ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín

Vliv vybraných environmentálních estrogenů na charakteristiky pohybu kančích spermií

Doktorská disertační práce

Autor práce: Ing. Adéla Krejcárková

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

2018

Poděkování

Děkuji svému školiteli doc. MVDr. Radko Rajmonovi, Ph.D. za vedení mé disertační práce a vytvoření přátelského pracovního prostředí.

Děkuji Ing. Petře Folkové, která významnou měrou přispěla ke vzniku této práce, nikdy neváhala pomoci či poradit a nenechala mě klesnout na mysli.

Děkuji všem ostatním kolegům a spolupracovníkům, kteří pomáhali vytvářet pohodovou a tvůrčí atmosféru.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří při mně vždy stáli a nikdy nepochybovali o zdárném zakončení mé cesty.

Obsah

1. Úvod....1
2. Literární rešerže....2
2.1. Estrogeny....2
2.2. Environmentální estrogeny....3
2.3. Zearalenon....5
2.4. Fytoestrogeny....10
2.5. Vliv na pohlavní aparát zvířat....17
2.5.1. Samice....17
2.5.2. Samci....23
2.6. CASA – computer assisted sperm analysis....33
2.6.1. Základní principy analýzy digitálního obrazu....34
2.6.2. Výstupy....35
2.6.3. Faktory ovlivňující výstupy analýzy....38
3. Hypotézy a cíle práce....39
4. Materiál a Metody....40
4.1. Chemikálie....40
4.2. Zvířata a odběr vzorků....40
4.3. Schéma experimentů....41
4.3.1. Analýza motility spermií....41
4.4. Statistická analýza....42
5. Výsledky....44
5.1. Experiment 1 (ZEA)....44
5.1.1. Hodnocení motility spermií na základě shlukové analýzy....44
5.1.2. Vliv na CASA parametry motility....46
5.2. Experiment 2 (α-ZOL)....47

5.2.1. Hodnocení motility spermií na základě shlukové analýzy 48
5.2.2. Vliv na CASA parametry motility 50
5.3. Experiment 3 (GEN) 52
5.3.1. Hodnocení motility spermií na základě shlukové analýzy 52
5.3.2. Vliv na CASA parametry motility 54
6. Diskuze 56
7. Závěr 61
8. Bibliografie 62

1. Úvod

V našem prostředí se vyskytuje řada látek, které mohou imitovat funkci endogenních hormonů a narušovat tak celkovou homeostázu organismu. Souhrnně se tyto látky nazývají endokrinní disruptory. Mimojiné se mezi ně řadí jak sojové fytoestrogeny tak zearalenon. Obě tyto sloučeniny jsou nesteroidní povahy a mají schopnost se vázat na estrogenové receptory v savčích buňkách a interferovat tak s hormonálním profilem organismu. Vzhledem k oblibě sojových šrotů ve výživě prasat a možné kontaminaci krmiv metabolitem plísní rodu *Fusarium spp.* – zearalenonem, je otázka dopadů jejich zkrmování stále aktuální. Díky estrogenní povaze obou těchto sloučenin dochází k ovlivnění zejména reprodukčních funkcí. Zatímco v případě zearalenonu jsou zaznamenané důsledky jeho ingesce převážně negativní, v případě konzumace sojových fytoestrogenů jsou výsledky méně jednoznačné. V závislosti na dávce byly pozorovány jak protektivní tak disruptivní účinky.

2. Literární rešerže

2.1. Estrogeny

Estrogeny představují jednu z hlavních skupin hormonů, které regulují reprodukční funkce a fertilizační procesy (Rosselli et al., 2000; Lazari et al., 2009) a hrají klíčovou úlohu v regulaci jak samičí tak samčí fertility (Gibson et Saunders, 2012). Disponují též širokou řadou biologických účinků na kardiovaskulární, muskulo – skeletární, imunitní a centrální nervový systém (Lazari et al., 2009). U obratlovců jsou estrogeny výhradně steroidními sloučeninami (Morito et al., 2001). Gray et al. (2016) uvádějí, že semenná plasma kanců obsahuje fyziologicky 92 pg 17β – estradiolu (E2)/ml, zatímco u prasnic koncentrace E2 ve folikulární tekutině kolísá mezi 8 – 300 ng/ml.

Estrogeny působí prostřednictvím vazby na své specifické receptory (ERs – estrogen receptors). Byly popsány dvě funkční isoformy ER a to ERα a ERβ, které jsou kódovány dvěma odlišnými geny (Luconi et al., 2002). Relativní exprese subtypů/ variant ER se liší mezi buňkami v různých tkáních, čímž dochází k různé odezvě na příslušné ligandy (Gibson et Saunders, 2012). Nejúčinějším přirozeným estrogenem je 17β – estradiol (Morito et al., 2001; Lazari et al., 2009; Lee et al., 2013; Marino et al., 2012). Další dva fyziologické estrogeny estron a estriol se sice váží na ER s vysokou afinitou, nicméně ve srovnání s E2 jsou mnohem slabšími agonisty (Lazari et al., 2009). Za normálních podmínek je ER buď bez ligandu, nebo má na sobě navázán svůj majoritní endogenní ligand (E2) (Branham et al., 2002). ER se váží nejen se steroidními, ale také s řadou nesteroidních sloučenin (Ososki et Kenelly, 2003).

ER patří do rodiny nukleárních hormonálních receptorů a působí jako ligandem aktivované jaderné transkripční faktory (Morito et al., 2001, Li et al., 2012). Po navázání estrogenu se z ER uvolní navázané heat shock proteiny, které ho udržují v inaktivním stavu, poté komplex ER – ligand interaguje prostřednictvím DNA vazebné domény se specifickými DNA sekvencemi pomocí aktivace nebo represe transkripce cílových genů (Luconi et al., 2002).

Vedle klasického genomického mechanismu působení, E2 indukuje buněčné změny nezávisle na ER transkripční aktivitě a to v podmínkách *in vivo* i *in vitro*. Tyto negenomické mechanismy jsou aktivovány rychle (tj. v řádech vteřin až minut) a jejich účinky vzdorují transkripčním a translačním inhibitorům (Acconcia et Kumar, 2006). Tato na ligandu

nezávislá aktivace může probíhat prostřednictvím kinázové kaskády a fosforylace ER (Mueller, 2004). Ačkoliv byly ER dlouhou dobu považovány za proteiny lokalizované v jádře, nedávné studie odhalily, že malá populace ER je exprimována na plazmatické membráně a hraje klíčovou úlohu v negenomických signalizačních dějích (Kang et al., 2010).

Li et al. (2012) ve své práci rozlišují tři hlavní mechanismy působení estrogenů. Klasický jaderný, genomický mechanismus, při kterém se komplex ligand – ER váže přímo na „estrogen responsive elements“ (ERE – palindromatická DNA sekvence); neklasický jaderný genomický mechanismus, při kterém ER interaguje s jinými transkripčními faktory a rychlý negenomický mechanismus, který aktivuje signální kaskády. Spolupráce mezi genomickými a negenomickými mechanismy je nezbytná pro pleiotropní účinek estrogenů v cílových tkáních (Marino et al., 2012). Předpokládá se, že vyjma ER existuje řada dalších proteinů, které mohou působit jako steroidní receptory (Levin, 2011).

V případě působení estrogenů skrze plasmatickou membránu, jsou popisovány tři hlavní modely: První zahrnuje klasické ER lokalizované na plasmatické membráně, druhý odlišné isoformy klasických ER a třetí estrogenové receptory s odlišnou strukturou od klasických ER (Ropero et al., 2006).

Vedle E2 je ligand vazebná doména ER schopná posloužit řadě přirozených i syntetických látek. Řada těchto sloučenin působí na transkripční aktivitu ER agonisticky nebo antagonisticky díky své schopnosti modifikovat interakce mezi estrogenovými receptory a transkripčními koagulátory (Marino et al., 2012). „Promiskuita“ estrogenových receptorů v akceptování řady různých ligandů může být dána jejich charakterem evolučně nejprimitivnější verze ligandem aktivovaných regulačních proteinů (Watson et al., 2007). Nicméně za normálních podmínek jsou pouze 2 - 3% E2 tzv. bioaktivní, zbytek je navázán na androgen binding protein (ABP) (West et al., 2005).

2.2. Environmentální estrogeny

Environmentální estrogeny jsou sloučeniny přítomné v prostředí, které mohou imitovat a v některých případech potlačovat účinky endogenních estrogenů (Belcher et Zsarnovszky, 2001) a mohou být jak přirozeného tak syntetického původu (Burow et al., 1999). Tyto sloučeniny se obvykle dělí do dvou kategorií fytoestrogeny a xenoestrogeny (Belcher et Zsarnovszky, 2001; Rosselli et al., 2000).

Fytoestrogeny tvoří skupinu přirozeně se vyskytujících sloučenin s estrogenní aktivitou a jsou přítomny v rostlinách, popř. pocházejí z bakteriálního nebo fungálního metabolismu prekurzorových sloučenin rostlin (Belcher et Zsarnovszky, 2001), zatímco xenoestrogeny jsou člověkem syntetizované chemické molekuly uvolňované do prostředí. Výčet sloučenin patřících do skupiny estrogenům podobných chemikálií je velký a zahrnuje pesticidy, herbicidy, ftaláty, organická rozpouštědla a léčiva (Rosselli et al., 2000).

Tyto látky mají estrogenní a/nebo antiestrogenní účinky a mohou interferovat s endokrinním systémem (Mueller, 2004), svou strukturou se podobají 17β – estradiolu (Rosselli et al., 2000). Tyto sloučeniny vykazují široké spektrum strukturální diverzity, Nadal et al. (2000) uvádějí, že se jejich chemická stavba nemusí nutně podobat struktuře steroidních hormonů. Nicméně všechny mají lipofilní benzenová jádra a další hydrofobní komponenty (Watson et al., 2007).

Environmentální estrogeny tvoří významnou skupinu tzv. endokrinních disruptorů (Burow et al., 1999; Shemes et Shore, 2012), které byly U.S. Environmental Protection Agency definovány jako exogenní látky, které zasahují do syntézy, sekrece, transportu, metabolismu, vazebné aktivity nebo eliminace přirozených hormonů, které jsou přítomny v těle a jsou zodpovědné za homeostázu, reprodukční a vývojové procesy (Cederroth et al., 2010). Endokrinní disruptory mohou ovlivňovat reprodukční zdraví zvířat buď přímým působením na gonády nebo skrze hypotalamo – hypofyzární systém (Majdič, 2010). Nejdominantnější endokrinní disruptory zasahující do reprodukce a pohlavní diferenciace mají buď estrogenní nebo antiestrogenní účinky (Wuttke et al., 2010).

Endokrinní disruptory interferují s funkcemi hormonální soustavy třemi následujícími způsoby: Napodobováním působení přirozeně produkovaných hormonů, jako jsou estrogeny nebo testosteron, prostřednictvím vazby na jejich receptory; blokací receptorů v cílových buňkách těchto hormonů, čímž zabraňují působení přirozených hormonů nebo narušením syntézy a funkcí hormonálních receptorů a modifikací syntézy, transportu, metabolismu a exkrece hormonů (Ropero et al., 2006).

Sloučeniny, které vykazují estrogenní účinky, mohou pracovat různými způsoby. Mohou působit přes ER v buněčném jádře, kde mohou přímo zasahovat do exprese genů prostřednictvím vazby na DNA nebo mohou působit přes ER na povrchu buňky a spouštět tak kaskády chemických signálů (specifické ionty, lipidy, cyklické nukleotidy apod.), které

pronikají skrze sérii kináz a fosfatáz kontrolujících jejich případné cíle prostřednictvím regulace jejich fosforylační úrovně (Watson et al., 2011).

Expozice estrogenním a antiestrogenním chemikáliím může ovlivňovat pohlavní diferenciaci, poměr pohlaví potomků, vývoj gonád (velikost, morfologie, váha), vývoj pohlavních orgánů (produkci sekretů), sekundární pohlavní znaky (svaly, tělesná hmota, vlasy/ochlupení apod.), pohlavní vývoj a zrání (sestup varlat, vývoj bradavek, prepuciální separaci, anogenitální vzdálenost apod.), oplozeníschopnost, plodnost (velikost vrhu a počet vrhů), dobu páření, páření a pohlavní chování, ovulaci, říjový cyklus, délku březosti, aborty, koncentraci androgenů a estrogenů, patologii reprodukční tkáně, histopatologii reprodukční tkáně, anomálie pohlavního aparátu, malformace pohlavního aparátu, životaschopnost plodu a potomstva, růst (tělesná hmotnost) plodu a potomstva (Rosselli et al., 2000).

Environmentální estrogeny mohou v jedné tkáni působit agonisticky, zatímco v jiné antagonisticky. Většina z nich jsou slabí tzv. částeční agonisté (např. inhibitory ER účinků) (Mueller, 2004). Vůči ER mají velmi slabou vazebnou afinitu, obvykle v mikromolárním množství a nejméně 10 000x nižší než je afinita E2 k ER (Marino et al., 2012).

2.3. Zearalenon

Zearalenon (ZEA) je nesteroidní estrogenní mykotoxin, který je biosyntetizován prostřednictvím plísní rodu *Fusarium*, včetně *F. gramminearum* (*Giberella zeae*), *F. culmorum, F. cerealis, F. equiseti, F. crookwellense* a *F. semitectum* (Zinedine et al., 2007; Minervini et Dell´Aquilla, 2008; Benzoni et al, 2008), které jsou běžnými půdními plísněmi v mírných a teplých oblastech (Zinedine et al., 2007; Milićević et al., 2010) a jsou významnými patogeny rostlin, které mohou proliferovat jak před sklizní tak po ní (Whitlow et al., 2002). Kanora et Maes (2009) uvádějí, že mezi hlavní producenty ZEA patří *F. graminearum* a *F. culmorum.*

Tato plíseň napadá řadu důležitých plodin jako je kukuřice, pšenice, čirok, žito a oves (Benzoni et al., 2008; Agag, 2004), v menší míře pak rýži a proso (Zinedine et al., 2007). Kanora et Maes (2009) označují za nejčastěji napadané plodiny kukuřici a pšenici. Toxické produkty mohou být detekovány i v cereálních produktech jako je mouka, slad a sojové boby (Zinedine et al., 2007). ZEA se přirozeně vyskytuje v místech s vysokou vlhkostí a nízkými teplotami (10 – 15°C), přičemž teplota 12 – 14°C je vyžadována pro signifikantní formaci ZEA, nicméně k jeho produkci dochází i při teplotách nižších než 10°C, dokonce může

nastávat i při teplotách pod bodem mrazu (Agag, 2004). Gromadzka et al. (2008) uvádějí, že nejvyšší množství ZEA bylo pozorováno při teplotách nižších než je 25°C s vysokou amplitudou denních teplot a při relativní vlhkosti vzduchu 16%. Nicméně dle Agag (2004) *Fusarium graminearum* vyžaduje ke svému růstu na obilných zrnech minimální vlhkost 22 – 25% a dodává, že v obilí se akumuluje vysoký podíl ZEA během skladování zrn napadených *Fusariem*, které nebyly dostatečně vysušeny nebo u zrn skladovaných ve vlhkém prostředí (např. kukuřice skladovaná při vlhkosti > 22%), to potvrzují i Whitlow et al. (2002), kteří ve své práci uvádějí, že hromadění ZEA v kukuřici je aktivizováno relativní vlhkostí 22 – 25%, jako další faktory zmiňují prodlouženou sklizeň. Množství akumulovaného ZEA je dále ovlivněno vegetačním obdobím, substrátem a druhem houby (Gromadzka et al., 2008), přičemž jeho produkce je zesílena faktory jako je vlhkost substrátu (10 – 20%), relativní vlhkost vzduchu (≥ 70%) a přístup kyslíku (Kanora et Maes, 2009)

Milićević et al. (2010) uvádějí, že vysoce kontaminované plodiny jsou často součástí zvířecích krmiv. Koncentrace ZEA pak může kolísat od několika mikrogramů po 276 mg/kg v závislosti na geografické poloze a klimatických podmínkách (Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007). Bhat et al. (2010) uvádějí, že ZEA společně s vomitoxinem patří mezi hlavní mykotoxiny ve Východní Evropě. Binder et al. (2007) hodnotili výskyt ZEA ve Střední Evropě a průměrná kontaminace dosahoval hodnoty 273 μg/kg s maximální koncentrací 1392 μg/kg, která byla zaznamenána u vzorku kukuřice. Z celkového objemu vzorků vykazovalo kontaminaci 44%. Během oficiální monitorovací studie v Německu byla zaznamenána kontaminace ZEA u více než 60% kukuřice a 20 – 40% u ostatních obilovin a krmiv (Döll et Dänicke, 2011).

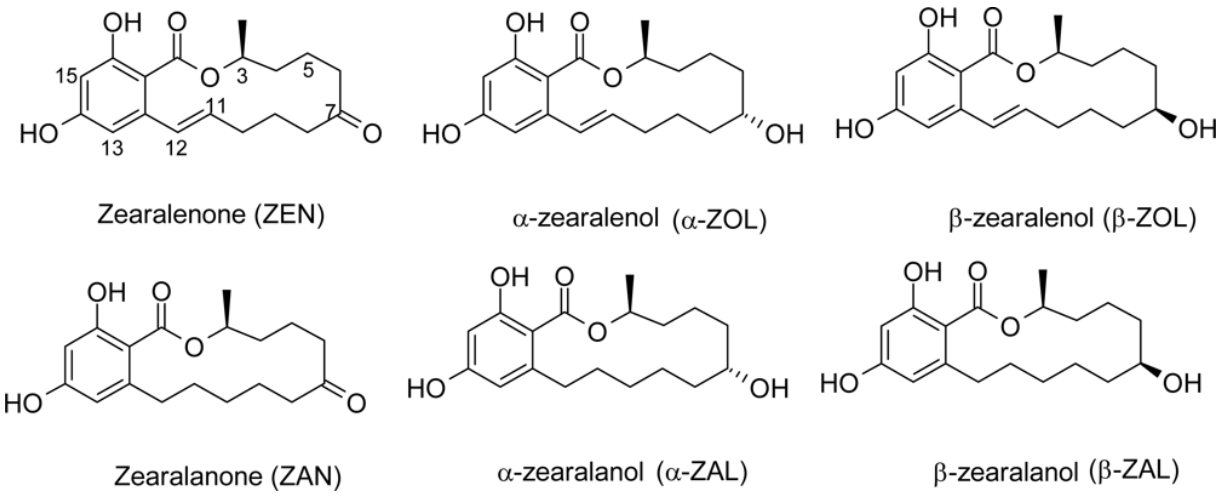
ZEA je stabilní a není degradovatelný běžnými zpracovatelskými postupy (Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007; Gromadzka et al., 2008; Schoevers et al., 2012). ZEA je po konzumaci rychle absorbován (Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007; Metzler et al., 2010, Zinedine et al., 2007), po podání 10 mg ZEA/ kg ž. hm. *per os* je vstřebáno zhruba 80 – 85% (Agag, 2004; Gromadzka et al., 2008, Zinedine et al., 2007).

Prasata jsou považována za nejcitlivěji reagující druh hospodářských zvířat (Benzoni et al., 2008; Fink – Gremmels et Malakinejad, 2007; Agag, 2004; Bhat et al., 2010). Citlivost k estrogenním účinkům ZEA je dána druhově specifickou biotransformací (Benzoni et al., 2008). U zvířat existují dvě hlavní biotransformační dráhy a to hydroxylace a konjugace s kyselinou glukuronovou. Při hydroxylaci dochází k redukci keto skupiny C – 6´, což vede

k přeměně ZEA na stereoizomery α - zearalenol (α – ZOL) a β – zearalenol (β – ZOL), další redukce dvojné vazby C11 – C12 vede k přeměně na stereoizomery α – zearalanol (α – ZAL) a β – zearalanol (β – ZAL) (obr. 1), které jsou však produkovány minoritně. *In vivo* byly pozorovány u skotu a ovcí (Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007). Tyto redukce jsou katalyzovány 3 – α(β -) – hydroxysteroid dehydrogenázou (HSD). U prasat dochází k hydroxylaci ZEA v játrech a intestinální mukóze (Metzler et al., 2010; Benzoni et al., 2008; Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007), nicméně biotransformace ZEA na α – ZOL byla u prasete zaznamenána i v granulózních buňkách (Minervini et Dell´Aquilla, 2008).

Druhou biotransformační dráhou je konjugace ZEA a jeho metabolitů s glukuronovou kyselinou, která je katalyzována uridin difosfát glukuronyl transferázou (UDPGT) (Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007; Minervini et Dell´Aquilla, 2008; Zinedine et al., 2007), prasata ve srovnání se skotem vykazují nízkou expresi UDPGT (Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007). Po ingesci ZEA v krmivu dochází ke kompetici mezi hydroxylačními a konjugačními reakcemi (Malekinejad et al., 2006).

Obr.1: Zearalenon a jeho metabolity



Převzato z: http://www.mdpi.com/1422-0067/10/4/1824/htm

Následkem glukuronace může dojít buď k přímému vyloučení močí a výkaly (Agag, 2004) následkem dokončení pre – systematické eliminace (Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007) nebo k vyloučení do žluče (Gromadzka et al., 2008; Metzler et al., 2010) a následné hydrolýze ve střevě, reabsorpci, vstupu do jater a systémové cirkulace (Gromadzka et al.,

2008). Obsáhlá enterohepatální cirkulace ZEA a jeho metabolitů zpomaluje exkreci a prodlužuje u prasat poločas rozpadu tohoto mykoestrogenu (Metzler et al., 2010; Gromadzka et al., 2008). U prasnic dochází ve sliznici střeva k velmi aktivní glukuronidové konjugaci se ZEA, která je zhruba 30x vyšší oproti redukovaným metabolitům (Minervini et Dell´Aquilla, 2008).

Zatímco alfa hydroxylace vede k nárůstu estrogenní potence ZEA, glukuronidace způsobuje jeho inaktivaci (Kanora et Maes, 2007), druhově specifický poměr α – hydroxylace společně s glukuronidační kapacitou určuje druhově specifickou vnímavost k ZEA (Fink – Gremmels et Malekinejad). Ve srovnání s ostatními druhy mají prasata nízkou schopnost glukuronidace (Kanora et Maes, 2009; Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007) a ZEA konvertují především na α – ZOL (Minervini et Dell´Aquilla, 2008; Gromadzka et al., 2008). Zajímavé je, že nízká dávka ZEA vede u prasnic k vyšší koncentraci ZEA a α – ZOL v krevní plazmě než u samců při stejné dávce (Benzoni et al., 2008).

