folikulů k syntéze steroidu vyvolávajícího dozrávání (maturation-inducing steroid, MIS). Nejvýznamnějším steroidem z hlediska dozrávání je $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (Nagahama a kol., 1995). Po dozrání oocytů dochází za předpokladu příznivých podmínek pro reprodukci k sekreci GnRH, což je nejdůležitější stimulant produkce LH. LH je nezbytný pro iniciaci steroidogeneze a následně ovulace (Patiño a Sullivan, 2002). Studie s karasem zlatým (*Carassius auratus*) prokázaly, že pro úspěšné dosažení předvýtěrové hladiny LH jsou důležité zejména vyšší hladiny testosteronu (T) a 17β -estradiolu, přičemž mechanismus pozitivní či negativní zpětné vazby steroidních hormonů je potvrzený u spousty druhů ryb (Kobayashi a kol., 1989). Inhibičně v souvislosti se sekrecí LH a současně protichůdně vůči vlivu GnRH působí dopamin (dopamine, DA). Dopamin je katecholaminní neurotransmitter, jenž zabraňuje předčasnému dozrávání pohlavních produktů. Klíčovou roli z hlediska tlumícího účinku dopaminu během vitelogeneze hraje s největší pravděpodobností hladina 17β -estradiolu (Dufour a kol., 2005). Účinky zpětné vazby pohlavních hormonů působí na mozek a podvěsek mozkový, čímž umožňují integraci s environmentálními podněty, tak aby ve výsledku vyvolaly požadovaný nárůst předovulační úrovně LH (Aida, 1988). Zjednodušené schéma reprodukční osy ryb je uvedeno na obrázku 12.



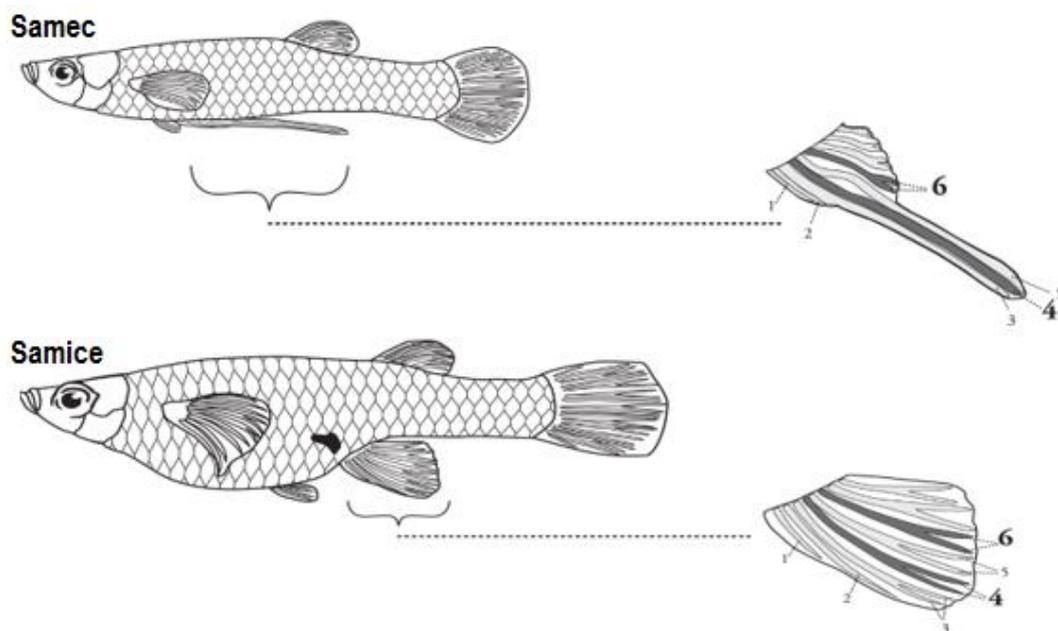
Obrázek 12 Zjednodušené schematické znázornění reprodukční osy ryb (převzato a upraveno z Mylonas a kol., 2010)

2.2. Živorodka Wingeova (*Poecilia wingei*)

Živorodka Wingeova také často nazývaná Endlerova, je drobná akvarijní ryba patřící do čeledi živorodkovitých. Je blízcce příbuzná známé živorodky duhové, od které se liší zejména barevným vzorem a lehce rozdílnou morfologií gonopodia (Poeser a kol., 2005). Jedná se o endemický druh, který se v současnosti přirozeně vyskytuje pouze v severní Venezuele, ve dvou oblastech zvaných Cumaná (Alexander a Breden, 2004; Schories a kol., 2009) a Campona (Poeser a kol., 2005). Z hlediska chovu jsou živorodky nenáročné ryby s krátkou reprodukční dobou, a proto nacházejí uplatnění jako modelový experimentální organismus v laboratořích (Dietrich a Krieger, 2009; Schories a kol., 2009). Živorodka Wingeova byla pro tuto práci použita také proto, že se u ní vyskytuje výrazný pohlavní dimorfismus, který byl z hlediska pozdějšího posouzení vlivu etonogestrelu na sekundární pohlavní znaky důležitý.

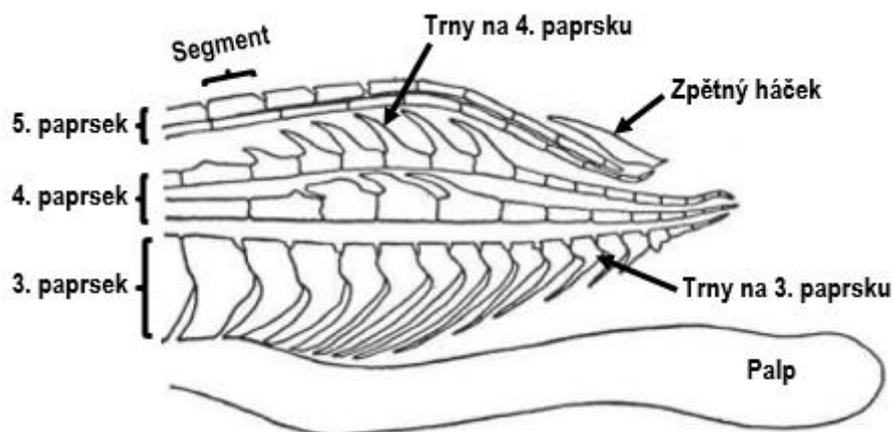
2.2.1. Pohlavní dimorfismus živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*)

Všechny druhy čeledi živorodkovitých se rodí s nediferencovanou anální ploutví. U samců se však anální ploutev v důsledku působení samčích pohlavních hormonů modifikuje do pomocného kopulačního orgánu – gonopodia, který během kopulace slouží k přenosu spermií (Turner, 1942; Angus a kol., 2001). Detail pohlavního dimorfismu anální ploutve gambusie komáří (*Gambusia affinis*) je zobrazen na obrázku 13.



Obrázek 13 Detail pohlavního dimorfismu anální ploutve gambusie komáří (*Gambusia affinis*)
(převzato a upraveno z Angus a kol., 2001)

Gonopodium lze považovat za unikátní a z hlediska struktury poměrně složitý orgán. Skládá se z devíti či deseti segmentovaných paprsků, z nichž tři (třetí, čtvrtý a pátý) jsou prodlouženy více než ostatní (Huang a kol., 2016; Coad, 2017) a na jejich konci se často nachází různé zpětné háčky, které při kopulaci slouží k uchopení samice do té doby, než dojde k přenosu spermií (Turner, 1941; Rosen a Bailey, 1963). Podrobná struktura gonopodia živorodky duhové, blízké příbuzné živorodky Wingeovy, je znázorněna na obrázku 14.



Obrázek 14 Gonopodium živorodky duhové (*Poecilia reticulata*) (převzato a upraveno z Rosen a Bailey, 1963)

U samic se běžně gonopodium nevytváří, avšak v důsledku působení hormonů s androgenní aktivitou (ethinyltestosteron, 17-methyltestosteron, androstenedion či spironolakton) se jejich anální ploutev do struktur podobných gonopodiu může vyvinout a dochází k tzv. maskulinizaci neboli k projevům samčích pohlavních znaků u samic (Angus a kol., 2001). Maskulinizace samic se může projevit například prodloužením 4. paprsku, přítomností trnů na 3. a 4. paprsku, vyšší šířkou 3. paprsku anebo výskytem výrůstku se zaobleným koncem nacházejícím se na spodním okraji gonopodia (Bailey, 1963). Tento výrůstek bývá v anglicko-jazyčné literatuře označován jako „palp“. V následujícím textu budu pro lepší přehlednost uvádět tento anglický termín.

Na druhé straně feminizace samců, tj. výskyt samičích pohlavních charakteristik u samců, se projevuje kupříkladu zvýšením hladiny 17 β -estradiolu, syntézou vitelogeninu či snížením hladiny testosteronu, což následně vede k inhibici růstu testes a poklesu produkce spermií (Tian a kol., 2012). U samců může také nastat v důsledku působení hormonů s androgenní aktivitou hypermaskulinizace, která se projevuje například signifikantně zvýšenou hmotností testes anebo zvýšením počtu segmentů paprsků gonopodia v porovnání se samci, kteří žádné hormonální látky exponováni nebyli (Hou a kol., 2018a).

Dalším typickým sekundárním pohlavním znakem je pestrobarevné zbarvení samců zahrnující černé, červené, oranžové, žluté či modré skvrny (Schories a kol., 2009). Samice jsou obvykle pouze jednobarevné (Poeser a kol., 2005). Nicméně v důsledku působení hormonálních látek může dojít k výskytu barevných skvrn i u samic (Sköld a

kol., 2008) anebo naopak k poklesu rozsahu a intenzity atraktivního zbarvení samců (Tian a kol., 2012). Posledním, na první pohled znatelným rozdílem mezi samci a samicemi, je jejich velikost. Samci obvykle dosahují délky okolo 2,5 cm, zatímco samice mohou dorůstat až do délky 4 cm (Poeser a kol., 2005). Samotný růst ryb může být ovlivněn kromě environmentálních podmínek také přítomností steroidních hormonů, zejména pokud jsou přítomny ve vodách dlouhodobě a ve vyšších koncentracích (Angus a kol., 2001). Přirozený vzhled samce a samice živorodky Wingeovy je zobrazen na obrázku 15.



Obrázek 15 Vzhled samce (nahore) a samice (dole) živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*) (převzato a upraveno z Řežucha, 2014)

2.2.2. Reprodukční strategie živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*)

Pro samce živorodky Wingeovy je charakteristické využívání různorodých reprodukčních taktik, které mohou podle potřeby střídat, přičemž jejich hlavním cílem je dosažení maximálních individuálních reprodukčních úspěchů. Chce-li samec samici přesvědčit k tzv. kooperativnímu páření, dvoří se jí formou tzv. sigmoidního předvádění, během něhož se před samicí rychle natrásá, ukazuje své rozmanitě zbarvené tělo s doširoka roztaženými ploutvemi a tělo má přitom zkroucené do polohy připomínající písmeno S (Pilastro a Bisazza, 1999). Barevnější samci mají sice větší šanci na spáření, nicméně ve vodách jsou viditelnější a jsou tak snadnější kořistí pro případné predátory. Proto se také míra zbarvení u samců obvykle snižuje se zvyšující se úrovní predace (Godin a McDonough, 2003).

Samci mohou také samičku pronásledovat a pokusit se jí oplodnit nenápadně (sneaking) tím způsobem, že ze zadu do samiččina pohlavního otvoru zasunou vztyčené gonopodium a uvolní malé množství spermatu uskladněného ve vácích (tzv. spermatozeugmatech). Celá akce je v porovnání s dvořením velice rychlá, neboť trvá pouze zlomek vteřiny až několik vteřin. Celkový objem spermatu dopraveného do samice během sneakingu je oproti kooperativnímu páření menší a existuje tudíž riziko, že nedojde k oplodnění (Řežucha, 2014).

Samičky jsou receptivní k podnětům samců a následně ke kooperativnímu páření pouze pár dní poté, co dojde k vypuzení potomstva z jejich těla. V této době dovolují samečkům se s nimi pářit. Samičky mohou být oplodněny i v jiném období, avšak pouze prostřednictvím sneakingu, přičemž spermie jsou schopny přetrvávat v samičích vejcovodech poměrně dlouhou dobu (Houde, 1997). U živorodky Wingeovy a jí podobných druhů platí pravidlo posledního samce, což znamená, že samec, který se se samičkou spáří naposledy, zplodí zpravidla většinu potomstva (Evans a Magurran, 2001).

Samci věnují reprodukčním strategiím, respektive snaze o spáření, poměrně hodně času i energie. Tyto strategie mohou být buďto vrozené anebo získané vlastní zkušeností či pozorováním jiných jedinců. To, jakým způsobem samci použít těchto taktik vybalancují, závisí u živorodek obecně jednak na environmentálních faktorech jako jsou intenzita okolního světla nebo rychlost proudění vody, jednak na faktorech

ekologických, což je například dostupnost potravy, stupeň predace, vnitrodruhová kompetice, populační hustota, poměr pohlaví či stupeň parazitace. Podstatný vliv mají i faktory fyziologické, morfologické a genetické, které zahrnují kupříkladu březost samice, zbarvení anebo délku ocasní ploutve (Řežucha, 2014).

2.3. Cizorodé látky ve vodním prostředí

Životní prostředí je nepřetržitě zatěžováno různými cizorodými látkami – xenobiotiky (Fent, 2015; Hou a kol., 2018a). V průběhu 20. století se začalo vyrábět velké množství těchto látek, přičemž mezi tyto látky patří kupříkladu polychlorované bifenyly (polychlorinated biphenyl, PCB), polycyklické aromatické uhlovodíky (polyaromatic hydrocarbons, PAH), organochlorové pesticidy (organochlorine pesticides, OCP), dibenzo-p-dioxiny (polychlorinated dibenzodioxins, PCDD) a mnoho dalších. Od počátku šedesátých let si ovšem lidé začali uvědomovat možné nepříznivé účinky cizorodých látek a jejich potenciální rizika pro životní prostředí. Z tohoto důvodu se řada těchto nebezpečných látek buďto přestala vyrábět úplně anebo jejich výroba byla do určité míry snížena (Van der Oost a kol., 2003).

V současnosti jedno z největších rizik pro životní prostředí a vodní organismy představují hormonálně aktivní látky známé jako endokrinní disruptory (endocrine disrupting chemicals, EDC) (Angus a kol., 2001; Kloas a kol., 2009; Fent, 2015). Endokrinní disruptory tvoří poměrně bohatou a různorodou skupinu sloučenin exogenního původu, které jsou schopny měnit běžnou funkci endokrinních systémů prostřednictvím interference se specifickými receptory a tím posléze narušovat syntézu, sekreci, transport či působení přirozených hormonů v těle, které jsou zodpovědné za normální vývoj organismu (Snyder a kol., 2003). K těmto látkám řadíme jak látky antropogenního původu (např. syntetické steroidní hormony, chlorované pesticidy, těžké kovy), tak samozřejmě i látky přírodního původu jako jsou kupříkladu fytoestrogeny anebo přírodní steroidní hormony (Křešinová a kol., 2009). Mezi nejsilnější endokrinní disruptory patří právě zmíněné přírodní steroidní hormony, ale i jejich syntetické analogy, které jsou schopny interakce s mnoha různými hormonálními receptory a jejich účinek se může projevit již ve velmi nízkých koncentracích, tj. už od

jednotek nanogramů na litr, přičemž tyto látky představují riziko především pro vodní ekosystémy, kde většina těchto substancí končí (Fent, 2015).

2.3.1. Progestiny

Syntetické progestiny označované také jako gestageny či progestogeny (Fent, 2015) jsou vyráběny s cílem napodobit přírodní hormon progesteron a vázat se na progesteronový receptor. Používají se při léčbě řady zdravotních problémů, zahrnující například rakovinu endometria¹², děložní krvácení (Kumar a kol., 2015), postmenopauzální problémy (Paulos a kol., 2010) nebo v hormonální substituční terapii (Besse a Garric, 2009; Runnalls a kol., 2013; Orlando a Ellestad, 2014). Progestiny jsou dále schopné inhibovat ovulaci a proliferaci děložní sliznice (endometria), a proto našly své uplatnění v orální antikoncepci (Zeilinger a kol., 2009; Golovko a kol., 2018), pro kterou jsou samostatně nebo v kombinaci se syntetickými estrogény (zejména ethinylestradiolem) nezbytnou složkou (Runnalls a kol., 2013; Kumar a kol., 2015; Frankel a kol., 2016a). Syntetické progestiny mají také své využití v živočišné výrobě jako stimulatory růstu u hospodářských zvířat (Liu a kol., 2012). Zatímco problematikou výskytu estrogenů v životním prostředí a jejich vlivu na vodní organismy se zabývalo poměrně velké množství prací (Angus a kol., 2001), progestiny se dostaly do popředí zájmu až v posledních letech (Fent, 2015).

2.3.1.1. Přírodní progestiny

Progestiny lze definovat jako hormony, které jsou schopny vyvolat sekreční reakci na děložní sliznici (Roztočil a kol., 2011). Prakticky jediným významným přírodním progestinem vyskytujícím se u lidí je progesteron (Fent, 2015). Jiné přírodní progestiny, jako je 17 α -hydroxyprogesteron, mají poměrně malý význam, poněvadž jejich gestagenní aktivita je víceméně zanedbatelná (Roztočil a kol., 2011). Progesteron je důležitý především u žen, neboť navozuje sekreční (luteální) fázi menstruačního cyklu a podporuje růst děložní sliznice po ovulaci, čímž ji připravuje na těhotenství (Kittnar a

¹² Rakovina endometria je zhoubný nádor vnitřní výstelky dělohy – endometria a druh rakoviny děložního tělíska.

kol., 2011). Dále také udržuje správný průběh těhotenství, má podstatný vliv na vývoj mléčné žlázy v prsu (Mourek, 2012) a v neposlední řadě je znám i jeho účinek na termoregulaci, respektive vzestup bazální teploty ve druhé polovině menstruačního cyklu (Roztočil a kol., 2011). Produkci tohoto hormonu zajišťují luteinní buňky žlutého tělíska (*corpus luteum*) v ováriu (Mourek, 2012), v malém množství je tvořen buňkami théky předovulačního folikulu a v nepatrné míře také nadledvinami (Roztočil a kol., 2011). Během těhotenství je ve velkém množství produkován také placentou. Progesteron tedy hraje klíčovou roli v přípravě těhotenství i v jeho samotném průběhu (Martínková a kol., 2007).

U ryb progesteron na rozdíl od lidí nemá tak významnou úlohu. Mnohem významnější je pro ně již zmíněný 17,20 β -P anebo 17,20 β ,21-P (Scott a kol., 2010), přičemž biologická aktivita progestinů u ryb je zprostředkována přes specifické nukleární progesteronové receptory, které byly zjištěny dva – PR α a PR β (Fent, 2015). Progestiny 17,20 β -P, případně 17,20 β ,21-P mají u mnoha druhů ryb vliv na závěrečné zrání oocytů, spermiaci, zvýšení motility spermií (Scott a kol., 2010) a například u závojnátky čínské (*Carassius auratus*) bylo prokázáno, že také působí jako feromony (Scott a Sorensen, 1994). 17,20 β -P je také nezbytným faktorem pro iniciaci meiózy, a to jak během spermatogeneze, tak i oogeneze (Scott a kol., 2010).

