



Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Vliv vybraných environmentálních estrogenů na charakteristiky pohybu kančích spermií

Doktorand: Ing. Adéla Krejčířková

Školitel: doc. MVDr. Radko Rajmon, Ph.D.

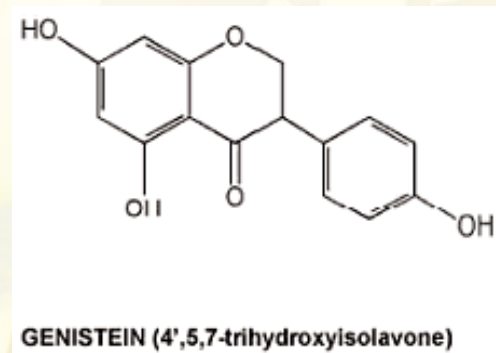
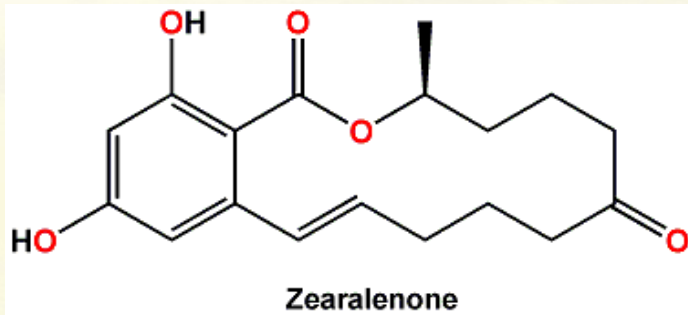
Katedra veterinárních disciplín, FAPPZ, ČZU



Environmentální estrogeny

Zearalenone, Genistein

- endokrinní disruptory
- imitace funkce endogenních estrogenů
- ubikvitní výskyt



Charakteristika

- Zearalenon (ZEA)
 - mykotoxin
 - produkt plísně rodu *Fusarium spp.*
 - v organismu konverze na α – (β –) ZOL
- Phytoestrogeny (f-E)
 - sekundární metabolity rostlin
 - v rostlinách především glykosidy
 - v organismu konverze na aglykony
 - významný zdroj: sója luštinatá
 - genistein, daidzein



-
- Aktivita:
 $E2 > \alpha\text{-ZOL} > ZEA > GEN$



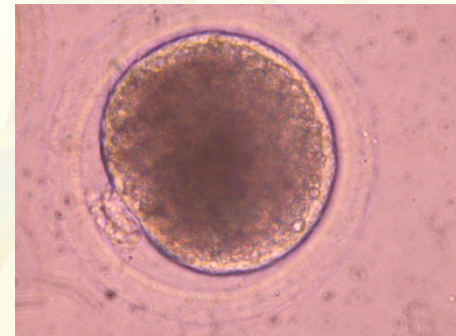
Výživa prasat – výskyt

- až 20% KD tvoří sója luštinatá
- kontaminace komponent KD mykotoxiny reálná
- ZEA + f-E stabilní



Vliv na organismus

- Somatické účinky
- Reprodukční aparát
- **Gamety**
 - Spermatogeneze
 - Vývodné pohlavní cesty
 - Samci
 - Samice



In vitro studie spermií

- Zearalenon + α – ZOL
 - inhibiční vliv (125 -250 μ M) (su)
 - vazba na zonu pellucidu
 - indukce akrozomální reakce
 - viabilita
 - variabilní výsledky
 - **motilita**
(20 – 31,4 μ M α -ZOL) (su)
- Genistein
 - inhibiční vliv
 - vazba na zonu pellucidu
(0,74 – 7,4 μ M GEN) (bo)
 - stimulační vliv (1-100 μ M GEN) (su)
 - indukce akrozomální reakce
 - viabilita
 - variabilní výsledky
 - Kapacitace (0,01 - 100 μ M GEN) (su)
 - **motilita** (1 – 100 μ M GEN) (su)

Nejasná spodní hranice účinnů



Hypotéza

- Zearalenon, α – zearalenol i genistein v nízkých dávkách omezují motilitu spermií kance
- Efektivita působení testovaných látek se bude lišit v poměru α – zearalenol > zearalenon > genistein



Cíl práce

- Ověřit hypotézy na modelu komerčních inseminačních dávek kančího ejakulátu v podmínkách *in vitro*
- Kriticky zhodnotit získané údaje o motilitě různými metodickými přístupy