Zöllner et al. (2002) se ve své studii zabývali koncentrací ZEA a jeho metabolitů v moči, játrech a svalové tkáni prasat, přičemž analýza vzorků moči prasat odhalila, že zhruba 60% ZEA bylo přeměněno na α – ZOL a β – ZOL v poměru 3:1, α – ZAL a β – ZAL byly detekovány pouze ve stopovém množství. Naproti tomu vzorek jater obsahoval především α – ZOL a v menším množství β – ZOL a ZEA. Poměr α – ZOL/β – ZOL byl 2,5 :1, α – ZAL a β – ZAL nebyly vůbec detekovány. Stupeň glukuronidace byl v případě ZEA v moči 27% a v játrech 62%, u α – ZOL byl v moči 88% a játrech 77% a v případě β – ZOL byl v moči 94% a v játrech 29%. Analýza svalové tkáně odhalila relativně vysoké množství neglukuronidovaného α – ZAL a α – ZOL společně se stopovým množstvím β – ZAL a ZEA, což indikuje, že metabolismus ZEA a jeho derivátů se neomezuje pouze na hepatální a gastrointestinální metabolické dráhy.

ZEA je v organismu rozsáhle distribuován a z tkání je eliminován pomalu (Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007). Množství detekovatelného ZEA ve zvířecích tkáních závisí na kontaminaci krmiva, způsobu podání ZEA popř. α – ZOL, době expozice a perzistenci ZEA v organismu zvířete (Agag, 2004).

U prasat po podání ZEA bylo nalezeno 45% z podané dávky v moči během prvních 48 hod, 22% bylo objeveno ve výkalech a celkové akumulované množství nalezené v moči a výkalech po 48 hod bylo 67% (Agag, 2004).

ZEA má chemickou strukturu laktonu kyseliny resorcylové, což mu umožňuje pasivně procházet buněčnými membránami a vázat se na receptory E2 v cytosolu a vytvářet komplex ZEA – ER (Kanora et Maes, 2009; Whitlow et al., 2002), aktivovat expresi iniciačních proteinů a tím způsobit vyšší aktivitu RNA – polymerázy I a II v jádře (Agag, 2004), čímž dochází ke kompetici s E2 o vazebná místa na ER a následné deregulaci estrogenních efektů (Döll et Dänicke, 2011). Stejně tak jeho metabolity vykazují dostatečnou strukturální similaritu s E2 a jsou tak schopné aktivovat ER (Frizzel et al., 2011). ZEA a jeho metabolity mohou regulovat hormonální aktivitu jak na receptorové úrovni, kde působí jako agonisté/ antagonisté, tak na pre – receptorové úrovni (Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007), kde interagují se steroidogenními enzymy (Schoevers et al., 2012; Benzoni et al., 2008). ZEA a jeho deriváty pracují jako kompetitivní agonisté/ antagonisté na obou typech ER, nicméně při experimentech s buňkami transfekovanými humánním ERα a ERβ se ukázalo, že ZEA je plným agonistou pro ERα, zatímco pro ERβ je jen částečným agonistou (Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007; Frizzel et al., 2011). Na rozdíl od fytoestrogenů ZEA a jeho deriváty působí jako čistí agonisté estrogenu a nedochází u nich k signifikantní vazbě na jiné receptory steroidních hormonů, jako jsou např. androgenový nebo progesteronový receptor (Metzler et al., 2010) a jeho afinita vůči SHBG (steroid hormon binding protein) je nízká (5% vs 100% E2) (Minervini et al., 2005), což zvyšuje jeho dostupnost z krve pro buněčné ER (Metzler et al., 2010).

ZEA vykazuje silně estrogenní a anabolické účinky (Sukevičiene et al., 2009) a svým estrogenním potenciálem odpovídá nejsilnějšímu fytoestrogenu – kumestrolu (Metzler et al., 2010), Gromadzka et al. (2008) dokonce uvádějí, že estrogenní potenciál ZEA je několikanásobně vyšší než u ostatních environmentálních estrogenů. Estrogenní aktivita se mezi mateřským ZEA a jeho metabolity liší. Zatímco α – ZOL je 10 x silnější než ZEA, tak naopak β – ZOL je slabší (Agag, 2004) Metzler et al. (2010) uvádějí, že až 50x. Nicméně vazba ZEA na ER v cílových tkáních je menší než 1 – 10% estradiolu zatímco α – ZOL vykazuje silnější vazbu a β – ZOL naopak slabší (Minervini et Dell´Aquila, 2008; Frizzel et al., 2011). Na rozdíl od fytoestrogenů se ZEA a jeho deriváty váží bezpreferenčně na oba subtypy ER (Metzler et al., 2010), ale liší se vzájemně svou relativní vazebnou afinitou, přičemž α – ZOL má nejvyšší vazebnou afinitu 43% vs 100% E2, v případě ZEA jsou to pouze 2% vs 100% E2 a v případě β – ZOL dokonce jen 0,2% vs 100% E2 (Frizzel et al., 2011). Proto konverze ZEA na α – ZOL může být považována za bioaktivační, zatímco konverze na β – ZOL za inaktivační (Malekinejad et al., 2006).

Vyjma estrogenních účinků vykazuje ZEA hepato - , hemato -, imuno – a genotoxické vlastnosti (Gromadzka et al., 2008; Devreese et al., 2013), v případě kultivovaných buněk byly popsány i cytotoxické účinky ZEA a α – ZOL (Metzler et al., 2010). V případě hepatotoxických vlastností byly *in vivo* zaznamenány změny v úrovni aspartát aminotransferázy, alanin aminotransferázy, alkalické fosfatázy, sérového kreatininu a bilirubinu (Gromadzka et al., 2008; Devreese et al., 2013), ZEA dále potlačuje metabolismus sérového albuminu a syntézu cholesterolu (Sutkevičiene et al., 2009) a zhoršuje hematokrit (Devreese et al., 2013). V případě genotoxických účinků byla demonstrována indukce DNA fragmentace, produkce micronucleí a chromosomální aberace (Parveen et al., 2009). Stopper et al. (2005) ve své studii pozorovali nárůst mikronukleí ve V79 buňkách od koncentrace ≥10 μM respektive ≥5 μM. Zajímavé je, že tento účinek byl snížen po adici daidzeinu. V rámci negenomického působení mohou sloučeniny ZEA spustit rychlou aktivaci Erk1/2 během 5 minut (Parveen et al., 2009).

2.4. Fytoestrogeny

Fytoestrogeny jsou polyfenolické nesteroidní sloučeniny, které se ubikvitně vyskytují v potravinách rostlinného původu a mohou mít širokou řadu biologických účinků u řady buněčných systémů *in vivo* i *in vitro* (Dusza et al., 2006) a mohou mít na řadu základních reprodukčních i vývojových procesů jak disruptivní tak potenciálně prospěšný charakter (Whitten et Patisaul, 2001). Fytoestrogeny se v rostlinách syntetizují z fenylpropanoidů a jednoduchých fenolů (Tapiero et al., 2002), obsah v rostlině pak závisí na kultivaru a lokálních podmínkách jako jsou teplota, srážky, načasování sklizně, úrodnost půdy, škůdci a nemoci. Jejich účinky závisí na typu fytoestrogenu, přítomnosti nebo absenci ER, stavem receptoru a typem cílové tkáně nebo buňky (Benassayag et al., 2002; Tapiero et al., 2002). Dusza et al. (2006) dále uvádějí, že jsou jejich účinky ovlivněny druhem zvířete, způsobem podání, dávkou a expoziční dobou. Jedna rostlina může být zdrojem řady fytoestrogenů (Rosselli et al., 2000; Murkies et al., 1998). Ingesce vysokých dávek fytoestrogenů u zvířat vede k relativně konstatním negativním účinkům na reprodukci, přičemž tyto účinky jsou výraznější u samic než u samců (Benassayag et al., 2002).

Rozdělení a klasifikace fytoestrogenů se mezi jednotlivými autory značně liší. Nejobsáhleji dělí fytoestrogeny Benassayag et al. (2002) a to na isoflavonoidy, flavonoidy, stilbeny, lignany, kumestany a mykotoxiny. Další autoři ve svých pracech tyto dílčí skupiny různě eliminují a přeskupují, popř. se liší v jejich koncovkách. Např. Dusza et al. (2006) a

Dixon (2004) dělí fytoestrogeny na isoflavonoidy, flavonoidy, stilbeny a lignany, Jefferson et al. (1998) je dělí na isoflavony, flavony, stilbeny a lignany. Ososki et Kenelly (2003) a Murkies et al. (1998) je dělí na isoflavony, kumestany a lignany, zatímco Tamaya (2005) na isoflavony, mykotoxiny a kumestany.

Nicméně výše zmínění autoři se vesměs shodují, že mezi nejvýznamější a nejstudovanější skupinu fytoestrogenů patří isoflavony, kterých je známo přes 1000 druhů a jsou obsaženy zejména v luštěninách (hrách, čočka, fazole), sóje, bobech, jeteli a vojtěšce (Vrzáňová et Heresová, 2004). Nejbohatším zdrojem je sója luštinatá (*Glycine max)* (Moravcová et Kleinová, 2002; Jefferson et al., 2012), která je v krmných dávkách prasat obsažena až z 20% (Zeman et al., 2006) a je hlavním zdrojem exogenních estrogenů u zvířat i lidí (Ososki et Kenelly, 2003). Sojové boby obsahují 560 – 3810 mg/kg isoflavonů v závislosti na druhu a podmínkách růstu (Moutsatsou, 2007), přičemž jeden gram rozdrcených sojových chipsů obsahuje téměř 800 μg daidzeinu a přes 500 μg genisteinu (primárně jako glykosidů) (Dixon, 2004).

Mezi přirozeně se vyskytující isoflavony s estrogenní aktivitou patří aglykony daidzein (DAI) (4´, 7´ - dihydroxyisoflavon) a genistein (GEN) (4 ´, 5´, 7´-trihydroxyisoflavon) (obr. 2) (Ososki et Kenelly, 2003), přičemž genistein je považován za biosynteticky nejjednodušší isoflavon (Dixon, 2004).

Obr. 2: Chemická struktura genisteinu a daidzeinu

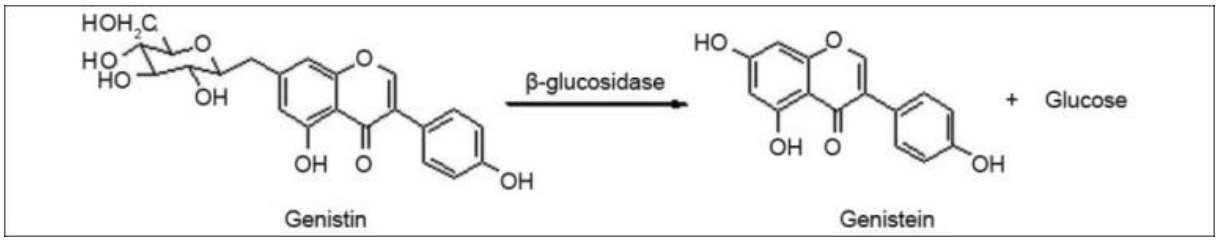
Převzato z: http://www.soyselect.info/soy-isoflavones/

Kim et al. (2012) uvádějí, že GEN + DAI a jejich konjugáty představují >65% všech isoflavonů. Nicméně aglykony se v rostlinných tkáních vyskytují zřídka a v nízké koncentraci, naopak jsou tam hojně zastoupeny jejich glykosidické konjugáty (Vacek et al., 2008), které obsahují glukózu nebo nadpoloviční podíl karbohydrátu (Retana – Márquez et

al., 2012). V případě sojových fytoestrogenů se jedná o konjugáty genisteinu tj. genistin a 6 – *o* – malonyl genistin a daidzeinu tj. daidzin a 6 – *o* – malonyl daidzin. Genistin (55 – 65%) a daidzin (30 – 35%) tvoří nejvyšší podíl isoflavonů v sóje, ve zbylých méně než 10% se nachází glycitin, glycitein, biochanin A a formononetin (Jefferson et al., 2012). Přičemž biochanin A a formononetin mohou být jako 4´- methylethery genisteinu a daidzeinu v těle metabolizovány na genistein a daidzein (Ososki et Kenelly, 2003).

Po ingesci jsou isoflavonové glykosidy hydrolyzovány prostřednictvím bakteriální β – glykosidázy ve střevní stěně (Cederroth et Nef, 2009) a v aktivní sloučeninu se přemění až po odnětí cukerného zbytku (Obr. 3) (Retana – Márquez et al., 2012). Konverze na jejich příslušné aglykony umožňuje jejich absorpci trávicím traktem (Cederrot et al., 2010) a činí je biologicky aktivními.

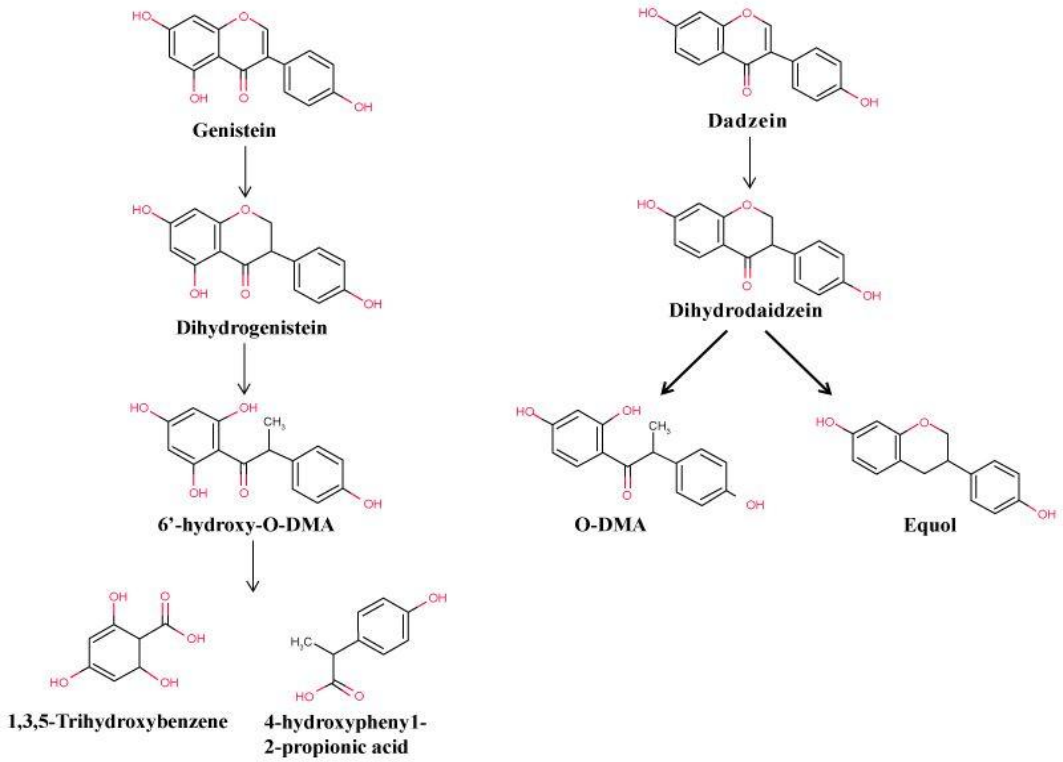
Obr. 3: biotransformace genistinu na genistein



Převzato z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3267303/figure/F1/

Mezi faktory, které mohou ovlivňovat biologickou dostupnost isoflavonů patří složení střevní mikroflóry, potravní matrix, velikost podané dávky, doba průchodu střevním traktem a vlastní chemické složení isoflavonů (Cederrot et Nef, 2009). Isoflavonové aglykony jsou transportovány z tenkého střeva do krve, popř. jsou přímo ve střevě dále metabolizovány (Pilšáková et al., 2010). Genistein může být dále metabolizován na dihydrogenistein a poté na 6´- hydroxy – *o* – desmethylangolensin a *p* – ethylfenol, daidzein může být dále metabolizován na dihydrodaidzein a poté na *o* – desmethylangolesin a equol (Obr. 4) (Ososki et Kenelly, 2003).

Obr. 4: metabolismus genisteinu a daidzeinu



Převzato z: https://www.omicsonline.org/articles-images/2157-7536-S12-004-g001.html

Genistein, daidzein, equol a *o* – desmethylangolesin jsou majoritními isoflavony detekovanými v krvi a moči zvířat i lidí (Cederroth et Nef, 2009). K degradaci isoflavonů dochází v játrech, kde jsou konjugovány s glukuronovou kyselinou a na nižší stupeň se sulfáty. Z těla jsou posléze vylučovány žlučí a/nebo močí (Pilšáková et al., 2010; Andres et al., 2009). Většina daidzeinu a genisteinu je z těla vyloučena během 24 hod (Pilšáková et al., 2010).

Fytoestrogeny mohou působit na buněčné i molekulární úrovni a potenciálně mohou ovlivňovat biosyntézu a metabolismus steroidů a mastných kyselin, steroidní nosičové proteiny v séru, intracelulární a transmembránový přenos hormonů na membránu a k jaderným receptorům (Ososki et Kenelly, 2003; Benassayag et al., 2002).

Díky své stabilní struktuře a nízké molekulové hmotnosti mohou fytoestrogeny procházet přes buněčné membrány a interagovat tak s enzymy a receptory (Rosselli et al., 2000). Polyfenolická povaha isoflavonů dále umožňuje modifikovat struktury a fyzikální

parametry plasmatické membrány jako je její fluidita a elektrické vlastnosti. Tyto účinky mohou být pozorovány jak při adsorbci polyfenolů membránou, tak při jejich inzerci do fosfolipidové dvojvrstvy (Fraga et al., 2010). Podobně jako estradiol se fytoestrogeny váží na ER a mají schopnost z ER kompetičně vytlačovat endogenní estrogeny (Rosselli et al., 2000; Polkowski et Mazurek, 2000), kromě ER se mohou vázat i na progesteronové, androgenové, aryl hydrocarbonové (Dusza et al., 2006) a aktivačně – proliferační receptory (Andres et al., 2009).

Afinita fytoestrogenů k ER vede k jejich účinkům na velké množství systémů, které jsou regulovány estrogeny včetně reprodukčního, kardiovaskulárního, muskuloskeletárního, metabolického a centrální nervové soustavy (Cederroth et Nef, 2009). Vazebná afinita se může mezi jednotlivými skupinami fytoestrogenů dramaticky lišit (Rosselli et al., 2000), nicméně ve srovnání s E2 nebo estronem je obecně nižší (Tapiero et al., 2002; Retana – Marquéz et al., 2012). Fytoestrogeny mohou interagovat s oběma typy ER (Cederroth et al., 2010; Retana – Marquéz et al., 2012), většina z nich však vykazuje vyšší afinitu k ERβ (Dusza et al., 2006; Retana – Marquéz et al., 2012; Andres et al., 2009). Afinita genisteinu k ERβ je zhruba 20 – 30x silnější než k ERα a je srovnatelná s afinitou E2, přičemž afinita ostatních isoflavonů je oproti E2 100 – 500x nižší (Pilšáková et al., 2010). Nicméně dle Polkowski et Mazurek (2000) je i v případě genisteinu relativní afinita oproti E2 100 – 1000x nižší. Zatímco E2 se na oba typy ER váže se stejnou afinitou (Turner et al., 2007; Retana – Márquez et al., 2012). Preference vazby na ERβ naznačuje, že mohou působit skrze odlišné dráhy od klasických ER (Tapiero et al., 2002; Setchell, 1998).

Fytoestrogeny mají ve srovnání s E2 a estronem slabý estrogenní potenciál (10^{-2} – 10^{-3}) (Setchell, 1998; Benassayag et al., 2002) a jejich biologická aktivita se liší v závislosti na strukturálních vlastnostech (Turner et al., 2007). Stejně tak Dusza et al. (2006) uvádějí, že biologická potence u fytoestrogenů je mnohem menší než u estrogenů (10^{-5} ku 10^{-3}). V případě isoflavonů se vůči E2 jedná o zhruba 1000x nižší potenci (Andres et al., 2009), proto vyžadovaná koncentrace isoflavonů k indukci transripční aktivity je 10^4x vyšší než u E2 a jejich biologická aktivita je nižší. Nicméně tento fakt je kompenzován prostřednictvím vysoké biologické dostupnosti. Koncentrace fytoestrogenů v biologických tekutinách je mnohem vyšší než koncentrace endogenních estrogenů za fyziologických podmínek (Benassayag et al., 2002; Cos et al., 2003). Volná cirkulační frakce fytoestrogenů je > 50% ve srovnání se 4,5% u E2 (Retana – Márquez et al., 2012). Pilšáková et al. (2010) uvádějí, že v přítomnosti dostatečného množství genisteinu, cca 100 nM/l, se jeho účinky mohou rovnat

účinkům endogenního E2 ve fyziologickém množství. Relativní potenciál isoflavonů u zvířat a na *in vitro* modelech kolísá v závislosti na řadě faktorů jako je cílová tkáň a její funkční stav, druh a stáří jedince, způsob podání, dávka, délka expozice a metabolismus jedince (Klein, 1998).

Fytoestrogeny mohou v různé míře působit vůči E2 jak agonisticky tak antagonisticky (Belcher et Zsarnovszky, 2001; Cederroth et Nef, 2009; Tapiero et al., 2002) v závislosti na jejich relativní koncentraci a afinitě (Irvine et al., 1998). Vysoká dostupnost fytoestrogenů pro ER vysvětluje, proč se v přítomnosti endogenních estrogenů chovají isoflavony jako antagonisté, zatímco při jejich absenci jako agonisté (Retana – Márquez et al., 2012). To potvrzuje i Kim et al. (2012), kteří uvádějí, že tento fakt závisí též na množství přítomného E2, tzn. v prostředí s nízkou hladinou estrogenů (hladina E2 po menopauze) působí metabolity isoflavonů agonisticky, zatímco v prostředí s vysokou hladinou estrogenů (hladina E2 před menopazou) antagonisticky. Díky těmto vlastnostem mohou být též klasifikovány jako selektivní modulátory ER tzv. SERMs – selective estrogen receptor modulators (Ososki et Kenelly, 2003; Andres et al., 2009, Moutsatsou. 2007; Cos et al., 2003), které lze definovat jako nesteroidní chemické látky s podobnou strukturou jako má E2 a afinitou přímo k ER (Ososki et Kenelly, 2003).

Fytoestrogeny podněcují jak estrogenní tak antiestrogenní účinky (Benassayag et al., 2002; Cederroth et Nef, 2009; Andres et al., 2009; Retana – Márquez, 2012) a to prostřednictvím interakce s řadou molekul, nosičových proteinů, enzymů, membránových a jaderných receptorů (Benassayag et al., 2002). Daný účinek v případě isoflavonů závisí na tkáni, množství endogenního estradiolu, typu isoflavonu (Cederroth et Nef, 2009) a jeho dávce (Andres et al., 2009). Některé sojové fytoestrogeny (genistein apod.) indukují v nízkých koncentracích estrogenní účinky, zatímco ve vysokých koncentracích antiestrogenní. Např. genistein při nízkých koncentracích indukuje buněčný růst, zatímco ve vysokých koncentracích může buněčný růst inhibovat (Rosselli et al., 2000), k této inhibici může docházet prostřednictvím modulace TGF (transforming growth factor) β1 signální dráhy (Kim et al, 1998), inhibice MAPK (mitogen – activated protein kinase) a down – regulace autofosforylace receptoru EGF (epidermal growth factor). Mezi další antiestrogenní účinky genisteinu patří kompetice s E2 o ER, narušování metabolismu E2 a inhibice tyrosin protein kináz (Rosselli et al., 2000).