2.3.1.2. Syntetické progestiny

Syntetické progestiny lze rozdělit na deriváty testosteronu (estrany a gonany) a deriváty progesteronu (pregnany a norpregnany) (Fent, 2015). V poslední době se také začal vyrábět derivát spironolaktonu s obchodním názvem drospirenon (Kumar a kol., 2015). Klasifikace a příklady některých syntetických progestinů jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 Klasifikace a příklady některých syntetických progestinů (převzato a upraveno z Kumar a kol., 2015 a Golovko a kol., 2018)

Strukturní odvození	Skupina	Progestin	Zkratka
Progesteron	Pregnany	Medroxyprogesteron acetát	MPA
		Medroxyprogesteron	MEP
		Chlormadinon acetát	CMA
		Cyproteron acetát	CPA
	Norpregnany	Nomegestrol acetát	NGA
		Megestrol acetát	MGA
		Ulipristal acetát	UPA
		Nestoron	NES
		Trimegeston	TRI
	Testosteron	Estrany	Altrenogest
Mifepriston			MIP
Ethisteron			ETH
Norethisteron			NET
Norethisteron acetát			NEA
Ethinodiol diacetát			EDA
Dienogest			DIE
Gonany		Levonorgestrel	LNG
		Etonogestrel	ETG
		Dydrogesteron	DDG
		Norelgestromin	NGMN
		Desogestrel	DSG
		Norgestimat	NTE
Gestoden	GES		
Spironolakton		Drospirenon	DRO

Syntetické progestiny prošly již určitým vývojem a je možné je rozdělit do čtyř generací podle data jejich vzniku. První generace progestinů byla vyrobena v 50. letech 20. století. Do této skupiny progestinů patřily zejména deriváty testosteronu anebo 17-hydroxyprogesteronu (Sitruk-Ware a Nath, 2013). Nicméně většina těchto prvních progestinů byla poměrně nespecifická a neomezovala se pouze na receptor progesteronu (PR), ale vázala se například i na androgenní (AR) nebo glukokortikoidní receptor (GR), což vedlo k řadě nežádoucích vedlejších účinků (Frankel a kol., 2016a). Mezi progestiny první generace patří kupříkladu norethisteron nebo medroxyprogesteron

acetát (Ellestad a kol., 2014). V rámci druhé generace progestinů, které byly opět především deriváty testosteronu, bylo docíleno nižšího androgenního efektu ve srovnání s první generací. Do této generace patří například levonorgestrel. Následující třetí generace progestinů zahrnuje například gestoden, etonogestrel či desogestrel (Sitruk-Ware, 2008). Čtvrtá generace progestinů byla syntetizována až v posledních letech a jedná se o tzv. ideální progestiny s minimálními nežádoucími účinky (Sitruk-Ware a Nath, 2013). Novější progestiny jako drospirenon, dienogest nebo trimegeston se váží specificky na progesteronový receptor a tím minimalizují vedlejší účinky související s interakcí s jinými receptory (Fent, 2015). Obecně deriváty testosteronu (gonany a estrany) vykazují androgenní aktivitu, zatímco u derivátů progesteronu (pregnanů a norpregnanů) se uvádí, že interagují s jinými steroidními receptory než progesteronovým pouze v omezené míře (Zeilinger a kol., 2009). Celosvětová spotřeba syntetických progestinů sice není známa, nicméně v několika evropských zemích byly provedeny alespoň odhady. Například roční průměrná spotřeba progestinů ve Francii se odhaduje na 12 800 kg, v Anglii na 1 700 kg a v České republice na 2 400 kg (Kumar a kol., 2015).

Z hlediska množství je syntetických progestinů na rozdíl od estrogenů široké spektrum a lze je na základě účinků rozdělit do několika skupin. Tzv. čisté progestiny (obsahující jen progestiny) mají pouze progestagenní účinek (Roztočil a kol., 2011), tj. obdobný účinek jako přirozený hormon progesteron, přičemž tohoto účinku je dosaženo prostřednictvím syntetického analogu progesteronu. Mechanismus účinku antikoncepce založené na progestinech vychází ze zahuštění cervikálního hlenu, který se poté stává pro spermie neprostupný (Čepický a Líbalová, 2008). Do této kategorie patří medroxyprogesteron acetát či megestrol acetát (Roztočil a kol., 2011), které se v nízkých dávkách také využívají například proti děložnímu krvácení anebo při endometrióze. Ve vyšších dávkách slouží k inhibici produkce gonadotropinů (Martínková a kol., 2007). V rámci rozšířenějších kombinovaných kontraceptiv (progestiny + estrogény) našly své uplatnění látky jako jsou například gestoden, desogestrel včetně jeho metabolitu etonogestrelu anebo norgestimát a jeho metabolit norelgestormin (Roztočil a kol., 2011). Kombinovaná antikoncepce zabraňuje proniknutí spermií prostřednictvím zablokování sekrece hypofyzárních gonadotropinů (Martínková a kol., 2007). Progestiny s androgenním účinkem se využívají v kombinované hormonální antikoncepci (Roztočil a kol., 2011) a jejich androgenní

účinek může vést k výskytu akné či hirzutismu (Martínková a kol., 2007). Jediným současně významným představitelem progestinů s androgenním účinkem je levonorgestrel. Progestiny s antiandrogenním účinkem zahrnují cyproteron acetát, dienogest nebo chlormadinon acetát a jsou využívány v kombinované hormonální antikoncepci. Cyproteron acetát se používá i samostatně v antiandrogenní indikaci (jedná se o nejsilnější známý antiandrogen). Další skupinou jsou progestiny, které mají androgenní i estrogenní účinek současně. Tento efekt má kupříkladu norethisteron acetát a jeho prekurzor lynestrenol. Vzhledem k tomu, že tyto progestiny mají progestagenní a estrogenní efekt, tak jsou vysoce efektivní v zástavě či odsunu hormonálně podmíněného děložního krvácení a v tomto ohledu jsou v klinické praxi široce používány. Poslední skupinu tvoří antiprogestiny a selektivní inhibitory progesteronových receptorů, které slouží jako receptorové blokátory progestinů. Tyto látky představují z klinického hlediska velký potenciál, ale jelikož působí jako abortiva, tak zatím nedošlo k jejich rozsáhlejšímu použití. Do této skupiny látek patří mifepriston anebo ulipristal acetát, který je využíván jako postkoitální antikoncepce (Roztočil a kol., 2011). Mechanismus účinku této antikoncepce spočívá především v zabránění vývoji děložní sliznice pro nidaci blastocysty, který nastává po sedmi dnech od oplodnění. Mezi nežádoucí účinky antikonceptiv se obecně řadí například migrény, výskyt karcinomu děložního hrdla nebo snížení libida (Martínková a kol., 2007). Biologická aktivita přírodního progesteronu a vybraných syntetických progestinů k různým steroidním receptorům u lidí je uvedena v tabulce 2.

Tabulka 2 Biologická aktivita progesteronu a některých syntetických progestinů k různým steroidním receptorům u lidí (převzato a upraveno z Kumar a kol., 2015)

Progestin	Aktivita									
	PR	ER	AR	GR	MR	Anti-ER	Anti-AR	Anti-GR	Anti-MR	Anti-GOR
Progesteron	+	-	-	+/-	-	+	+	-	+	+
Medroxyprogesteron acetát	+	-	+	+	-	+	+/-	+/-	+/-	+
Cyproteron acetát	+	-	+/-	+	-	+	+	+	-	+
Nomegestrol acetát	+	-	-	-	-	+	+		-	+
Nestoron	+	-	-	+/-	-	+	-	-		
Trimegeston	+	-	-	-	-	+	+/-	-	+	+
Norethisteron	+	+	+	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+
Norethisteron acetát	+	+	+	-	-		-		-	
Dienogest	+	+/-	+/-	-	-	+	+	-	-	+
Levonorgestrel	+	+/-	+	-	-	+	-		+/-	+
Etonogestrel	+	+/-	+	-	-	+	-		-	+
Desogestrel	+	-	+	-			-		-	
Norgestimát	+	-	+	-		+	-		-	+
Gestoden	+	+/-	+	+/-	-	+	-		+	+
Drospirenon	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+

(anti)PR – (anti)progestagenní aktivita; (anti)AR – (anti)androgenní aktivita; (anti)ER – (anti)estrogenní aktivita; (anti)GR – (anti)glukokortikoidní aktivita; (anti)MR – (anti)mineralokortikoidní aktivita; (anti)GOR – (anti)gonádotropní aktivita
 (+) – aktivní; (-) – neaktivní; (+/-) – literatura se neshoduje

U ryb bylo na základě mnoha různých studií prokázáno, že syntetické progestiny již v relativně nízkých koncentracích (jednotky $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$) způsobují řadu nežádoucích účinků (Fent, 2015), což je způsobeno především narušením normálního endokrinního systému ryb pravděpodobně prostřednictvím navázání progestinů na různé receptory (Kumar a kol., 2015; Hou a kol., 2018c), např. jaderný receptor pro estrogény (ER), androgeny, glukokortikoidy nebo minerálokortikoidy (MR) s různými afinitami (Besse a Garric, 2009; Kumar a kol., 2015). To následně ovlivňuje expresi genů zapojených do steroidogeneze a celkovou hladinu hormonů v těle ryb. Progestiny také mohou interferovat s přírodními feromony, a tím zhoršit fyziologické reakce a reprodukční chování ryb, neboť feromony jsou důležité pro synchronizaci jejich výtěru (Besse a Garric, 2009). Jednotlivé mechanismy účinku, které jsou základem nepříznivých vlivů syntetických progestinů, mohou být také specifické pro jednotlivé druhy ryb anebo se lišit v závislosti na typu progestinu, a proto je často poměrně obtížné je spolehlivě určit (Fent, 2015).

2.3.1.3. Výskyt progestinů ve vodním prostředí

Přírodní hormon progesteron spolu se stabilnějšími syntetickými progestiny je ve formě sulfonovaných a glukuronovaných metabolitů vylučován z lidského těla, přičemž některé progestiny mohou být v odpadní vodě znovu aktivovány na původní progestiny (Fent, 2015). Progestiny vstupují do vodního prostředí nejen skrze vypouštěné odpadní vody (Dong a kol., 2013; Frankel a kol., 2016b), ale také se splachy z chovů hospodářských zvířat (Orlando a Ellestad, 2014; Fent, 2015). Koncentrace progestinů v odpadní vodě se vzhledem k jejich rozsáhlému využití a vysoké spotřebě mohou vyskytovat i v poměrně vysokých koncentracích (Besse a Garric, 2009). Odpadní vody jsou následně čištěny v čistírnách odpadních vod (ČOV), kde dochází k různé míře jejich odbourávání (Racz a Goel, 2010), přičemž procento jejich odstranění je vysoce variabilní a někdy nemusí být odstraněny vůbec (Dong a kol., 2013). Například u progesteronu byla zjištěna poměrně vysoká účinnost odstranění na ČOV (Fent, 2015), zatímco syntetický progestin norgestrel vykazoval poměrně málo efektivní odstranění (Hou a kol., 2018b). Údaje o odbouratelnosti syntetických progestinů na ČOV a degradaci v povrchových vodách zatím nejsou k dispozici, nicméně se předpokládá, že rozložitelnost syntetických progestinů bude nižší oproti přírodnímu progesteronu, poněvadž syntetické progestiny jsou navrhovány tak, aby měly vyšší poločas rozkladu v těle než progesteron (Besse a Garric, 2009).

Po celém světě, v místech, kde dochází k vypouštění různých typů odpadních vod, byly progestiny detekovány v rozmezí od několika nanogramů až po několik stovek nanogramů (Kumar a kol., 2015). V případě odpadních vod z chovů hospodářských zvířat byl dokonce prokázán výskyt progesteronu v koncentraci nad $10\,000\text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ (Yost a kol., 2013) a norgestrelu v koncentraci $10\,088\text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ (Liu a kol., 2012). Například koncentrace medroxyprogesteronu ve vzorcích komunálních odpadních vod se pohybovala do $15\text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ (Zeilinger a kol., 2009).

V povrchových vodách se progestiny mohou nacházet jak ve vodním sloupci, tak i sedimentu či biotě, kde může vzhledem k jejich hydrofobní povaze s rozdělovacím koeficientem ($\log K_{ow}$) v rozmezí 3,1 – 5,4 docházet k jejich akumulaci. Obvykle se koncentrace progestinů v povrchových vodách pohybuje v rozmezí $0,1\text{ – }30\text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ (Fent, 2015).

2.3.1.4. Rizika spojená s výskytem progestinů ve vodním prostředí

V posledních letech se progestiny dostaly do popředí zájmu a jsou předmětem různých toxikologických studií, neboť u řady z nich byl prokázán negativní efekt, především na reprodukci ryb (Fent, 2015). V následujícím textu je popsáno několik studií, které se zabývaly účinky vybraných progestinů na ryby.

Progesteron

Účinky progesteronu na dospělé samice gambusie komáří (*Gambusi affinis*), někdy též označované jako živoročky komáří, byly sledovány ve studii Hou a kol. (2017). Samice byly vystaveny progesteronu ve třech různých koncentracích (4; 44 a 410 ng·l⁻¹) po dobu 42 dní. Samice exponované nejvyšší koncentraci progesteronu měly delší 3. paprsek anální ploutve a širší segmenty 3. paprsku, což indikuje maskulinizaci. Rovněž byl pozorován výskyt postovulačních a atretických folikulárních buněk se signifikantně vyšším počtem v nejvyšší koncentraci.

V dalším experimentu, jež provedl Liang a kol. (2015), byl sledován vliv progesteronu (4; 33 a 63 ng·l⁻¹) na pohlavní diferenciaci dánia pruhovaného. Expozice byla zahájena 20 dní po oplození jiker a skončila 60 dní po oplození. Výsledky ukázaly, že expozice progesteronu v nejvyšší koncentraci vedla k významnému zvýšení procentuálního zastoupení samic. Nicméně další studie, kterou prováděl Svensson a kol. (2016), vliv progesteronu (3,7; 77 a 1122 ng·l⁻¹) na pohlavní diferenciaci u dánia pruhovaného neprokázala.

Levonorgestrel

Vliv levonorgestrelu na ryby byl poprvé sledován ve studii Zeilinger a kol. (2009). V rámci této studie byly dospělí jelečci velkohlaví (*Pimephales promelas*) chováni 21 dní v akváriích s třemi odlišnými nominálními koncentracemi levonorgestrelu (0,8; 3,3 a 29,6 ng·l⁻¹). Koncentrace levonorgestrelu $\geq 0,8$ ng·l⁻¹ vedla ke snížení plodnosti samic a od koncentrace 29,6 ng·l⁻¹ také k jejich maskulinizaci, která se projevila tmavým zbarvením kůže a ploutví.

Působením lenorgestrelu na reprodukční vývoj a chování viviparní gambusie Holbrookovy (*Gambusia Holbrooki*) se zabývali také Frankel a kol. (2016a). V jejich

studii byly dospělé gambusie exponovány 10 a 100 ng·l⁻¹ levonorgestrelu po dobu 8 dnů. U samců exponovaných vyšší koncentraci levonorgestrelu došlo k prodloužení gonopodia (znak hypermaskulinizace) a ke změnám reprodukčního chování, konkrétně se podstatně snížil jejich zájem o páření se samicemi. Samice vykazovaly významné zvýšení poměru 4. paprsku k 6. paprsku anální ploutve (znak maskulinizace), a to v obou koncentracích levonorgestrelu, přičemž rozdíly mezi těmito koncentracemi nebyly příliš významné.

Vlivem levonorgestrelu na diferenciaci gonád ryb se zabývala i studie autorů Svensson a kol. (2016), ve které byla juvenilní dáňia pruhovaná od 20. do 80. dne po oplození exponována třem koncentracím levonorgestrelu (5,5; 79 a 834 ng·l⁻¹). Po skončení experimentu bylo zjištěno, že expozice levonorgestrelu již v nejnižší koncentraci vedla k 100 % výskytu samců. To potvrzuje i experiment autorů Hua a kol. (2015), během něhož byla embrya dáňia pruhovaného vystavena čtyřem koncentracím levonorgestrelu (0,1; 10; 33 a 100 ng·l⁻¹). Test trval od oplození až do 63. dne po oplození. Levonorgestrel v koncentraci ≥ 10 ng·l⁻¹ způsobil 100 % zastoupení samců. Z těchto poznatků vyplývá, že androgenní progestin levonorgestrel indukuje fenotyp samců již v koncentracích podobných těm, které byly zjištěny ve vodním prostředí (Svensson a kol., 2016) a představuje tak reálné riziko pro populace ryb nacházející se ve vodách kontaminovaných tímto progestinem (Hua a kol., 2015).

Další studie byla zaměřená na účinky norgestrelu, což je racemická směs, ve které je jedna složka biologicky aktivní, zatímco druhá složka nikoliv. Biologicky aktivní složkou této směsi je levonorgestrel. Během experimentu byly dospělé samice gambusie komáří vystaveny celkem třem koncentracím norgestrelu (3,6; 35,8 a 368 ng·l⁻¹) po dobu 42 dní. Výsledky ukázaly, že norgestrel ve všech třech koncentracích způsobil zvýšený výskyt atretických folikulů v ováriích, zhoršil funkci pohlavních orgánů a negativně ovlivnil reprodukční chování samců. U ryb exponovaných 35,8 a 368 ng·l⁻¹ norgestrelu měla anální ploutev samic zvýšenou délku 4. paprsku, větší šířku 3. paprsku a vykazovala zvýšený počet segmentů v 3. paprsku. Expozice norgestrelu také ve všech koncentracích zhoršila reprodukční úspěch ryb, konkrétně o 58,4 % (3,6 ng·l⁻¹), 65,7 % (35,8 ng·l⁻¹), 76,4 % (368 ng·l⁻¹). V koncentracích 35,8 a 368 ng·l⁻¹ dokonce došlo k rozvoji spermatogeneze v ováriích (Hou a kol., 2018b).

Liang a kol. (2015) ve své studii rovněž sledoval efekt norgestrelu (4; 34 a 77 ng·l⁻¹) na poměr pohlaví dáňia pruhovaného. Expozice začala 20 dní po oplození a skončila

v 60. dni po oplození. Výsledky ukázaly, že expozice norgestrelu v koncentracích 34 a 77 ng·l⁻¹ zvýšila procentuálního zastoupení samců na 100 %.

Závěry výše uvedených studií tedy nasvědčují tomu, že (levo)norgestrel může již v relativně nízkých koncentracích ovlivnit reprodukční chování, sekundární pohlavní znaky, ale i diferenciaci pohlaví (Liang a kol., 2015).

Norethisteron

Norethisteronem se poprvé zabývala studie autorů Paulos a kol. (2010), během které byl hodnocen jeho vliv na medaku japonskou a jelečka velkohlavého. 28denní studie s medakou japonskou ukázala, že norethisteron v koncentraci ≥ 25 ng·l⁻¹ způsobuje prokazatelné snížení plodnosti. 21denní studie s jelečkem velkohlavým prokázala výrazný pokles plodnosti v koncentraci ≥ 100 ng·l⁻¹. U obou experimentů byly navíc zjištěny morfologické změny samic prokazující jejich maskulinizaci, což ukazuje na androgenní účinek norethisteronu

Účinkům norethisteronu se také věnovala studie Hou a kol. (2018c), ve které se hodnotil jeho vliv na pohlavní diferenciaci dánia pruhovaného. Juvenilní ryby (20 dní po vykulení) byly vystaveny čtyřem různým nominálním koncentracím norethisteronu (4,2; 32,3; 421,3 a 892,9 ng·l⁻¹) po dobu 45 dní. Na konci experimentu byl prokázán signifikantně vyšší poměr samců k samicím u skupin exponovaných koncentracím norethisteronu $\geq 32,3$ ng·l⁻¹. Expozice norethisteronu $\geq 421,3$ ng·l⁻¹ vedla k urychlení pohlavního dozrávání u samců, zatímco u samic ve všech koncentracích došlo ke zpomalení dozrávání ovárií. Norethisteron v koncentracích 421,3 a 892,9 ng·l⁻¹ také výrazně redukoval expresi genů regulujících steroidogenezi (*Cyp11a1*, *Cyp11c*, *Cyp19a1a* a *Cyp11b*), zatímco exprese enzymu podílejícího se na androgenní steroideogenezi (*Hsd17b3*) se zvýšila. Došlo i k zvýšení exprese některých receptorů nacházejících se v gonádách (progesteronového, androgenního, mineralokortikoidního). U genů zapojených do osy hypothalamus-hypofýza-gonády, konkrétně gonadotropiny uvolňujícího hormonu 3 (GnRH3) a proopiomelanokortinu (Pomc), byla exprese mRNA rovněž významně zvýšena, avšak s výjimkou *GnRH3* v nejnižší koncentraci.