Materiál a metody

- Spermata:
 - komerční inseminační dávky
(ProAgro, Nymburk a.s.)
 - minimální subjektivní motilita
 - >75%
- Chemikálie:
 - ZEA (Z2125, Sigma Aldrich s.r.o.)
 - α -ZOL (Z0166, Sigma Aldrich s.r.o.)
 - GEN (G6776, Sigma Aldrich, s.r.o.)
 - DMSO (D5789, Sigma Aldrich, s.r.o.)
- Testované koncentrace:
 - ZEA, α -ZOL, GEN
 - 0,5 μ M; 1 μ M; 2,5 μ M;
5 μ M; 10 μ M; 20 μ M
 - DMSO
 - 2 μ l/1ml semene
- Délka inkubace
 - 2 hod, 4 hod
- Termostabilní prostředí
 - 38°C



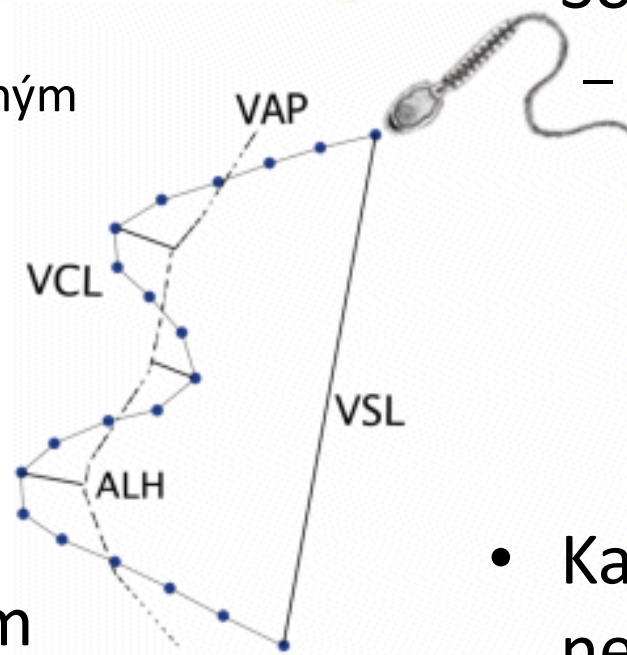
CASA – computer assisted sperm analysis

• Vybavení

- mikroskop s vyhřevným stolkem
- objektiv Ph 1 BM s negativním fázovým kontrastem
- kamera
 - 34,5 snímků/sec

• Kamerový záznam

- Leja® sklo
- 6 předdefinovaných polí
- časová smyčka 2 sec



• Software

- NIS – Elements 3.2 (Laboratory Imaging, Prague)
 - trajektorie a vlastnosti pohybu jednotlivých spermií
 - VCL, VSL, VAP, ALH, BCF
 - STR, WOB, LIN
- Kategorizace nepohyblivých spermií
 - $VAP \leq 10 \mu\text{m}/\text{sec}$