Mezi další intracelulární účinky fytoestrogenů patří inhibice řady enzymů. Obecně, různé polyfenolické sloučeniny jsou účinnými inhibitory aktivity širokého spektra enzymů. Jejich cílem jsou zpravidla enzymy s puriny (např. ATP) jako substráty (kinázy, ATPázy, adenylát cykláza apod.) popř. enzymy s NADPH jako kofaktorem (aldosa reduktáza, malát dehydrogenáza, laktát dehydrogenáza, nitric oxid syntáza, 11β – hydroxysteroid dehydrogenáza apod.), přičemž ATP – dependentní enzymy jsou pravděpodobně ovlivněny navázáním polyfenolu do ATP vazebného místa enzymu (Fraga et al., 2010). Tento jev je popisován mj. u genisteinu (Andres et al., 2009; Polkowski et Mazurek, 2000).

V souvislosti s isoflavony byla dále popsána inhibice tyrosin protein kinázy (TPK), DNA topoisomerázy I a II, které katalyzují topologické změny na DNA a jsou zahrnuty jak do replikace DNA, tak do genové transkripce (Benassayag et al., 2002; Cos et al., 2003; Andres et al., 2009), 17β – hydroxysteroid oxidoreduktázy typu 1 (17β – HSO), která je zodpovědná za konverzi relativně slabého estronu na mnohem silnější estradiol a v menší míře za konverzi androstendionu na testosteron (Irvine et al., 1998; Cos et al., 2009; Retana – Márquez et al., 2012; Mitchell et al., 1998; West et al., 2005), 3β – hydroxysteroid dehydrogenázy (3β – HSD) (Rice et al., 2006), která katalyzuje konverzi pregnenolonu na progesteron (Ye et al., 2011) a 17β – hydroxysteroid dehydrogenázy (17β – HSD), která redukuje úroveň endogenního testosteronu a postupně redukuje i syntézu estrogenu (West et al., 2005), 5α – reduktázy, která katalyzuje konverzi testosteronu na 5α – dihydrotestosteron (Pilšáková et al., 2010; Retana – Márquez et al., 2012; Mitchell et al., 1998), aromatázy (Cos et al., 2003; Pilšáková et al., 2010; Retana – Márquez et al., 2012), která způsobuje irreverzibilní konverzi androgenů na estrogeny (Carreau et al., 2003), protein kinázy C (PKC) (Benassayag et al., 2002) a stimulace syntézy globulinu vázajícího pohlavní hormony (SHGB – sex hormone binding globulin) (Murkies et al., 1998; Mitchell et al., 1998; Retana – Márquez et al., 2012), který reguluje koncentraci cirkulujícího volného estrogenu (Setchell, 1998) a dochází tak k uvolnění ER pro vazbu fytoestrogenů (West et al., 2005). Dále byla popsána stimulace formace superoxid dismutázy a glutation peroxidázy, které se dávají so souvislosti s protektivními – antioxidačními účinky (West et al., 2005).

Většina z výše zmíněných intracelulárních mechanismů byla popsána i u genisteinu tj. inhibice TPK (Andres et al., 2009; Setchell, 1998; Polkowski et Mazurek, 2000; West et al., 2005), DNA topoisomerázy I a II (Andres et al., 2009; Polkowski et Mazurek, 2000; Benassayag et al., 2002), 17β – HSD (Whitehead et Rice, 2006; Le Bail et al., 1998; Keung, 1995; West et al., 2005), 3β – HSD (Keung, 1995; Magee et Rowland, 2004; West et al.,

2005), aromatázy (Rice et al., 2006; Setchell, 1998), 5α – reduktázy (Ye, et al., 2011) a stimulace syntézy SHGB (Holmes et al., 2004). U genisteinu byla dále popsána inhibice řady iontových kanálů, jako kanály řízené napětím selektivní pro Ca^{2+}, Na^{+} a K^{+} (Huang et al., 2010), regulace signalizace Akt, inhibice molekul v dráze MAPK a blokace aktivace p38 MAPK prostřednictvím TGF – β (Sarkar et al., 2009). Na buněčné úrovni genistein indukuje apoptózu a diferenciaci rakovinných buněk, inhibuje buněčnou proliferaci, moduluje buněčný cyklus, inhibuje angiogenezi a polačuje funkci osteoklastů a lymfocytů (Setchell, 1998).

Sojové isoflavony mají vedle hormonálních účinků i účinky nehormonální jako je signální transdukce a antioxidační aktivita (Omoni et Aluko, 2008). Nicméně řada těchto nehormonálních účinků byla prokázána ve vysokých koncentracích, kterých by bylo v *in vivo* podmínkách dosahováno jen stěží (Cos et al., 2003).

Předpokládá se, že isoflavony genistein a daidzein zprostředkovávají většinu svých biologických účinků spíše skrze modulaci klíčových savčích enzymů a receptorů stress – response pathway než skrze jejich antioxidační vlastnosti nebo schopnosti inhibovat TPK (Cederroth et Nef, 2009).

2.5. Vliv na pohlavní aparát zvířat

Vzhledem k popsané expresi estrogenových receptorů u obou pohlaví a přímému vlivu estrogenů na pohlavní soustavu, je otázka vlivu environmentálních estrogenů na reprodukci stále aktuální. Zvířata se dostávají do kontaktu s těmito látkami především prostřednictvím přijaté potravy, proto je důležité rozklíčovat reálné dopady zkrmování těchto sloučenin na jejich reprodukční funkce. Mezi environmentální estrogeny přítomné ve zvířecích krmivech patří zejména sojové fytoestrogeny a zearalenon, z toho důvodu jsou tyto látky stále předmětem zkoumání a to jak v podmínkách *in vivo* tak v podmínkách *in vitro*.

2.5.1. Samice

2.5.1.1. Zearalenon

Jak již bylo zmíněno výše, prasata jsou vůči ZEA velmi vnímavá, přičemž nejcitlivěji reagují prasnice (Agag, 2004; Metzler et al., 2010; Whitlow et al., 2002) a zejména pak prepubertální prasničky (Benzoni et al., 2008; Kanora et Maes, 2009; Döll et Dänicke, 2011;

Metzler et al., 2010). U samic prasete klinická manifestace toxikózy ZEA zahrnuje primárně reprodukční trakt (Agag, 2004). Mezi hlavní symptomy patří vulvovaginitis u prasnic (Sutkevičiene et al., 2009) a hyperemie a edematózní zduření vulvy u prepubertálních prasniček, v některých případech může dojít až k prolapsu vaginy a rekta (Bhat et al., 2010; Whitlow et al., 2002), dále může docházet k otoku dělohy (Bhat et al., 2010) jejímu zvětšení a distorzi (Whitlow et al., 2002), atrofii vaječníků (Bhat et al., 2010; Whitlow et al., 2002; Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007; Minervini et Dell´Aquilla, 2008), zvětšení mléčné žlázy (Bhat et al., 2010; Metzler et al., 2010), prodloužení estru (Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007; Metzler et al., 2010), k anestru (Metzler et al., 2010), výskytu perzistujícího žlutého tělíska (Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007; Freitas et al., 2012), narušení ovulace (Li et al., 2012), změnám v úrovni sérového progesteronu a estrogenu (Sutkevičiene et al., 2009), snížení fertility (Metzler et al., 2010; Sutkevičiene et al., 2009; Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007), nymfomanii (Minervini et Dell´Aquilla, 2008), pseudograviditě (Metzler et al., 2010; Fink Gremmels – et Malekinejad; Minervini et Dell´Aquilla, 2008; Freitas et al., 2012), změnám na endometriu (Minervini et Dell´Aquilla, 2008) narušení implantace embrya (Li et al., 2012; Fink – Gremmels et Malekinejad, 2007), narušení fetálního vývoje (Li et al., 2012), abortům (Metzler et al., 2010), předčasným porodům (Metzler et al., 2010; Freitas et al., 2012), zmenšení vrhu (Sutkevičiene et al., 2009; Metzler et al., 2010) a porodu slabých (Fink Gremmels – et Malekinejad; Freitas et al., 2012) nebo mrtvých selat (Fink Gremmels – et Malekinejad).

ZEA se v krmivech běžně nachází v koncentraci <200 ppm (Sutkevičiene et al., 2009) to odpovídá 200 mg ZEA/kg krmiva, zatímco zaznamenaná dávka, která u prasat ještě nevyvolá žádné účinky je 40 μg/kg ž. hm. (Gromadzka et al., 2008). Sutkevičiene et al. (2009) uvádějí, že prepubertální prasničky jsou ovlivněny již 5 mg ZEA/kg krmiva. Nicméně účinky této látky byly pozorovány i při nižších koncentracích. Wang et al. (2010) zaznamenal, že konzumace 2 mg ZEA/ kg krmiva vedla u prepubertálních prasniček k signifikantnímu zvýšení váhy dělohy a šířky vulvy. Minervini et Dell´Aquilla (2008) popisují, že podání 1 – 5 ppm ZEA vedlo u prasniček k hyperemii a edematóznímu zduření vulvy. Metzler et al. (2010) uvádějí ještě nižší hodnoty, v této studii byl hyperestrogenismus u prasnic zaznamenán při dávce 0,5 – 1 mg ZEA/kg krmiva, Wang et al. (2010) však po podávání 0,5 mg ZEA/ kg krmiva nezaznamenali žádné zřetelné estrogenní účinky. Podávání 0,1 mg ZEA/kg ž. hm. březím prasnicím vedlo k snížení počtu živě narozených mláďat a zvýšení pseudogravidity, u

prasniček bylo pozorováno zduření vulvy po 8 dnech podávání 0,02 mg ZEA/kg ž. hm., což je dokonce pod výše zmíněnou hranicí účinnosti stanovenou ve studii Gromadzka et al. (2008).

ZEA a jeho deriváty byly rovněž zkoumány na úrovni oocytů. Minervini et Dell´Aquilla (2008) uvádějí, že ZEA způsobuje u prasnic sterilitu prostřednictvím iniciace malfunkce ovárií. Oocyty zanikají v Graafově folikulu a navzdory příznakům říje nedochází k ovulaci. Deriváty ZEA, α-ZOL a β-ZOL negativně ovlivňují *in vitro* zrání porcinních oocytů v závislosti na dávce. Kultivace oocytů v přítomnosti α-ZOL po dobu 48 hod a koncentraci 7,5 μM vedla k signifikantnímu poklesu zrání, zatímco β-ZOL vykazoval stejný efekt při 30 μM. Koncentrace 7,5 μM snižovala podíl zygot, které dosáhly stádia blastocysty. ZEA a jeho deriváty v koncentracích 0,3 – 31,2 μM redukovaly procento oocytů, které dosáhly metafáze II (MII), způsobovali jaderné malformace v množství závislém na koncentraci, přičemž ZEA a α-ZOL byli nejúčinnější v nižších koncentracích. ZEA je nejvíce cytotoxický v nízkých koncentracích (pM), následovaný α-ZOL (nM) a β-ZOL (μM) po 24 hod inkubaci.

Malekinejad et al. (2007) ve své studii hodnotili vliv ZEA, α – ZOL a β – ZOL na zrání oocytů a raný embryonální vývoj prasat. Sledované koncentrace byly 0,312; 3,12 a 31,2 μM. ZEA i jeho deriváty ve všech testovaných koncentracích redukovaly počet oocytů, které dosáhly MII fáze a v závislosti na dávce indukovaly jaderné malformace.

Ranzenigo et al. (2008) se ve své práci zabývali účinky ZEA na granulózní buňky, proliferaci a steroidogenezi oocytů prasat. Granulózní buňky z malých folikulů (1 – 5mm) byly kultivovány 2 dny v médiu obohaceném o 5% fetální bovinní sérum a 5% porcinním fetální sérum, po 48 hodinách se oocyty přemístily do média bez séra s nebo bez kontaminantů. Vybrané koncentrace byly 0,0937; 0,937 a 9,37 μM. ZEA v nejvyšší testované koncentraci zvyšoval IGF – I indukovanou produkci P4, zatímco v nižších koncentracích byl bez účinků, nicméně tyto nižší koncentrace zvyšovaly FSH indukovanou sekreci P4.

Minervini et al. (2001) hodnotili vliv ZEA, α – ZOL a ZAN na *in vitro* zrání bovinních oocytů. Testované koncentrace byly v rozmezí 0,3 – 30 μg/ml. Zrání oocytů do MII fáze bylo inhibováno u oocytů kultivovaných v přítomnosti 30 μg/ml ZEA (94,2 μM), α – ZOL i ZAN (oba 93,6 μM) se signifikantním nárůstem chromatinových abnormalit v přítomnosti ZEA a α – ZOL.

Stejně jako u výše zmiňovaných fytoestrogenů i ZEA a jeho deriváty mají prokazatelné účinky na samičí reprodukční aparát včetně vlastních zárodečných buněk. Proto i v tomto případě lze hledat analogii v působení těchto látek se samčími gametami.

2.5.1.2. Fytoestrogeny

Konzumace fytoestrogenů může mít potenciálně prospěšné účinky, ale zároveň může vést k řadě reprodukčních problémů (Whitten et Patisaul, 2001). Příjem GEN může způsobovat narušení vývoje a funkce ovárií, estrálního cyklu, hypotalamo – hypofyzární – gonádové osy, subfertilitu a zvýšený výskyt adenokarcinomu (Cederroth et al., 2012). Wang et al. (2010) uvádějí, že nejcitlivější cílovou tkání k estrogenním účinkům je u prepubertálních prasniček děloha. U ovariektomizovaných prasniček došlo k zvýšení váhy dělohy a cervixu po konzumaci 200 mg GEN/kg v krmivu, přičemž bylo pozorováno, že zvýšení váhy dělohy prostřednictvím sojových isoflavonů je závislé na dávce (Wang et al., 2010). To potvrzuje i Ford et al. (2006), kteří ve své studii podávali GEN ovariektomizovaným prasničkám intramuskulárně a to v dávce 50, 100, 200 a 400 mg/den po dobu 10 dní. Váha dělohy a děložního krčku se oproti kontrolní skupině zvýšila po podávání 200 a 400 mg GEN.

Dalším pozorovaným důsledkem konzumace GEN je zvětšení vulvy. Prasničky, kterým bylo podáváno krmivo s 20% obsahem soji měly větší vulvu než prasničky v kontrolní skupině, nicméně toto krmivo nemělo vliv na váhu reprodukčního traktu nebo výskyt histologických abnormalit (Wang et al., 2010).

Mezi další zdokumentované účinky isoflavonů prováděné na zvířecích modelech patří proliferace epiteliálních buněk v reprodukčním traktu a anestrus (Whitten et Naftolin, 1998). Ve výše zmíněné studii Ford et al. (2006) byla hodnocena výška epiteliálních buněk v reprodukčním traktu ovariektomizovaných prasniček, přičemž k jejímu nárůstu v okolí děložních žlázek a v lumen dělohy a cervixu došlo po adici 400 mg GEN/ den.

Řada studií expozice GEN byla prováděná na hlodavcích (Cederroth et al., 2012). Konzumace fytoestrogenů ve vysokých dávkách nebo v kritických fázích vývoje hlodavců může vést k řadě reprodukčních problémů (Mitchell et al., 2001).

Cline et al. (2004) hodnotili účinky konzumace aglykonů sojových isoflavonů na reprodukční trakt u pohlavně dospělých myší. Poměr isoflavonů v pokusných skupinách byl 10GEN: 1DAI, 2GEN: 1DAI a 1GEN: 10DAI v celkovém množství 120 mg isofavonů (v

průměru 40 mg/kg/ž.hm.) po dobu 16 týdnů. Účinky 10GEN:1DAI byly minimální nebo žádné, naproti tomu 2GEN:1DAI a 1GEN:10DAI způsoboval dramatické estrogenní účinky. U samic docházelo k endometritidám a účinkům typickým pro estrogenní stimulaci (zvětšení dělohy, keratinizaci vaginálního epitelu, nárůstu epiteliálních buněk na povrchu endometria a uterinní squamózní metaplasii).

Lamartiniere et al. (2002) ve své studii podávali samicím potkana, které se dosud nepářily, krmivo s obsahem DAI 250 mg/kg krmiva (nízká dávka) a 1000 mg/kg krmiva (vysoká dávka). Podávání bylo započato 14 dní před připouštěním a ukončeno 50 dní po porodu. DAI v žádné testované koncentraci neovlivňoval fertilitu, podíl samčích a samičích potomku ani anogenitální vzdálenost. Obě testované koncentrace mírně, nikoliv však signifikantně, snižovaly váhu ovárií a dělohy a velikost mléčné žlázy.

K rozdílným výsledkům při testování GEN došli Santell et al. (1997), kteří hodnotili jeho vliv na váhu dělohy, vývoj mléčné žlázy a hladinu prolaktinu v plazmě u samic potkana linie Sprague – Dawley. Testované koncentrace byly 150, 375 a 750 mg/kg krmiva, přičemž koncentrace 375 a 750 mg/kg krmiva signifikantně zvyšovala váhu dělohy a nejvyšší testovaná dávka signifikantně inhibovala regresi mléčné žlázy, která přirozeně následuje po ovariektomii. Tato koncentrace též signifikantně zvyšovala hladinu prolaktinu v krevní plazmě. Stejně tak Ren et al. (2001) uvádějí, že isoflavony stimulují pohlavní trakt samic, přičemž u hlodavců stimulují růst dělohy a mléčné žlázy.

Řada publikací se též věnovala vlivu isoflavonů na pohlavní buňky. Na modelu porcinních oocytů bylo provedeno několik studií. Basini et al. (2010) ve své práci hodnotili účinky GEN na steroidogenezi a proliferaci granulózních buněk v koncentracích 1; 18,5 a 185 μM GEN. Žádná z testovaných koncentrací neměla vliv na proliferaci granulózních buněk. Nejvyšší koncentrace inhibovala produkci E2 granulózními buňkami, zatímco koncentrace 18,5 μM byla neúčinná. Naproti tomu koncentrace 1 μM E2 produkci stimulovala. Progesteron (P4) byl inhibován ve všech testovaných koncentracích.

V případě vlivu GEN na produkci P4 granulózními buňkami došli Nynca et Ciereszko (2006) k podobným výsledkům. Testované koncentrace byly 0,5; 5 a 50 μM. GEN v závislosti na dávce inhiboval bazální i FSH - stimulovanou produkci P4 antrálními, murálními i neseparovanými granulózními buňkami. Na rozdíl od předchozí studie neměly vybrané koncentrace vliv na sekreci E2. Viabilita byla ovlivněna pouze nejvyšší dávkou.

Podobná studie se zabývala účinky DAI. Hodnoceny byly stejné koncentrace jako v případě GEN (0,5; 5 a 50 μM). I tento isoflavon inhiboval sekreci progesteronu granulózními buňkami, zatímco produkce E2 zůstala neovlivněna (Nynca et al., 2013).

Podobně Galeati et al. (2010) hodnotili vliv DAI na steroidogenní aktivitu kumulárních buněk. Obě testované koncentrace (1 a 10 μM) signifikantně snižovaly sekreci P4 kumulárními buňkami po 24 a 48 hod kultivace. Produkce E2 nebyla jako v předchozím případě ovlivněna. V této studii byly dále hodnoceny účinky DAI na jaderné a cytoplasmatické zrání, které nebylo vybranými koncentracemi v průběhu *in vitro* zrání narušeno.

In vitro zrání prasečích oocytů bylo předmětem i dalších prací. Jung et al. (1993) přidávali k denudovaným oocytům GEN v koncentracích 20, 40 a 60 μg/ml média, což odpovídá 74; 148 a 222 μM a došli k závěru, že GEN *in vitro* zrání inhibuje, přičemž oocyty byly senzitivní v průběhu prvních 12 hodin inkubace. GEN potlačoval rozpad jaderné membrány i kondenzaci chromatinu.

Vodková et al. (2008) ve své práci testovali vliv genisteinu a jeho glykosidu genistinu (GIN) na *in vitro* zrání oocytů a expanzi kumulárních buněk. Koncentrace GEN byly podobné jako u Jung et al. (1993) a to 13, 40 a 80 μg/ml tedy 48,1; 148 a 296 μM, GIN byl přidáván v množství 80, 160 and 240 μg/ml, které odpovídá 185; 370 a 555 μM. Oocyty byly kultivovány 24 hod s přídavkem kontaminantu a poté dalších 24 hod v čistém médiu, GEN v závislosti na dávce blokoval zrání oocytů ve stádiu zárodečného váčku (GV = germinal vesicle), po opláchnutí GEN zrání oocytů pokračovalo, ale s výskytem abnormalit (32%). GIN v koncentraci 80 μg/ml také indukoval signifikantní zastavení v GV (18%). S rostoucí koncentrací GIN se podíl zastavených oocytů snižoval, nicméně se zvýšil podíl abnormálně zrajících oocytů. Expanze kumulárních buněk byla po adici GEN ovlivněna v poměru k dávce, v případě GIN byly účinky méně zřetelné.

Podobné účinky jako na modelu porcinních oocytů byly popsány i u hlodavců. Chan (2009) u myší hodnotil mmj. vliv GEN na jaderné zrání, fertilitu a raný embryonální vývoj v koncentracích 1, 5 a 10 μM. V závislosti na dávce měl GEN negativní účinky na všechny testované parametry, tj. snižoval podíl zrajících oocytů, zhoršoval jejich fertilitu a narušoval raný embryonální vývoj.

Ve studii Kimura (1996) GEN potlačoval rozpad zárodečného váčku (GVBD = germinal vesicle breakdown) u myších oocytů v ED50 = 20 μg GEN/ml (74 μM) a jeho inhibiční účinky byly plně reversibilní. Oocyty kultivované s 30 μg GEN/ml média (111 μM) vykazovaly snížený podíl vydělených pólových tělísek (15 – 20%), přičemž většina oocytů (80 – 90%) s inhibicí vydělení pólového tělíska měla zastavené zrání v metafázi I (MI). Inhibiční účinky byly závislé na dávce.