Gestoden

Gestodenum se poprvé zabývala studie autorů Runnalls a kol. (2013). V rámci této studie byl proveden 21denní experiment, který sledoval účinky tří koncentrací gestodenu (1; 10 a 100 ng·l⁻¹) na samice jelečka velkohlavého. Maskulinizace jelečka velkohlavého byla prokázána od koncentrace 1 ng·l⁻¹ gestodenu, přičemž síla maskulinizačního účinku stoupala s rostoucí koncentrací tohoto progestinu. Od této koncentrace gestodenu také došlo k signifikantnímu snížení plodnosti samic.

Vliv gestodenu na jelečka velkohlavého byl také hodnocen ve studii Frankel a kol. (2016b). Ryby byly exponovány gestodenu v koncentraci 1 ng·l⁻¹ po dobu 8 dní. Již po jednom dni byly pozorovány změny v reprodukčním chování ryb. Samci byli agresivnější a jejich snaha i zájem o páření se samicemi značně klesly. Podobně se změnilo i reprodukční chování charakteristické pro samice. Navíc v 25 % akvárií obsahujících gestoden se vyskytovala vždy minimálně jedna samice projevující se chováním typickým pro samce k jiné samici. Gestoden rovněž způsobil snížení celkové produkce jiker, a to bez zjevných histopatologických změn na gonádách. Společně tyto výsledky naznačují, že snížená produkce jiker je primárně způsobena pozměněným chováním ryb, přičemž přesné mechanismy, jakým gestoden narušuje reprodukční chování, nejsou známy. Rychlé působení v nízké koncentraci a výrazné změny v reprodukční biologii ryb zjištěné v laboratorních podmínkách naznačují, že by gestoden, pokud se vyskytne ve vodním prostředí, mohl negativně ovlivnit divoké populace ryb.

Drospirenon

Působení drospirenonu na ryby, respektive na jelečka velkohlavého, bylo sledováno ve studii Zeilinger a kol. (2009). Během experimentu byli jelečci velkohlaví chováni v akváriích s třemi odlišnými koncentracemi (0,66; 6,5 a 70 µg·l⁻¹) po dobu 21 dní. Drospirenon v koncentraci $\geq 6,5$ µg·l⁻¹ způsobil snížení plodnosti samic.

Desogestrel

Desogestrelu se věnovali ve své práci Runnalls a kol. (2013). Tito autoři sledovali vliv tří koncentrací desogestrelu (0,1; 1 a 10 µg·l⁻¹) na jelečky velkohlavé po dobu 21 dní. Koncentrace desogestrelu ≥ 1 µg·l⁻¹ způsobila maskulinizaci samic a také snížení produkce jiker.

3. Materiál a metodika

Ve Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém ve Vodňanech (VÚRH) v Laboratoři vodní toxikologie a ichthyopatologie (LVTI) byl proveden toxikologický test, během něhož byly živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*) vystaveny dvěma různým koncentracím syntetického progestinu etonogestrelu po dobu 34 dní.

Experiment probíhal pod dohledem pracovníků Laboratoře vodní toxikologie a ichthyopatologie, především Dipl. Biol. Christoha Steinbacha, Ph.D., Ing. Hany Kocour Kroupové a Ing. Pavla Šauera, Ph.D. Má úloha spočívala zejména ve zpracování vzorků, konkrétně pořízení snímků ryb, měření morfometrických parametrů a fotografování histologických řezů gonád.

3.1. Návrh experimentu

Ryby byly v rámci toxikologického testu rozděleny do čtyř pokusných skupin, v nichž byly chovány 34 dní. Pro experiment byly vybrány pouze pohlavně zralé živorodky Wingeovy s minimální délkou těla 17 mm. Samci byli navíc selektováni na základě optimálního zbarvení těla a plně vyvinutého gonopodia. První kontrolní skupina byla chována pouze v čisté ředící vodě (K). Jako ředící voda byla použita dechlorovaná voda z vodovodního řadu. Druhá kontrolní skupina byla chována v ředící vodě s 0,0005 % rozpouštědla dimethylsulfoxidu (DMSO) (KS). Do pokusných skupin byl dávkován etonogestrel rozpuštěný v DMSO, neboť tím bylo dosaženo jeho lepšího rozpuštění. Proto byla také zahrnuta kontrolní skupina s DMSO, jelikož tím můžeme vyloučit vliv samotného rozpouštědla. Třetí skupina ryb byla exponována etonogestrelu v koncentraci $3,2 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ (E1) a ve čtvrté skupině byly ryby vystaveny $320 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ (E2). KS byla provedena ve třech opakováních a ostatní skupiny ve dvou opakováních.

Samci a samice byli v průběhu experimentu chováni odděleně ve 100 litrových akváriích, přičemž do každého akvária se umístilo 22 ryb. Jednalo se o semistatický systém, kde docházelo k obnově lázni každých 24 hodin. Během testu byl zaznamenáván úhyn ryb. Na konci experimentu byly ryby nejprve kvůli případným změnám zbarvení vyfotografovány. Následně byly ryby usmrceny vyšší dávkou anestetika MS-222 a fixovány v 10 % pufovaném formalínovém roztoku pro

morfologickou a histologickou analýzu. Tento test byl uskutečněn v souladu s platnou legislativou ČR.

3.2. Přístroje

Přístroje použité pro zpracování vzorků:

- Analytické váhy RADWAG WAS 220/C/2
- Barvicí automat Sakura Tissue-Tek DRS 2000
- Binokulární lupa Olympus SZX7
- Digitální zrcadlovka Olympus E-600
- Mikroskop Olympus BX51
- Mikrotom Diapath Galileo
- Sušárna Thermostat Ekom BT50
- Tkáňový procesor Bamed
- Topná deska Sakura 1452
- Vodní lázeň Medite TFB 55
- Zalévací linka Leica EG 1150H
- Zdroj studeného světla Olympus KL 1500 LCD

3.3. Chemikálie

Chemikálie použité pro zpracování vzorků:

- Anestetikum MS-222
- Dekalcifikační roztok (VWR Prolabo Chemicals)
- Eosin (Diapath), Etanolový roztok 0,5 %
- Hematoxylin (Mayerův) (Diapath)
- Lepidlo Pertex (Histolab)
- Parafín Histowax (Bamed)
- Pufrovací roztok (Scott's tap water)

3.4. Hodnocení zbarvení samic živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*) na konci testu

Na konci 34denního testu toxicity se hodnotila intenzita zbarvení samic živorodky Wingeovy. Z každé testované skupiny byl vybrán určitý počet samic (K = 10; KS = 29; E1 = 17; E2 = 20), přičemž každá z vybraných samic byla následně samostatně vyfocena a intenzita zbarvení se hodnotila v rozsahu 0 – 3 na základě toho, kde a v jakém rozsahu se u ryb barevné skvrny vyskytovaly (tabulka 3). Barevné skvrny se zpravidla postupně rozšiřovaly od ocasní ploutve, přes ocasní násadec až k trupu a oblasti hlavy.

Tabulka 3 Hodnocení úrovně zbarvení těla samic živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*) na konci testu

Intenzita zbarvení	Hodnocení
0	Žádný výskyt barevných skvrn
1	Barevné skvrny na ocasní ploutvi
2	Barevné skvrny na ocasním násadci a ocasní ploutvi
3	Barevné skvrny na hlavě, trupu, ocasním násadci a ocasní ploutvi

3.5. Měření morfometrických parametrů živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*)

V rámci měření morfometrických parametrů živorodky Wingeovy bylo hodnoceno celkem 9 základních parametrů, 5 parametrů pomocného kopulačního orgánu samců – gonopodia a 4 parametry anální ploutve samic. U samic byla ještě navíc na základě 3 parametrů hodnocena úroveň maskulinizace.

3.5.1. Měření základních morfometrických parametrů

Nejprve byla každá ryba vyjmuta z formalínu pinzetou (obrázek 16), promyta v čisté vodě, osušena a následně zvážena na analytických vahách RADWAG WAS 220/C/2 s přesností na čtyři desetinná místa.



Obrázek 16 Vzorky ryb v 10 % pufovaném formalínu

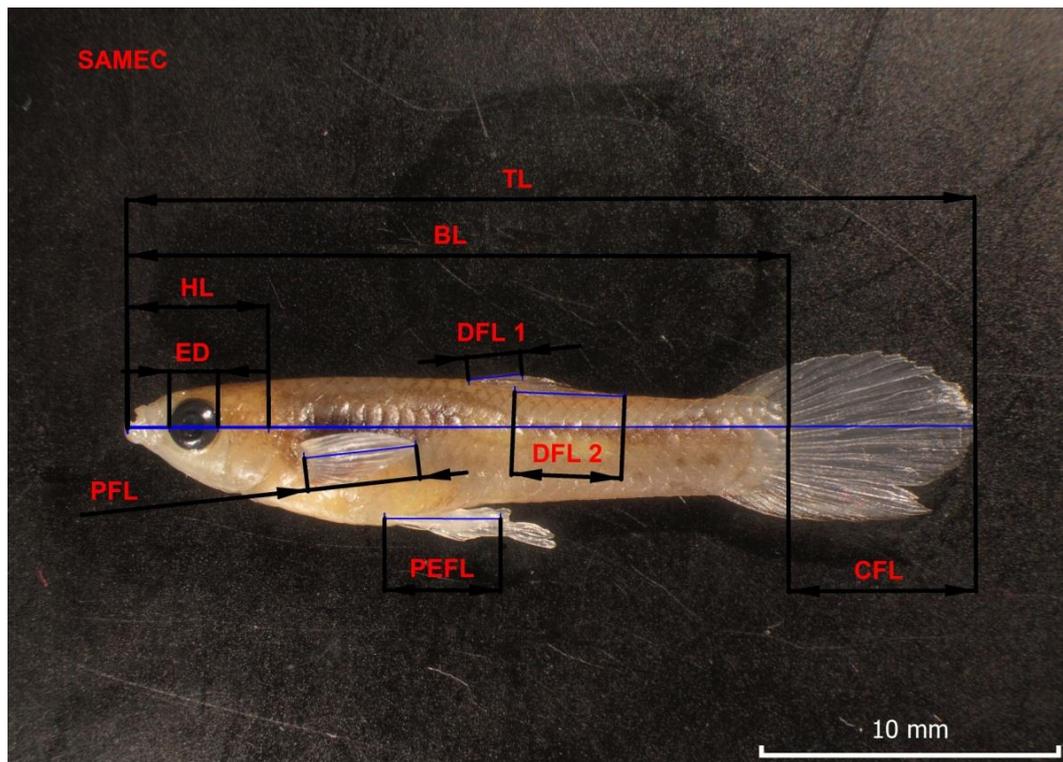
Poté byla daná ryba umístěna pod binokulární lupu Olympus SZX7, kde byla zdrojem studeného světla Olympus KL 1500 LCD vhodně nasvícena a s použitím digitální zrcadlovky Olympus E-600 vyfocena. Ryba byla poté vložena zpět do příslušné lahvičky s 10 % formalínem. Snímek byl následně uložen a později analyzován ve specializovaném programu QuickPHOTO MICRO 2.3 k měření jednotlivých morfometrických parametrů s přesností na dvě desetinná místa. Na snímku ryb bylo měřeno celkem 9 parametrů zahrnujících: celkovou délku (TL), délku těla (BL), délku hlavy (HL), průměr oka (ED), délku ocasní ploutve (CFL), délku 1. paprsku hřbetní ploutve (DFL 1), délku posledního paprsku hřbetní ploutve (DFL 2), délku prsních ploutví (PFL) a délku břišních ploutví (PEFL). Jednotlivé morfometrické parametry, které byly u samců a samic měřeny, jsou znázorněny na obrázku 17 a 18. Následně byly vypočteny poměry mezi jednotlivými tělesnými parametry, tj. poměr oka k délce těla (ED / BL), poměr délky hlavy k délce těla (HL / BL), poměr délky 1. hřbetního paprsku k délce těla ($DFL 1 / BL$), poměr posledního hřbetního paprsku k délce těla ($DFL 2 / BL$), poměr délky 1. hřbetního paprsku k délce posledního hřbetního paprsku ($DFL 1 / DFL 2$), poměr délky prsní ploutve k délce těla (PFL / BL), poměr délky břišní ploutve k délce těla ($PEFL / BL$) a poměr délky ocasní ploutve k délce těla (CFL / BL). Ze zjištěné hmotnosti a celkové délky těla byl ještě vypočítán Fultonův koeficient kondice (FCF) podle vzorce (2).

$$FCF = \frac{m}{TL^3} \cdot 100000 \quad (2)$$

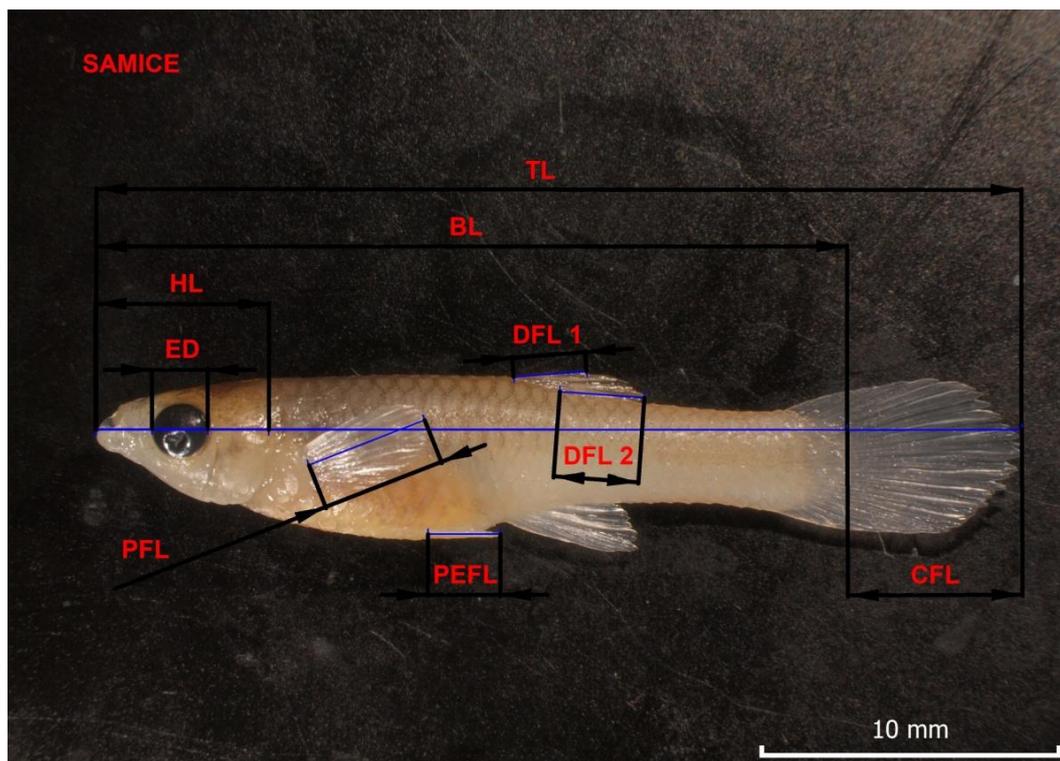
FCF – Fultonův koeficient kondice [$100 \text{ g} / \text{mm}^3$]

m – hmotnost ryby [g]

TL – celková délka těla [mm]



Obrázek 17 Morfometrické parametry měřené u samců živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*). TL – celková délka; BL – délka těla; HL – délka hlavy; ED – průměr oka; CFL – délka ocasní ploutve; DFL 1 – délka 1. paprsku hřbetní ploutve; DFL 2 – délka posledního paprsku hřbetní ploutve; PFL – délka prsních ploutví; PEFL – délka břišních ploutví

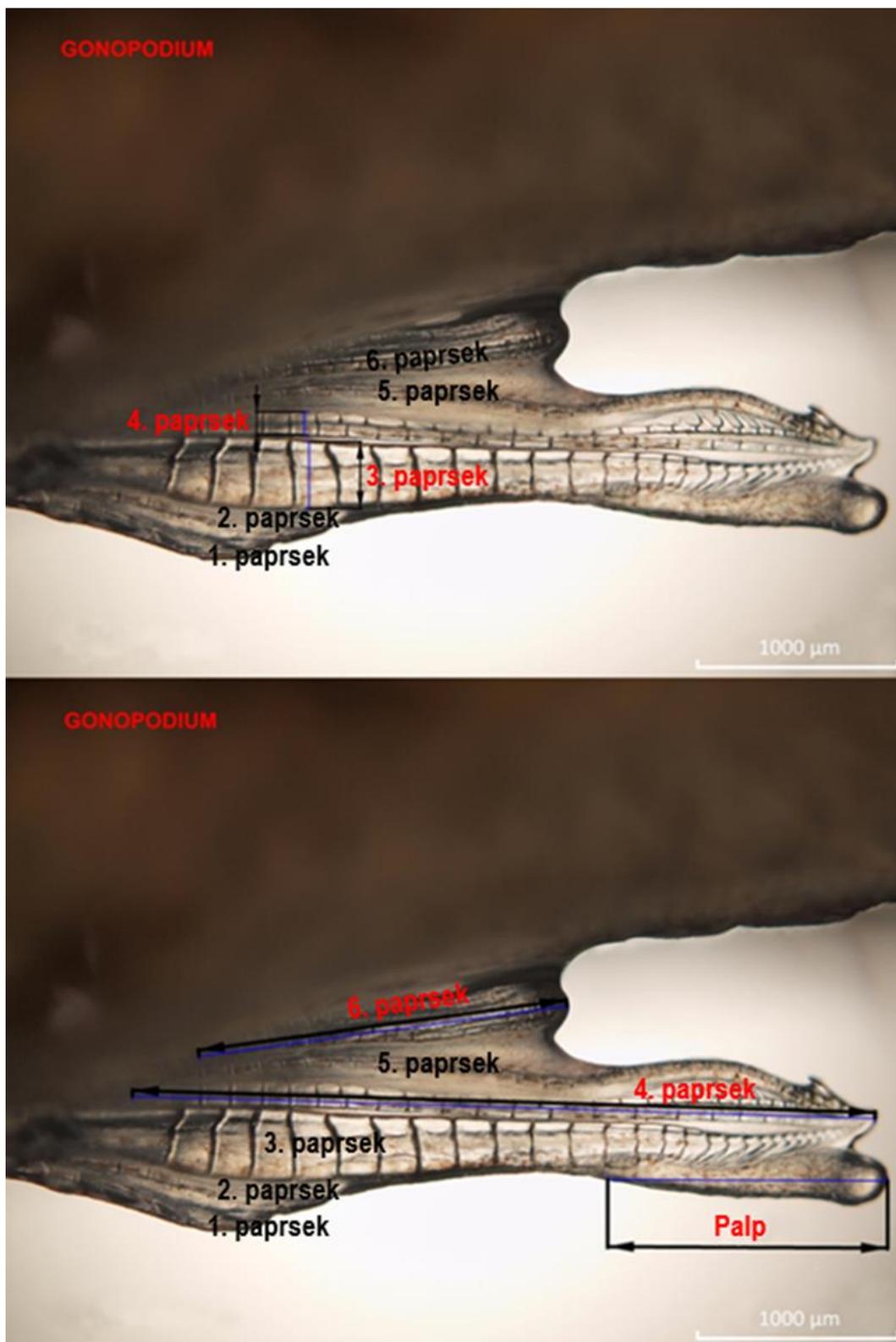


Obrázek 18 Morfometrické parametry měřené u samic živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*). TL – celková délka; BL – délka těla; HL – délka hlavy; ED – průměr oka; CFL – délka ocasní ploutve; DFL 1 – délka 1. paprsku hřbetní ploutve; DFL 2 – délka posledního paprsku hřbetní ploutve; PFL – délka prsních ploutví; PEFL – délka břišních ploutví