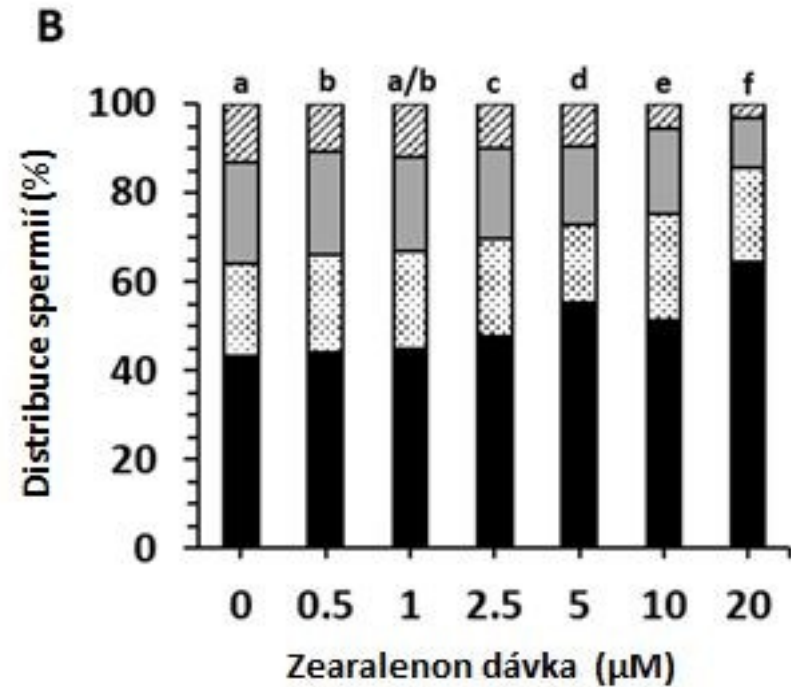
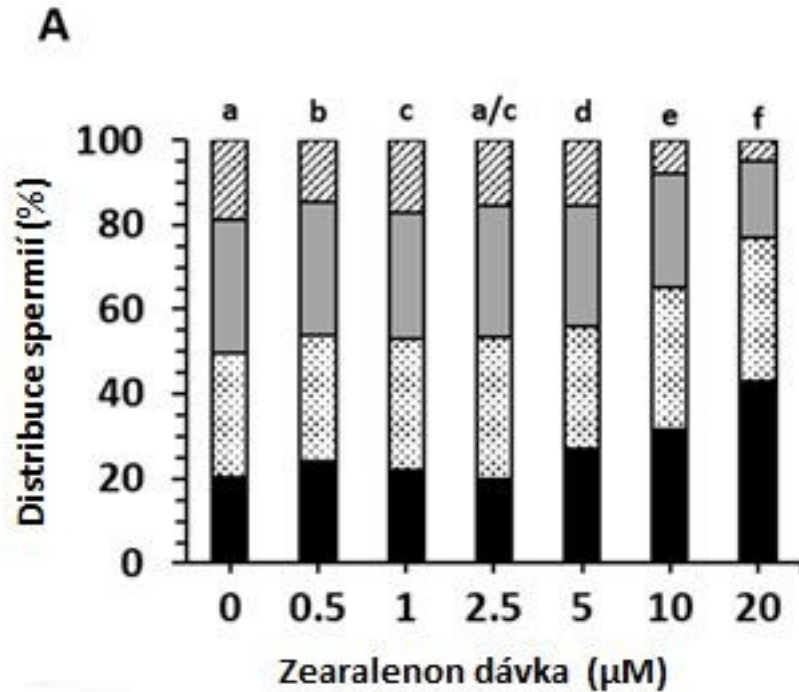


Statistické vyhodnocení

- Program Statistica
 - Střední hodnoty jednotlivých parametrů pohybu
 - Pouze motilní spermie
 - ANOVA
 - Schéffeův test
 - Clusterová analýza
 - K-means clustering
 - Eukleidovské vzdálenosti
 - VCL, VSL, VAP, ALH, BCF
 - Clustery: Rychlé, Středně rychlé, Pomalé (Průměr ± SEM)
 - » přidaná kategorie: Nepohyblivé
 - Chí kvadrát test