Zhuang et al. (2010) hodnotili účinky GEN na ovariální folikulární vývoj u samic potkana. Testována byla zvířata ve věku 4 měsíců po 4 týdením podávání GEN a zvířata ve věku 15 měsíců, po 4 měsících podávání GEN. U obou skupin byla zvolena shodná koncentrace 160 mg/kg/den. U samic ve stáří 4 měsíců byly nalezeny folikuly v různých stádiích (primordiální, primární, sekundární, antrální, atretické folikuly a žlutá tělíska (CL = *corpus luteum*). U pokusné skupiny byl nalezen vyšší podíl primordiálních folikulů a naopak nižší podíl antrálních a atretických folikulů. U stárnoucích potkanů v 15 měsících věku histologický profil ukázal pouze několik vyvíjejících se folikulů v různých fázích vývoje jak u pokusných skupin, tak u kontrol. Počet primárních, antrálních, atretických folikuů a CL se statisticky nelišil, nicméně počet primordiálních a antrálních folikulů byl u pokusné skupiny vyšší. Samice ošetřené GEN, dále vykazovaly vyšší podíl funkčních folikulů.

Z výše uvedeného je patrné, že bylo prokázáno ovlivnění jak samičího reprodukčního traktu, tak pohlavních buněk sojovými isoflavony. Vzhledem k podobnému založení samičích a samčích gamet, které je odlišuje od somatických buněk, se nabízí myšlenka, že by tyto látky mohly interferovat i se spermiemi a to včetně průchodu samičím pohlavním aparátem.

2.5.2. Samci

2.5.2.2. Zearalenon

Negativní účinky ZEA na pohlavní aparát byly zaznamenány mimojiné i u samců prasete. U mladých kanečků byl popsán feminizační efekt jako důsledek hyperestrogenismu, který je charakterizován testikulární atrofií, otokem prepucia a zvětšením mléčné žlázy (Agag, 2004; Whitlow et al., 2002; Freitas et al., 2012), jako další symptom byl popsán pokles libida (Sutkevičiene et al., 2009; Benzoni et al., 2008; Berger et al., 1981), snížení hmotnosti varlat, nadvarlat a měchýřkovitých žláz (Kanora et Maes, 2009) a redukce koncentrace testosteronu v plasmě (Sutkevičiene et al., 2009; Kanora et Maes, 2009). Otok prepucia a hypertrofie mléčné žlázy byla popsána jak u mladých kastrátů (Benzoni et al., 2008) tak u dospělých

kanců (Sutkevičiene et al., 2009; Bhat et al., 2010). U kanců byla po adici ZEA dále zaznamenána menší velikost a nižší hmotnost varlat (Bhat et al., 2010, Sutkevičiene et al., 2009; Benzoni et al., 2008), poruchy v testikulárním vývoji a spermatogenezi (Sutkevičiene et al., 2009), Agag (2004) však uvádí, že dospělí kanci zřejmě disponují mechanismy, které brání poklesu spermatogeneze. Dále byla popsána nižší motilita spermií po dlouhodobém přijímání nízkých koncentrací ZEA a ovlivnění nadvarletních funkcí (Benzoni et al., 2008). Pokles libida byl pozorován i u dospělých kanců (Bhat et al., 2010; Sutkevičiene et al., 2009; Freitas et al., 2012) nicméně pouze při vysokých koncentracích. V množství, které se běžně nachází v krmivu, tzn. 200 ppm, k tomuto jevu nedochází (Sutkevičiene et al., 2009). Minervini et Dell´Aquila (2008) uvadějí, že reprodukční potenciál kanců krmených běžně kontaminovaným krmivem není negativně ovlivněn.

Výše uvedené potvrzuje i studie Berger et al. (1981), ve které u kanečků krmených po dobu 4 týdnů 40 ppm ZEA od 14 týdnů věku, bylo pozorováno snížení libida a pouze menšina testovaných zvířat vykazovala pohlavní chování. Koncentrace testosteronu v plasmě byla během konzumace ZEA snížená, velikost varlat nebyla ovlivněna. Ve věku 36 týdnů se testovaná skupina od kontrolní nelišila.

Podobně i ve studii Kanora et Maes (2009) podávání krmiva prepubertálním kanečkům s obsahem ZEA (až 600 ppm) v délce 6 – 15 týdnů vedlo k signifikantnímu snížení hmotnosti varlat (až o 30%) oproti kontrolní skupině. Po podávání 100 ppm ZEA byla dokonce pozorována inhibice spermatogeneze, která byla reverzibilní (ukončení podávání krmiva).

Zajímavá byla studie kolektivu Bielas et al. (2017), kteří podávali kancům prasete divokého (*Sus scrofa l.*) želatinové kapsle se 150 µg ZEA /kg ž. hm. každé dva měsíce vždy 7 po sobě jdoucích dních po dobu trvání jednoho roku, popř. 50 µg ZEA /kg.ž.hm ve formě přirozeně kontaminovaného krmiva. Odběr spermií probíhal disekcí z nadvarlete a spermie byly odebírány z jeho ocasu. Posléze byly spermie naředěny BTS médiem a skladovány v 17°C po dobu 6 dní (144). Hodnocena byla mj. motilita spermií, které byla měřena po 0 hod, 24 hod a 144 hod skladování pomocí systému CASA a kalibrovaného Leja® skla v 35°C. Již v 0 hod byl zaznamenán signifikantní pokles podílu motilních spermií oproti kontrolní skupině a to u obou testovaných koncentrací. Překvapivá situace nastala při hodnocení po 24 hod, kdy došlo k signifikantnímů nárůstu podílu motilních spermií oproti 0 hod v obou testovaných skupinách díky čemuž vymizel rozdíl v podílu motilních spermií

mezi hodnocenými koncentracemi a kontrolou. Po 144 hod došlo opět k statisticky významnému poklesu podílu motilních spermií u skupin zatížených zearalenonem, tyto se mezi sebou nelišily. Podobná situace nastala i v případě hodnocení progresivní motility spermií (%). Dále byla hodnocena hyperaktivace, akrozomální reakce a integrita plasmatických membrán. Ani u jednoho z těchto parametrů nebylo zaznamenáno ovlivnění zearalenonem.

Také u hlodavců ZEA v podmínkách in vivo negativně ovlivňoval stav spermií, a to v širokém spektru koncentrací, včetně koncentrací velmi nízkých – v řádu < 1μM.

Long et al. (2017) podávali po dobu pěti týdnů myším 25, 50 a 75 mg ZEA/ kg ž. hm. intraperitoneálně (i. p.) což je zhruba o řád více než v případě výše zmíněné studie na kancích. Ve všech testovaných skupinách následně pozorovali signifikantní pokles podílu motilních spermií získaných z nadvarlete v míře závislé na dávce, Dále byly pozorovány morfologické deformity a to zejména abnormality hlavičky a defekty bičíku.

Podobné výsledky zaznamenali i Adibnia et al. (2016), kteří podávali potkanům 1, 2 a 4 mg ZEA/ kg ž.hm *i.p.* I v tomto případě autoři zaznamenali signifikantní pokles jak podílu motilních spermií tak viability a to v míře závislé na dávce.

Stejně tak Pang et al. (2017) zaznamenali negativní účinky zearalenonu když mladým myším samců (3 týdny) podávali 20 μg popř. 40 μg ZEA /kg ž.hm. prostřednictvím žaludeční sondy *per os*. Po 14 dnech podávání byl, ve srovnání s kontrolou, zaznamenán pokles počtu spermatogenních buněk v semenotvorných kanálcích varlete bez ohledu na dávku a po 28 dnech byla patrná, snížená motilita a hyperaktivace spermií (hodnoceno systémem CASA), dále byla pozorována nižší koncentrace a viabilita spermií a to v míře závislé na dávce.

Vzhledem k pozorovaným účinkům podávání ZEA *in vivo* jak na kančím tak na hlodavčím modelu je patrné, že tento estrogenní mykotoxin ovlivňuje spermatogenezi, potažmo kvalitu spermií. Nicméně tyto studie pracovaly se spermiemi získanými z ocasu nadvarlete, které se od ejakulovaných spermií odlišují např. stavem některých receptorů na svém povrchu. Dále z těchto studií není patrné, zda spermie ovlivňuje přímo ZEA nebo spíše jeho metabolity.

V podmínkách *in vitro* byl vliv účinku ZEA a jeho majoritního metabolitu α – ZOL na spermie testován pouze na porcinních a equinních spermiích a velmi okrajově na bovinních spermiích. Zatímco na modelu porcinních spermiích efekty těchto estrogenních mykotoxinů pozorovány byly, vliv na hřebčí spermie nebyl u ZEA prokázán a to v širokém spektru koncentrací 100 μM – 0,1 pM ZEA (Filannino et al., 2011). V případě α – ZOL byly pozorovány účinky pouze v nejvyšší koncentraci 100 μM (Filannino et al., 2011) viz níže.

Ve vysokých dávkách tj. > 100 μM ZEA byly u porcinních spermií zaznamenány inhibiční účinky na motilitu a to konkrétně po adici 250 μM, 187,5 μM a 125 μM ZEA již po 1 hod společné inkubace (Tsakmakidis et al., 2006; 2007).

V rozmezí těchto vysokých koncentrací byla zároveň pozorována inhibice akrozomální reakce (Tsakmakidis et al., 2006)

Dále pozorován pokles viability spermií (Tsakmakidis et al., 2006; 2007) a zhoršená vazba na *zonu pellucidu* po inkubaci s 250 μM a 187,5 μM ZEA nikoliv však se 125 μM ZEA (Tsakmakidis et al., 2007).

Se snižující se koncentrací ZEA na úroveň středních tj. 10 – 100 μM, nízkých tj. 1 – 10 μM popř. velmi nízkých tj. < 1 μM vymizely pozorované účinky na motilitu porcinních spermií a to v koncentracích 94,2; 62,8 a 31,4 μM (Tsakmakidis et al., 2008). Žádné účinky na motilitu prasečích spermií nedetekovali ani Benzoni et al. (2008) v širokém spektru koncentrací 20 μM – 0,2 pM ZEA po dobu 5 hod společné inkubace na stejném modelu spermií. Stejně tak nedošlo k ovlivnění motility porcinních spermií ve studii Sambuu et al. (2013), přičemž jejich experimentální schéma zahrnovalo skladování v Modena médiu po dobu 1 a 3 týdnů při 5°C v přítomnosti 3,12 μM popř. 0,0312 μM ZEA. Žádný vliv na motilitu popř. jednotlivé charakteristiky pohybu nebyl pozorován ani u equinních spermií v rozmezí 10 μM – 1pM ZEA (Filannino et al., 2011).

Další parametry kvality spermií byly sledovány jen nepravidelně. V koncentracích 3,14 μM a 0,0314 μM ZEA nebyly zaznamenány žádné účinky na akrozomální reakci porcinních spermií (Sambuu et al., 2013). Stejně tak nebyla ovlivněna viabilita spermií (Sambuu et al., 2013). Nicméně byla zaznamenána zhoršená penetrace oocytu po adici 3,14 μM a 0,314 μM nikoliv však 0,0314 μM. V tomto případě trvala společná inkubace 22 hod. Zajímavé je, že při testování o řád nižší koncentrace tj. 0,00314 μM (3,14 nM) byla opět detekována zhoršená penetrace oocytu (Sambuu et al., 2011). Podobně Yousef et al. (2017)

testovali vliv ZEA na odezvu bovinních oviduktálních epiteliálních buněk na spermie a ve velmi nízkých dávkách tj 3,14 pM – 3,14 nM pozorovali eliminaci této odezvy.

Lehce odlišná situace oproti mateřské sloučenině nastala při testování α-ZOL, majoritního metabolitu ZEA. Stejně jako ZEA ve vysokých dávkách signifikantně inhiboval motilitu porcinních spermií v koncentracích 125 – 250 μM a snižoval viabilitu a vazbu na *zonu pellucidu* v koncentracích 250 μM a 187,5 μM nikoliv však po adici 125 μM (Tsakmakidis et al. 2006; 2007). Koncentrace 100 μM se na rozdíl od ZEA jevila jako účinná i v případě equinních spermií – v tomto případě došlo ke statisticky významné inhibici motility a to jak celkové tak progresivní motility, dále pak došlo k poklesu VAP, VSL a LIN nikoliv však VCL a ALH byla stimulována (Filannino et al., 2011).

V čem se α-ZOL v těchto vysokých koncentracích lišil, byly jeho účinky na akrozomální reakci. Zatímco ZEA signifikantně inhiboval akrozomální reakci ve všech testovaných koncentracích a inkubačních časech tj. 250 μM; 187,5 μM a 125 μM po 1 – 4 hod inkubace, s výjimkou 1 hod inkubace se 125 μM ZEA, tak α-ZOL překvapivě působil na akrozomální reakce porcinních spermií inhibičně pouze v koncentracích 187,5 μM a 250 μM a to po 2 – 4 hod nikoliv však 1 hod společné inkubace. Stimulační účinky na akrozomální reakci byly naopak pozorovány po adici 100 μM ZEA ke vzorku equinních spermií (Filannino et al., 2011)

Na rozdíl od ZEA α-ZOL vykazoval účinky i ve středních koncentracích (10 – 100 μM), nicméně pozorované efekty jsou nejednotné. Zatímco Gray et al. (2016) pozorovali signifikantní snížení všech parametrů motility vyjma ALH a LIN tj. celkové motility, rapidní motility, progresivní motility a parametrů VCL, VSL, VAP, STR a BCF po společné koinkubaci s 31,2 μM α-ZOL a to již po 30 min inkubace, Benzoni et al. (2008) pozorovali po 5 hod inkubace s 20 μM α-ZOL statisticky významné navýšení parametru VCL při současně inertní VSL. Gray et al. (2016) zároveň zaznamenali i signifikantní pokles podílu akrozomálních reakcí po 3 hod inkubace v koncentraci 31,2 μM.

V nízkých koncentracích pak již nebyly žádné další účinky α-ZOL na spermie detekovány, stejně jako v případě ZEA, a to ani na porcinní (Benzoni et al., 2008; Sambuu et

al., 2013) nebo equinní (Filannino et al., 2013) spermie až do koncentrace 0,2 pM resp 0,1 pM.

Souhrnně lze říci, že zearalenon při testování *in vitro* vykazoval účinky ve vysokých dávkách, zatímco již ve středních a nižších dávkách se jevil jako inertní, zatímco α-ZOL vykazoval účinky i ve středních dávkách. To by mohlo souviset s vyšším estrogenním potenciálem α-ZOL oproti mateřské sloučenině ZEA.

Na úrovni *in vitro* bylo doposud publikováno jen omezené množství prací a to na hospodářských zvířatech, zejména prasatech. Nicméně pokud se podíváme na experimenty vedené v podmínkách *in vivo* tak u divokých prasat byly pozorovány negativní účinky zearalenonu na kvalitativní parametry spermií i v nízkých a v případě myší až velmi nízkých koncentracích. Což zřejmě souvisí jen s omezenými možnostmi simulace fyziologických podmínek v *in vitro* podmínkách.

2.5.2.1. Fytoestrogeny

Stejně jako u samic byly popsány účinky fytoestrogenů i u samců. V případě prasat byla publikována studie Yuan et al. (2012), ve které bylo kancům čínských miniprasat podáváno krmivo s obsahem isoflavonů. Zatímco 250 ppm sojových isoflavonů způsobilo nárůst hmotnosti varlat, 500 ppm ve srovnání s kontrolou způsobilo redukci váhy varlat a nadvarlat. 250 ppm dále zvýšilo podíl fruktózy v ejakulátu oproti kontrole, což mělo pozitivní vliv na jeho kvalitu. 500 ppm isoflavonů signifikantně snižovalo úroveň LH a testosteronu ve srovnání s kotnrolou.

Další studie byly zaměřeny zejména na hlodavce. Whitten et Naftolin (1998) uvádějí, že podávání GEN prepubertálním myším samcům po dobu 6 týdnů v rozmezí 900 – 3600 mg/kg ž. hm. *per os* způsobovalo pokles hmotnosti varlat a narušení spermatogeneze. Naproti tomu podávání 300 – 1000 mg GEN / kg ž. hm. dospělým potkanům po dobu 4 týdnů váhu varlat neovlivnilo. V případě prepubertálních potkanů však podávání krmiva se 7% obsahem soji váhu varlat zvyšovalo.

Zatímco dle Whitten et Naftolin (1998) a Cederroth et al. (2010) expozice dietárním isoflavonům neovlivňuje hladinu sérového testosteronu u dospělých myší a potkanů, Strauss et al., 1998 zaznamenali po adici 2,5 mg GEN subkutánně/ kg ž. hm. po dobu 9 dní redukci koncentrace sérového i testikulárního testosteronu. Dále došlo ke snížení obsahu LH v hypofýze a poklesu váhy prostaty. S tím koreluje i práce Setchell (1998), dle které GEN

inhibuje růst prostatických buněk. Cederroth et al. (2010) dále uvádějí, že dlouhodobé podávání fytoestrogenů snižuje nadvarletní zásoby spermií a redukuje počet haploidních buněk ve varlatech CD-1 myší.

K odlišným výsledkům dospěli Faqi et al. (2004) a Lee et al. (2004), dle kterých isoflavony nemají na fertilitu myších a potkaních samců žádný vliv. Faqi et al. (2004) ve své práci podávali potkanům linie Wistar – Unilever od 10 týdnů věku krmivo se směsí isoflavonů (45% GEN, 23% DAI a 4% glycitein) v množství 200 nebo 2000 mg/kg krmiva po dobu minimálně 12 měsíců. Krmná expozice isoflavonům nepůsobila toxicky, ani nezasahovala do váhového přírůstku. Absolutní i relativní hmotnost varlat a nadvarlat společně s testikulární morfologií byla u obou testovaných skupin srovnatelná s kontrolou. Stejně tak vybrané látky neovlivňovaly počet spermií, jejich produkci nebo morfologii.

Ve studii Lee et al. (2004) byli myší samci od 5 týdnů do 6 měsíců věku krmeni potravou obsahující GEN v množství 2,5 mg/ kg/ den. Ani v tomto případě nebyly pozorovány žádné účinky na hmotnost těla nebo váhu reprodukčních orgánů. Žádné signifikantní rozdíly nebyly pozorovány ani v počtu spermií nebo jejich motilitě.

Vliv sojových fytoestrogenů byl, stejně jako u samic, studován i na úrovni gamet. Bylo provedeno několik studií, které hodnotili účinky GEN popř. DAI na kvalitu spermií u různých modelových organismů.

Pozorované účinky genistenu na spermie *in vitro* byly napříč studiemi poněkud nekonzistentní. A to jak ve vysokých > 100 μM; středních 10 – 100 μM; nízkých 1 – 10 μM i velmi nízkých < 1 μM koncentracích.

Na úrovni vysokých dávek Uma Devi et al. (2000) po adici 500 μM GEN k nadvarletním spermií křečka nepozorovali žádné účinky na motilitu spermií ani po 150 min společné inkubace, zatímco Bajpai et al. (2003) po inkubaci humánních ejakulovaných spermií s 400 μM GEN pozorovali po 6 hod signifikantní pokles všech parametrů motility – celkové motility, progresivní motility, jednotlivých kinematických parametrů i hyperaktivace, viabilita spermií zůstala neovlivněná.

Středních koncentrace GEN vykazovaly podobně rozporuplné účinky. Zatímco jak Oh et al. (2011) v případě porcinních tak Tao et al. (2009) v případě murinních spermií

zaznamenali statisticky významný pokles motility po adici 100 μM GEN, Kim et al. (2014) ve stejné dávce nepozorovali žádný vliv na motilitu spermií ani po 6 hod inkubace. V koncentraci 50 μM GEN byly výsledky podobné. Zatímco Oh et al. (2011) i Tao et al. (2009) opět zaznamenali pokles podílu motilních spermií, Kim et al. (2014) po 3 hod inkubace nepozorovali žádné účinky a po 6 hodinách společné inkubace pozorovali dokonce stimulaci motility

Testování kapacitace spermií přineslo podobně nehomogenní výsledky. Zatímco Ryu et al. (2014) v této koncentraci nepozorovali ani u jednoho ze zkoumaných druhů (*sus, bos, mus*) žádné účinky 100 μM genisteinu na kapacitaci spermií po 15 popř. 30 min inkubace, Mohamed et al. (2011) pozorovali po 15 min společné inkubace stimulační účinky na kapacitaci porcinních spermií. Naproti tomu Park et al. (2011) pozorovali u murinních spermií účinky inhibiční a to rovněž po 15 min inkubace s GEN. Zajímavé je, ačkoliv Mohamed et al. (2011) u porcinních a Park et al. (2011) u murinních spermií pozorovali opačné účinky (stimulační vs inhibiční) oba kolektivy shodně pozorovali efekty po 15 nikoliv však 30 min inkubace.

V případě akrozomální reakce Ryu et al. (2014) pozorovali u porcinních spermií stimulační účinky 100 μM GEN jak po 15 tak 30 min inkubace, s čímž se shodují i výsledky kolektivu Mohamed et al. (2011) na stejném modelovém organismu. Bovinní spermie zůstaly stejnou dávkou neovlivněny (Ryu et al., 2014) a murinní spermie byly stimulovány pouze po 15 min inkubace se 100 μM GEN (Ryu et al., 2014; Park et al., 2011). Viabilitu testovali pouze Kim et al. (2014), kteří zaznamenali stimulační účinky 100 μM M GEN po 6 hod, nikoliv však po 3 hodinách inkubace. Při koncentraci 50 μM kolektiv Kim et al. (2014) rovněž zaznamenali stimulaci motility, nicméně v tomto případě byly účinky signifikantní již po 3 hod inkubace.

V nízkých koncentracích tj. 10 μM GEN byl pozorován pokles podílu motilních spermií již od nejkratší doby inkubace tj. 15 min v případě porcinních (Oh et al., 2011) i murinních spermií (Tao et al., 2009). Zajímavé je, že zatímco po 15 min inkubace s genisteinem nebyly pozorovány žádné účinky na střední hodnoty kinematických parametrů spermií, po 30 min inkubace došlo k signifikantnímu poklesu VAP (Oh et al., 2011). Naproti tomu v případě bovinních spermií nebyly po adici 7,4 μM GEN zaznamenány žádné účinky na motilitu spermií (Menzel et al., 2007).

Jednoznačnější nebyly ani zaznamenané účinky GEN na kapacitaci spermií. Zatímco Ryu et al. (2014) nezaznamenali žádný vliv 10 μM tohoto environmentálního estrogenu na schopnost prasečích spermií kapacitovat, Mohamed et al. (2011) na stejném modelovém organismu pozorovali po 15 min společné inkubace stimulaci kapacitace. V případě murinních spermií byla zaznamenána po 15 min inkubace s 10 μM GEN naopak inhibice kapacitace. (Park et al., 2014). Naproti tomu Ryu et al. (2014) žádné účinky na murinní spermie nepozorovali, ačkoliv jejich studie vykazovala stejné metodické přístupy. Žádné účinky na kapacitaci nebyly pozorovány ani u bovinních spermií a to ani v koncentraci 10 μM (Ryu et al., 2014) ani v koncentraci 7,4 μM (Menzel et al., 2007).