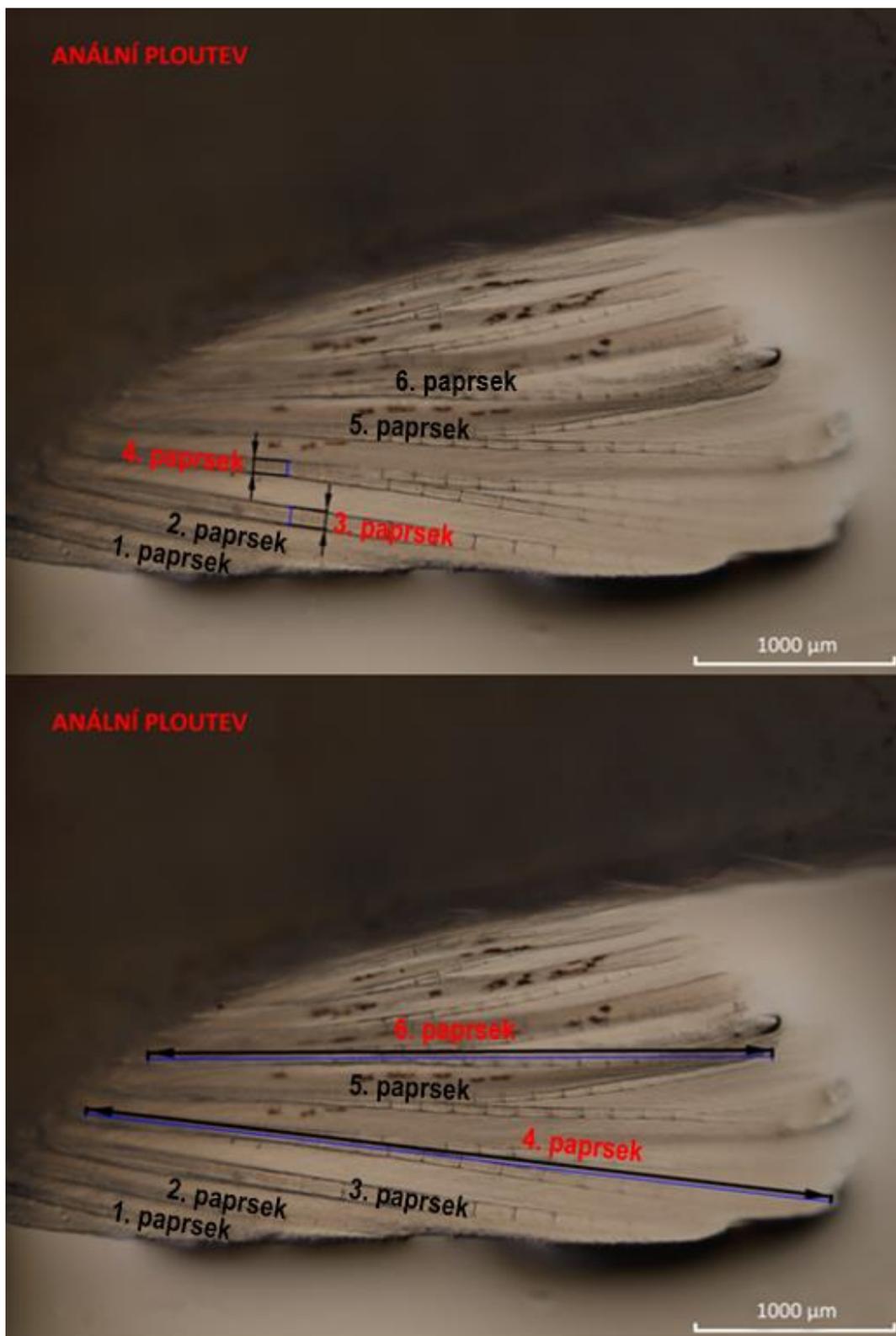
3.5.2. Měření morfometrických parametrů gonopodia a anální ploutve

Dalším krokem bylo měření morfometrických parametrů gonopodia a anální ploutve samic za použití mikroskopu Olympus BX51 s čtyřnásobným zvětšením. Nejprve byla opět každá ryba pinzetou vyjmuta z 10 % formalínu, promyta v čisté vodě a umístěna pod mikroskop. U samců bylo ještě zapotřebí odstříhnout břišní ploutve, aby nepřekrývaly gonopodium. Jelikož vhodné zaostření celého gonopodia či anální ploutve na jednom snímku zpravidla nebylo možné, bylo digitální zrcadlovkou pořízeno přibližně 3 – 5 fotek a s využitím přídatné funkce programu QuickPHOTO MICRO 2.3 nazývané Deep Focus, který z několika fotek vybere nejostřejší úseky, bylo docíleno kvalitního snímku, jenž byl posléze uložen. Takovýto snímek byl poté použit v programu QuickPHOTO MICRO 2.3 k měření jednotlivých morfometrických parametrů gonopodia a anální ploutve. Na snímku gonopodia bylo měřeno celkem 5 parametrů zahrnujících: Šířku a délku 3. paprsku, šířku a délku 4. paprsku a délku

palpu. Na snímku anální ploutve byla měřena šířka 3. paprsku, délka 3. paprsku, šířka 4. paprsku a délka 4. paprsku. Morfometrické parametry gonopodia a anální ploutve, které byly u samců a samic měřeny, jsou vyznačeny na obrázku 19 a 20. Následně byl zjišťován poměr šířky 3. paprsku k šířce 4. paprsku, poměr délky 4. paprsku k délce 6. paprsku, poměr délky 4. paprsku k délce těla a poměr délky 6. paprsku k délce těla. U samců byl ještě navíc stanoven poměr palpu k délce těla a poměr délky 4. paprsku k délce palpu.



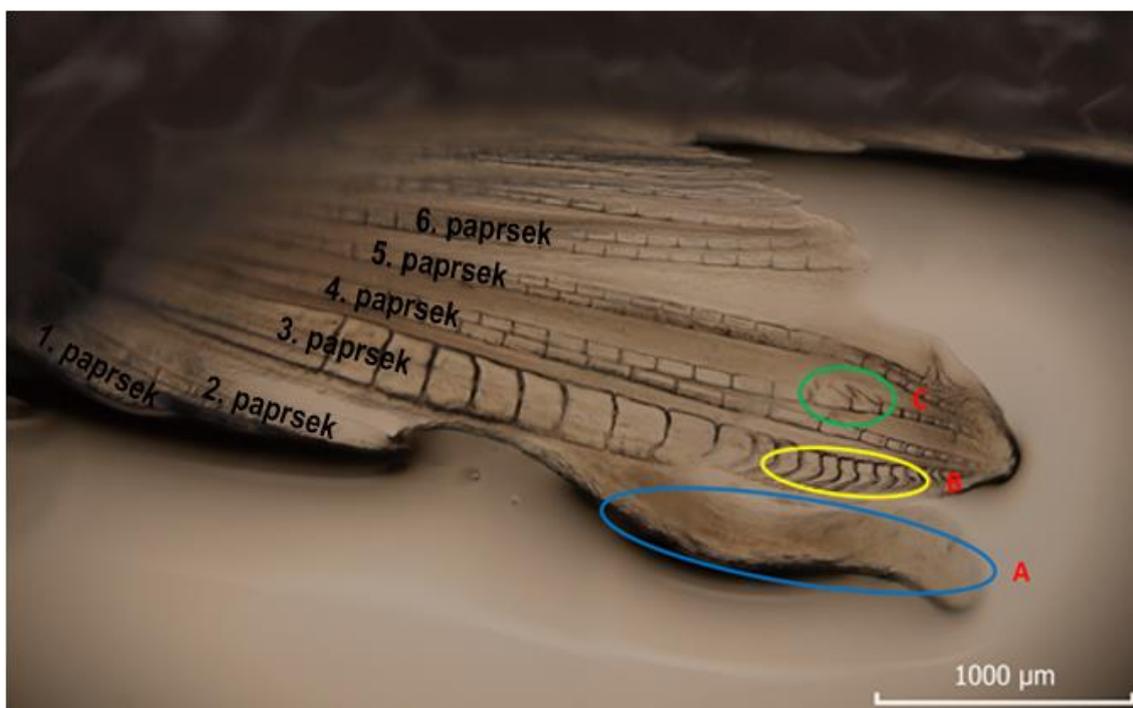
Obrázek 19 Morfometrické parametry měřené u gonopodia samců živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*)



Obrázek 20 Morfometrické parametry měřené u anální ploutve samic živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*)

3.5.3. Hodnocení míry maskulinizace anální ploutve samic

Dále byla hodnocena míra maskulinizace anální ploutve samic v jednotlivých skupinách. Hodnocen byl vzhled anální ploutve, která se u maskulinizovaných samic přetváří do formy podobné gonopodiu. Celkem byly sledovány 3 parametry zahrnující výskyt palpu (ano / ne), výskyt a počet trnů na 3. paprsku a výskyt a počet trnů na 4. paprsku. Morfometrické parametry sledované u anální ploutve, indikující maskulinizaci samic jsou znázorněny na obrázku 21.

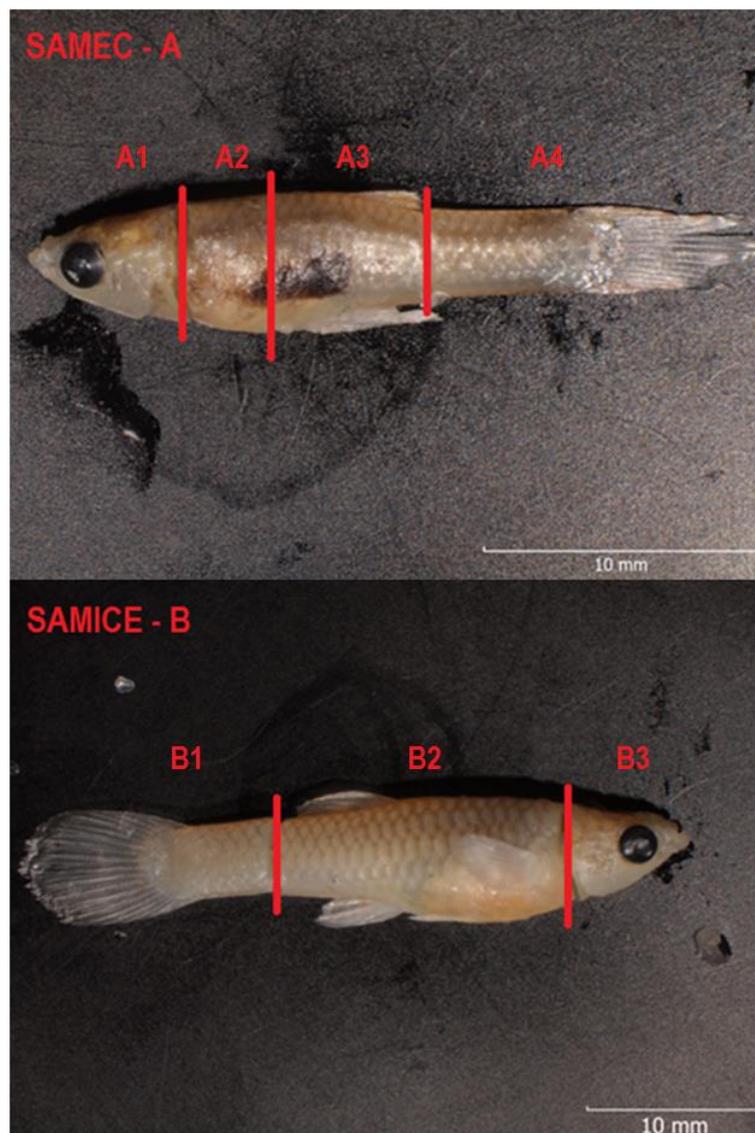


Obrázek 21 Morfometrické parametry sledované u anální ploutve indikující maskulinizaci samic živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*), tj. výskyt palpu (A), výskyt a počet trnů na 3. paprsku (B) a výskyt a počet trnů na 4. paprsku (C)

3.6. Histologické zpracování vzorků živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*)

Pro histologickou analýzu byly použity vzorky ryb odebrané v závěru testu. Histologické zpracování ryb se skládalo z několika dílčích kroků. Nejprve byly ryby přemístěny z 10 % formalínu do dekalciфикаčního roztoku, který způsobil odvápnění

kostí a posléze jejich změknutí, díky čemuž bylo možné jednotlivé vzorky ryb snadněji řezat na mikrotomu. Po dekalifikaci byly ryby pomocí skalpelu rozřezány na několik částí. Samci byli rozřezáni celkem na čtyři části, přičemž první řez byl za hlavou, druhý v oblasti počátku gonopodia a poslední byl veden v místě, kam gonopodium dosahovalo. U samic byly provedeny pouze dva řezy, přičemž prvním řezem se od těla oddělil ocasní násadec a druhým řezem byla oddělena hlava. Řezy u samců a samic živorodky Wingeovy jsou zobrazeny na obrázku 22. K dalšímu histologickému zpracování byly použity pouze části, ve kterých se nacházely gonády, tzn. u samců části A2 a A3, u samic část B2.

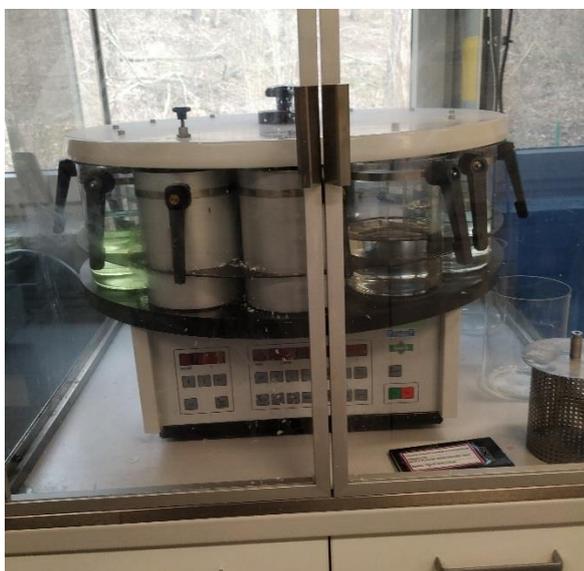


Obrázek 22 Řezy u samců (A) a samic (B) živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*)

Rozřezané části ryb byly následně uzavřeny do označených histologických kazet. Pro snadnější rozlišení byli samci umístěni do bílých kazet a samice se vkládaly do kazet růžových (obrázek 23). Histologické kazety byly poté znovu vloženy do dekalcificačního roztoku. Po ukončení procesu dekalcifikace následovala dehydratace vzorků ryb prostřednictvím ethanolu, xylenu a parafínu v tkáňovém procesoru Bamed (obrázek 24).



Obrázek 23 Části ryb umístěné v histologických kazetách, přičemž bílé histologické kazety byly určeny pro samce a růžové pro samice



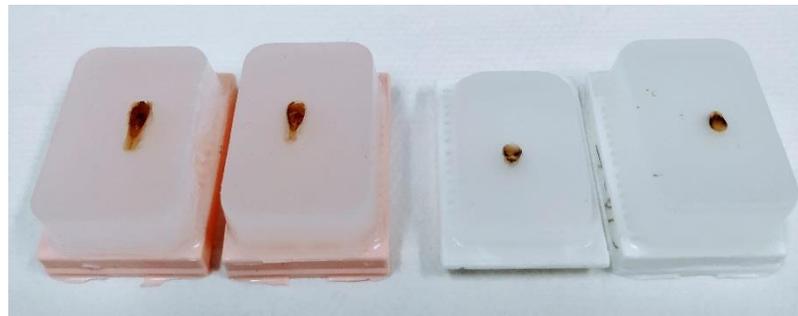
Obrázek 24 Tkáňový procesor Bamed

Dalším krokem bylo zalévání jednotlivých vzorků do parafinových bločků pomocí zalévací linky Leica EG 1150H (obrázek 25). Vzorek ryby byl nejprve vhodně umístěn

do kovové formičky, která byla následně přibližně do jedné třetiny napuštěna parafínem, na ni bylo položeno víčko histologické kazety a posléze parafínem doplněna. Části ryb zalité v parafínových bločcích jsou zobrazeny na obrázku 26. Poté byly parafínové bločky nějakou dobu ponechány v ledničce a následně řezány pomocí poloautomatického mikrotomu s nastavenou tloušťkou řezů 4,5 μm (obrázek 27). Z jednoho bločku se obvykle udělalo 5 – 7 řezů.



Obrázek 25 Zalévací linka Leica EG 1150H



Obrázek 26 Části ryb zalité v parafínových bločcích



Obrázek 27 Mikrotom Diapath Galileo

Vždy bylo zhotoveno několik histologických řezů, které byly nato pinzetou vkládány do vodní lázně Medite TFB 55 (obrázek 28), aby došlo k jejich napnutí. Teplota vodní lázně byla nastavena na 40 °C. Po určité době byly jednotlivé histologické řezy předem označeným laboratorním sklíčkem vyjmuty z vodní lázně a umístěny na topnou desku (Sakura 1452, obrázek 29), kde docházelo k fixaci histologických řezů na sklíčko. Teplota na topné desce odpovídala 40 °C.



Obrázek 28 Vodní lázeň Medite TFB 55



Obrázek 29 Topná deska Sakura 1452

Potom následovalo umístění již zafixovaných histologických řezů na laboratorní sklíčka do stojánků (obrázek 30), který byl později vložen na nějakou dobu do sušárny (Thermostat Ekom BT50), aby došlo k odstranění parafínu. Závěrečnou fází bylo barvení vzorků hematoxylinem a eosinem v barvicím automatu Tissue-Tek DRS 2000 (obrázek 31). Na obarvené vzorky bylo poté nanášeno lepidlo a položeno krycí sklíčko, které sloužilo k ochraně vzorku před vnějším poškozením.