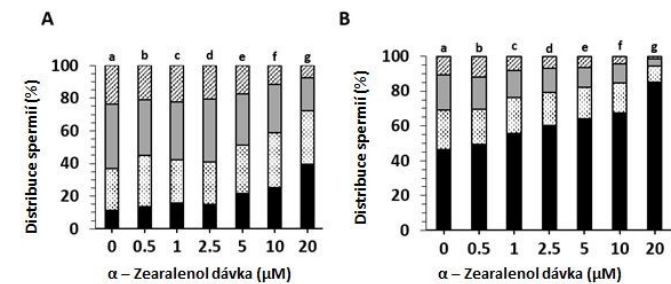
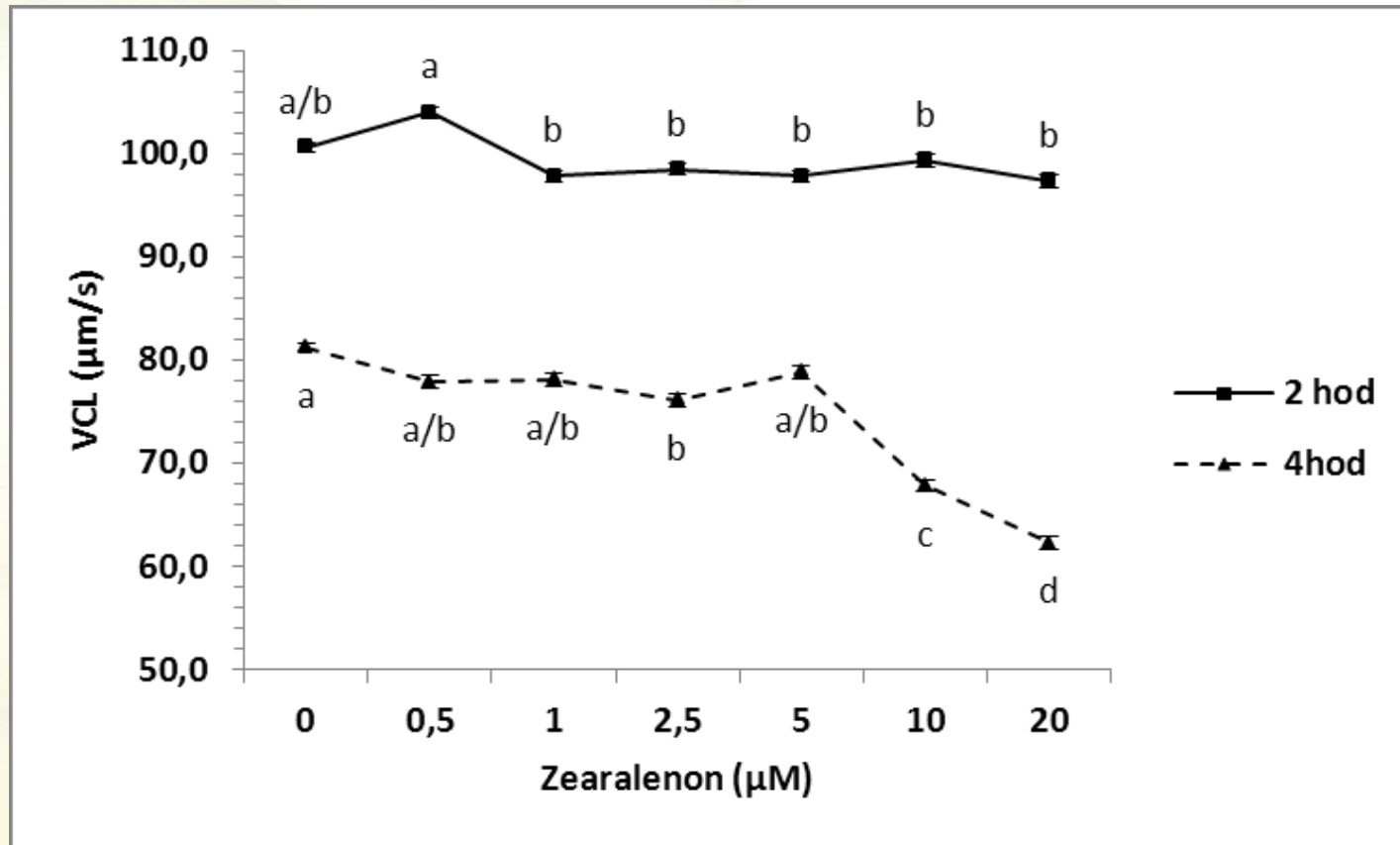
Zearalenon výsledky



A = 2 hod inkubace

B = 4 hod inkubace

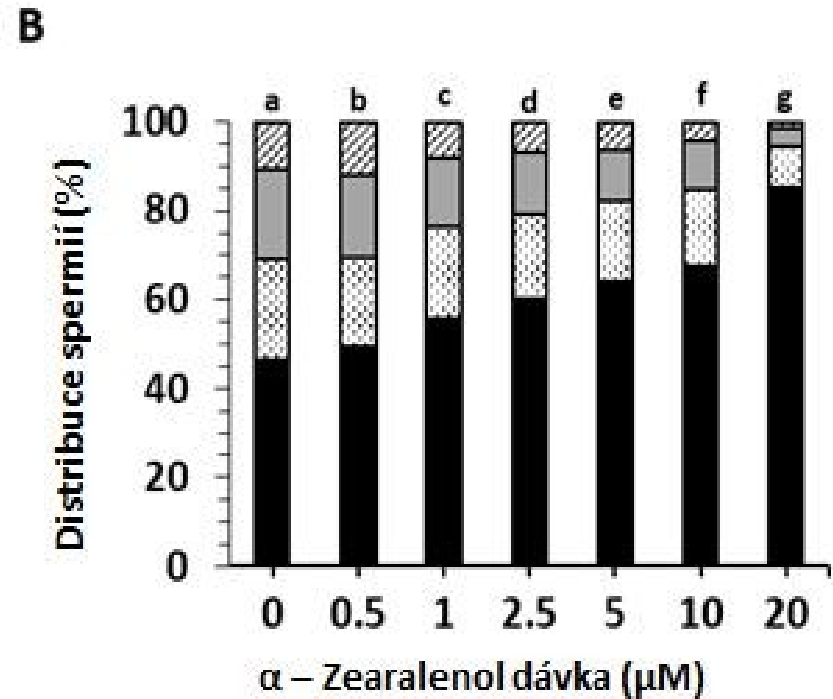
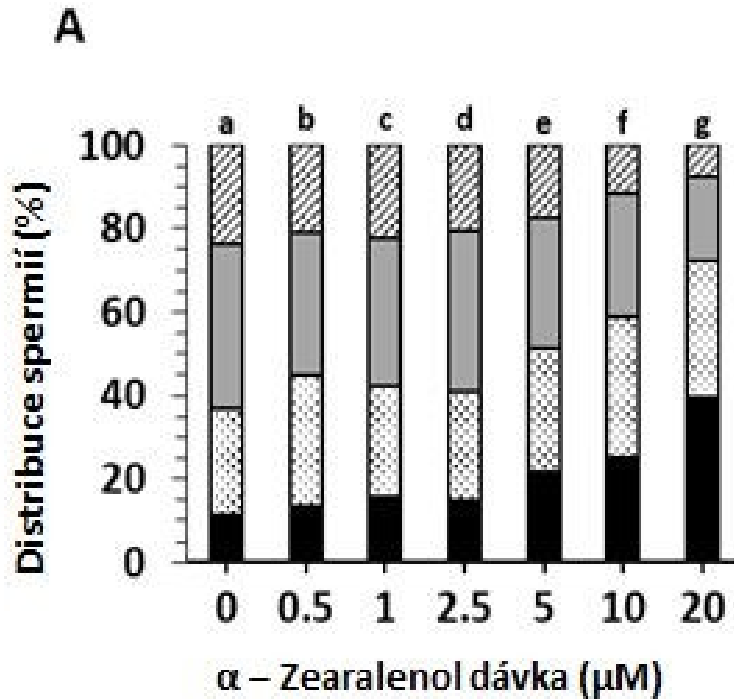
Zearalenon výsledky



Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů

α -Zearalenol výsledky

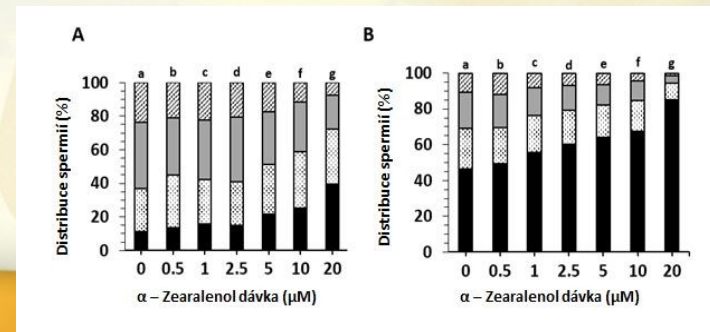
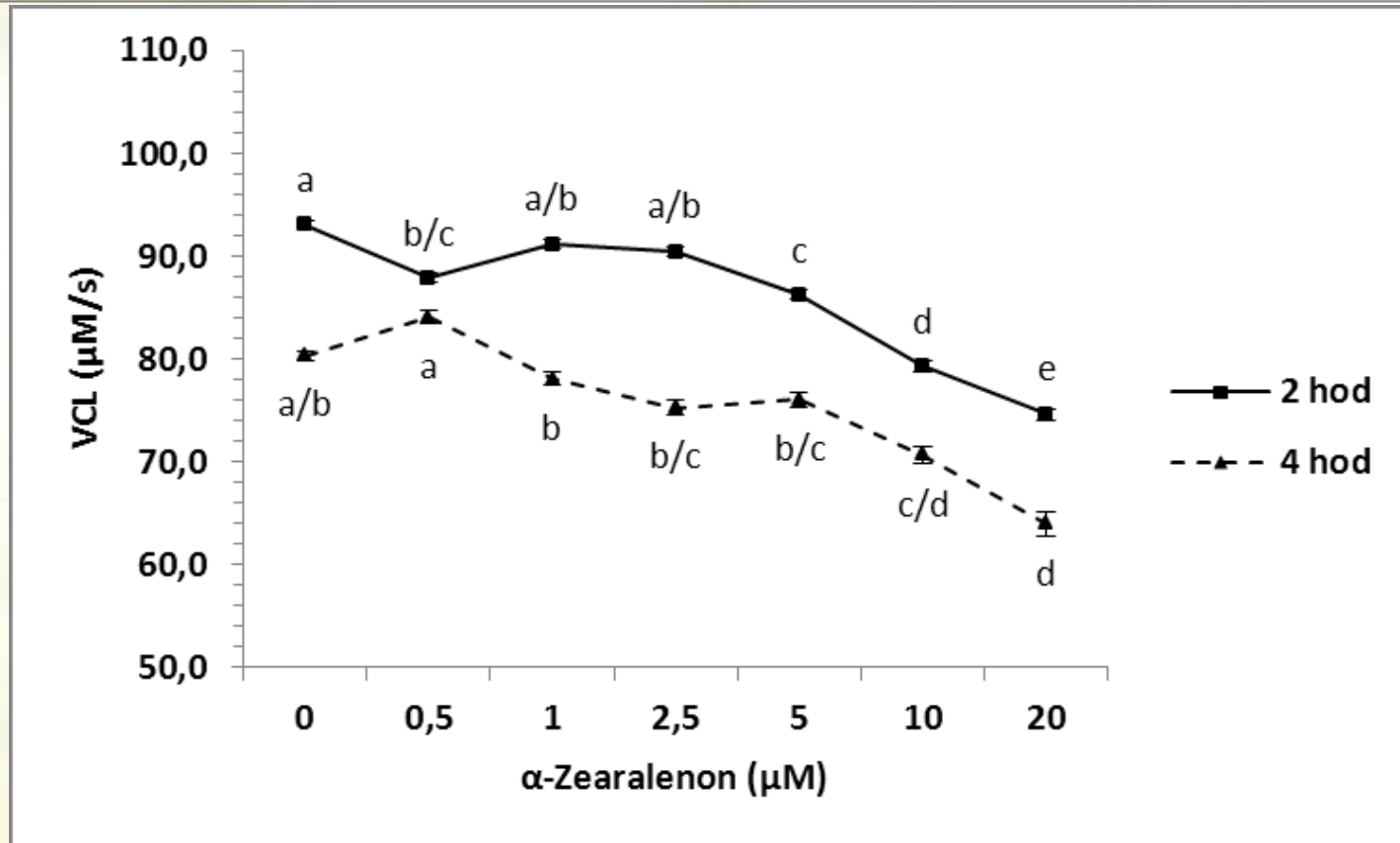