Při testování vlivu 10 μM GEN na akrozomální reakci porcinních spermií byly po 30 min společné inkubace s GEN pozorovány stimulační účinky (Ryu et al., 2014; Mohamed et al., 2011). V případě 15 min inkubace s 10 μM GEN se však výsledky studií rozcházejí. Zatímco Ryu et al., (2014) žádné účinky nepozorovali, Mohamed et al. (2011) zaznamenali i v této kratší inkubaci stimulační účinky. Úplná shoda naopak nastala při testování murinních spermií, u kterých byla zaznamenána stimulace akrozomální reakce v přítomnosti 10 μM GEN po 30 min nikoliv však po 15 min inkubace s GEN (Park et al., 2011; Ryu et al., 2014). Zajímavé je, že u bovinních spermií nebyly po adici 10 μM GEN pozorovány žádné účinky na akrozomální reakci (Ryu et al., 2014) zatímco v koncentraci 7,4 μM GEN bylo pozorováno signifikantní snížení podílu akrozom reaktivních spermií (Menzel et al., 2007; Hinsch et al., 2000). V této koncentraci bylo u bovinních spermií též pozorováno statisticky významné snížení vazebných schopností spermií na *zonu pellucidu* (Menzel et al., 2007).

I ve velmi nízkých koncentracích byly v případě motility zaznamenány nekonzistentní výsledky. Zatímco Oh et al. (2011) zaznamenali u porcinních spermií po adici 1 μM stejné výsledky jako ve vyšší (10 μM) koncentraci tj. statisticky významný pokles podílu motilních spermií, Kim et al. (2014) nezaznamenali po až 6 hod působení žadný vliv na motilitu, rovněž prasečích, spermií, nicméně pozorovali signifikantní nárůst viability a to jak po 3 hod tak po 6 hod společné inkubace s 1 μM GEN. V koncentracích < 1 μM byla v případě hodnocení motility porcinních spermií zaznamenána signifikantní inhibice pohybu až do koncentrace 0,001 μM, nižší koncentrace nebyla testována (Oh et al., 2011). Zajímavé je, že stejně jako ve vyšších koncentracích, které byly testovány touto pracovní skupinou, opět došlo k ovlivnění CASA parametrů motility po 30 min nikoliv však 15 min inkubace a to konkrétně signifikantním poklesem VAP.

Ani testování kapacitace spermií nepřineslo jednotné výsledky. Zatímco Ryu et al. (2014) nepozorovali žádné účinky 1 μM GEN na kapacitaci kančích spermií po 15 min popř. 30 min inkubace, Mohamed et al. (2011) zaznamenali signifikantní nárůst podílu kapacitovaných spermií po 15 min nikoliv však po 30 min inkubace s GEN. Tyto výsledky opět kopírují ty dosažené v koncentraci 10 μM GEN. V případě bovinních (Ryu et al., 2014) i murinních (Ryu et al., 2014; Park et al., 2011) nebyly pozorovány žádné signifikantní účinky. Ačkoliv Adeoya – Osiguwa et al. (2003) pozorovali u murinních spermií po 30 min společné inkubace signifikantní nárůst podílu kapacitovaných spermií. Ani nižší koncentrace nepřinesly jednotné výsledky. Zatímco Ryu et al. (2014) nepozorovali žádné rozdíly v podílu kapacitovaných porcinních spermií od koncentrace 0,1 – 0,001 μM GEN, Mohamed et al., (2011) pozorovali statisticky významný nárůst podílu kapacitovaných spermií po 15 min nikoliv však 30 min inkubace a to po adici 0,1 a 0,01 μM GEN nikoliv však 0,001 μM GEN, v tomto případě ani oni nezaznamenali žádné signifikantní rozdíly. Zajímavá situace nastala při hodnocení bovinních spermií. Ačkoliv v širokém spektru koncentrací 0,01 – 100 μM GEN nebyly zaznamenány žádné účinky na kapacitační schopnost spermií po 15 min popř. 30 min společné inkubace, v případě testování nejnižší koncentrace tj. 0,001 μM GEN byla pozorována signifikantní stimulace podílu kapacitovaných spermií a to po 15 min nikoliv však 30 min společné inkubace. Ani v případě murinních spermií nebyly výsledky jednoznačné. Zatímco Ryu et al. (2014) a Park et al. (2011) nezaznamenali v koncentraci 0,1 μM GEN žádné účinky na kapacitaci spermií ani po 15 min ani po 30 min inkubace, Fraser et al. (2006) a Adeoya – Osiguwa et al. (2003) zaznamenali signifikantní nárůst kapacitovaných spermií a to po 35 resp. 30 min společné společné inkubace. Snížením testované koncentrace na 0,01 μM GEN popř. 0,001 μM GEN došlo k částečné proměně pozorovaných účinků. Zatímco Ryu et al. (2014) stále nepozorovali žádné změny, Park et al. (2011) detekovali statisticky významnou stimulaci po 30 min nikoliv však 15 min inkubace. Stejně jako Fraser et al. (2003) po 35 min a Adeoya – Osiguwa et al. (2003) po 30 min inkubace. Vliv GEN na kapacitaci spermií ve velmi nízkých dávkách byl testována i na humánních spermiích, v tomto případě GEN v rozmezích 0,001 – 0,1 μM kapacitaci spermií signifikantně stimuloval a to po 1 hod společné inkubace (Fraser et al., 2003).

Vliv GEN na akrozomální reakci spermií byl, ve srovnání s kapacitací, místy odlišný. Zatímco v případě porcinních spermií docházelo v koncentraci 0,1 μM GEN ke stimulaci kapacitace pouze ve studii Park et al. (2011) a to po 15 min inkubace nikoliv však 30 min inkubace a v případě Ryu et al. (2014) k ovlivnění nedošlo. Akrozomální reakce byla

stimulována po 30 min nikoliv však 15 min inkubace s GEN (Ryu et al., 2014) zatímco Park et al. (2011) žádné účinky nedetekovali. Stejné výsledky byly zaznamenány i při testování účinků 0,01 μM GEN (Ryu et al., 2014; Park et al., 2011). V nejnižší zkoumané koncentraci tj. 0,001 μM GEN nebyly pozorovány žádné efekty na akrozomální reakci porcinních spermií ani u jednoho z výše zmíněných řešitelských týmů. V případě bovinních spermií nebyly, na rozdíl od kapacitace, v žádné z velmi nízkých koncentrací tj. 0,1 – 0,001 μM GEN pozorovány účinky statisticky významné rozdíly v akrozomální reakci spermií (Ryu et al., 2014). Lehce odlišné výsledky AR oproti kapacitaci byly detekovány i u murinních spermií. Zatímco Ryu et al. (2014) i Park et al. (2011) nezaznamenali po adici 0,1 μM GEN žádné změny v kapacitaci spermií ani po 15 min ani po 30 min společné inkubace, AR byla u obou řešitelských týmů signifikantně ovlivněna po 30 min nikoliv však 15 min inkubace. Naproti tomu Fraser et al. (2003) i Adeoya – Osiguwa et al. (2003) shodně pozorovali statisticky významný nárůst jak kapacitovaných tak akrozom reaktivních spermií a to po 35 min resp. 30 min inkubace. Zatímco Fraser et al. (2003) a Adeoya – Osiguwa et al. (2003) pozorovali stejné efekty i ve snížené koncentraci tj. 0,01 μM GEN, Ryu et al. (2014) ani Park et al. (2011) v této koncentraci již žádné účinky nezaznamenali. V nejnižší testované koncentraci, tj. 0,001 μM GEN detekoval změny a v množství AR pouze kolektiv Adeoya – Osiguwa et al. (2003) a to opět stimulační. Humánní spermie reagovali na přítomnost velmi nízkých dávek (0,1 – 0,001 μM) GEN stejně jako v případě kapacitace a to statisticky významným nárůstem podílu spermií po akrozomální reakci (Fraser et al., 2003).

Z dostupné literatury nelze s určitostí definovat přesné účinky genisteinu na kvalitativní parametry spermií. Nicméně bylo doloženo, že genistein působí na spermie v širokém spektru koncentrací a to napříč jednotlivými testovacími markery. Dá se říci, že zatímco na motilitu spermií působí spíše inhibičně na kapacitaci a akrozomální reakci naopak stimulačně, na rozdíl od ZEA a jeho majoritního metabolitu α-ZOL kde byly zaznamenané účinky převážně inhibiční..

Zajímavé ovšem je, že ačkoliv by se dal předpokládat podobný mechanismus působení fytoestrogenů a estrogenních mykotoxinů, klinické účinky v *in vitro* studiích tomu nenapovídají. ZEA je v literatuře popisován jako environmentální estrogen s nejvyšším estrogenním potenciálem (Gromadzka et al., 2008), přičemž α-ZOL je považován za až 10x silnější než ZEA (Agag, 2004). Pokud však porovnáme studie zaměřené na ovlivnění spermií, nejnižší zaznamenaná účinná koncentrace u α-ZOL byla zaznamenána ve studii Benzoni et al.

(2008) a to 20 μM, kde paradoxně stimuloval VCL, zatímco v případě genisteinu byl jako nejnižší účinná koncentrace pro porcinní spermie detekován 0,001 μM GEN.

2.6. CASA – computer assisted sperm analysis

CASA neboli počítačem asistovaná analýza spermií představuje praktický nástroj pro objektivní analýzu pohybu spermií a jejich klasifikaci do různých kategorií, což poskytuje více kritérií pro odhad fertility (Šimoník et al., 2015). Tento systém analýzy pohybu spermií lze považovat za účinný, přesný a spolehlivý nástroj pro hodnocení plodnosti. Výstupy, které poskytuje, jsou objektivní s vyšší vypovídací schopností, standardizovatelné a opakovatelné (Kathiravan et al., 2011). Další výhodou systémů CASA oproti manuální analýze je automatická rekonstrukce trajektorií (Mortimer, 1997). Systém CASA byl poprvé představen v roce 1980 (Mortimer, 2000) a v průběhu let se vyvinul z analýzy multiexpozic mikrofotografií, přes analýzu snímků jednotlivých videonahrávek, až po nejnovější semi – automatizované metody (McKinnon et al., 2011). Prvními dostupnými systémy byly CellSoft Automated Semen Analyser a Hamilton Thorn Motility Analyser (HTM) poté byly na trh uvedeny i další typy (Katila, 2001). Sestavy počítačové analýzy spermatu CASA se vzájemně liší zejména hardwarovým, optickým (mikroskop, objektiv, kamera) a softwarovým vybavením (Verstegen et al., 2002). Systém CASA je založen na zachycování po sobě jdoucích snímků z mikroskopu (Quintero – Moreno et al., 2003) pomocí jednoduché čipové kamery. Obraz je následně převeden do černo – bílého rozlišení a exportován do počítače. Vyhodnocení snímků probíhá prostřednictvím specifického softwaru s modulem CASA, který je schopen tyto snímky analyzovat (Allahbadia, 2005). Získaná data jsou následně matematicky zpracována a jednotlivé trajektorie jsou definovány v numerické podobě. Výsledky tohoto zpracování se odráží v sériích parametrů, které přesně definují pohyb jednotlivých spermatických buněk (Quintero – Moreno et al., 2003).

Postup analýzy motility spermií pomocí CASA je částečně automatizovaným, avšak jeho spolehlivost závisí na řadě faktorů. Proto nelze přistupovat k práci mechanicky, ale je třeba porozumět principům.

2.6.1. Základní principy analýzy digitálního obrazu

Nasnímaný obraz z videokamery se skládá z pixelů, přičemž síla signálu daného pixelu je úměrná jeho jasu nebo inteznitě (Katz et al., 1985). Spermie jsou často snímány ve

tmavém poli nebo pomocí negativního fázového kontrastu, což usnadňuje softwaru jejich identifikaci. Výsledný tvar pohybových trajektorií je ovlivněn počtem nasnímaných obrázků za časovou jednotku (Mortimer, 2000). Obecně čím je počet snímků větší, tím vykreslenější je trajektorie pohybu jednotlivých spermií (Mortimer, 2000) obvykle se jedná o 30 – 60 snímků/sec (fps) (Katila, 2001).

Mnoho systémů CASA využívá pro analýzu digitalizovaný binární obraz tedy monochromatický obraz složený z černé a bílé barvy, kde se zároveň může vyskytovat také barva šedá, pro jejíž převod do digitální formy je definována široká škála číselných kódů v souvislosti s odstíny. K identifikaci konkrétních objektů - spermií se obvykle používá technika detekce hran, která je založena na identifikaci jednoho či více okrajů objektu prostřednictvím videoprocesoru a algoritmů. Poloha jeho těžiště (geometrický střed) je následně určena jednoduchým výpočtem, který je aplikován na celou videosekvenci (Mortimer, 1994). Poté co byly identifikovány a digitalizovány všechny hlavičky spermií na snímku, dochází k analýze dalšího snímku a k vytváření trajektorií na základě poloměru kružnice s nejvyšší pravděpodobností výskytu (Mortimer, 2000). Dráha spermie, jako část trajektorie, je vytvořena na základě propojení hlavičky spermie daného snímku s hlavičkou na snímku dalším, která se nachází v kružnici o poloměru definovaném pomocí maximálního prostorového posunu spermie mezi snímky, jenž je vypočten z podílu zadané maximální rychlosti spermie a počtu snímků za jednotku času. Pokud je v kružnici detekováno více objektů, je pro tvorbu dráhy využito těžiště hlavičky postavené nejblíže středu kružnice nebo jsou na závěr vyhledány tyto mylné body a trajektorie je rekonstruována na základě obecného směru nebo specifického schématu pohybu, také může však dojít i k ukončení výpočtu dané dráhy (Mortimer, 1994).

2.6.2. Výstupy

Obecně je motilita spermií považována za jednu z nejdůležitějších vlastností spojenou s oplozovací schopností s čímž úzce souvisí určení množství spermií v ID poškozených v průběhu kryokonzervace (Fitzpatrick et al., 2002). Subjektivní hodnocení motility je výrazně ovlivňováno zkušenostmi hodnotícího pracovníka z čehož vyplývá vyšší pravděpodobnost výskytu systematické chyby (Januskauskas et al., 1999). Hodnocení pohybových charakteristik pomocí systému CASA poskytuje širokou škálu kinematických parametrů popsaných Mortimer (2000) které jsou uvedené v tab. 1 a vyjádřeny graficky na obr. 5. Tyto ukazatele, mající vyšší vypovídající hodnotou, charakterizují fyziologický stav

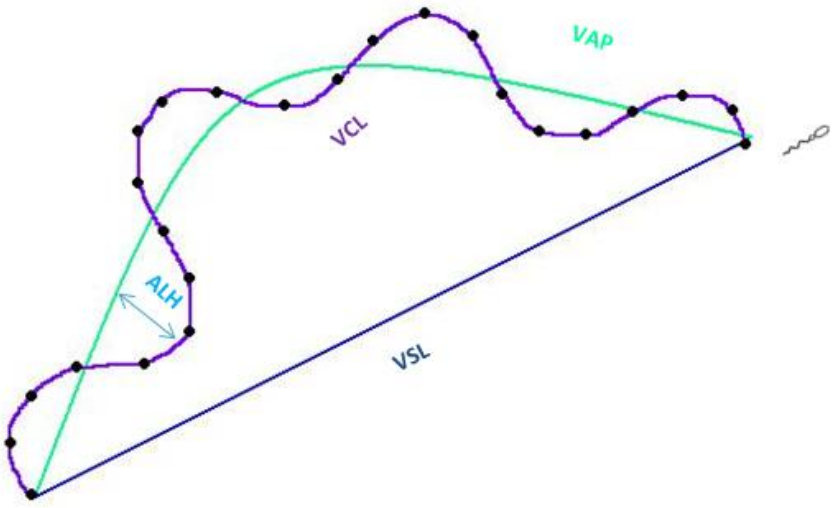
spermií a jejich oplozovací schopnosti a podávají tak přesnější informace k odhadu fertility býka (Farrell et al., 1998). Na základě výsledků CASA lze spermie rozdělit do 4 kategorií – rychle, středně, pomalu se pohybující a nepohyblivé podle klasifikace WHO určené pro lidské spermie. Kategorizace je podle WHO prováděna v závislosti na nejnižší a střední hodnotě VAP (VLL a MVV) a prahové hodnotě STR, kdy za rychlé jsou brány spermie s VAP > MVV, středně rychlé LVV < VAP < MVV, pomalé VAP < LVV a nepohyblivé ty, které se během analýzy nehýbaly. Procento spermií s progresivním pohybem je potom určováno pomocí VAP, jenž přesahuje MVV a prahovou hodnotu STR. Jiným způsobem odlišení různých skupin spermií, avšak na základě širší škály parametrů hodnocených CASA ve vzorku ejakulátu je stanovení tzv. subpopulací spermií, kdy k diferenciaci dochází pomocí clusterové analýzy (Šimoník et al., 2015), která lépe definuje pohybové vlastnosti jednotlivých spermií (Quintero – Moreno et al., 2007). Jak bylo naznačeno výše, jednotlivé subpopulace lze jednoduše charakterizovat na základě průměrných kinematických parametrů získáných ze systému CASA (Martínez – Pastor et al., 2011), tyto subpopulace rozdělené do clusterů následně reflektují vlastnosti vzájemně podobných spermií. Ve srovnání s tímto, se jeví prostý průměr nebo medián celé populace spermií jako nedostatečný (Amann et Waberski, 2014).

Tab. 1: Parametry motility spermií

VCL	křivočará rychlost	curvilinear velocity
VAP	střední dráhová rychlost	average path velocity
VSL	lineární rychlost	straight line velocity
STR	přímost pohybu	straightness (VSL/VAP)
LIN	linearita	linearity (VSL/VCL)
WOB	kmitavost	wobble (VAP/VCL)
TMOT	procento celkové motility	total motility
PMOT	procento progresivně motilních	progressive motility
ALH	laterální pohyb hlavičky	Amplitude of lateral head displacement
BCF	frekvence křížení	beat cross frequency

(převzato z: Katila, 2001)

Obr. 5: Vyjádření vybraných pohybových charakteristik



2.6.3. Faktory ovlivňující výstupy analýzy

Velmi významným faktorem z hlediska standardizace výsledků CASA systémů je pre-analytická část zahrnující přípravu vzorku k analýze. A to z hlediska koncentrace, objemu vzorku a použitého média k ředění. Vzorky pro hodnocení musí být vždy naředěny, protože koncentrace samotného ejakulátu je příliš vysoká pro úspěšnou analýzu drah jednotlivých spermií (Verstegen et al., 2002) uvádějí optimální koncentraci spermií pro analýzu v intervalu 30 – 50 x 10^6/ml. Objem vzorku naředěného semene k analýze se pohybuje v rozmezí 4 – 10 µl, v závislosti na používaných hodnotících komůrkách. Pro komůrku typu Microcell se pro analýzu využívá 7 µl v případě použití Maklerovy komůrky jsou to 4 µl (Januskauskas et al., 1999), stejně jako v případě Leja skel (Shojaei et al., 2012). Rovněž použití různých typů komůrek může mít vliv na výsledky analýz jak na pohybové parametry, tak na celkové procento motilních spermií společně s dobou vlastní analýzy, jež by neměla překročit dobu 5 minut (Contri et al., 2010). Díky malým objemům používaným při analýzách musí být vzorky maximálně homogenní a zpracování šetrné. Z hlediska objektivnosti výsledků jsou tedy kladeny vyšší nároky na přípravu vzorku v porovnání se subjektivním hodnocením, protože výsledek může být snadno ovlivněn. Při zkoumání vlivu rychlosti snímkování, tedy počtu snímků za sekundu, byl nalezen signifikantní vliv tohoto faktoru při použití kamery s 30 fps v porovnání s 45 a 60 fps a to na nižší hodnoty TMOT, PMOT, všech kinematických parametrů a kategorií rychlých, středně a pomalu se pohybujících spermií (Contri et al., 2010).

Mezi nejčastější zdroje chyb v CASA systémech patří chybné rozpoznávání objektů, kolize a srážky, ztráta trajektorií v důsledku vysoké koncentrace spermií, chyby při rekonstrukci kolidujících trajektorií a interpolace trajektorií, nicméně stále probíhají inovace CASA systémů a vznikají nové algoritmy pro správné posouzení statických objektů a srážek. Jednou z nejzákladnějších prevencí chybných výsledků v důsledku kolizí spermií je dodržování výše zmíněné vhodné koncentrace doporučené výrobcem CASA, která je uváděna v rozsahu 30 – 50 x 10^6/ml (Verstegen et al., 2002). Contri et al. (2010) uvádějí optimální koncentraci 20 x 10^6/ml, kdy při jejich experimentu již koncentrace 50 a 100 x 10^6/ml způsobovaly velké množství chybně vytvořených trajektorií a zhoršovaly detekci spermií.

3. Hypotézy a cíle práce

Na základě zmíněných poznatků z vědecké literatury byla stanovena následující **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.

Cíle práce:

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

4. Materiál a Metody

4.1. Chemikálie

Pokud není specifikováno jinak, všechny chemikálie byly pořízeny u firmy Sigma Aldrich® (St. Louis, Missouri, USA (distributor Praha, ČR)).

Zásobní roztoky (10 mM) zearalenonu (Z2125), α-zearalenolu (Z0166) a genisteinu (G6776) byly připravovány rozpuštěním lyofilizovaného prášku v dimethyl sulfoxidu (DMSO; D5879) a skladovány v -20°C. Pracovní roztoky pro dosažení jednotlivých, požadovaných koncentrací se připravovaly v den experimentu. Jako disolvent bylo použito ředící médium spermií (SUS, Medichimica, Regio Emilia, Italy). Podrobněji viz příprava pracovních roztoků.

4.2. Zvířata a odběr vzorků

Sperma pro experimenty bylo získáváno od plemenných kanců s prověřenou plodností ustájených a chovaných v prostorách komerčního provozu inseminační stanice. Ihned po odběru ejakulátu byla zachycená spermiová frakce zředěna ředícím médiem (SUS) a v podobě komerčních inseminačních dávek tj. expedovaná ve formě plastové tuby o objemu 50 ml byla pro následující zpracování a analýzu přepravována a uchovávána v klimaboxu (termobox Klimabox, Selko Praha s.r.o.) při konstantní teplotě 17°C. Každá inseminační dávka byla před použitím v experimentu vyšetřena na aktuální podíl pohyblivých spermií. Toto hodnocení probíhalo po zahřátí aliquoty semene po dobu 4 min ve vodní lázně temperované na teplotu 38°C a posouzení bylo prováděno subjektivní analýzou pod světelným mikroskopem s výhřevným stolkem při 100x zvětšení (specifikace viz níže). Pro experimenty byl následně použit pouze ejakulát s více než 75 % motilních spermií. Experimenty byly prováděny v laboratoři na Katedře veterinárních disciplín ČZU a to maximálně 48 hodin po odběru.