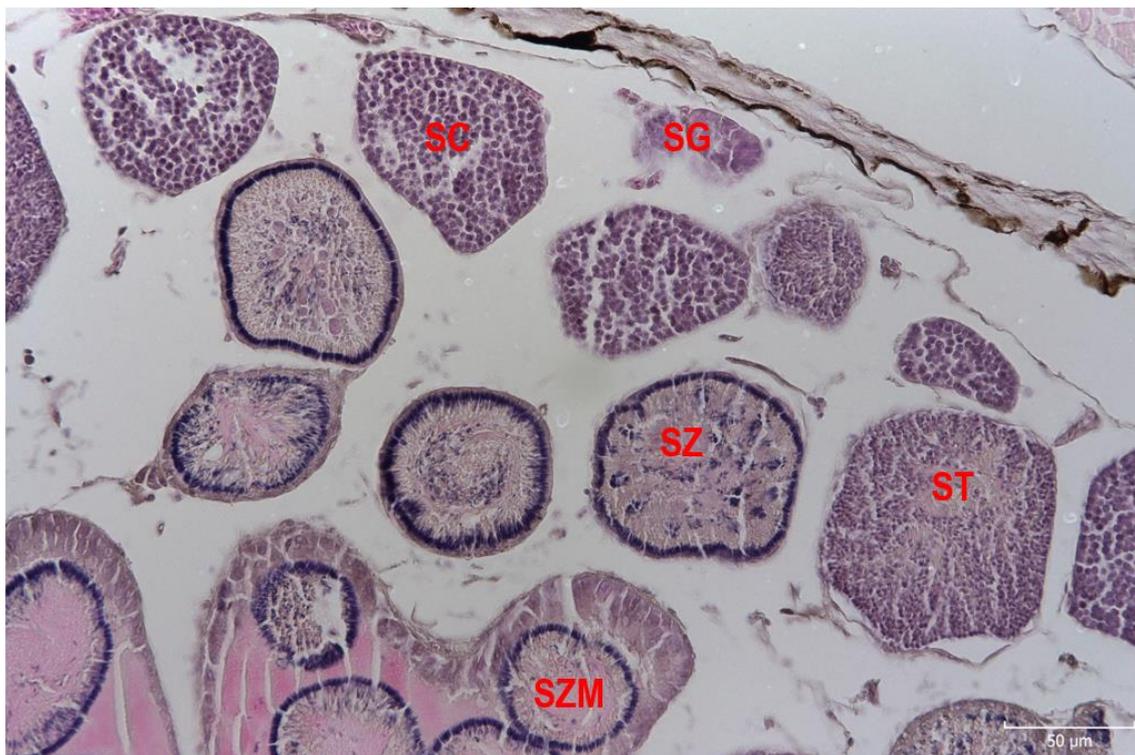


Obrázek 30 Stojánek s histologickými řezy zafixovanými na podložním skle

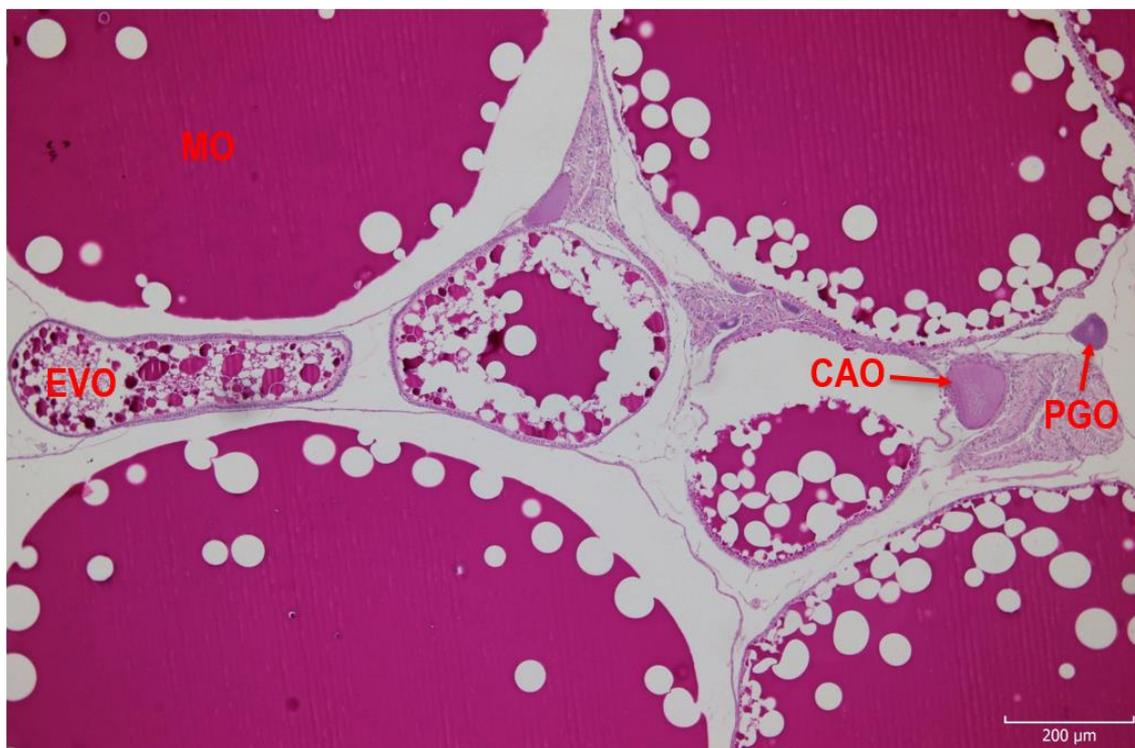


Obrázek 31 Barvicí automat Tissue-Tek DRS 2000

Histologické preparáty se následně umístily pod světelný mikroskop, kde bylo počítáno zastoupení jednotlivých vývojových stádií pohlavních buněk. V testes se zjišťoval počet spermatogonií, spermatocytů, spermatid, spermatoforů a zralých spermatoforů (obrázek 32). V ováriích byly počítány oocyty v primárním růstu, kortikální alveolární oocyty, raně vitelogenní oocyty a zralé oocyty (obrázek 33).



Obrázek 32 Testes živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*). SG – spermatogonie; SC – spermatocyty; ST – spermatidy; SZ – spermatofory; SZM – zralé spermatofory



Obrázek 33 Ovárium živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*). PGO – oocyty v primárním růstu; CAO – kortikální alveolární oocyty; EVO – raně vitelogenní oocyty; MO – zralé oocyty

3.7. Použité statistické metody

Výsledky byly zpracovány v programu Statistica 13. Pro vyhodnocení pohlavního dimorfismu živorodky *Wingeovy* byl použit jednovýběrový t – test na zvolené hladině významnosti $p < 0,05$. Rozdíly v jednotlivých morfometrických parametrech mezi pokusnými skupinami byly zjištěny pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) a Tukey-HSD testu pro nestejně N na zvolené hladině významnosti $p < 0,05$. Všechny rozdíly testovaných skupin byly vztahovány ke kontrolní skupině s rozpouštědlem (KS). Pro zhodnocení procentuálního zastoupení jednotlivých vývojových stádií pohlavních buněk v testes a ováriu mezi pokusnými skupinami byl použit Pearsonův chí kvadrát test (χ^2 – test) na zvolené hladině významnosti $p < 0,05$.

4. Výsledky

4.1. Pohlavní dimorfismus živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*)

Pohlavní dimorfismus živorodky Wingeovy byl sledován, abychom přesně zjistili, do jaké míry se samci a samice vzájemně od sebe liší. Pohlavní dimorfismus byl vyhodnocen u ryb z kontrolní skupiny chované v čisté vodě (K). Parametry, které byly u samců a samic měřeny, jsou uvedeny v tabulce 4. Signifikantní rozdíly byly zjištěny u všech sledovaných parametrů s výjimkou délky ocasní ploutve (CFL) a délky 4. paprsku řitní ploutve.

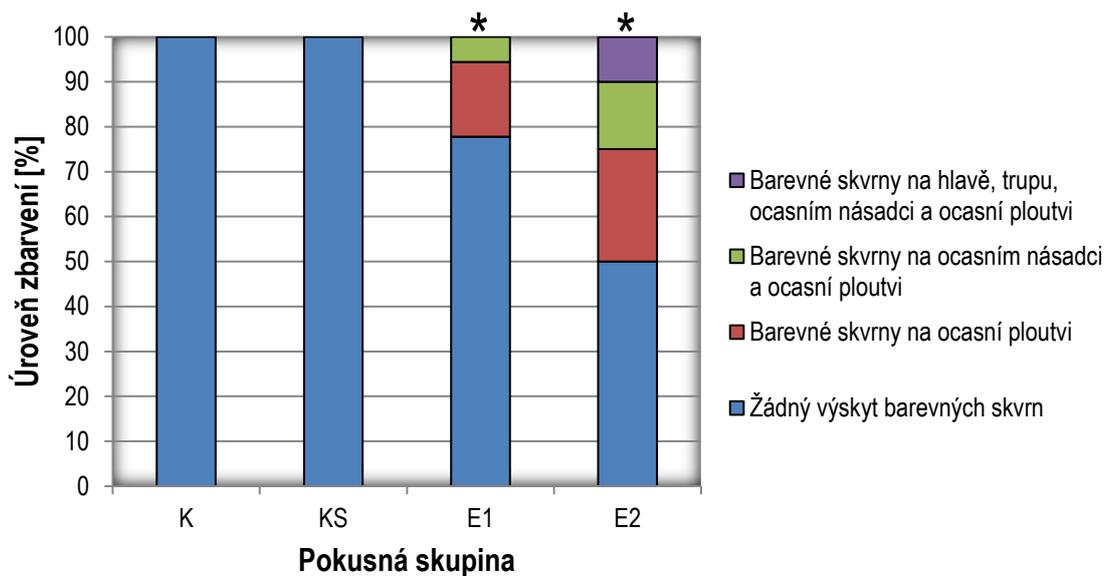
Tabulka 4 Morfometrické parametry živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*) vyhodnocené u skupiny s čistou vodou (K). * značí signifikantní rozdíl mezi samci a samicemi. Hladina významnosti: $p < 0,05$ (t – test). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD).

Parametr	Samice	Samec
Zbarvení / vzorování [%]	0	100*
TL [mm]	30,4 \pm 2,80	25,5 \pm 2,0*
BL [mm]	24,9 \pm 2,50	20,3 \pm 1,5*
Tělo		
Váha [g]	0,31 \pm 0,08	0,17 \pm 0,04*
FCF [100 g / mm ³]	1,08 \pm 0,09	1,01 \pm 0,06*
ED [mm]	1,80 \pm 0,10	1,63 \pm 0,09*
ED / BL	0,07 \pm 0,005	0,08 \pm 0,008*
HL [mm]	5,55 \pm 0,39	4,62 \pm 0,30*
HL / BL	0,22 \pm 0,01	0,23 \pm 0,02*
Hřbetní ploutev		
DFL 1 [mm]	2,44 \pm 0,29	1,81 \pm 0,32*
DFL 1 / BL	0,10 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02*
DFL 2 [mm]	2,97 \pm 0,22	3,98 \pm 0,92*
DFL 2 / BL	0,12 \pm 0,01	0,20 \pm 0,04*
DFL 1 / DFL 2	0,82 \pm 0,09	0,48 \pm 0,13*
Prsní ploutve		
PFL [mm]	3,95 \pm 0,42	3,53 \pm 0,43*
PFL / BL	0,16 \pm 0,02	0,18 \pm 0,03*
Břišní ploutve		
PEFL [mm]	2,82 \pm 0,35	3,27 \pm 0,35*
PEFL / BL	0,11 \pm 0,009	0,16 \pm 0,02*
Ocasní ploutev		
CFL [mm]	5,45 \pm 0,45	5,27 \pm 0,50
CFL / BL	0,22 \pm 0,02	0,26 \pm 0,03*
Gonopodium / Řitní ploutev		
Šířka 3. paprsku [mm]	0,08 \pm 0,02	0,31 \pm 0,04*
Šířka 4. paprsku [mm]	0,08 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01*
Poměr šířky 3. paprsku / šířka 4. paprsku	1,10 \pm 0,11	3,01 \pm 0,26*
Délka 4. paprsku [mm]	3,77 \pm 0,33	3,65 \pm 0,23
Délka 6. paprsku [mm]	3,01 \pm 0,27	1,81 \pm 0,21*
Poměr délky 4. paprsku / délka 6. paprsku	1,25 \pm 0,05	2,03 \pm 0,22*
Poměr délky 4. paprsku / BL	0,15 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01*
Poměr délky 6. paprsku / BL	0,12 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01*
Délka palpu [mm]	-	1,60 \pm 0,14*
Poměr délky palpu / BL	-	0,08 \pm 0,006*
Poměr délky 4. paprsku / délka palpu	-	2,29 \pm 0,186*

TL – celková délka; BL – délka těla; FCF – Fultonův kondiční faktor; ED – průměr oka; HL – délka hlavy; DFL 1 – délka 1. paprsku hřbetní ploutve; DFL 2 – délka posledního paprsku hřbetní ploutve; PFL – délka prsních ploutví; PEFL – délka břišních ploutví; CFL – délka ocasní ploutve

4.2. Vliv etonogestrelu na zbarvení samic živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*)

Vliv syntetického progestinu etonogestrelu na změnu zbarvení samic živorodky Wingeovy je zobrazen v grafu 1. Rozsah zbarvení se u exponovaných samic v závislosti na koncentraci postupně rozšiřoval od ocasní ploutve, přes ocasní násadec až k trupu a oblasti hlavy.



Graf 1 Vliv etonogestrelu na zbarvení samic živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*) po 34denní expozici. K – kontrolní skupina s čistou vodou; KS – kontrolní skupina s rozpouštědlem; E1 – skupina s nižší koncentrací etonogestrelu ($3,2 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$); E2 – skupina s vyšší koncentrací etonogestrelu ($320 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$). * značí signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou KS.

Hladina významnosti: $p < 0,05$ (t – test).

4.3. Vliv etonogestrelu na morfometrii živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*)

Morfometrické parametry měřené u samic živorodky Wingeovy po 34denní expozici etonogestrelu jsou uvedeny v tabulce 5. Všechny signifikantní rozdíly jsou vztaženy ke kontrolní skupině s rozpouštědlem (KS). U kontrolní skupiny K byl zjištěn signifikantně kratší 1. paprsek hřbetní ploutve (DFL 1), delší břišní ploutve (PEFL) a větší poměr délky břišních ploutví k délce těla (PEFL / BL).

Samci exponovaní etonogestrelu v koncentraci $3,2 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$, vykazovaly významně kratší 1. paprsek hřbetní ploutve (DFL 1), menší poměr délky 1. paprsku hřbetní ploutve k délce těla (DFL 1 / BL), menší poměr délky břišní ploutve k délce těla (PEFL / BL) a u gonopodia menší poměr délky 4. paprsku k délce 6. paprsku v porovnání s kontrolou (KS).

U skupiny vystavené vyšší koncentraci etonogestrelu ($320 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$) byla signifikantní změna zjištěna celkem u šesti parametrů. Jednalo se o nižší poměr délky posledního

paprsku hřbetní ploutve k délce těla (DFL 2 / BL), větší délku břišních ploutví (PEFL), větší poměr délky břišních ploutví k délce těla (PEFL / BL) a dále byl u gonopodia zjištěn delší 6. paprsek, menší poměr délky 4. paprsku k délce 6. paprsku a větší poměr délky 6. paprsku k délce těla.

Tabulka 5 Morfometrické parametry samců živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*) měřené u jednotlivých testovaných skupin. K – kontrolní skupina s čistou vodou; KS – kontrolní skupina s rozpouštědlem; E1 – skupina s nižší koncentrací etonogestrelu (3,2 ng·l⁻¹); E2 – skupina s vyšší koncentrací etonogestrelu (320 ng·l⁻¹). * značí signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou KS. Hladina významnosti: p < 0,05 (ANOVA). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka (SD).

Parametr	K	KS	E1	E2
Zbarvení / vzorování [%]	100	100	100	100
TL [mm]	25,5 ± 2,0	25,8 ± 1,70	25,7 ± 2,17	25,6 ± 2,30
BL [mm]	20,3 ± 1,5	20,5 ± 1,39	20,5 ± 1,71	20,3 ± 1,83
Váha [g]	0,17 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,17 ± 0,04
FCF [100 g / mm ³]	1,01 ± 0,06	0,99 ± 0,08	1,02 ± 0,06	1,00 ± 0,09
ED [mm]	1,63 ± 0,09	1,63 ± 0,06	1,63 ± 0,08	1,63 ± 0,09
ED / BL	0,08 ± 0,008	0,08 ± 0,004	0,08 ± 0,008	0,08 ± 0,009
HL [mm]	4,62 ± 0,30	4,66 ± 0,34	4,57 ± 0,28	4,60 ± 0,34
HL / BL	0,23 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,23 ± 0,03
Tělo				
DFL 1 [mm]	1,81 ± 0,32*	1,99 ± 0,26	1,73 ± 0,31*	1,95 ± 0,40
DFL 1 / BL	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,02*	0,10 ± 0,02
DFL 2 [mm]	3,98 ± 0,92	4,17 ± 1,01	4,31 ± 1,31	4,69 ± 1,15
DFL 2 / BL	0,20 ± 0,04	0,20 ± 0,04	0,21 ± 0,05	0,23 ± 0,05*
DFL 1 / DFL 2	0,48 ± 0,13	0,50 ± 0,13	0,44 ± 0,16	0,44 ± 0,14
Hřbetní ploutev				
PFL [mm]	3,53 ± 0,43	3,52 ± 0,40	3,46 ± 0,46	3,50 ± 0,47
PFL / BL	0,18 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,03
Břišní ploutve				
PEFL [mm]	3,27 ± 0,35*	3,06 ± 0,36	2,97 ± 0,33	3,38 ± 0,44*
PEFL / BL	0,16 ± 0,02*	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,02*	0,17 ± 0,02*
Ocasní ploutev				
CFL [mm]	5,27 ± 0,50	5,27 ± 0,53	5,25 ± 0,71	5,32 ± 0,55
CFL / BL	0,26 ± 0,03	0,26 ± 0,02	0,26 ± 0,04	0,27 ± 0,03
Gonopodium				
Šířka 3. paprsku [mm]	0,31 ± 0,04	0,30 ± 0,04	0,29 ± 0,03	0,29 ± 0,02
Šířka 4. paprsku [mm]	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,007	0,10 ± 0,01
Poměr šířky 3. paprsku / šířka 4. paprsku	3,01 ± 0,26	2,98 ± 0,34	3,01 ± 0,23	2,98 ± 0,23
Délka 4. paprsku [mm]	3,65 ± 0,23	3,65 ± 0,21	3,65 ± 0,21	3,71 ± 0,20
Délka 6. paprsku [mm]	1,81 ± 0,21	1,86 ± 0,19	1,95 ± 0,14	2,00 ± 0,18*
Poměr délky 4. paprsku / délka 6. paprsku	2,03 ± 0,22	1,98 ± 0,16	1,88 ± 0,11*	1,86 ± 0,14*
Poměr délky 4. paprsku / BL	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01
Poměr délky 6. paprsku / BL	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,25	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01*
Délka palpu [mm]	1,60 ± 0,14	1,55 ± 0,25	1,55 ± 0,33	1,68 ± 0,30
Poměr délky palpu / BL	0,08 ± 0,006	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Poměr délky 4. paprsku / délka palpu	2,29 ± 0,186	2,45 ± 0,74	2,76 ± 2,26	2,35 ± 0,87

TL – celková délka; BL – délka těla; FCF – Fultonův kondiční faktor; ED – průměr oka; HL – délka hlavy; DFL 1 – délka 1. paprsku hřbetní ploutve; DFL 2 – délka posledního paprsku hřbetní ploutve; PFL – délka prsních ploutví; PEFL – délka břišních ploutví; CFL – délka ocasní ploutve

Morfometrické parametry samic živorodky Wingeovy jsou uvedeny v tabulce 6. U kontrolní skupiny K nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v žádném námi měřeném parametru v porovnání s kontrolou s rozpouštědlem (KS).

U samic exponovaných nižší koncentraci etonogestrelu ($3,2 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$) byla zjištěna změna pouze ve dvou parametrech, U těchto ryb byl zaznamenán menší poměr délky břišních ploutví k délce těla (PEFL / BL) a změna ve zbarvení těla (celkem u 22,2 % samic).

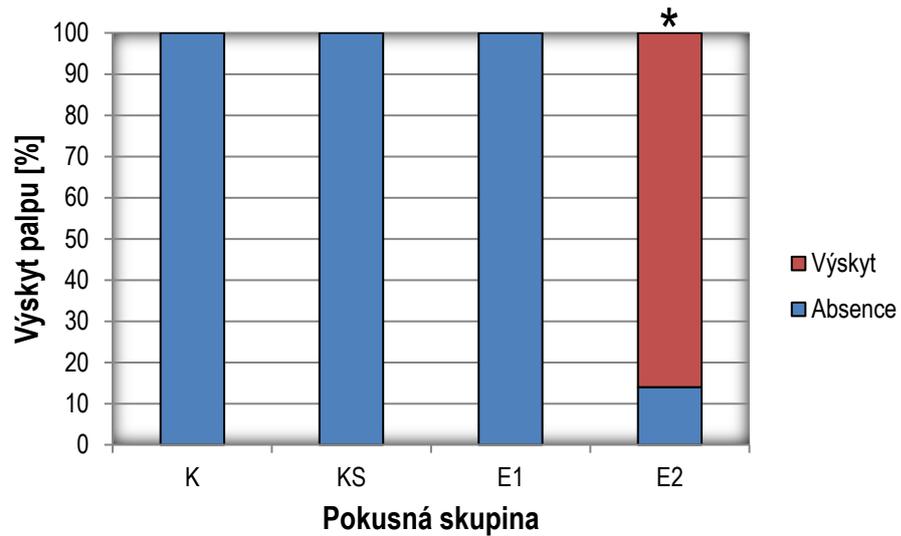
U samic vystavených vyšší koncentraci etonogestrelu ($320 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$) byly v porovnání s kontrolní skupinou s rozpouštědlem (KS) zjištěny signifikantní změny celkem u 13 parametrů. V této skupině byl zjištěn menší poměr délky 1. paprsku hřbetní ploutve k délce 2. paprsku hřbetní ploutve (DFL 1 / DFL 2), větší poměr délky 1. hřbetního paprsku k délce těla (DFL 1 / BL), delší poslední paprsek hřbetní ploutve (DFL 2), větší poměr délky posledního paprsku hřbetní ploutve k délce těla (DFL 2 / BL), větší délka břišních ploutví (PEFL), větší poměr délky břišních ploutví k délce těla (PEFL / BL), větší poměr délky ocasní ploutve k délce těla (CFL / BL) a u řitní ploutve širší 3. paprsek, širší 4. paprsek, větší poměr šířky 3. paprsku k šířce 4. paprsku, větší poměr délky 4. paprsku k délce 6. paprsku, větší poměr délky 4. paprsku k délce těla a výrazný rozdíl ve zbarvení samic, kde celkový počet samic, u kterých byl prokázán výskyt barevných skvrn na těle odpovídal 50 %.