	Rychlé
	Středně rychlé
	Pomalé
	Nepohyblivé

A = 2 hod inkubace

B = 4 hod inkubace

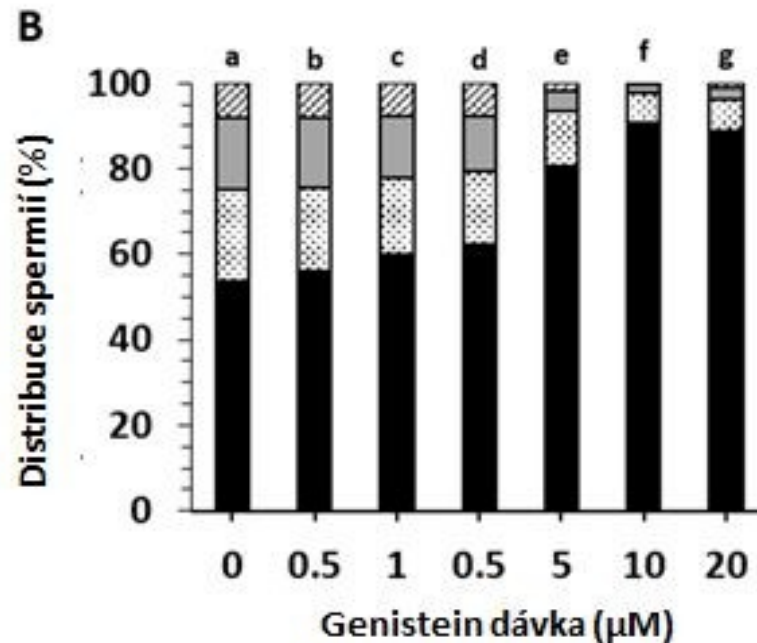
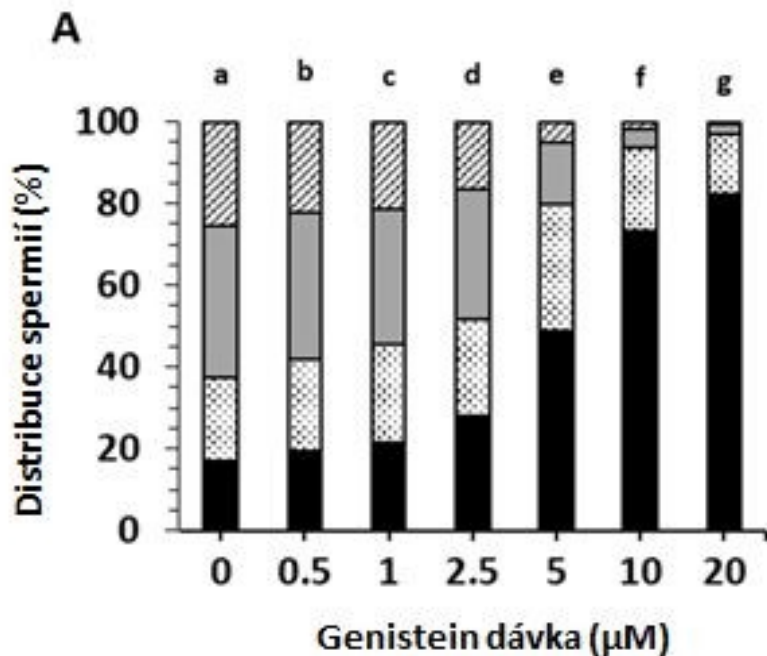
α -Zearalenol výsledky



Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů

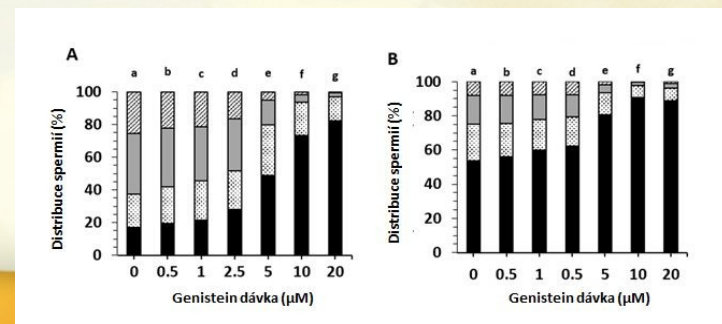
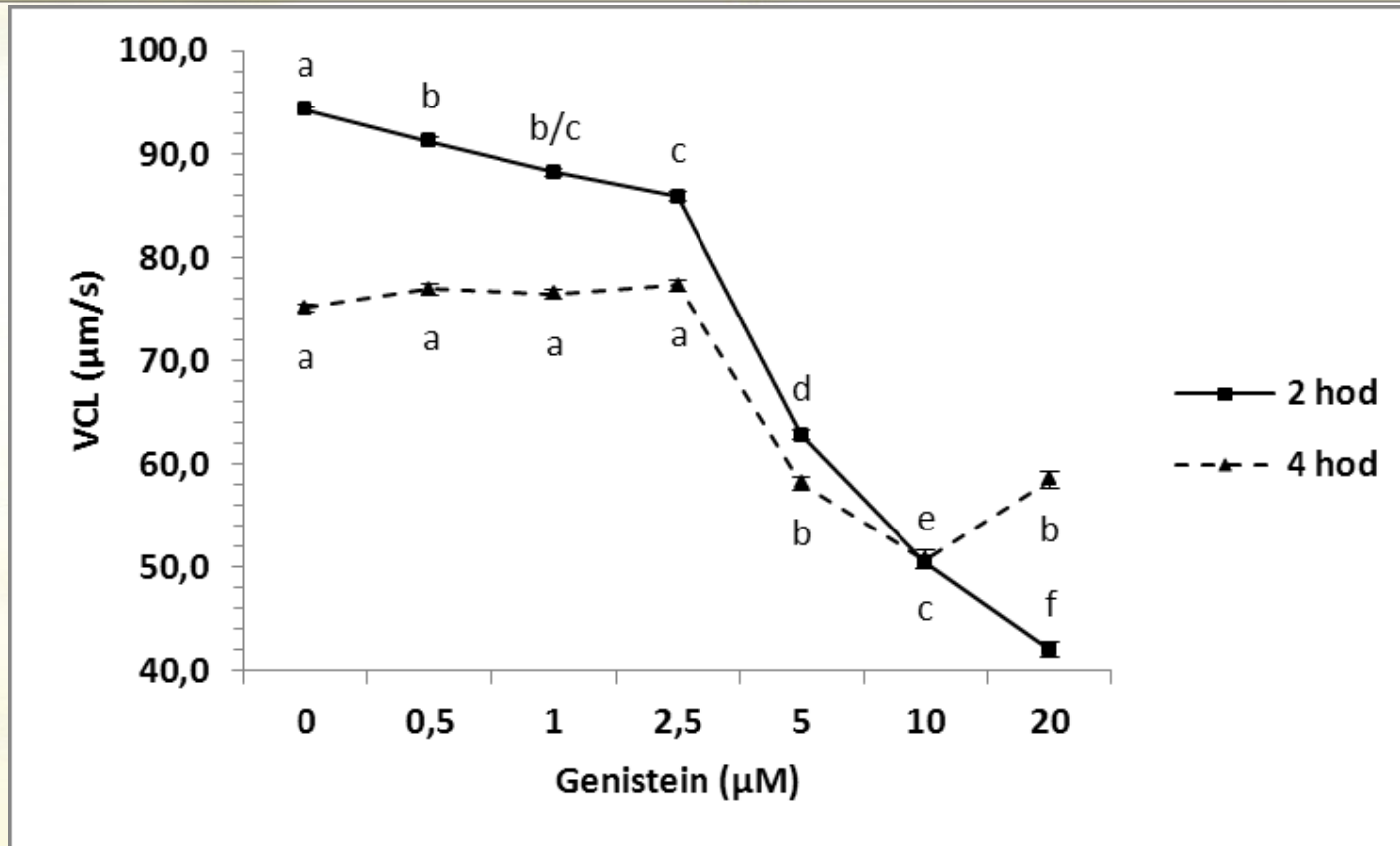
Genistein výsledky