4.3. Příprava pracovních roztoků

Zásobní roztoky byly připravovány smísením 5 mg příslušného kontaminantu (ZEA, α-ZOL a GEN) v lyofilizovaném stavu se 100 µl DMSO. Výsledný roztok byl rozdělen na aliquoty o objemu 40 µl a označen jako pracovní roztok – P20. Tyto aliquoty byly následně skladovány v -20 °C. V den pokusu byla rozmrazena aliquota P20 příslušného kontaminantu a tohoto pracovního roztoku byly postupným ředěným vytvořeny pracovní roztoky P10; P5; P2,5; P1 a P0,5, které odpovídaly příslušným koncentracím v dílčích experimentech. Tyto pracovní roztoky byly použity v den výroby a den následující, a po tuto dobu byly skladovány

v mrazáku při -20°C. Dalším krokem byla výroba tzv. finálních pracovních roztoků. Ty byly připravovány vždy čerstvé před začátkem experimentu. Podrobněji: 5 µl příslušného pracovního roztoku Px bylo smíseno se 120 µl supernatantu, který byl připravován centrifugací ejakulátu (viz níže). Finální pracovní roztoky byly označeny jako F20; F10; F5; F2,5; F1 a F0,5 a v této podobě byly následně přidávány ke vzorkům semene. Stejným způsobem byla připravena i kontrola DMSO, tj. 5µl DMSO + 120 µl supernatantu.

Příprava supernatantu probíhala následovně: 2 ml ejakulátu byly rozděleny do 2 mikrozkumavek o objemu 1,5 ml a centrifugovány (Minispin, Eppendorf®) po dobu 10 min při rychlosti 1500 otáček/sec. Následně bylo z každé mikrozkumavky odebráno 750 µl supernatantu a tento byl stočen podruhé a to při rychlosti 10 000 otáček/sec rovněž po dobu deseti minut. Poté bylo z každé zkumavky odebráno 500 µl supernatantu. Výsledný objem tak činil 1 ml supernatantu a tento již byl určen pro výrobu finálních pracovních roztoků

4.4. Schéma experimentů

Realizovány byly tři jednotlivé experimenty (ZEA, α-ZOL, GEN) za použití stejného standardizovaného operačního protokolu: Inseminační dávka byla rozdělena na jednotlivé alikvoty (950 µl) do plastových zkumavek Eppendorf® o objemu 1,5 ml a tyto byly následně vloženy do vodní lázně (SUB 6, Grant Instruments, Cambridge, England) vytemperované na 38°C. Poté se připravené a temperované finální pracovní roztoky ZEA (Experiment 1), α-ZOL (Experiment 2) popř. GEN (Experiment 3) přidaly k ejakulátu v množství odpovídajícím dílčím finálním koncentracím 0 µM (kontrola rozpouštědla, 2 µl DMSO na 998 µl ejakulátu), 0,5 µM; 1 µM; 2,5 µM; 5 µM; 10 µM a 20 µM. Všechny alikvoty spermatu byly následně inkubovány ve stejných podmínkách (38°C – vodní lázeň) a motilita spermií byla hodnocena po 2 a 4 hodinách inkubace. Veškeré pomůcky a laboratorní vybavení používané během experimentu byly rovněž vytemperováno na 38°C a to prostřednictvím histologické výhřevné desky VD2.

4.4.1. Analýza motility spermií

Motilita spermií byla hodnocena použitím CASA modulu (Nis Elements, ver. 3.20, Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic), 2 µl vzorku (při koncentraci spermií v rozmezí 30 and 35 x 10^6) byly umístěny do komůrky 20 µm hlubokého kalibrovaného Leja® skla (Nieuw-Vennep, The Netherlands), z 6 polí (6 polí na sklíčko) byla pomocí kamery (ProgRes® CT1, Jenoptik, Jena, Germany) a mikroskopu s výhřevným stolkem (Eclipse

E600, Nikon, Tokyo, Japan) při zvětšení 100x (negativní fázový kontrast, objektiv Ph 1 BM, Nikon, Tokyo, Japan) zaznamenána motilita. Analýzou 69 digitalizovaných snímků pořízených v časové smyčce 2 sec při frekvenci snímání 34.5 snímků za sekundu bylo dosaženo objektivního hodnocení pohybu spermií. Dráha každé spermie byla analyzována prostřednictvím následujících pohybových parametrů: curvilinear velocity (VCL; [μm/s]) – pohyb po reálné dráze, average-path velocity (VAP; [μm/s]) – pohyb po průměrné dráze, straight-line velocity (VSL; [μm/s]) – pohyb po přímé dráze, amplitude of lateral head displacement (ALH; [μm]) – amplituda laterální výchylky hlavičky, beat cross frequency (BCF; [Hz]) – frekvence kmitání bičíku, linearity (LIN; VSL/VCL x 100 [%]) - linearita, straightness (STR; VSL/VAP x 100 [%]) - přímočarost a wobble (WOB; VAP/VCL x 100 [%]) - woblerita.

Spermie s VAP > 10 μm/s byly klasifikovány jako motilní. Z populace pohyblivých spermií byly vyjádřeny střední hodnoty výše uvedených CASA pohybových parametrů, dále byla analyzována struktura jednotlivých subpopulací. Nakonec byl vyjádřen podíl nepohyblivých - IMMOTILE spermií (VAP ≤ 10 μm/s).

4.5. Statistická analýza

Statistická analýza byla prováděna prostřednictvím programu Statistica 12 (StatSoft CR, Prague, Czech Republic). Byly použity následující statistické testy: clusterová analýza, ANOVA, chí-kvadrát test, Schefféův test.

Shlukové analýze byla podrobena data motilních (VAP > 10 μm/) spermií metodou K-means clustering. Tímto procesem byly spermie na základě Euklidovských vzdáleností vybraných markerů motility spermií (VCL, VSL, VAP, ALH, BCF) rozděleny do tří specifických nesouvislých clusterů, odpovídajících třem subpopulacím: *SLOW* – pomalé, *MEDIUM FAST (MEDIUM F.)* – středně rychlé a *FAST* – rychlé spermie. Každý cluster byl charakterizován hodnotami průměr a standardní chyba aritmetického průměru (SEM - *Standard Error of Arithmetic Mean*) parametrů motility spermií. Pro účely zjištění distribuce spermií do jednotlivých subpopulací byla jako čtvrtá subpopulace přidána kategorie IMMOTILE - nepohyblivé spermie (VAP ≤ 10 μm/s). Významnost rozdílů v distribuci spermií do subpopulací byla ověřována chí-kvadrát testem.

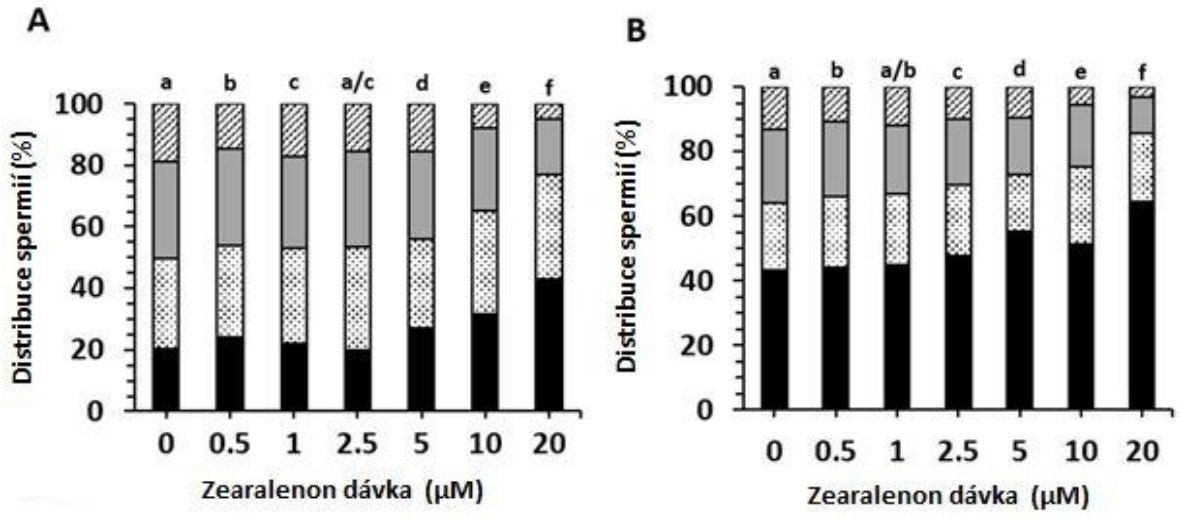
Analýzou variance (ANOVA) s interakcemi byl hodnocen vliv koncentrace vybraných endokrinních disruptorů na jednotlivé parametry pohybu spermií. Poté byla vyjádřena hodnota průměru ± SEM. Případné statisticky signifikantní rozdíly mezi zjištěnými hodnotami byly následně specifikovány použitím Schefféova testu. S ohledem na velký rozsah analyzovaných souborů (N > 6500 v každé pokusné skupině) a existující variabilitu biologického materiálu na pozadí experimentálního designu, byla stanovena hladina významnosti $p < 0{,}0001$.

5. Výsledky

5.1. Experiment 1 (ZEA)

5.1.1. Hodnocení motility spermií na základě shlukové analýzy

Účinky ZEA se projevily již po 2 hod inkubace (Graf 1A) kdy byla pozorována redistribuce spermií mezi jednotlivými subpopulacemi. S rostoucí koncentrací ZEA docházelo zejména k nárůstu podílu spermií v subpopulaci IMMOTILE na úkor subpopulace FAST, resp. MEDIUM F. Po 4 hod inkubace (Graf 1B) došlo k prohloubení pozorovaných účinků při zachování stejného trendu. Zároveň byl zaznamenán signifikantní pokles středních hodnot parametrů pohybu charakterizujících jednotlivé subpopulace mezi 2 a 4 hod inkubace, vyjma BCF (Tab. 2).



Graf 1. Distribuce spermií v subpopulacích vyjádřená v procentech - IMMOTILE (černý sloupec), SLOW (tečkovaný sloupec), MEDIUM F. (šedý sloupec) and FAST (šrafovaný sloupec) po 2 hod (**A**) a 4 hod (**B**) inkubace s různými dávkami ZEA.

a-f odlišné superskripty označují statisticky významný rozdíl mezi skupinami na hladině významnosti $p < 0{,}0001$ (chi-kvadrát test).

Tab. 2: Charakteristiky subpopulací kančích spermií vystavených ZEA* po 2 hod a 4 hod inkubace. Průměr ± SEM.

	2 hod			4 hod		
	SLOW	MEDIUM F.	FAST	SLOW	MEDIUM F.	FAST
VCL [μm/s]	49.06 ± 0.18[a]	99.25 ± 0.13[a]	144.45 ± 0.18[a]	43.43 ± 0.13[b]	83.14 ± 0.13[b]	133.59 ± 0.30[b]
VAP [μm/s]	26.01 ± 0.10[a]	61.33 ± 0.10[a]	87.46 ± 0.13[a]	20.66 ± 0.06[b]	44.47 ± 0.10[b]	72.81 ± 0.19[b]
VSL [μm/s]	21.22 ± 0.11[a]	54.64 ± 0.12[a]	78.58 ± 0.16[a]	17.02 ± 0.07[b]	38.81 ± 0.12[b]	63.99 ± 0.23[b]
ALH [μm]	4.44 ± 0.03[a]	6.51 ± 0.02[a]	8.80 ± 0.02[a]	3.78 ± 0.02[b]	5.48 ± 0.02[b]	7.88 ± 0.03[b]
LIN [%]	48.39 ± 0.24[a]	56.83 ± 0.13[a]	55.78 ± 0.13[a]	44.45 ± 0.20[b]	48.48 ± 0.16[b]	49.62 ± 0.2[b]
WOB [%]	57.30 ± 0.20[a]	63.23 ± 0.11[a]	61.70 ± 0.11[a]	52.10 ± 0.17[b]	54.99 ± 0.13[b]	55.99 ± 0.17[b]
STR [%]	78.66 ± 0.24[a]	88.28 ± 0.12[a]	89.38 ± 0.11[a]	80.44 ± 0.21[b]	85.84 ± 0.16[b]	86.87 ± 0.18[b]
BCF [Hz]	6.62 ± 0.03[a]	6.96 ± 0.02[a]	7.14 ± 0.03[a]	6.59 ± 0.02[a]	6.77 ± 0.02[b]	7.10 ± 0.04[a]

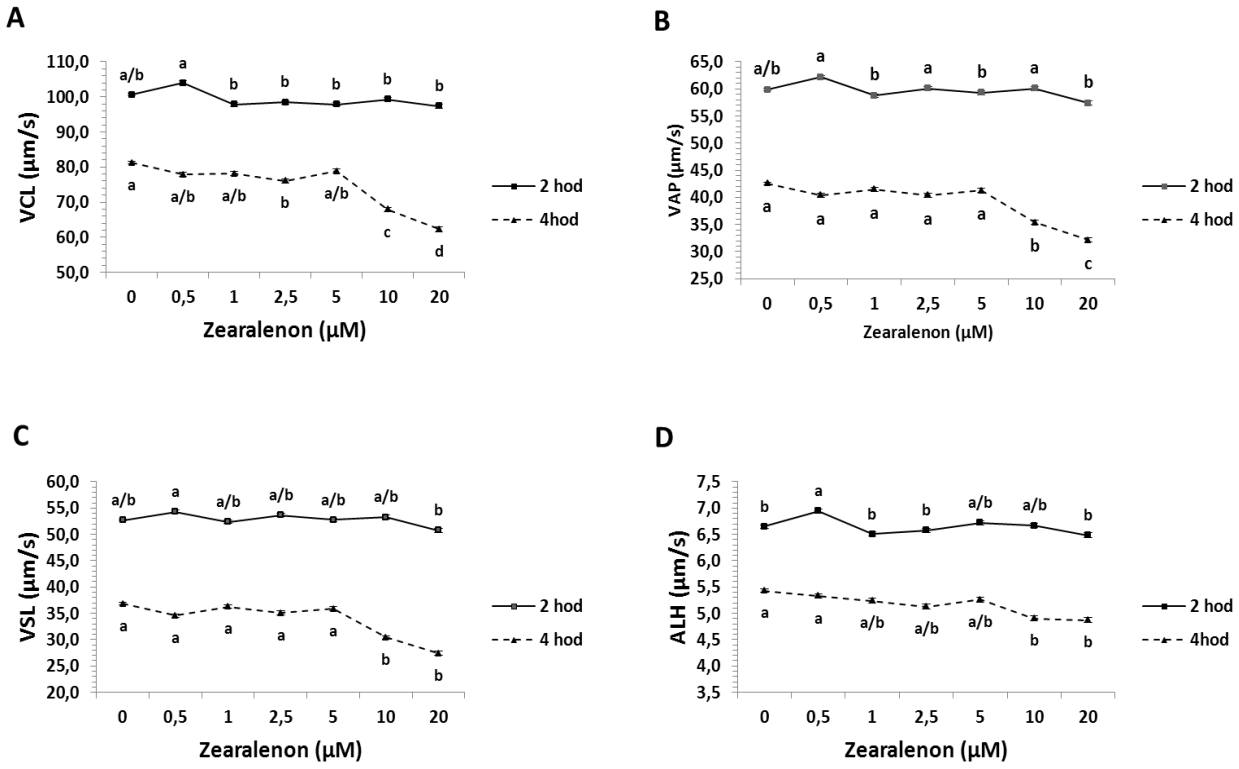
*V experimentu 1 byly spermie vystaveny 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 popř. 20 μM ZEA.

[a,b] hodnoty označené různými písmennými superskripty v řádku v rámci stejné subpopulace indikují statisticky významný rozdíl mezi 2. a 4. hod inkubace ($p < 0.0001$, Schefféův test)

5.1.2. Vliv na CASA parametry motility

Po 2 hod koinkubace spermií se ZEA nebylo VCL významněji ovlivněno (Graf 2A) nicméně po 4 hod inkubace došlo k poklesu hodnot tohoto parametru v míře závislé na dávce, signifikantnímu od 2,5 µM. Pouze koncentrace 5 µM z tohoto trendu vybočovala a nelišila se statisticky od kontroly. Podobný trend byl zaznamenán i u parametru VSL a VAP (Graf 2B, 2C).

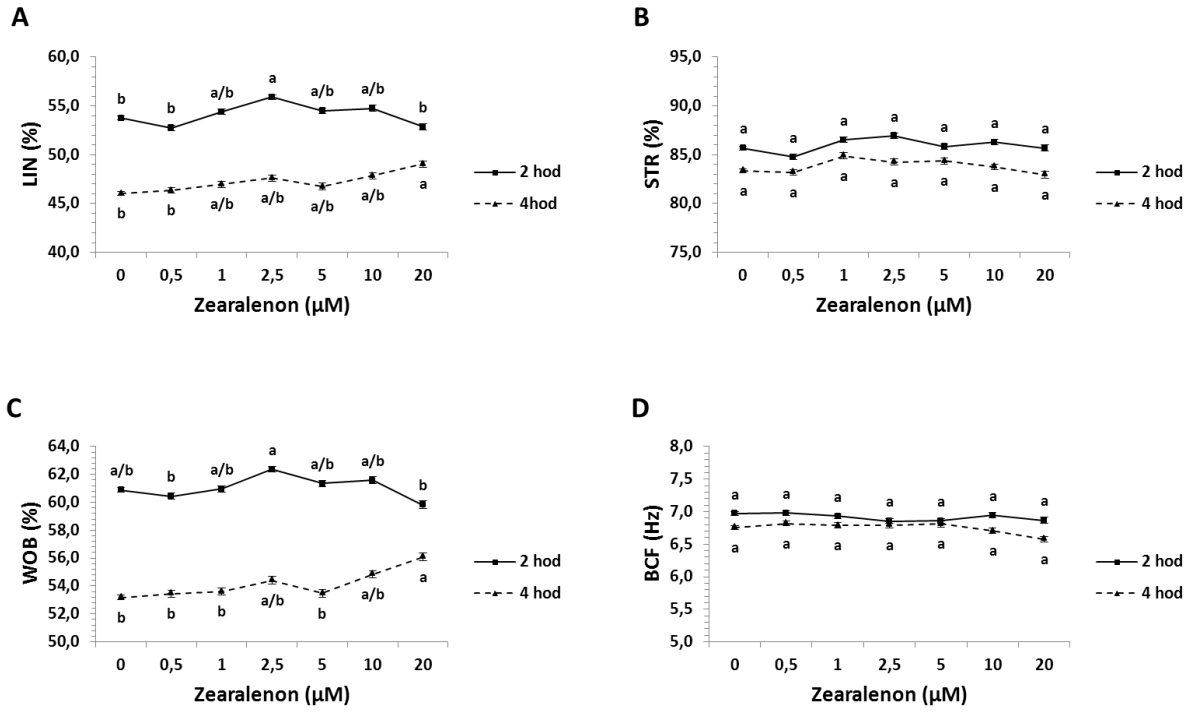
Podobná situace jako u rychlostních parametrů byla pozorována i v případě ALH (Graf 2D). Ačkoliv u koncentrace 0,5 µM po 2 hod inkubace bylo zaznamenáno signifikantní zvýšení. Naopak po 4 hod inkubace byl pokles hodnot ALH signifikantní až po adici 10 µM popř. 20 µM ZEA.



Graf 2. Účinky různých koncentrací ZEA na pohybové parametry kančích spermií VCL (**A**), VSL (**B**), VAP (**C**) a ALH (**D**) po 2 hod a 4 hod inkubace.

a,b,c,d- odlišné superskripty indikují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi ZEA na hladině významnosti $p < 0{,}0001$ (Schefféův test).

Odlišná situace nastala v případě dopočítávaných parametrů. U LIN se po 2 hod inkubace projevovala mírná tendence k navýšení hodnot se signifikantním vrcholem v koncentraci 2,5 μM (Graf 3A). Naproti tomu po 4 hod inkubace průměrné hodnoty rostly lineárně s koncentrací ZEA, při adici 20 μM byl nárůst oproti kontrole statisticky významný. Podobné změny byly zaznamenány i u parametru STR a WOB (Graf 3B, 3C). BCF nebyla ovlivněna (Graf 2D).



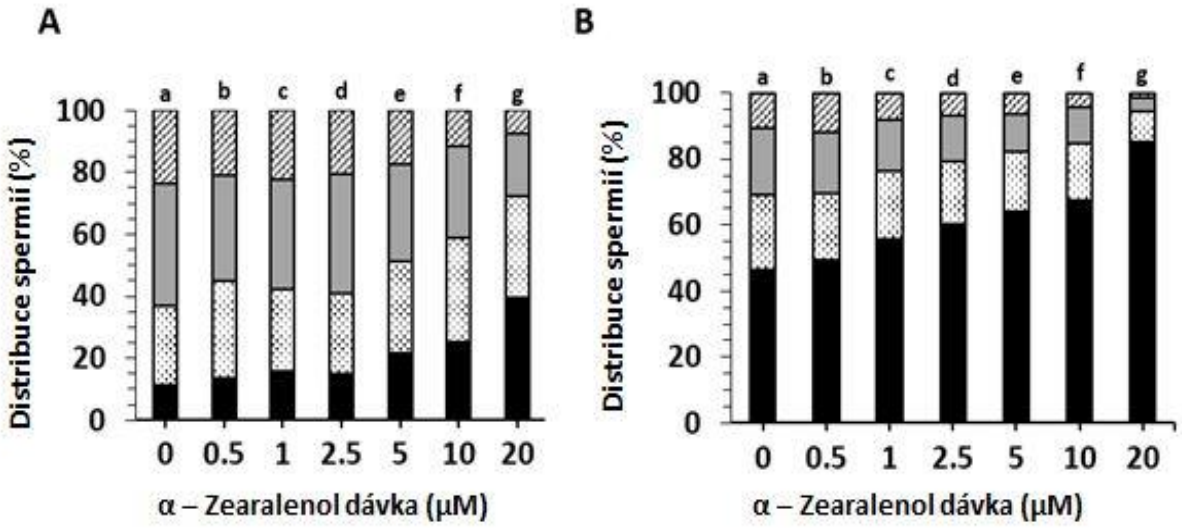
Graf 3. Účinky různých koncentrací ZEA na pohybové parametry kančích spermií LIN (**A**), STR (**B**), WOB (**C**) a BCF (**D**) po 2 hod a 4 hod inkubace.

a,b,c,d- odlišné superskripty indikují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi ZEA na hladině významnosti $p < 0{,}0001$ (Schefféův test).