Tabulka 6 Morfometrické parametry samic živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*) měřené u jednotlivých testovaných skupin. K – kontrolní skupina s čistou vodou; KS – kontrolní skupina s rozpouštědlem; E1 – skupina s nižší koncentrací etonogestrelu (3,2 ng·l⁻¹); E2 – skupina s vyšší koncentrací etonogestrelu (320 ng·l⁻¹). * značí signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou KS. Hladina významnosti: p < 0,05 (ANOVA). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka (SD).

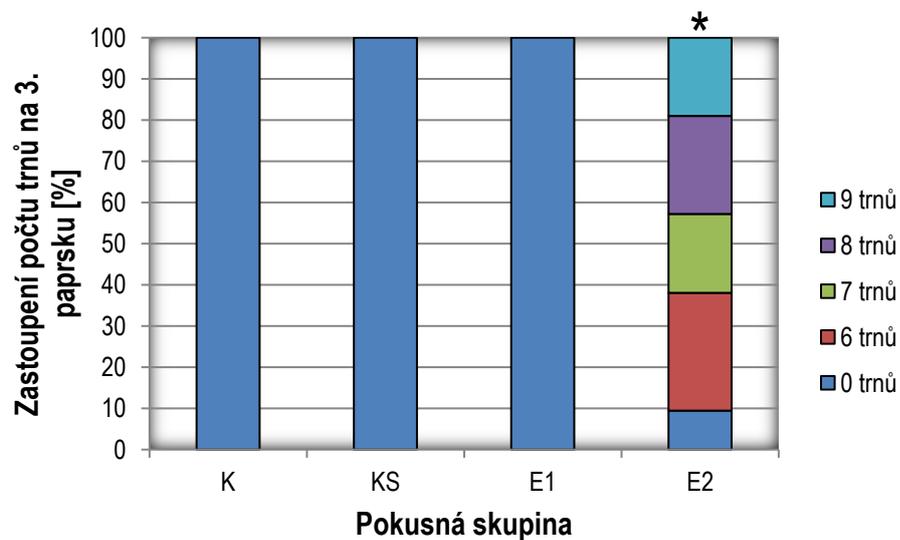
Parametr	K	KS	E1	E2
Zbarvení / vzorování [%]	0	0	22*	50*
TL [mm]	30,4 ± 2,80	29,9 ± 3,00	29,6 ± 2,57	28,9 ± 3,11
BL [mm]	24,9 ± 2,50	24,4 ± 2,59	24,4 ± 2,28	23,4 ± 2,90
Váha [g]	0,31 ± 0,08	0,30 ± 0,11	0,28 ± 0,08	0,26 ± 0,09
FCF [100 g / mm ³]	1,08 ± 0,09	1,10 ± 0,11	1,07 ± 0,08	1,06 ± 0,10
ED [mm]	1,80 ± 0,10	1,81 ± 0,14	1,75 ± 0,12	1,76 ± 0,12
ED / BL	0,07 ± 0,005	0,07 ± 0,004	0,07 ± 0,004	0,08 ± 0,006
HL [mm]	5,55 ± 0,39	5,48 ± 0,52	5,35 ± 0,42	5,29 ± 0,46
HL / BL	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,01
Hřbetní ploutev				
DFL 1 [mm]	2,44 ± 0,29	2,42 ± 0,33	2,40 ± 0,22	2,50 ± 0,42
DFL 1 / BL	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,008	0,11 ± 0,01*
DFL 2 [mm]	2,97 ± 0,22	2,83 ± 0,40	2,84 ± 0,28	3,48 ± 0,43*
DFL 2 / BL	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,15 ± 0,02*
DFL 1 / DFL 2	0,82 ± 0,09	0,85 ± 0,10	0,85 ± 0,09	0,72 ± 0,10*
Prsní ploutve				
PFL [mm]	3,95 ± 0,42	3,70 ± 0,61	3,80 ± 0,42	3,53 ± 0,51
PFL / BL	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,02
Břišní ploutve				
PEFL [mm]	2,82 ± 0,35	2,88 ± 0,33	2,72 ± 0,41	3,16 ± 0,34*
PEFL / BL	0,11 ± 0,009	0,12 ± 0,008	0,11 ± 0,01*	0,14 ± 0,01*
Ocasní ploutev				
CFL [mm]	5,45 ± 0,45	5,45 ± 0,62	5,23 ± 0,40	5,49 ± 0,54
CFL / BL	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,24 ± 0,03*
Řitní ploutev				
Šířka 3. paprsku [mm]	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,23 ± 0,04*
Šířka 4. paprsku [mm]	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01*
Poměr šířky 3. paprsku / šířka 4. paprsku	1,10 ± 0,11	1,17 ± 0,13	1,14 ± 0,09	2,37 ± 0,48*
Délka 4. paprsku [mm]	3,77 ± 0,33	3,67 ± 0,39	3,62 ± 0,37	3,66 ± 0,31
Délka 6. paprsku [mm]	3,01 ± 0,27	2,90 ± 0,36	2,95 ± 0,32	2,72 ± 0,34
Poměr délky 4. paprsku / délka 6. paprsku	1,25 ± 0,05	1,27 ± 0,05	1,23 ± 0,05	1,35 ± 0,09*
Poměr délky 4. paprsku / BL	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,008	0,15 ± 0,009	0,16 ± 0,01*
Poměr délky 6. paprsku / BL	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,007	0,12 ± 0,01

TL – celková délka; BL – délka těla; FCF – Fultonův kondiční faktor; ED – průměr oka; HL – délka hlavy; DFL 1 – délka 1. paprsku hřbetní ploutve; DFL 2 – délka posledního paprsku hřbetní ploutve; PFL – délka prsních ploutví; PEFL – délka břišních ploutví; CFL – délka ocasní ploutve

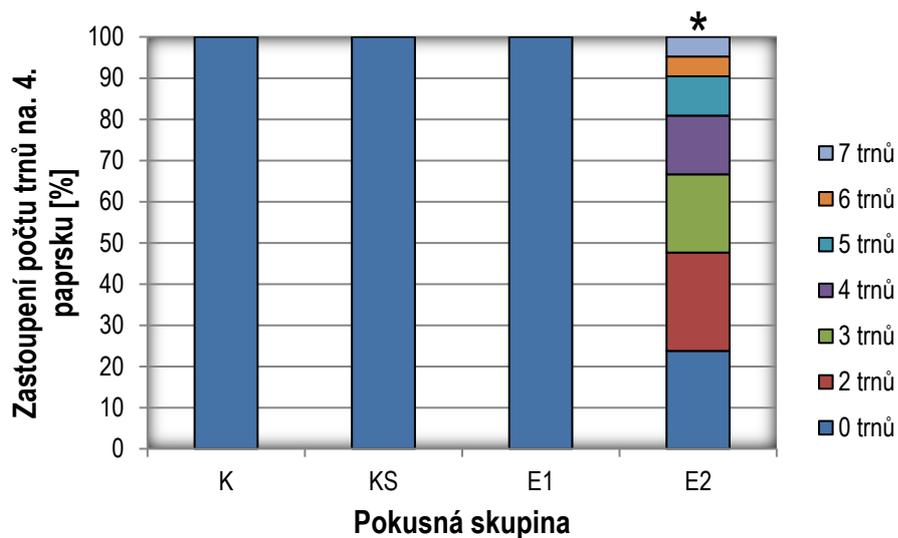
Maskulinizace samic byla hodnocena na základě výskytu palpu a výskytu a počtu trnů na 3. a 4. paprsku řitní ploutve. Zatímco u ryb vystavených nižší koncentraci etonogestrelu nebyly pozorovány žádné známky maskulinizace, ve vyšší koncentraci byly naopak patrné poměrně velké změny, a to jak ve výskytu palpu, tak i ve výskytu trnů na 3. a 4. paprsku. Výsledky jsou shrnuty v grafech 2, 3 a 4.



Graf 2 Vliv etonogestrelu na výskyt palpu na řitní ploutvi u samic živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*). K – kontrolní skupina s čistou vodou; KS – kontrolní skupina s rozpouštědlem; E1 – skupina s nižší koncentrací etonogestrelu ($3,2 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$); E2 – skupina s vyšší koncentrací etonogestrelu ($320 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$). * značí signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou s rozpouštědlem (KS). Hladina významnosti: $p < 0,05$ (ANOVA).



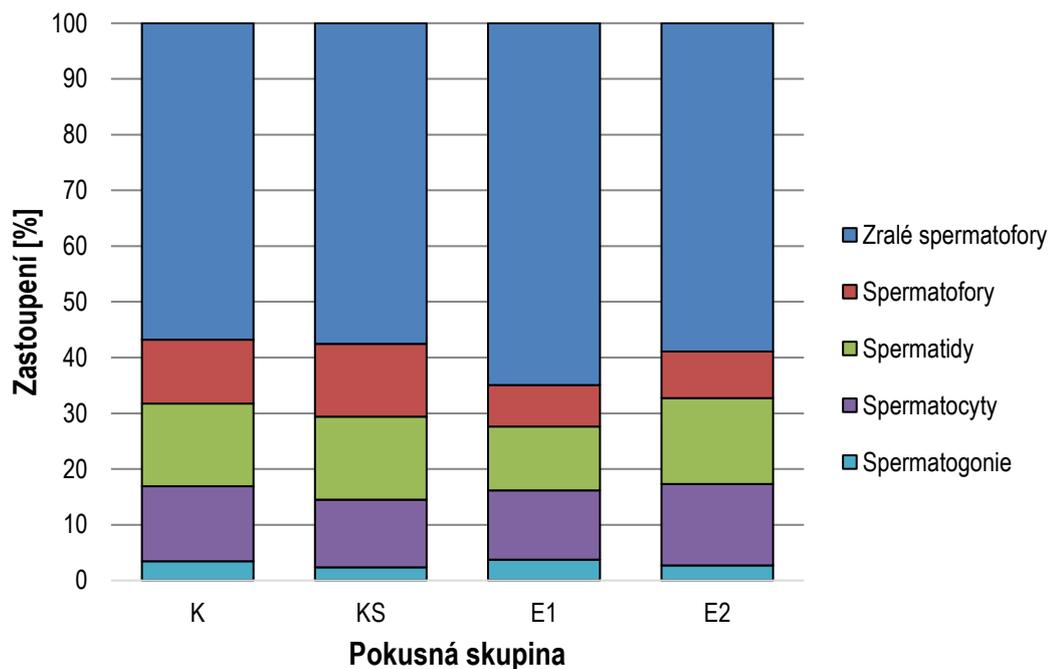
Graf 3 Vliv etonogestrelu na výskyt a počet trnů na 3. paprsku řitní ploutve u samic živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*). K – kontrolní skupina s čistou vodou; KS – kontrolní skupina s rozpouštědlem; E1 – skupina s nižší koncentrací etonogestrelu ($3,2 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$); E2 – skupina s vyšší koncentrací etonogestrelu ($320 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$). * značí signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou s rozpouštědlem (KS). Hladina významnosti: $p < 0,05$ (ANOVA).



Graf 4 Vliv etonogestrelu na výskyt a počet trnů na 4. paprsku řitní ploutve u samic živorodky *Wingeovy (Poecilia wingei)*. K – kontrolní skupina s čistou vodou; KS – kontrolní skupina s rozpouštědlem; E1 – skupina s nižší koncentrací etonogestrelu ($3,2 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$); E2 – skupina s vyšší koncentrací etonogestrelu ($320 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$). * značí signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolní skupiny s rozpouštědlem (KS). Hladina významnosti: $p < 0,05$ (ANOVA).

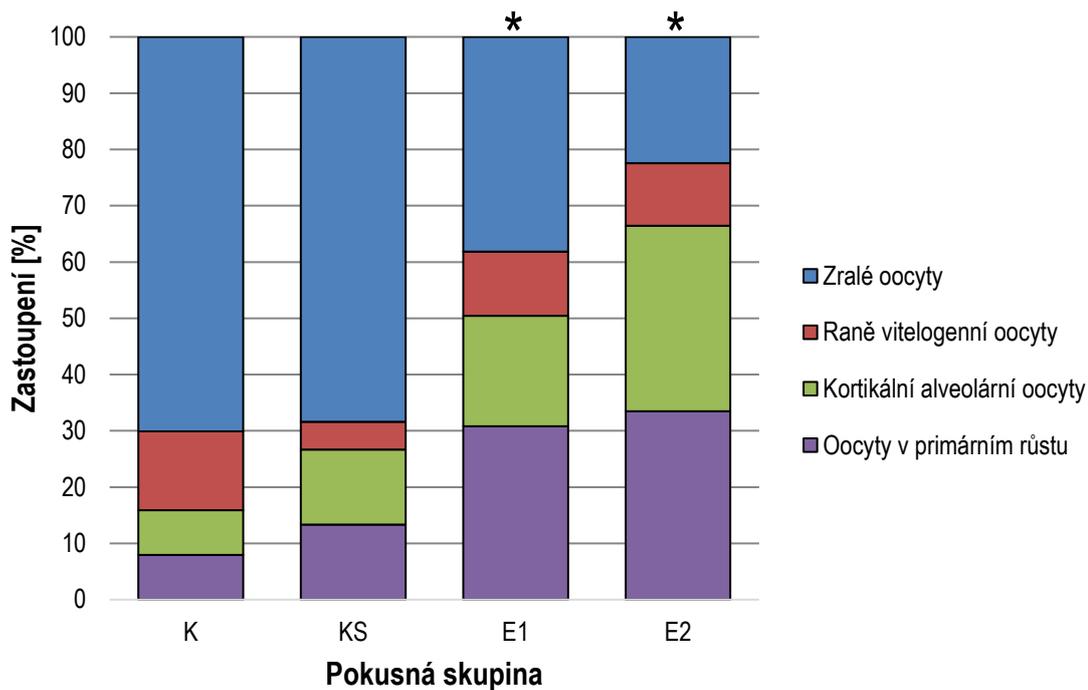
4.4. Histologie gonád živorodky *Wingeovy (Poecilia wingei)*

Běžný vývoj testes samců nebyl působením etonogestrelu nijak zásadně ovlivněn. U všech samců byl prokázán výskyt převážně zralých spermatoforů. Mezi experimentálními skupinami nebyly ve frekvenci výskytu jednotlivých vývojových stadií pohlavních buněk zjištěny žádné statisticky významné rozdíly (graf 5).



Graf 5 Procentuální zastoupení jednotlivých vývojových stádií pohlavních buněk v testes samic živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*). K – kontrolní skupina s čistou vodou; KS – kontrolní skupina s rozpouštědlem; E1 – skupina s nižší koncentrací etonogestrelu ($3,2 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$); E2 – skupina s vyšší koncentrací etonogestrelu ($320 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$). $n = 8$. * značí signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou. Hladina významnosti: $p < 0,05$ (χ^2 – test).

U testovaných samic měl etonogestrel signifikantní vliv na zrání oocytů. V kontrolních skupinách převažovaly zralé oocyty, zatímco u ryb vystavených nižší ($3,2 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$) i vyšší ($320 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$) koncentraci etonogestrelu se relativní výskyt zralých oocytů s rostoucí koncentrací významně snižoval (graf 6).



Graf 6 Procentuální zastoupení jednotlivých vývojových stádií oocytů v ovariích samic živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*). K – kontrolní skupina s čistou vodou; KS – kontrolní skupina s rozpouštědlem; E1 – skupina s nižší koncentrací etonogestrelu ($3,2 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$); E2 – skupina s vyšší koncentrací etonogestrelu ($320 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$). $n = 8$. * značí signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou. Hladina významnosti: $p < 0,05$ (χ^2 – test).

Žádná ryba, která byla podrobena histologické analýze, nevykazovala histopatologické změny gonád a nebyl pozorován výskyt intersexu.

5. Diskuze

Vzhledem k relativně vysoké spotřebě a široké škále využití bývají syntetické progestiny detekovány na výtoku z ČOV i v desítkách nanogramů na litr. Nicméně koncentrace v povrchových vodách jsou v důsledku zředění výrazně nižší (Kumar a kol., 2015). Přesto se prokázalo, že i jednotky $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ mohou negativně ovlivnit běžný vývoj ryb (Fent, 2015). Cílem této diplomové práce bylo zhodnocení účinků syntetického progestinu etonogestrelu na sekundární pohlavní znaky a histologii gonád živorodky Wingeovy. Živorodky Wingeovy se vyznačují poměrně výrazným pohlavním dimorfismem. Samci se od samic odlišují především pestrým zbarvením těla (Schories a kol., 2009), menší velikostí (Poeser a kol., 2005) a modifikovanou anální ploutví – gonopodiem (Coad, 2017).

V našem experimentu byl u samic exponovaných etonogestrelu s rostoucí koncentrací pozorován zvyšující se výskyt barevných skvrn, který je typický pro samce a u samic je projevem maskulinizace. Navíc u samic exponovaných vyšší koncentraci etonogestrelu ($320 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$) byla pozorována změna tvaru anální ploutve do tvaru připomínající gonopodium, což je opět znak maskulinizace. Změna zbarvení, respektive ztmavnutí kůže a ploutví, které je charakteristické pro samce jelečka velkohlavého, bylo také zjištěno u samic tohoto druhu po 21denní expozici levonorgestrelu $\geq 29,6 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ (Zeilinger a kol., 2009). V přírodě by jakákoliv změna barvy samic mohla vést k nižšímu zájmu samců o takovéto samice, ale rovněž i k vyšší predaci, což by ve výsledku mohlo ovlivnit celkovou plodnost dané populace ryb (Johnson a Candolin, 2017). Účinky levonorgestrelu se také zabývala studie Frankel a kol. (2016a), v níž se u gambusí Holbrookovy exponovaných $\geq 10 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ zjistila maskulinizace, která se projevila významným zvýšením poměru 4. paprsku k 6. paprsku anální ploutve. Podobné maskulinizační změny vykazovaly i samice gambusie komáří vystavené $\geq 35,8 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ norgestrelu po 42 dnech. U samic došlo ke změně morfometrie anální ploutve, konkrétně k prodloužení 4. paprsku, větší šířce a zvýšení počtu segmentů 3. paprsku (Hou a kol., 2018b). Maskulinizace byla rovněž pozorována u samic jelečka velkohlavého po 21denní expozici gestodenu ($\geq 1 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$) a desogestrelu ($\geq 1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), což je prekurzor etonogestrelu (Runnals a kol., 2013). Dále také byl prokázán vliv na diferenciaci pohlaví po expozici juvenilních dánií pruhovaných levonorgestrelu $\geq 5,5$

ng·l⁻¹ (Hua a kol., 2015) a norethisteronu $\geq 32,3$ ng·l⁻¹ (Hou a kol., 2018c), což se projevilo prokazatelně vyšším zastoupením samců v porovnání s kontrolami (Svensson a kol., 2016; Hou a kol., 2018c).