A = 2 hod inkubace

B = 4 hod inkubace

Genistein výsledky



Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů

Diskuze

- ZEA, α -ZOL, GEN
 - Inhibice motility
 - 0,5 μ M - \uparrow 20 μ M
 - 2 hod – \uparrow 4 hod
 - \uparrow podílu nepohyblivých spermií
 - \downarrow pohybu motilních
- Síla účinku
 - GEN > α -ZOL > ZEA
- ZEA + α -ZOL
 - *in vivo* koncentrace
 - \downarrow hranice doposud pozorovaných účinků
- GEN
 - Silnější účinky než ZEA + α -ZOL
 - Literatura:
 - \downarrow % motility 0,001 – 100 μ M GEN 15 min inkubace (Oh et al., 2011)
 - \emptyset vliv % motility 1 – 100 μ M GEN 3hod inkubace (Kim et al., 2014)



Závěr

- Koncentrace dosažitelné *in vivo*
 - ZEA + α -ZOL
- GEN – nejpotentnější inhibitor motility spermií
- Clusterová analýza
 - Citlivější indikátor než střední hodnoty průměru pohybových parametrů
- Vliv rozpustnosti jednotlivých látek
- Nelineární vztah
 - Účinek x dávka





Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Děkuji Vám za pozornost



Seznam použitých citací

- Oh, S. – A., Park, Y. J., Song, W. – H., Mohamed, E. – S. A., Pang, M. – G. 2011. Effects of Estrogenic Xonibiotics on Boar Sperm Motility and Motion Kinematics. *Reprod. Dev. Biol.* 35(1): 47 – 54.
- Kim, T. – H., Yuh I. – S., Park, I. – Ch., Cheong, H. – T., Kim, J. – T., Park, Ch. – K., Yang, B. – K. 2014. Effects of Quercetin and Genistein on Boar Sperm Characteristics and Porcine IVF Embryo Developments. *J. Emb. Trans.* 29(2): 141 – 148.



Seznam použitých obrázků

- <http://www.labmaster.fi/products/tr-fia-kits/genistein-tr-fia.htm>
- http://www.ceresfarm.co.nz/fe_mycotoxins.htm
- http://www.ent.iastate.edu/imagegal/plantpath/corn/gibberella/gibberella_ear_rot.html
- https://www.google.cz/search?q=glycine+max&rlz=1C1AOHY_csCZ749CZ750&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwitqgHV4NbXAhVEKuwKHZ-DAm8Q_AUICigB&biw=1280&bih=933#imgrc=Z1SpoVn9lvQA_M:http://www.ceresfarm.co.nz/fe_mycotoxins.htm
- <http://www.pres2.com/benefits-of-soy/>
- <http://www.wired.com/dangerroom/2008/12/change-is-comin/>
- <http://www.few.vu.nl/~oostnbrk/>
- http://vsp.lf.dk/Viden/Foder/Foderkvalitet%20og%20fej/Svampetoksiner/Fusariumtoksiner_for_giftning.aspx?full=1
- <http://www.ansc.purdue.edu/swine/porkpage/repro/sp200204.htm>
- http://www2.warwick.ac.uk/fac/med/research/csri/reproductive_biology/oocyte/
- <http://www.vscht.cz/homepage/vc/index/vc2/obecne/software/statistica>
- http://www.itsnature.org/wp-content/uploads/2010/06/DXRTy7Pq1mfvwisofJEMk1qEo1_500.jpg
- http://www.micropticsl.com/eng_vet/products/sperm_analysis_sca_motility_concentration.htm