5.2. Experiment 2 (α-ZOL)

5.2.1. Hodnocení motility spermií na základě shlukové analýzy

I v případě α-ZOL došlo již po 2 hod inkubace (Graf 4A) k výrazné redistribuci spermií mezi jednotlivými subpopulacemi. K signifikantnímu nárůstu podílu spermií závislém na dávce došlo u subpopulace IMMOTILE již od nejnižší testované koncentrace tj. 0,5 µM α-ZOL. Tato změna byla na úkor zejména kategorií FAST a MEDIUM F. Stejný trend byl pozorován i po 4 hod inkubace (Graf 4B), nicméně inhibiční účinky byly mnohem výraznější. I v případě α-ZOL byl pozorován signifikantní pokles středních hodnot mezi 2 a 4 hod inkubace u drtivé většiny parametrů pohybu charakterizujících jednotlivé subpopulace. Hodnoty parametrů VCL a ALH však u některých subpopulací naopak vzrostly (Tab. 3).



Graf 4. Distribuce spermií v subpopulacích vyjádřená v procentech v IMMOTILE (černý sloupec), SLOW (tečkovaný sloupec), MEDIUM F. (šedý sloupec) and FAST (šrafovaný sloupec) po 2 hod (**A**) a 4 hod (**B**) inkubace s různými dávkami α-ZOL.

a-f odlišné superskripty označují statisticky významný rozdíl mezi skupinami na hladině významnosti $p < 0,0001$ (chi-kvadrát test).

Tab. 3: Charakteristiky subpopulací kančích spermií vystavených α-ZOL* po 2 hod a 4 hod inkubace. Průměr ± SEM.

	2 hod			4 hod		
	SLOW	MEDIUM F.	FAST	SLOW	MEDIUM F.	FAST
VCL [μm/s]	48.75 ± 0.10[a]	91.49 ± 0.10[a]	141.76 ± 0.19[a]	43.52 ± 0.13[b]	87.18 ± 0.17[b]	144.43 ± 0.34[b]
VAP [μm/s]	23.41 ± 0.06[a]	47.69 ± 0.07[a]	69.94 ± 0.14[a]	19.09 ± 0.06[b]	40.90 ± 0.13[b]	63.01 ± 0.24[b]
VSL [μm/s]	19.18 ± 0.06[a]	40.55 ± 0.09[a]	58.33 ± 0.18[a]	14.27 ± 0.08[b]	33.45 ± 0.15[b]	49.99 ± 0.30[b]
ALH [μm]	4.00 ± 0.02[a]	5.82 ± 0.02[a]	8.20 ± 0.02[a]	4.74 ± 0.03[b]	5.77 ± 0.03[a]	7.89 ± 0.04[b]
LIN [%]	41.33 ± 0.13[a]	46.02 ± 0.11[a]	42.56 ± 0.14[a]	35.27 ± 0.19[b]	40.06 ± 0.20[b]	36.01 ± 0.24[b]
WOB [%]	49.91 ± 0.11[a]	53.48 ± 0.09[a]	50.51 ± 0.12[a]	47.02 ± 0.16[b]	48.32 ± 0.17[b]	44.80 ± 0.20[b]
STR [%]	80.04 ± 0.15[a]	83.79 ± 0.12[a]	81.96 ± 0.15[a]	72.56 ± 0.25[b]	79.31 ± 0.24[b]	77.09 ± 0.31[b]
BCF [Hz]	6.65 ± 0.02[a]	7.02 ± 0.02[a]	7.16 ± 0.03[a]	5.94 ± 0.03[b]	6.70 ± 0.03[b]	6.88 ± 0.04[b]

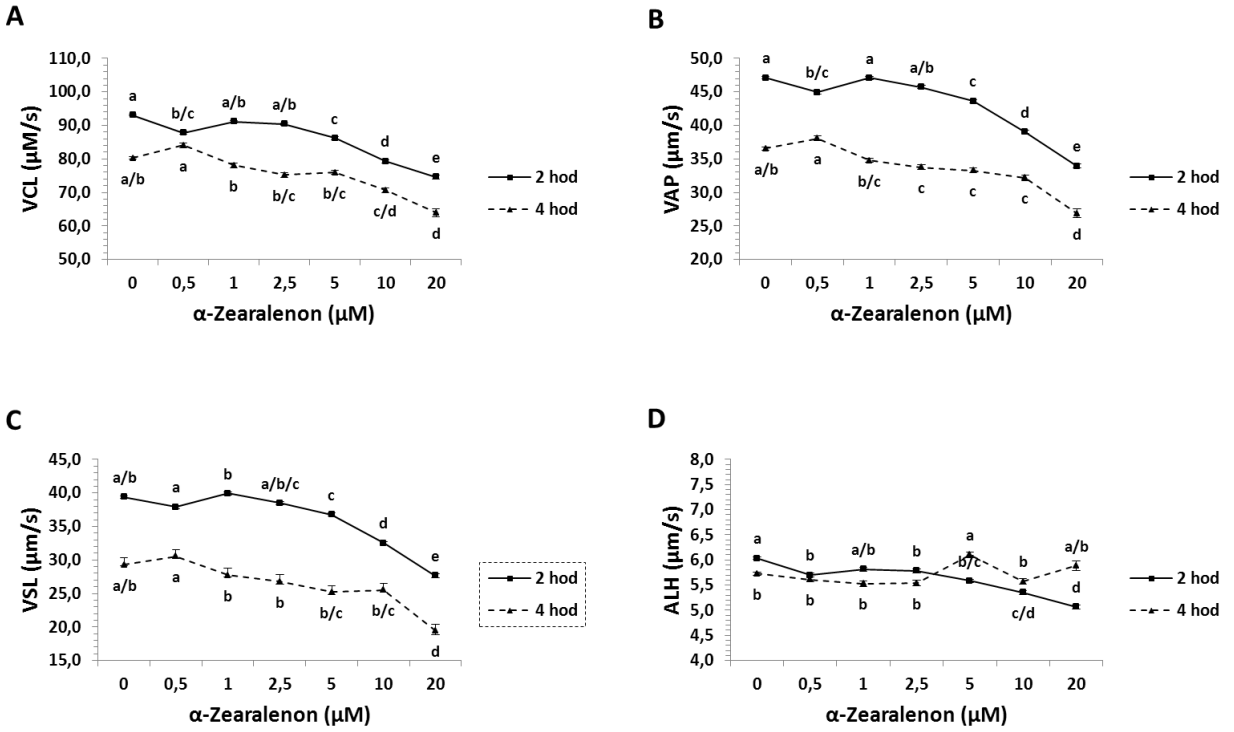
*V experimentu 2 byly spermie vystaveny 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 popř. 20 μM α-ZOL.

[a,b] hodnoty označené různými písmennými superskripty v řádku v rámci stejné subpopulace indikují statisticky významný rozdíl mezi 2. a 4. hod inkubace ($p < 0.0001$, Schefféův test.)

5.2.2. Vliv na CASA parametry motility

Inkubace spermií s α-ZOL vedla, v závislosti na dávce, k poklesu hodnoty VCL statisticky průkazné od koncentrace 5 µM po 2 hodinách, resp. od 2,5 µM po 4 hodinách inkubace. Opět jistým způsobem vybočovala nejnižší koncentrace 0,5 µM, kdy po 2 hodinách inkubace byla hodnota VCL signifikantně snížena oproti kontrole (Graf 5A). Podobné efekty byly zaznamenány i v případě VAP a VSL (Graf 5B, 5C).

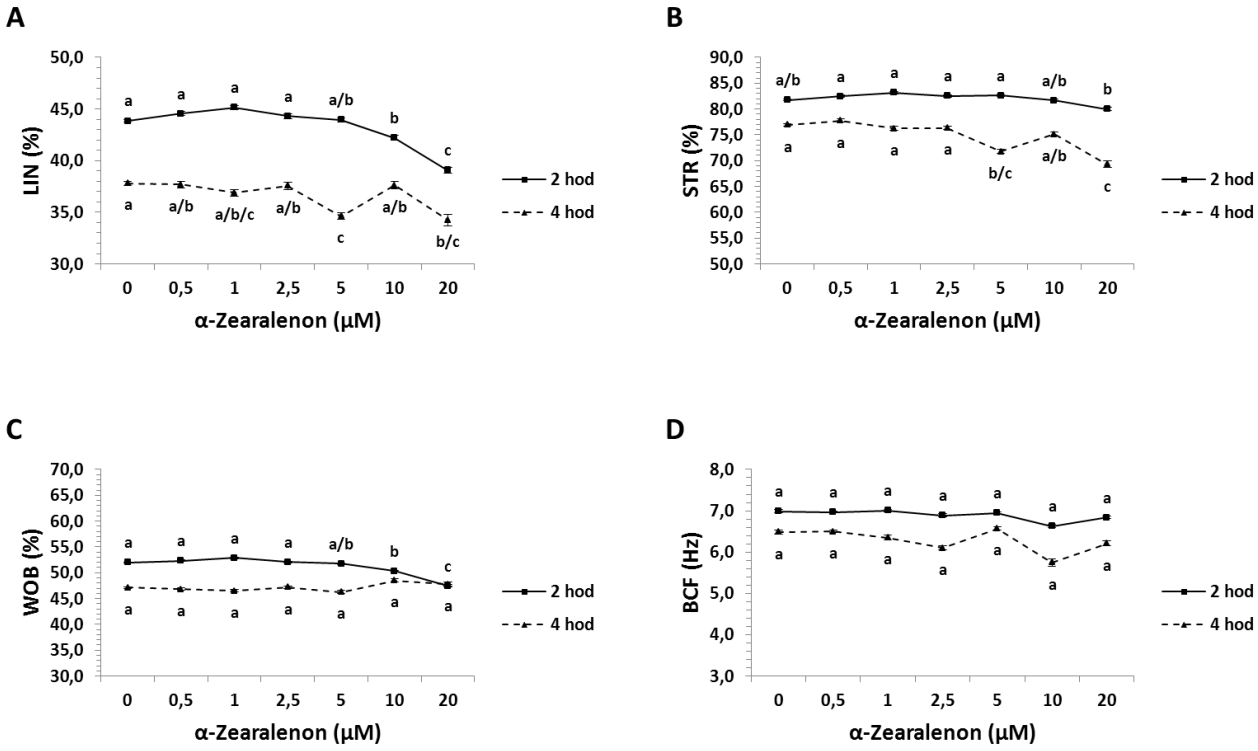
Parametr ALH vykazoval po 2 hod inkubace (Graf 5D) změny analogické VCL (Graf 5A). Po 4 hod inkubace však byly průměrné hodnoty ALH pro všechny koncentrace na úrovni kontroly, vyjma dávky 5 µM a 20 µM α-ZOL, kde došlo k navýšení hodnoty.



Graf 5. Účinky různých koncentrací α-ZOL na pohybové parametry kančích spermií VCL (**A**), VAP (**B**), VSL (**C**) a ALH (**D**) po 2 hod a 4 hod inkubace.

a,b,c,d- odlišné superskripty indikují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi α-ZOL na hladině významnosti $p < 0{,}0001$ (Schefféův test).

LIN vykazovala po 2 hod inkubace signifikantní, na dávce závislý, pokles střední hodnoty pouze v nejvyšších koncentracích 10 µM a 20 µM α-ZOL (Graf 5A). Po 4 hod inkubace se však pokles hodnoty LIN projevil selektivně u koncentrací 5 µM a 20 µM. Podobný trend byl zaznamenán i u parametrů WOB, STR a BCF (Graf 5B, 5C, 5D).



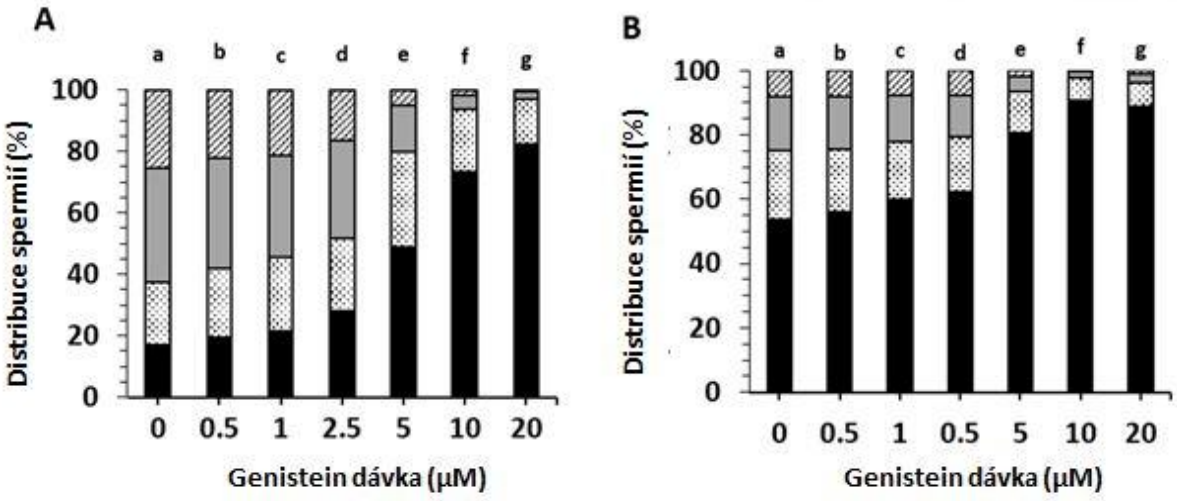
Graf 6. Účinky různých koncentrací α-ZOL na pohybové parametry kančích spermií LIN (**A**), STR (**B**), WOB (**C**) a BCF (**D**) po 2 hod a 4 hod inkubace.

a,b,c,d- odlišné superskripty indikují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi α-ZOL na hladině významnosti $p < 0{,}0001$ (Schefféův test).

5.3. Experiment 3 (GEN)

5.3.1. Hodnocení motility spermií na základě shlukové analýzy

Také GEN po 2 hod inkubace (Graf 7A) zvyšoval podíl nepohyblivých spermií již od nejnižší testované koncentrace, přičemž nárůst efektu se zvyšující se dávkou byl nejstrmější ze všech testovaných látek. Tyto změny opět korelují s úbytkem spermií v subpopulaci FAST a zejména u nejvyšších koncentrací GEN je patrná i výrazná redukce spermií v subpopulaci MEDIUM F. Po 4 hod inkubace (Graf 7B) byly tyto trendy ještě výraznější. I zde byl pozorován mezi 2 a 4 hod inkubace signifikantní pokles středních/průměrných hodnot většiny parametrů charakterizujících jednotlivé subpopulace, opět s výjimkou parametrů VCL a ALH – jako u experimentu s α-ZOL (Tab. 4).



Graf 7. Distribuce spermií v subpopulacích vyjádřená v procentech v IMMOTILE (černý sloupec), SLOW (tečkovaný sloupec), MEDIUM F. (šedý sloupec) and FAST (šrafovaný sloupec) po 2 hod (**A**) a 4 hod (**B**) inkubace s různými dávkami GEN.

a-g odlišné superskripty označují statisticky významný rozdíl mezi skupinami na hladině významnosti $p < 0{,}0001$ (chi-kvadrát test).

Tab. 4: Charakteristiky subpopulací kančích spermií vystavených GEN* po 2 hod a 4 hod inkubace. Průměr ± SEM.

	2 h			4 h		
	SLOW	MEDIUM F.	FAST	SLOW	MEDIUM F.	FAST
VCL [μm/s]	41.67 ± 0.11[a]	88.26 ± 0.11[a]	138.75 ± 0.20[a]	41.61 ± 0.10[a]	83.77 ± 0.14[b]	142.25 ± 0.31[b]
VAP [μm/s]	22.31 ± 0.06[a]	46.90 ± 0.08[a]	70.32 ± 0.16[a]	19.39 ± 0.05[b]	36.07 ± 0.11[b]	58.80 ± 0.24[b]
VSL [μm/s]	18.75 ± 0.07[a]	40.50 ± 0.10[a]	59.99 ± 0.20[a]	14.89 ± 0.07[b]	27.75 ± 0.14[b]	44.98 ± 0.28[b]
ALH [μm]	3.85 ± 0.02[a]	5.80 ± 0.02[a]	8.05 ± 0.02[a]	4.45 ± 0.02[b]	6.45 ± 0.03[b]	8.39 ± 0.04[b]
LIN [%]	52.54 ± 0.2[a]	47.97 ± 0.13[a]	44.93 ± 0.16[a]	41.35 ± 0.20[b]	35.13 ± 0.19[b]	33.10 ± 0.23[b]
WOB [%]	59.88 ± 0.17[a]	54.88 ± 0.11[a]	52.10 ± 0.13[a]	51.32 ± 0.16[b]	44.75 ± 0.16[b]	42.62 ± 0.19[b]
STR [%]	81.66 ± 0.18[a]	84.43 ± 0.13[a]	83.61 ± 0.16[a]	74.35 ± 0.22[b]	73.51 ± 0.25[b]	73.75 ± 0.31[b]
BCF [Hz]	6.66 ± 0.02[a]	7.08 ± 0.02[a]	7.32 ± 0.03[a]	6.1 ± 0.02[b]	6.33 ± 0.03[b]	6.60 ± 0.04[b]

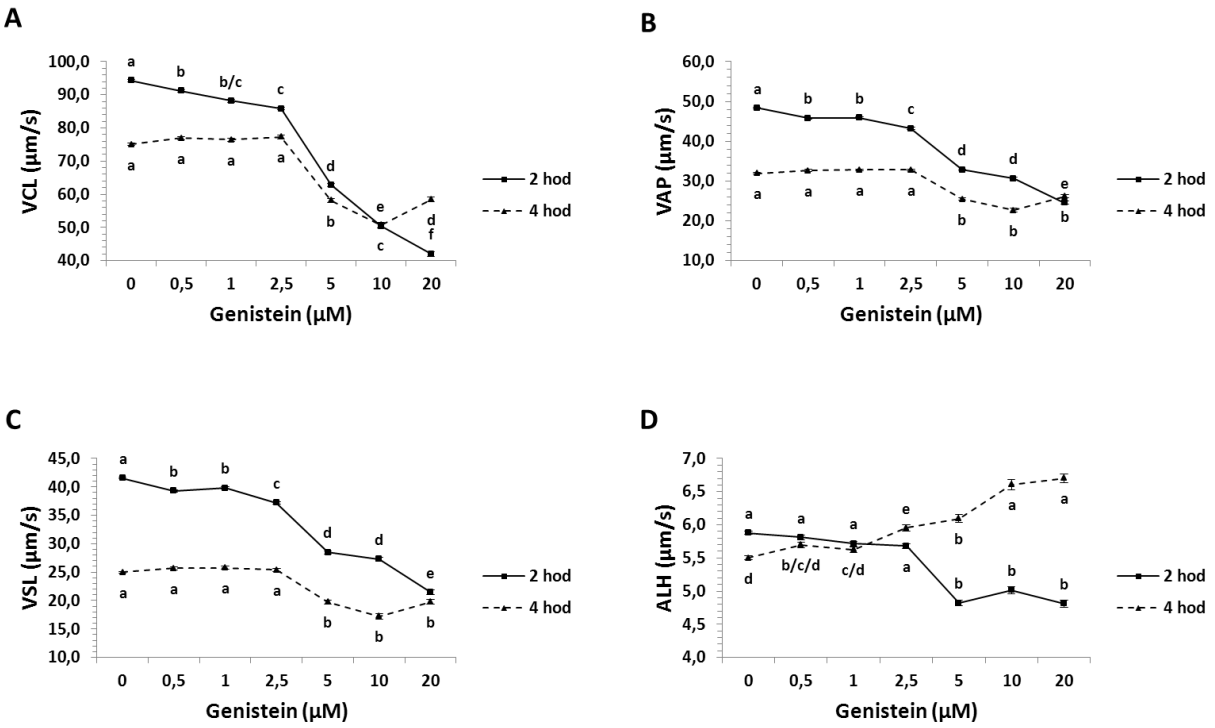
*V experimentu 3 byly spermie vystaveny 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 popř. 20 μM GEN.

[a,b] hodnoty označené různými písmennými superskripty v řádku v rámci stejné subpopulace indikují statisticky významný rozdíl mezi 2. a 4. hod inkubace ($p < 0.0001$, Schefféův test)

5.3.2. Vliv na CASA parametry motility

GEN po 2 hod inkubace signifikantně inhiboval VCL již od nejnižší testované koncentrace, tj. 0,5 µM (Graf 8A). Na rozdíl od 4 hod inkubace kdy byl inhibiční efekt patrný až od koncentrace 5 µM, přičemž nejefektivnější byla koncentrace 10 µM. Podobný trend byl patrný i u VAP a VSL (Graf 8B, 8C) pouze se skupiny významně inhibované oproti kontrole na stanovené hladině významnosti nelišily navzájem.

Neobvyklou dynamiku změn měly hodnoty ALH. Po 2 hod inkubace vykazovaly do 2,5 µM GEN jen nevýznamný sestupný trend, avšak od koncentrace 5 µM došlo k dramatickém propadu (Graf 8D). Naproti tomu po 4 hod hodnoty ALH společně se zvyšující se koncentrací GEN rostly, signifikantně od adice 2,5 µM.

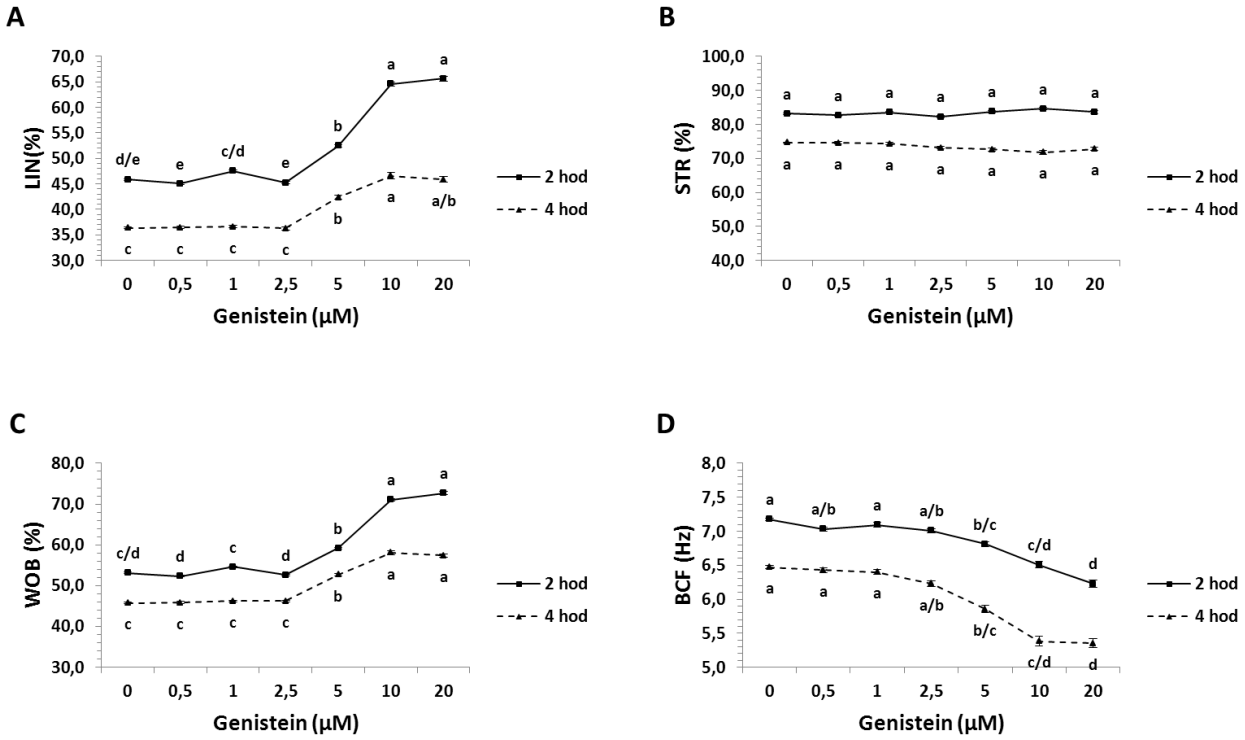


Graf 8. Účinky různých koncentrací GEN na pohybové parametry kančích spermií VCL (**A**), VAP (**B**), VSL (**C**) a ALHF (**D**) po 2 hod a 4 hod inkubace.

a-f: odlišné superskripty indikují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi GEN na hladině významnosti $p < 0{,}0001$ (Schefféův test).