Všechny námi pozorované změny sekundárních pohlavních znaků u samic exponovaných etonogestrelu jsou známkami maskulinizace a ukazují na silný androgenní účinek etonogestrelu. To se do jisté míry dalo předpokládat, neboť se jedná o derivát testosteronu (Golovko a kol., 2018). *In vitro* testy prokázaly, že se progestiny většinou neváží na progesteronový receptor ryb, ale některé z nich, zejména ty odvozené od testosteronu jako je etonogestrel, mají vysokou afinitu k androgenním receptorům (Ellestad a kol., 2014; Bain a kol., 2015). Mezi syntetické progestiny odvozené od testosteronu, u nichž se rovněž potvrdil androgenní účinek, patří například levonorgestrel, gestoden či desogestrel (Kumar a kol., 2015).

Maskulinizace byla pozorována i v povrchových vodách, a to již v 80. letech minulého století u samic divokých gambusí komářích na Floridě v řece Rice Creek poblíž města Palatka, kam ústily odpadní vody z místního papírenského průmyslu (Noggle a kol., 2010). K maskulinizačním efektům volně žijících druhů ryb by tedy mohlo dojít nejen ve vodách kontaminovaných progestiny s androgenními účinky jako je etonogestrel, ale také v místech, kam vytékají průmyslové odpadní vody (Zeilinger a kol., 2009).

U exponovaných samic etonogestrel také v obou koncentracích signifikantně snížil zastoupení zralých oocytů oproti kontrolním skupinám, přičemž jejich podíl klesal se zvyšující se koncentrací. To mohlo být způsobeno nižší hladinou 17 β -estradiolu, který řídí vývoj ovárií (Nagahama a kol., 1994). Tomu napovídá i studie provedená Blüthgen a kol. (2013), kteří zjistili, že dospělé samice dánia pruhovaného vystavené levonorgestrelu v koncentraci 3124 ng·l⁻¹ měly prokazatelně nižší hladiny 11-ketotestosteronu a 17 β -estradiolu v porovnání s kontrolní skupinou. Účinkům levonorgestrelu se také věnovala studie Zeilinger a kol. (2009), v níž se po 21denní expozici koncentraci $\geq 0,8$ ng·l⁻¹ snížila produkce jiker samic jelečků velkohlavých. Pokles plodnosti byl také zaznamenán u samic jelečka velkohlavého po 21denní expozici norethisteronu ≥ 100 ng·l⁻¹ (Paulos a kol., 2010), gestodenu ≥ 1 ng·l⁻¹ a desogestrelu ≥ 1 μ g·l⁻¹ (Runnalls a kol., 2013). Koncentrace norgestrelu $\geq 35,8$ ng·l⁻¹ po 42 dnech dokonce vyvolala rozvoj spermatogeneze u samic gambusie komářích (Hou a kol., 2018b). Společně tyto výsledky potvrzují, že progestiny představují skutečné

riziko pro vodní organismy, neboť koncentrace zjištěné v laboratorních podmínkách, u nichž se prokázal negativní vliv na ryby, jsou podobné těm, jež byly změřeny ve vodním prostředí (Svensson a kol., 2016).

Samci exponovaní etonogestrelu v obou koncentracích vykazovali menší poměr 4. paprsku k délce 6. paprsku gonopodia. Ve vyšší koncentraci etonogestrelu byl navíc u gonopodia zjištěn větší poměr délky 6. paprsku k délce těla a prodloužila se délka 6. paprsku. Nejedná se však o morfometrické změny, které by naznačovaly hypermaskulinizaci. Nicméně hypermaskulinizace byla pozorována po 8denní expozici samců gambusie Holbrookovy $100 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ levonorgestrelu a projevila se signifikantním prodloužením gonopodia (Frankel a kol., 2016a). Z toho lze usuzovat, že levonorgestrel má silnější androgenní účinky než etonogestrel, neboť hypermaskulinizace samců nebyla pozorována ani v koncentraci $320 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ etonogestrelu. Zapotřebí je také zmínit, že gonopodium slouží jako pomocný kopulační orgán, který během páření slouží k přenosu spermií (Angus a kol., 2001) a jakékoliv změny jeho morfologie mohou mít vliv na úspěšnou reprodukci. Navíc gonopodium je u živorodek rovněž důležité z hlediska pohlavního výběru (Kwan a kol., 2013). Ve volné přírodě samci vykazují relativně velké rozdíly v délce a struktuře gonopodia (Kahn a kol., 2010), přičemž například u živorodek duhových bylo prokázáno, že se samice sdružují především se samci majícími delší gonopodium (Brooks a Caithness, 1995). Stejné preference se také zjistily u samic gambusíí komářích, protože si k páření vybíraly zejména samce s delším gonopodiem. Morfologie a struktura gonopodia tedy může ovlivnit jak samotnou reprodukci, tak i pohlavní výběr ze strany samic (Kahn a kol., 2010).

U samců exponovaných etonogestrelu nebyl zjištěn žádný signifikantní vliv na běžný vývoj testes. U samců z kontrolních i pokusných skupin se vyskytovaly v gonádách především zralé spermatofoxy. Jinak tomu bylo ve studii Hou a kol. (2018c), v níž se po 45denní expozici norethisteronu $\geq 421,3 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ u juvenilních samců dánií pruhovaných zjistilo prokazatelně rychlejší dozrávání pohlavních buněk.

Syntetické progestiny tedy mohou mít na ryby řadu nežádoucích vlivů, a proto je zapotřebí jim věnovat patřičnou pozornost. V současné době jsou účinky na vodní organismy známy pouze u některých syntetických progestinů, a dokud nebudou provedeny další ekotoxikologické studie, nelze vytvořit úplný přehled rizik, které mohou tyto látky představovat pro necílové organismy žijící ve vodním prostředí (Fent, 2015). Rovněž jsou k dispozici pouze omezené informace o mechanismu účinků

progestinů u ryb, zejména ohledně jejich interakcí se steroidními receptory. V současnosti pravděpodobně největší nebezpečí představují progestiny odvozené od testosteronu, jako je například levonorgestrel či gestoden, u nichž se prokázal negativní vliv na reprodukci ryb již v jednotkách $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ (Kumar a kol., 2015). Důležité je také brát v úvahu, že se progestiny do vodního prostředí skrze ČOV dostávají neustále a obvykle v různých směsích, v důsledku čehož může dojít k aditivním či synergickým účinkům. Synergické účinky byly prokázány například v případě syntetických progestinů dydrogesteronu a medroxyprogesteron acetátu (Zhao a kol., 2015) anebo směsi drospirenonu a progesteronu (Hou a kol., 2017). Proto je zapotřebí provádět další toxikologické studie s cílem jasně posoudit rizika progestinů a jejich směsí pro vodní organismy (Šauer a kol., 2018).

6. Závěr

V důsledku poměrně velké spotřeby a širokého využití jsou syntetické progestiny v povrchových vodách detekovány stále častěji. Cílem této diplomové práce bylo posouzení vlivu syntetického progestinu etonogestrelu na sekundární pohlavní znaky a histologii gonád živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*).

U samic exponovaných etonogestrelu byla v obou koncentracích (3,2 ng·l⁻¹ a 320 ng·l⁻¹) zjištěna maskulinizace, která se projevila výskytem barevných skvrn a ve vyšší koncentraci také změnou morfometrie anální ploutve do formy připomínající gonopodium. Expozice etonogestrelu měla rovněž signifikantní vliv na zrání oocytů samic. Zatímco v kontrolních skupinách převládaly zralé oocyty, u ryb vystavených etonogestrelu se jejich podíl s rostoucí koncentrací snižoval. Samci vystavení etonogestrelu měli v obou koncentracích menší poměr 4. paprsku k délce 6. paprsku gonopodia a v koncentraci 320 ng·l⁻¹ byl u gonopodia také pozorován větší poměr délky 6. paprsku k délce těla a prodloužení délky 6. paprsku. Nicméně se nejedná o takové změny, které by svědčily o hypermaskulinizaci. Přesto uvedené změny mohou mít negativní vliv na reprodukci ryb, poněvadž gonopodium je pomocný kopulační orgán, který během páření slouží k přenosu spermatoforů do těla samic. Změna morfologie gonopodia by rovněž mohla ovlivnit pohlavní výběr ze strany samic, jelikož se například u živorodky duhové či gambusie komáří zjistilo, že se samice sdružují zejména se samci majícími delší gonopodium. Ve vývoji pohlavních buněk samců nebyla po expozici etonogestrelu prokázána žádná změna. Ve všech skupinách se vyskytovaly především zralé spermatofory. Na základě těchto výsledků je možné tvrdit, že podobně jako tomu bylo u živorodky Wingeovy by mohly být ohroženy i populace volně žijících ryb, pokud by se etonogestrel vyskytl ve vodním prostředí v koncentraci dosahující jednotek ng·l⁻¹.

V současné době je riziko spojené s výskytem progestinů poměrně velký problém, neboť se jedná o steroidní hormony, které mohou narušovat běžný vývoj ryb již v jednotkách ng·l⁻¹. Na čistírnách odpadních vod obvykle nedochází k jejich úplnému odstranění a část z nich se neustále dostává do povrchových vod. Z těchto důvodů mohou progestiny představovat poměrně velké nebezpečí pro vodní organismy, neboť jsou jim vystavovány dlouhodobě a v různých směsích, byť ve zdánlivě nízkých

koncentracích. Navíc u řady progestinů nejsou známy účinky na necílové organismy a jsou k dispozici pouze omezené informace o jejich výskytu ve vodním prostředí. Proto je zapotřebí koncentrace progestinů v povrchových vodách i nadále sledovat a provádět další toxikologické testy, které nám mohou poskytnout podrobnější informace o této rizikové skupině látek. Jako experimentální organismy by také měly být použity druhy ryb běžně se vyskytující v povrchových vodách. Rovněž by bylo vhodné provést chronické testy toxicity, jelikož v některých povrchových vodách jsou ryby exponovány syntetickým progestinům dlouhodobě.

7. Seznam použité literatury

- AIDA, K. (1988). A review of plasma hormone changes during ovulation in cyprinid fishes. *Aquaculture*, 74(1-2), 11-21.
- ALEXANDER, H. J., & BREDEN, F. (2004). Sexual isolation and extreme morphological divergence in the Cumana guppy: a possible case of incipient speciation. *Journal of evolutionary biology*, 17(6), 1238-1254.
- ANGUS, R. A., McNATT, H. B., HOWELL, W. M., & PEOPLES, S. D. (2001). Gonopodium development in normal male and 11-ketotestosterone-treated female mosquitofish (*Gambusia affinis*): a quantitative study using computer image analysis. *General and comparative endocrinology*, 123(2), 222-234.
- ATZ, J. W. (1964). *Intersexuality in fishes. Intersexuality in vertebrates including man*. London, New York: Academia Press, 145-232.
- BAIN, P. A., KUMAR, A., OGINO, Y., & IGUCHI, T. (2015). Nortestosterone-derived synthetic progestogens do not activate the progestogen receptor of Murray–Darling rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) but are potent agonists of androgen receptors alpha and beta. *Aquatic Toxicology*, 163, 97-101.
- BARUŠ, V., & OLIVA, O. (1995). *Fauna ČR a SR: Mihulovci (Petromyzontes) a ryby (Osteichthyes) (1)*, 1. vyd. Praha: Academia, 623 s. ISBN 80-200-0500-5.
- BESSE, J. P., & GARRIC, J. (2009). Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environmental pollution*, 157(12), 3485-3494.
- BILLARD, R. (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species (1). *Reproduction Nutrition Développement*, 26(4), 877-920.
- BLÜTHGEN, N., CASTIGLIONI, S., SUMPTER, J. P., & FENT, K. (2013). Effects of low concentrations of the antiprogestin mifepristone (RU486) in adults and embryos of zebrafish (*Danio rerio*): 1. Reproductive and early developmental effects. *Aquatic toxicology*, 144, 83-95.
- BROOKS, R., & CAITHNESS, N. (1995). Female choice in a feral guppy population: are there multiple cues?. *Animal Behaviour*, 50(2), 301-307.
- COAD, B. W. (2017). Review of the livebearer fishes of Iran (Family *Poeciliidae*). *Iranian Journal of Ichthyology*, 4(4), 305-330.
- COLE, K. S. (1997). Gonadal development and sexual allocation in mangrove killifish, *Rivulus marmoratus* (*Pisces: Atherinomorpha*). *Copeia*, 1997(3), 596-600.
- ČEPICKÝ, P., & LÍBALOVÁ, Z. (2008). Gestagenní antikoncepce. *Moderní babictví*, 15, 1-3.

- DIETRICH, D., & KRIEGER, H. O. (2009). Histological analysis of endocrine disruptive effects in small laboratory fish. Hoboken: John Wiley & Sons, 381 pp. ISBN 978-0-471-76358-1.
- DONG, Z., SENN, D. B., MORAN, R. E., & SHINE, J. P. (2013). Prioritizing environmental risk of prescription pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 65 (1), 60-67.
- DUFOUR, S., WELTZIEN, F. A., SEBERT, M. E., LE BELLE, N., VIDAL, B., VERNIER, P., & PASQUALINI, C. (2005). Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: ecophysiological and evolutionary implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040(1), 9-21.
- DVOŘÁK, P., PYSZKO, M., VELÍŠEK, J., LÍŠKOVÁ, Z. D., & ANDREJI, J. (2014). Anatomie a fyziologie ryb, 1. vyd. Vodňany: Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská Univerzita, 189 s. ISBN 978-80-87437-80-3.
- ELLESTAD, L. E., CARDON, M., CHAMBERS, I. G., FARMER, J. L., HARTIG, P., STEVENS, K., VILLENEUVE, D. L., WILSON, V., & ORLANDO, E. F. (2014). Environmental gestagens activate fathead minnow (*Pimephales promelas*) nuclear progesterone and androgen receptors in vitro. *Environmental science & technology*, 48(14), 8179-8187.
- EVANS, J. P., & MAGURRAN, A. E. (2001). Patterns of sperm precedence and predictors of paternity in the Trinidadian guppy. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268(1468), 719-724.
- FENT, K. (2015). Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems: concentrations, effects and risk assessment. *Environment international*, 84, 115-130.
- FRANKEL, T. E., MEYER, M. T., & ORLANDO, E. F. (2016a). Aqueous exposure to the progestin, levonorgestrel, alters anal fin development and reproductive behavior in the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *General and comparative endocrinology*, 234, 161-169.
- FRANKEL, T. E., MEYER, M. T., KOLPIN, D. W., GILLIS, A. B., ALVAREZ, D. A., & ORLANDO, E. F. (2016b). Exposure to the contraceptive progestin, gestodene, alters reproductive behavior, arrests egg deposition, and masculinizes development in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental science & technology*, 50(11), 5991-5999.
- GENTEN, F., TERWINGHE, E., & DANGUY, A. (2009). *Atlas of Fish Histology*, 1st. Boca Raton: CRC Press, 223 pp. ISBN 978-1-57808-544-6.
- GODIN, J. G. J., & McDONOUGH, H. E. (2003). Predator preference for brightly colored males in the guppy: a viability cost for a sexually selected trait. *Behavioral Ecology*, 14(2), 194-200.

- GOLOVKO, O., ŠAUER, P., FEDOROVA, G., KROUPOVÁ, H. K., & GRABIC, R. (2018). Determination of progestogens in surface and waste water using SPE extraction and LC-APCI/APPI-HRPS. *Science of The Total Environment*, 621, 1066-1073.
- HUA, J., HAN, J., GUO, Y., & ZHOU, B. (2015). The progestin levonorgestrel affects sex differentiation in zebrafish at environmentally relevant concentrations. *Aquatic Toxicology*, 166, 1-9.
- HOU, L., XU, H., YING, G., YANG, Y., SHU, H., ZHAO, J., & CHENG, X. (2017). Physiological responses and gene expression changes in the western mosquitofish (*Gambusia affinis*) exposed to progesterone at environmentally relevant concentrations. *Aquatic Toxicology*, 192, 69-77.
- HOU, L. P., YANG, Y., SHU, H., YING, G. G., ZHAO, J. L., FANG, G. Z., XIN, L., SHI, W. J., YAO, L., & CHENG, X. M. (2018a). Masculinization and reproductive effects in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) after long-term exposure to androstenedione. *Ecotoxicology and environmental safety*, 147, 509-515.
- HOU, L. P., CHEN, H., TIAN, C. E., LIANG, Y., WU, R. R., ZHANG, X. M., FANG, X. W., ZHANG, C. P., HU, J. J., SONG, L. Y., LIANG, Y. Q., SCHLENK, D., & XIE, L. (2018b). Alterations of secondary sex characteristics, reproductive histology and behaviors by norgestrel in the western mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Aquatic Toxicology*, 198, 224-230.
- HOU, L. P., CHEN, H., TIAN, C. E., SHI, W. J., LIANG, Y., WU, R. R., FANG, X. W., ZHANG, C. P., LIANG, Y. Q., & XIE, L. (2018c). The progestin norethindrone affects sex differentiation and alters transcriptional profiles of genes along the hypothalamic–pituitary–gonadal and hypothalamic–pituitary–adrenal axes in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*.
- HOUDE, A. E. (1997). *Sex, color, and mate choice in guppies*. New Jersey: Princeton University Press, 224 pp. ISBN 9780691027890.
- HUANG, G. Y., LIU, Y. S., CHEN, X. W., LIANG, Y. Q., LIU, S. S., YANG, Y. Y., HU, L. X., SHI, W. J., TIAN, F., ZHAO, J. L., CHEN, J. YING, G. G. (2016). Feminization and masculinization of western mosquitofish (*Gambusia affinis*) observed in rivers impacted by municipal wastewaters. *Scientific reports*, 6, 20884.
- CHEN, H., ZHANG, Y., LI, S., LIN, M., SHI, Y., SANG, Q., LIU, M., ZHANG, H., LU, D., MENG, Z., LIU, X., & LIN, H. (2011). Molecular cloning, characterization and expression profiles of three estrogen receptors in protogynous hermaphroditic orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and comparative endocrinology*, 172(3), 371-381.

- CHESTER-JONES, I., INGLETON, P. M., & PHILLIPS, J. G. (2013). Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology. New York: Springer Science & Business Media, 666 pp. ISBN 978-1-4899-3619-6.
- JOHNSON, R., WOLF, J., & BRAUNBECK, T. (2010). OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Guidance document on the diagnosis of endocrine-related histopathology in fish gonads. Series on Testing and Assessment, (123), 114.
- JOHNSON, S., & CANDOLIN, U. (2017). Predation cost of a sexual signal in the threespine stickleback. *Behavioral Ecology*, 28(4), 1160-1165.
- KAHN, A. T., MAUTZ, B., & JENNIONS, M. D. (2009). Females prefer to associate with males with longer intromittent organs in mosquitofish. *Biology Letters*, rsbl20090637.
- KISHIDA, M., & SPECKER, J. L. (1993). Vitellogenin in tilapia (*Oreochromis mossambicus*): induction of two forms by estradiol, quantification in plasma and characterization in oocyte extract. *Fish physiology and biochemistry*, 12(3), 171.
- KITTNAR, O., JANDOVÁ, K., KURIŠČÁK, E., LANGMEIER, M., MAREŠOVÁ, D., MLČEK, M., MYSLIVEČEK, J., POKORNÝ, J., RILJAK, V., & TROJAN, S. (2011). *Lékařská fyziologie*, 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 800 s. ISBN 978-80-247-3068-4.
- KLOAS, W., URBATZKA, R., OPITZ, R., WÜRTZ, S., BEHRENDT, T., HERMELINK, B., HOFMANN, F., JAGNYTSCH, O., KROUPOVÁ, H., LORENZ, C., NEUMANN, N., PIETSCH, C., TRUBIROHA, A., BALLEGOOY, CH. V., WIEDEMANN, C., LUTZ, I. (2009). Endocrine disruption in aquatic vertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163(1), 187-200.
- KOBAYASHI, M., AIDA, K., & HANYU, I. (1989). Involvement of steroid hormones in the preovulatory gonadotropin surge in female goldfish. *Fish physiology and biochemistry*, 7(1-6), 141-146.
- KŘEŠINOVÁ, Z., SVOBODOVÁ, K., & CAJTHAML, T. (2009). Microbial Degradation of Endocrine Disruptors. *Chemické listy*, 103(3).
- KUMAR, V., JOHNSON, A. C., TRUBIROHA, A., TŮMOVÁ, J., IHARA, M., GRABIC, R., KLOAS, W., TANAKA, H., & KROUPOVÁ, H. K. (2015). The challenge presented by progestins in ecotoxicological research: a critical review. *Environmental science & technology*, 49(5), 2625-2638.
- KWAN, L., CHENG, Y. Y., RODD, F. H., & ROWE, L. (2013). Sexual conflict and the function of genitalic claws in guppies (*Poecilia reticulata*). *Biology letters*, 9(5), 20130267.
- LAMPERT, K. P. (2009). Invited review: Clonal reproduction in freshwater fish: mechanisms, systematic overview, genetic and ecological consequences. *Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie*, 174(3), 245-260.

- 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*). *Aquatic Toxicology*, 160, 172-179.
- LIU, S., YING, G. G., ZHOU, L. J., ZHANG, R. Q., CHEN, Z. F., & LAI, H. J. (2012). Steroids in a typical swine farm and their release into the environment. *water research*, 46(12), 3754-3768.
- LOWERRE-BARBIERI, S. K., GANIAS, K., SABORIDO-REY, F., MURUA, H., & HUNTER, J. R. (2011). Reproductive timing in marine fishes: variability, temporal scales, and methods. *Marine and Coastal Fisheries*, 3(1), 71-91.
- LUBZENS, E., YOUNG, G., BOBE, J., & CERDÀ, J. (2010). Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 367-389.
- MARTÍNKOVÁ, J., CHLÁDEK, J., MIČUDA, S., CHLÁDKOVÁ, J. (2007). *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing, 380 s. ISBN 978-80-247-1356-4.
- MOUREK, J. (2012). *Fyziologie – Učebnice pro studenty zdravotnických oborů – 2., doplněné vydání*, 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 224 s. ISBN 978-80-247-3918-2.
- MYLONAS, C. C., FOSTIER, A., & ZANUY, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 516-534.
- NAGAHAMA, Y., MIURA, T., & KOBAYASHI, T. (1994). The onset of spermatogenesis in fish. *Germline development*, 255.
- NAGAHAMA, Y., YOSHIKUNI, M., YAMASHITA, M., TOKUMOTO, T., & KATSU, Y. (1995). 4 Regulation of oocyte growth and maturation in fish. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 30, pp. 103-145). Academic Press.
- NAKAMURA, M., & TAKAHASHI, H. (1973). Gonadal sex differentiation in tilapia, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido University*, 24:1–13.
- NAKAMURA, M., TAKAHASHI, H., & O. HIROI. (1974). Sex differentiation in the masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery*, 28:1–8.
- NAKAMURA, M., KOBAYASHI, T., CHANG, X. T., & NAGAHAMA, Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *Journal of Experimental Zoology*, 281(5), 362-372.
- NAKAMURA, S., KOBAYASHI, K., NISHIMURA, T., & TANAKA, M. (2011). Ovarian germline stem cells in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *International journal of biological sciences*, 7(4), 403.

- NOGGLE, J. J., GROSS, T. S., & HOLM, S. E. (2010). Masculinization of eastern mosquitofish (*Gambusia*) and exposure to pulp and paper discharge: diminished responses following mill process modifications. *Water Quality Research Journal*, 45(2), 145-152.
- NÓBREGA, R. H., MORAIS, R. D. V. D. S., CRESPO, D., DE WAAL, P. P., DE FRANCA, L. R., SCHULZ, R. W., & BOGERD, J. (2015). Fsh stimulates spermatogonial proliferation and differentiation in zebrafish via Igf3. *Endocrinology*, 156(10), 3804-3817.
- ORLANDO, E. F., & ELLESTAD, L. E. (2014). Sources, concentrations, and exposure effects of environmental gestagens on fish and other aquatic wildlife, with an emphasis on reproduction. *General and comparative endocrinology*, 203, 241-249.
- ORNITAKE, K. (1972). Morphological studies of normal sex-differentiation and induce sexreversal process of gonads in the medaka, *Oryzias latipes*. *Annot. Zool. Jpn.*, 45:159-169.
- PARENTI, L. R., & GRIER, H. J. (2004). Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integrative and comparative biology*, 44(5), 333-348.
- PATIÑO, R., & SULLIVAN, C. V. (2002). Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(1), 57-70.
- 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.
- PILASTRO, A., & BISAZZA, A. (1999). Insemination efficiency of two alternative male mating tactics in the guppy *Poecilia reticulata*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 266(1431), 1887-1891.
- POESER, F. N., KEMPKES, M., & ISBRÜCKER, I. J. (2005). Description of *Poecilia (Acanthophaelus) wingei* n. sp. from the Paría Peninsula, Venezuela, including notes on *Acanthophaelus* Eigenmann, 1907 and other subgenera of *Poecilia* Bloch and Schneider, 1801 (*Teleostei, Cyprinodontiformes, Poeciliidae*). *Contributions to Zoology*, 74(1/2), 97-115.
- RACZ, L., & GOEL, R. K. (2010). Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. *Journal of Environmental Monitoring*, 12(1), 58-70.
- RICHARDSON, T. J., POTTS, W. M., & SAUER, W. H. (2011). The reproductive style of *Diplodus capensis* (*Sparidae*) in southern Angola: rudimentary hermaphroditism or partial protandry?. *African Journal of Marine Science*, 33(2), 321-326.
- ROSEN, D. E., & BAILEY, R. M. (1963). The poeciliid fishes (*Cyprinodontiformes*): their structure, zoogeography, and systematics. *Bulletin of the AMNH*; v. 126, article 1.
- ROZTOČIL, A., BARTOŠ, P., BÁČA, V., CVRČEK, P., ČEPICKÝ, P., DOUCKOVÁ, P., DVOŘÁK, D., FEYEREISL, J., HLAVÁČKOVÁ, L., HOŘÍN, P., HOŘÍNOVÁ, V.,

- KEPÁK, J., KROFTA, L., KUČERA M., LÍBALOVÁ, Z., PESCHOUT, R., ROZTOČILOVÁ, S., ŘEŽÁBEK, K., SKOVAJSOVÁ, M., SLAVÍČEK, L., ŠAFÁŘ, P., ŠIMETKA, O., VALOVÁ, A., ZAVADIL, M. (2011). *Moderní gynekologie*. Praha: Grada Publishing, 528 s. ISBN 978-80-247-7109-0.
- 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. *Environmental science & technology*, 47(4), 2077-2084.
- ŘEŽUCHA, R. (2014). *Personality, reprodukční strategie a pohlavní výběr u vybraných taxonů ryb*. Brno. Disertační práce, 139 s. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce: doc. RNDr. Martin Reichard, Ph.D.
- SANDRA, G. E., & NORMA, M. M. (2010). Sexual determination and differentiation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 20(1), 101-121.
- SCHORIES, S., MEYER, M. K., & SCHARTL, M. (2009). Description of *Poecilia (Acanthophaelus) obscura* n. sp., (Teleostei: Poeciliidae), a new guppy species from western Trinidad, with remarks on *P. wingei* and the status of the "Endler's guppy". *Zootaxa*, 2266, 35-50.
- SCHULZ, R. W., DE FRANCA, L. R., LAREYRE, J. J., LEGAC, F., CHIARINI-GARCIA, H., NOBREGA, R. H., & MIURA, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 390-411.
- SCOTT, A. P., & SORENSEN, P. W. (1994). Time course of release of pheromonally active gonadal steroids and their conjugates by ovulatory goldfish. *General and comparative endocrinology*, 96(2), 309-323.
- SCOTT, A. P., SUMPTER, J. P., & STACEY, N. (2010). The role of the maturation-inducing steroid, 17, 20 β -dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. *Journal of Fish Biology*, 76(1), 183-224.
- SITRUK-WARE, R. (2008). Reprint of pharmacological profile of progestins. *Maturitas*, 61(1-2), 151-157.
- SITRUK-WARE, R., & NATH, A. (2013). Characteristics and metabolic effects of estrogen and progestins contained in oral contraceptive pills. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 27(1), 13-24.
- SKÖLD, H. N., AMUNDSEN, T., SVENSSON, P. A., MAYER, I., BJELVENMARK, J., & FORSGREN, E. (2008). Hormonal regulation of female nuptial coloration in a fish. *Hormones and Behavior*, 54(4), 549-556.
- SNYDER, S. A., WESTERHOFF, P., YOON, Y., & SEDLAK, D. L. (2003). Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water: implications for the water industry. *Environmental Engineering Science*, 20(5), 449-469.

- SPURNÝ, P., MAREŠ, J., KOPP, R., & ŘEZNÍČKOVÁ, P. (2015). *Hydrobiologie a rybářství*. Brno: Fakulta agronomická, Mendelova univerzita v Brně, 254 s. ISBN 978-80-7509-345-5.
- SRISAKULTIEW, P. (1993). *Studies on the reproductive biology of Oreochromis niloticus L.* Doctor thesis, 369 pp. University of Stirling, Institute of Aquaculture. Supervisor: Dr. K. J. Rana.
- STRÜSSMANN, C. A., & NAKAMURA, M. (2002). Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(1), 13-29.
- SUNOBE, T., SADO, T., HAGIWARA, K., MANABE, H., SUZUKI, T., KOBAYASHI, Y., SAKURAI, M., DEWA, S. I., MATSUOKA, M., SHINOMIYA, A., FUKUDA, A., & MIYA, M. (2017). Evolution of bidirectional sex change and gonochorism in fishes of the gobiid genera *Trimma*, *Priolepis*, and *Trimmatom*. *The Science of Nature*, 104(3-4), 15.
- 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.
- ŠAUER, P., STARÁ, A., GOLOVKO, O., VALENTOVÁ, O., BOŘÍK, A., GRABIC, R., & KROUPOVÁ, H. K. (2018). Two synthetic progestins and natural progesterone are responsible for most of the progestagenic activities in municipal wastewater treatment plant effluents in the Czech and Slovak republics. *Water research*, 137, 64-71.
- TAKAHASHI, H. (1974). Modification of the development of female reproductive organs in the guppy, *Poecilia reticulata*, following an androgen treatment in their juvenile period. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido University*, 25:174-199.
- TAKASHIMA, F., & HIBIYA, T. (1995). *An atlas of fish histology: normal and pathological features*, 2nd. Tokyo: Kodansha, Gustav Fischer Verlag, 195 pp. ISBN 3437307827.
- TIAN, H., LI, Y., WANG, W., WU, P., & RU, S. (2012). Exposure to monocrotophos pesticide during sexual development causes the feminization/demasculinization of the reproductive traits and a reduction in the reproductive success of male guppies (*Poecilia reticulata*). *Toxicology and applied pharmacology*, 263(2), 163-170.
- TURNER, C. L. (1941). Morphogenesis of the gonopodium in *Gambusia affinis affinis*. *Journal of Morphology*, 69(1), 161-185.
- TURNER, C. L. (1942). Morphogenesis of the gonopodial suspensorium in *Gambusia affinis* and the induction of male suspensorial characters in the female by androgenic hormones. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 91(2), 167-193.
- URIBE, M. C., GRIER, H. J., & MEJÍA-EOA, V. (2014). Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis*, 4(3), e983400.

- VAN DER OOST, R., BEYER, J., & VERMEULEN, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149.
- WU, G. C., TOMY, S., LEE, M. F., LEE, Y. H., YUEH, W. S., LIN, C. J., LAU, E. L., & CHANG, C. F. (2010). Sex differentiation and sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *General and comparative endocrinology*, 167(3), 417-421.
- YOST, E. E., MEYER, M. T., DIETZE, J. E., MEISSNER, B. M., WORLEY-DAVIS, L., WILLIAMS, C. M., LEE, B., & KULLMAN, S. W. (2013). Comprehensive assessment of hormones, phytoestrogens, and estrogenic activity in an anaerobic swine waste lagoon. *Environmental science & technology*, 47(23), 13781-13790.
- ZEILINGER, J., STEGER-HARTMANN, T., MASER, E., GOLLER, S., VONK, R., & LÄNGE, R. (2009). Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 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*). *Environmental science & technology*, 49(7), 4636-4645.

8. Seznam zkratek

11-KT	– 11-ketotestosteron
17,20β-P	– 17,20 β -dihydroxypregn-4-en-3-on
17,20β,21-P	– 17,20 β ,21-trihydroxy-pregn-4-en-3-on
AR	– Androgenní receptor
ČOV	– Čistírna odpadních vod
DA	– Dopamin
E2	– 17- β -estradiol
EDC	– Endokrinní disruptory
EGF	– Epidermální růstový faktor
ER	– Estrogenní receptor
FSH	– Folikuly stimulující hormon, folitropin
GnRH	– Gonadotropin uvolňující hormon
GnRH3	– Gonadotropiny uvolňující hormon 3
GOR	– Gonádotropní receptor
GR	– Glukokortikoidní receptor
GSI	– Gonadosomatický index
HPA	– Osa hypotalamus-hypofýza-gonáda
IGF I, IGF II	– Inzulinu podobné růstové faktory
LH	– Luteinizační hormon
LOEC	– Nejnižší koncentrace, při které je pozorován účinek testované látky
LogKow	– Rozdělovací koeficient v systému oktanol / voda
MIH	– Indukčně-dozrávací hormon
MIS	– Steroidy vyvolávající dozrávání
mMIHR	– Membránový receptor pro indukčně-dozrávací hormon
MR	– Minerálokortikoidní receptor
mRNA	– Mediátorová ribonukleová kyselina
nMIHR	– Jaderný receptor pro indukčně-dozrávací hormon
OCP	– Organochlorové pesticidy
P4	– Progesteron
PAH	– Polycyklické aromatické uhlovodíky

PCB	– Polychlorované bifenyly
PCDD	– Dibenzo-p-dioxiny
PG	– Prostaglandiny
PGC	– Prvotní zárodečné buňky
Pomc	– Proopiomelanokortin
PR	– Progesteronový receptor
PRα	– Progesteronový receptor α
PRβ	– Progesteronový receptor β
rRNA	– Ribozomální ribonukleová kyselina
T	– Testosteron
Vtg	– Vitelogenin

9. Abstrakt

Vliv syntetického progestinu etonogestrelu na sekundární pohlavní znaky a histologii gonád živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*)

Syntetické progestiny jsou steroidní hormony, které jsou nejen součástí hormonální antikoncepce, ale používají se i při léčbě řady zdravotních problémů. Díky širokému používání léků na bázi progestinů nacházíme jejich rezidua v odpadních vodách, odkud se následně dostávají do čistíren odpadních vod a do vod povrchových. Cílem této diplomové práce bylo posoudit, zda má syntetický progestin etonogestrel vliv na sekundární pohlavní znaky a histologii gonád živorodky Wingeovy (*Poecilia wingei*). Během experimentu byly samci a samice odděleně, vystaveny 3,2 a 320 ng·l⁻¹ etonogestrelu po dobu 34 dní. Jako kontrola sloužila skupina ryb chovaných v čisté vodě (K) a skupina ryb chovaných v čisté vodě obsahující rozpouštědlo dimethylsulfoxid (KS). Na konci testu byly všechny ryby vyfotografovány, aby byly zachyceny případné změny v jejich zbarvení. Poté byly ryby usmrceny a fixovány v 10 % pufovaném formalínovém roztoku pro morfometrickou a histologickou analýzu. Vzorky ryb odebrané pro morfometrickou analýzu byly vyfotografovány s pomocí softwaru QuickPHOTO MICRO 2.3 a na zhotovených snímcích byly měřeny jednotlivé morfometrické parametry. Zpracování vzorků ryb pro histologickou analýzu zahrnovalo dekalifikaci, dehydrataci a následně zalití vzorků do parafinových bločků. Z parafinových bločků se poté zhotovily řezy o tloušťce cca 4,5 μm, které byly obarveny hematoxylinem a eosinem. Na takto připravených histologických vzorcích se zjišťovaly histologické změny gonád.

U samic exponovaných etonogestrelu byl v obou koncentracích pozorován výskyt barevných skvrn, které jsou charakteristické pro samce a u samic indukují maskulinizaci. Navíc samice vystavené koncentraci 320 ng·l⁻¹ vykazovaly změnu morfometrie anální ploutve do struktury podobné gonopodiu (modifikovaná anální ploutev samců sloužící jako pomocný kopulační orgán), což je znak, který rovněž ukazuje na maskulinizaci. Dále expozice etonogestrelu jak v nižší, tak i ve vyšší koncentraci snížila zastoupení zralých oocytů v ováriích, přičemž jejich výskyt se snižoval s rostoucí koncentrací. U samců exponovaných etonogestrelu byl v obou koncentracích zjištěn menší poměr 4.

paprsku k délce 6. paprsku gonopodia. V koncentraci etonogestrelu $320 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ byl navíc pozorován větší poměru délky 6. paprsku k délce těla a prodloužení délky 6. paprsku. Ačkoli nedošlo k takovým změnám, které by indikovaly hypermaskulinizaci, mohly by tyto změny mít negativní vliv na reprodukci, případně pohlavní výběr ze strany samic. Expozice etonogestrelu neměla žádný vliv na běžný vývoj testes, neboť se u samců ze všech skupin vyskytovaly převážně zralé spermatofoxy. Na základě těchto poznatků lze konstatovat, že etonogestrel, podobně jako jiné progestiny, představuje reálné riziko pro ryby, pokud se vyskytne ve vodním prostředí v koncentracích pohybujících se už v jednotkách $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$.

Klíčová slova: etonogestrel, gonády, progestiny, ryby, sekundární pohlavní znaky, živoročka

10. Abstract

Effect of synthetic progestin etonogestrel on the secondary sexual characteristics and gonad histology of Endler's guppy (*Poecilia wingei*)

Synthetic progestins are steroid hormones, which are not only part of the hormonal contraceptives, but they are also used to treat a number of health problems in human. Due to the widespread use of progestin-based drugs, their residues are being found in wastewaters, from where they also enter into the wastewater treatment plants and surface waters. The aim of this thesis was to assess whether the synthetic progestin etonogestrel affects the secondary sexual characteristics and gonad histology of Endler's guppy (*Poecilia wingei*). During the experiment, males and females were separately exposed to 3.2 and 320 ng·l⁻¹ etonogestrel for 34 days. A group of fish reared in pure water (K) and group of fish reared in pure water containing the solvent dimethylsulfoxide (KS) served as controls. At the end of the test, all the fish were photographed to capture any color changes. Then the fish were sacrificed and fixed in 10 % buffered formalin solution for morphometric and histological analysis. Fish samples taken for morphometric analysis were photographed using QuickPHOTO MICRO 2.3 software and individual morphometric parameters were measured on the images taken. Fish sample processing for histological analysis included decalcification, dehydration, and pouring of the samples into paraffin blocks. Then paraffin blocks were cut with the thickness of about 4.5 µm, resulting slides were stained with hematoxylin and eosin. Histological changes of the gonads were determined on the histological samples prepared in this way.

In females exposed to both concentrations of etonogestrel occurrence of color spots was observed. Color spots are characteristic for male and in females indicate masculinization. In addition, females exposed to 320 ng·l⁻¹ etonogestrel showed a change in anal fin morphometry to a gonopodium-like structure (modified anal fin of males serving as helping copulatory organ), a sign also suggesting masculinization. Furthermore, exposure of etonogestrel in both lower and higher concentration of etonogestrel reduced number of mature oocytes in the ovaries, and their occurrence decreased with increasing concentration. In males exposed to both concentrations of

etonogestrel a smaller ratio of the length of 4th ray to the length of 6th ray of gonopodium was found. In addition, at concentration of etonogestrel $320 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ a greater ratio of the length of 6th ray to body length and extension of length of 6th ray was observed. Although there were no changes, which would indicate hypermasculinization, these changes could have a negative impact on reproduction, or sexual selection by the female. Etonogestrel exposure had no effect on the normal development of testes, because predominantly mature spermatophores were found in males of all treatment groups. Based on these findings, we can say that etonogestrel, like other progestins, represents a real risk to fish if it occurs in aquatic environment at concentrations reaching units of $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$.

Keywords: etonogestrel, gonads, progestins, fish, secondary sexual characteristics, guppy