LIN vykazovala signifikantní nárůst hodnot u koncentrací 5 – 20 µM jak po 2 tak 4 hod inkubace (Graf 9A). Podobný trend byl pozorován i v případě WOB (Graf 9C). V případě STR nebyly zaznamenány žádné signifikantní rozdíly středních hodnot (Graf 9B).

Naopak u BCF se v obou časech inkubace projevil trend poklesu hodnoty v závislosti na dávce GEN (Graf 9D). Změna oproti kontrole byla průkazná od koncentrace 5 µM.



Graf 9. Účinky různých koncentrací GEN na pohybové parametry kančích spermií LIN (**A**), STR (**B**), WOB (**C**) a BCF (**D**) po 2 hod a 4 hod inkubace.

a-f: odlišné superskripty indikují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi GEN na hladině významnosti $p < 0{,}0001$ (Schefféův test).

6. Diskuze

Cílem práce bylo objektivně posoudit efekty tří přirozeně se vyskytujících estrogenních látek (ZEA, a-ZOL, GEN) na pohybovou aktivitu porcinních ejakulovaných spermií za jednotných laboratorních podmínek. Motilita spermií je široce využívána jako základní marker kvality ejakulátu popř. spermií (Dzyuba et al., 2015; Petelák et Krylov, 2016; Šimoník et al., 2016). Nicméně způsob hodnocení motility může získané výsledky významně ovlivnit (Broekhuijse et al., 2011). V našem případě jsme zvolili objektivní hodnocení motility spermií prostřednictví systému počítačové analýzy obrazu (CASA – computer assisted sperm analysis). Přesněji středních hodnot kinematických parametrů doplněné o metodu clusterové analýzy, která je mimořádně vhodná pro řešení heterogenity dat motility spermií v oddělených subpopulací a napomáhá tak získávat informace obsažené v souboru dat z CASA (Martínez – Pastor et al., 2011). Dále byl do hodnocení zahrnut podíl nepohyblivých spermií.

Zearalenon je znám svými negativními účinky na reprodukční orgány kanců již od koncentrace 100 ppm v krmivu (Kanora et Maes, 2009) To odpovídá 10^1 - 10^3 ppb v tkáních což je v přepočtu cca 1 μM (Prelusky, 1994; naše data), což je výrazně nižší hodnota než nejnižší zaznamenaná účinná koncentrace (125 μM) ve studii Tsakmakidis et al. (2006). Nicméně v našich experimentech byly negativní účinky zearalenonu pozorovány již od koncentrace 0,5 μM kdy došlo po 2 hod inkubace k signifikantnímu nárůstu podílu nepohyblivých spermií. Se zvyšující se koncentrací se účinky zvýrazňovaly, ubývalo zejména spermií s rychlým (FAST) a středně rychlým (MEDIUM F.) pohybem. Prodloužení inkubace na 4 hod obecně zvýšilo podíl nepohyblivých spermií ve všech testovaných variantách, vzájemný poměr efektů jednotlivých koncentrací ZEA se ale podstatně neměnil (Graf 1A, 1B).

Ačkoli poměr zastoupení jednotlivých kategorií spermií vykazoval zřetelnou závislost na dávce ZEA, průměrná rychlost pohybu po skutečné dráze (VCL) pohybujících se spermií (Graf 2A) se po 2 hodinách inkubace od kontroly významně nelišila v žádné z testovaných koncentrací. Hodnoty nejnižší koncentrace 0,5 μM byly dokonce vyšší (u VCL signifikantně) než u ostatních testovaných koncentrací ZEA (Graf 2A). Křivka ALH vypadala velmi podobně (Graf 2D). Nejnižší koncentrace ZEA zřejmě snižuje podíl pohyblivých spermií s mírným nárůstem jejich pohybové aktivity. Oh et al (2011) také nepozorovali, ve své studii

zkoumající vliv GEN na kančí spermie, žádné účinky na jednotlivé parametry CASA nicméně stejně jako my, ve většině případů detekovali nárůst podílu nepohyblivých spermií. K tomu dochází pravděpodobně proto, že ačkoliv podíl nepohyblivých spermií narůstá, charakteristiky doposud motilních spermií se po určitou dobu nemění. To může být způsobeno faktem, že stres může evokovat přechodnou stimulaci spermií před následným vyčerpáním. Vzhledem k heterogenitě populace spermií a rychlosti jejich reakce na stres, může být tento jev manifestován jako absence jakéhokoliv účinku na průměrné hodnoty kinematických parametrů nebo dokonce jako nárůst průměrné rychlosti spermií. Tento mechanismus je demonstrován nárůstem středních hodnot VCL (Graf 2A) u nejnižší koncentrace ZEA po 2 hod inkubace.

Takové chování souboru dat CASA může vysvětlovat negativní výsledky některých z předchozích studií. Např. Benzoni et al. (2008) také hodnotili VCL a VLS u kančích spermií. Po expozici ZEA (2 pM – 20 μM) nepozorovali žádné účinky, nicméně autoři neuvádějí procentuální podíl celkové motility.

Po 4 hodinách inkubace se projevil prudký pokles u dvou nejvyšších koncentrací (10 a 20 μM). Podobný trend byl zaznamenán i v případě VSL (Graf 2B), VAP (Graf 2C) a také ALH (Graf 2D), kde výrazný nárůst hodnoty u koncentrace 0,5 μM po 2 hodinách inkubace zřejmě vysvětluje významnou část navýšení hodnoty VCL. Současně se ale laterální pohyb hlavičky zřejmě jen omezeně podílel na zpomalení rychlosti pohybu spermií u nejvyšších koncentrací ZEA po 4 hodinách inkubace, kdy pokles hodnoty ALH (Graf 2D) byl sice signifikantní, ale zdaleka ne tak prudký jako v případě VCL (Graf 2A). Tyto změny pohybu nebyly provázeny změnou frekvence pohybu bičíku a nepromítly se nijak výrazně ani do parametrů charakterizujících přímočarost pohybu, zejména STR (Graf 3B).

Všechna tato pozorování naznačují, že účinná koncentrace ZEA na motilitu spermií je mnohem nižší, než bylo doposud publikováno.

Alpha – zearalenol, který vzniká biotransformací ZEA v játrech (Benzoni et al., 2008), je považován za až 10x potentnější než samotný zearalenone (Agag, 2004). Zatímco Benzoni et al. (2008) pozorovali pokles VSL spermií prasete *in vitro* při koncentraci 20 μM α-ZOL, Gray et al. (2016) pozorovali po adici 31,2 μM α-ZOL negativní účinky na motilitu od nejkratší doby inkubace tj. 30 min (↑12 hod). Na druhou stranu Tsakmakidis et al. (2008) ve

stejné i vyšší koncentraci (↑94,2 μM) po 4 hodinách inkubace nepozorovali žádné rozdíly oproti kontrole. V našem případě α-ZOL již po 2 hodinách inkubace způsoboval nárůst podílu nepohyblivých spermií od nejnižší testované koncentrace opět na úkor zejména rychlejších kategorií. Tentokrát se ale výrazněji proměňoval i podíl spermií s pomalým pohybem. Efekt byl závislý na dávce a ve všech koncentracích signifikantně výraznější než v případě experimentu se ZEA (chi-kvadrát test, $p < 0{,}0001$) (Graf 4A, 4B).

Silnější účinky α-ZOL se projevily i na úrovni pohybových vzorců. Na rozdíl od experimentu ZEA byl pozorován na dávce závislý pokles hodnot VCL (Graf 5A). Tvar křivky středních hodnot ALH (Graf 5D) po 2 hodinách inkubace vykazuje stejný trend jako VCL. Nicméně pozorování po 4 hod inkubace vypadá překvapivě, protože oproti poklesu VCL se vzrůstající koncentraci a-ZOL jsou hodnoty ALH stabilní nebo dokonce (v koncetraci 5 a 20 μM) zvýšené. Tyto abnormality se objevují (zrcadlově) i v případě parametru BCF (Graf 6D) a parametrů odrážejících přímost pohybu – LIN (Graf 6A), STR (Graf 6B) a WOB (Graf 6C). Proto spermie vykazují větší odchylku laterálního pohybu hlavičky při pomalejší frekvenci a větším zakřivení své dráhy. Data a-ZOL tak poukazují na další úskalí středních hodnot kinematických parametrů.

Mechanické hodnocení jednotlivých parametrů může vést k závěrům o nelineárním působení a-ZOL, stimulačním účinku na ALH nebo progresivity pohybu. Nicméně porovnáním všech dostupných dat lze předpokládat, že střední hodnoty byly ve skutečnosti ovlivněny přítomností většího množství spermií s víceméně lokálním pohybem v pomalé kategorii spermií což s celkově malým počtem motilních spermií významně posouvá střední hodnoty kinematických parametrů. Nárůst středních hodnot ALH charakterizující pomalý cluster spermií po 4 hodinách inkubace (Tab. 2) rovněž odpovídá této domněnce. Podobně "překvapivý" nárůst parametru LIN v případě experimentu s GEN (viz níže) je lépe pochopitelný v souvislosti s daty subpopulací spermií – mezi nízkým počtem motilních spermií ty pomalé převažují. Vzhledem k tomu, že LIN = VSL/VCL*100 a kančí spermie fyziologicky vykazují vyšší procentuální podíl cirkulárního pohybu (Johnson et al., 2000), pomalé spermie mají vyšší LIN ve srovnání s rychlými dokonce i na té samé dráze.

Zatímco ZEA a jeho metabolity jsou spojovány s účinky veskrze negativními (Zinedine et al., 2007), fytoestrogeny mohou na reprodukci zvířat působit i potencionálně prospěšně (Whitten et Patisaul, 2011). Obojí bylo pozorováno u kanců na úrovni *in vivo*

(Yuan et al., 2012). V podmínkách *in vitro* byly zaznamenané účinky nejednotné, zatímco Oh et al. (2011) zaznamenali účinky negativní, Kim et al. (2014) nepozorovali vesměs žádné účinky, v jednom případě dokonce zaznamenali účinky stimulační.

Tento rozdílný obraz změn by mohl souviset s poněkud odlišným působením GEN na metabolické dráhy spermií než v případě ZEA a α-ZOL. Může ale souviset i s vlastnostmi testovaného ejakulátu, protože je evidentní, že rezistence spermií k inkubačním podmínkám (viz podíl jednotlivých kategorií spermií v kontrole, Graf 1A, 1B; 4A, 4B a 7A, 7B) se mezi jednotlivými experimenty lišila. Vzhledem k tomu, že naše experimenty s jednotlivými environmentálními estrogeny probíhaly jeden po druhém, faktor kvality ejakulátu může zůstat v pozadí.

Zajímavé je, že Oh et al. (2011) nezjistili u sledovaných parametrů CASA žádné změny v rozmezí koncentrací 0,001 – 100 μM GEN, ačkoli popisovali signifikantní nárůst nepohyblivých spermií. Je ovšem pravdou, že i v naší studii jsme jak u ZEA, tak α-ZOL prokázali u některých nižších koncentrací signifikantní změny v podílu jednotlivých kategorií spermií, aniž by to bylo provázeno průkaznými změnami v parametrech CASA. Při mírnější zátěži nemusí být zřejmě střední hodnoty parametrů CASA dostatečně citlivým indikátorem účinku.

Naše data naznačují podobné změny, které byly zaznamenány v případě ZEA a α-ZOL tj. signifikantní redistribuce spermií zejména již od nejnižší testované koncentrace 0,5 μM, kdy docházelo k statisticky významnému nárůstu procentuálního podílu nepohyblivých spermií a to zejména na úkor dvou nejrychlejších subpopulací. Účinky se zdají být výraznější a to jak při hodnocení clusterovou analýzou (Graf 7A, 7B) tak hodnocením individuálních kinematických parametrů (Graf 8A-D, 9A-D) Ze srovnání obou použitých analytických metod se jeví clusterová analýza jako citlivější a homogennější. Nicméně kombinací obou použitých metod lze objasnit některé nesrovnalosti výsledků naší práce s pracemi dříve publikovanými.

Je zřejmé, že inhibiční účinky GEN byly ze všech námi testovaných kontaminantů nejvýraznější – např. 20 μM GEN způsobilo nárůst podílu nepohyblivých spermií oproti kontrole o 65,3% (vs. 28,34% α-ZOL a 22,81% ZEA). Stejně tak dynamika středních hodnot kinematických parametrů byla strmější. Přitom estrogenní aktivita GEN je v literatuře

uváděna výrazně nižší, než v případě ZEA a jeho metabolitu α-ZOL (např. Gromadzka et al., 2008). Nicméně i Oh et al. (2011) pozorovali pokles celkové motility po adici GEN již od koncentrace 0,001 μM, a to dokonce již po 15, resp. 30 min inkubace. Přitom jak vyplývá z informací uvedených výše, podobný nález nebyl pro ZEA ani α-ZOL publikován. Současně ale Kim et al. (2014) ve stejných koncentracích (1 – 100 μM GEN) po 3 hod inkubace nezjistili na motilitu spermií žádný vliv. Tento nesoulad by mohl být dán rozdílnými metodikami vyhodnocování, kdy Kim et al. (2014) používali subjektivní hodnocení, zatímco Oh et al. (2011) testovali motilitu spermií objektivní metodou hodnocení (CASA). Nabízí se ale i jiné vysvětlení. Jak GEN, tak ZEA a jeho metabolity jsou látky rozpustné v ethanolu či DMSO, ale jen velmi špatně ve vodě. Přitom veškeré testace účinků na spermie probíhají v prostředí vodných roztoků, kdy tyto látky rozpuštěné v polárním rozpouštědle jsou přidávány ke vzorku spermií. Naše orientační analýzy (nepublikováno) ukazují, že i malé změny složení kultivačního media mohou vést k precipitaci těchto látek nebo jejich vazbě na další komponenty, což nepochybně ovlivňuje dostupnost látek a jejich účinek. Přitom žádná z námi citovaných studií neprověřovala skutečné koncentrace látek v mediu. Proto je třeba přistupovat ke studiím s negativním nálezem velmi obezřetně.

Problematika dostupnosti účinných látek může být v pozadí ne zcela lineárního vztahu pozorovaných účinků a dávky (např. efekty námi testované nejnižší koncentrace 0,5 μM jak ZEA, tak α-ZOL), i když v tomto směru nelze podceňovat ani kvantitativní interakci receptor – účinná látka (Schmieder et al., 2003). Samotnou dostupností látky by např. nebylo možno vysvětlit přechylování mezi inhibičními a stimulačními efekty – např. právě v citované studii Kim et al. (2014) pozorovali po 6 hodinách inkubace vyšší podíl motilních spermií oproti kontrole. Mohlo by se jednat o tzv.„nonmonotonic dose-response curves“, které byly popsány u řady endokrinních disruptorů (Vandenberg et al., 2012) a jsou definovány jako nelineární vztah mezi dávkou, kdy k bodu zvratu dojde někde mimo rozsah testovaných koncentrací.

7. Závěr

Naše data naznačují, že účinky ZEA, a-ZOL a GEN jsou patrné již od nejnižší testované koncentrace, tj. 0,5 μM environmentálního estrogenu v míře závislé na dávce, kdy nejvýraznějších účinků je dosahováno v nejvyšší testované koncentraci, tj. 20 μM. V případě zearalenonu se jedná o posun hranice pozorovaných účinků, která byla doposud popsána a zároveň to znamená, že účinné koncentrace ZEA a α-ZOL se posouvají k hodnotám dosažitelným v běžných podmínkách, což vyvolává otázku posouzení rizik těchto látek na reprodukci prasat.

Dalším zajímavým zjištěním byl fakt, že oproti předpokladu genistein vykazoval nejsilnější účinky na motilitu spermií ze všech námi testovaných environmentálních estrogenů a to již v nejnižší koncentraci tj. 0,5 μM GEN. Vzhledem k vysoké oblibě sojových šrotů ve výživě prasat by korelace tohoto zjištění s reálnými dopady na jejich reprodukci měla být podrobena dalšímu zkoumání.

Opakovaná zjištění posunutí podílu subpopulací spermií bez signifikantních změn středních hodnot kinematických parametrů naznačuje, že v případě mírnějšího stresu tyto střední hodnoty CASA nemusí nezbytně být dostatečně citlivými indikátory změn v motilitě spermií. Na to by měl být brán zřetel zejména v toxikologickém výzkumu modelu spermií, kde i mírné změny mohou být indikativní. Naopak clusterová analýza se ukázala jako citlivější indikátor změn v motilitě spermií a jeví se tak jako velmi účinný nástroj pro její hodnocení v podobně designovaných studiích.

Do budoucna by bylo vhodné do testování účinků environmentálních estrogenů zařadit i analýzu skutečné koncentrace těchto látek v médiu, neboť by se mohlo jednat o zdroj diskrepancí ve výsledcích mezi jednotlivými studiemi.

Vzhledem k pozorované účinnosti těchto látek již v nejnižší testované koncentraci zůstává otázkou, kde se tedy nachází hranice účinků těchto environmentálních estrogenů a jaké faktory stojí za negativními výsledky obdobných studií.

8. Bibliografie

1. Acconcia, F., Kumar, R. 2006. Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. Cancer Letters. 238: 1 – 14.

2. Adibnia, E., Razi, M., Malekinejad, H. 2016. Zearalenone and 17β – estradiol induced damages in male rats reproduction potential; evidence for ERα and ERβ receptors expression and steroidogenesis. Toxicon. 120 : 133 – 146.

3. Adeoya – Osiguwa, S. A.; Markoulaki, S; Pocock, V.; Milligan, S.R.; Fraser, L.R. 2003. 17β – Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. Human Reproduction. 18(3): 100 – 107.

4. Agag, B. I. 2004. Mycotoxins in food and feeds 3 – zearalenone. Ass. Univ. Bull. Environ. Res. 7(2): 169 – 176.

5. Allahbadia, G. N. 2005. Intrauterine Insemination. Taylor & Francis. p. 480. ISBN: 1 – 84214 – 3220.

6. Amann, R. P., Waberski. D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potentional developments. Theriogenology. 81: 5 – 17.

7. Andres, A., Donovan, S. M., Kuhlenschmidt, M. S. 2009. Soy isoflavones and virus infections. Journal of Nutritional Biochemistry. 20: 563 – 569.

8. Bajpai, M., Asin, S., Doncel, G. F. 2003. Effects of tyrosine kinase inhibitors on tyrosine phosphorylation and motility parameters in human sperm. Archives of Andrology. 49:229 – 246.

9. Basini, G., Bussolati, S., Santini, S. E., Grasselli, F. 2010. The impact of phytoestrogen genistein on swine granulosa cell function. Journal of Anomal Physiology and Animal Nutrition. 94: 374 – 382.

10. Belcher, S. M., Zsarnovszky, A. 2001. Estrogenic Actions in the Brain: Estrogen, Phytoestrogens, and Rapid Intracellular Signaling Mechanisms. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 299:408 – 414.

11. Benassayag, C., Perrot – Applanat, M., Ferre, F. 2002. Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. Journal of Chromatography B. 777:233 – 248.

12. Benzoni, E., Minervini, F., Giannoccaro, A., Fornelli, F., Vigo, D., Visconti, A. 2008. Influence of in vitro exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality. Reproductive Toxicology. 25: 461 – 467.

13. Berger, T., Esbenshade, K. L., Diekman, M. A., Hoagland, T., Tuite, J. 1981. Influence of Prepubertal Consumption of Zearalenone on Sexual Development of Boars. J. Anim. Sci. 53: 1559 – 1564**.**

14. Bhat, R., Ravishankar, R. B., Rai, V., Karim, A. A. 2010. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 9: 57 – 81.

15. Bielas, W., Niżański, W., Nicpoń, J. E., Partyka, A., Mordak, R., Nowak, M., Ciaputa, R. 2017. Effect of zearalenone on circulating testosterone concentration, testicular and epididymal morphology and epididymal sperm characteristics in wild boars. Theriogenology. 102: 59-66.

16. Binder, E. M., Tam, L. M., Chin, L. J., Handl, J., Richard, J. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. Animal Feed Science and Technology. 137: 265 – 282.

17. Branham, W. S., Dial, S. L., Moland, C. L., Hass, B. S., Blair, R. M., Fang, H., Shi, L., Tong, W., Perkins, R. G., Shechan, D. M. 2002. Phytoestrogens and mycoestrogens bind to the rat uterine estrogen receptor. Journal of Nutrition. 132: 658 – 664.

18. Broekhuijse, M. L. V. J., Sostaric, E., Feitsma, H., Gadell, B. M. 2011. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessment in pig artificial insemination. Theriogenology. 76: 1473 – 1486.

19. Burow, M. E., Tang, Y., Collins – Burow, B. M., Kajewski, S., Reed, J. C., McLachlan, J. A., Beckman, B. S. 1999. Effects of environmental estrogens on tumor necrosis factor α – mediated apoptosis in MCF – 7 cells. Carcinogenesis. 20(11): 2057 – 2061.

20. Carreau, S., Lambard,S., Delalande, Ch.,Galeraud,I. D., Bilinska, B., Bourguiba, S. 2003. Aromatase expression and role of oestrogens in male gonad: a review. Reproductive biology and Endocrinology. 11: 1 – 35.

21. Cederroth, Ch. R., Nef, S. 2009. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. Molecular and Cellular Endocrrinology. 304: 30 – 42.

22. Cederroth, Ch. R., Auger, J., Zimmermann, C., Eustache, F., Nef, S. 2010. Soy, phyto – oestrogens and male reproductive function: a review. International journal of andrology. 33: 304 – 316. ISSN: 0105 – 6263.

23. Cederroth, Ch. R., Zimmermann, C., Nef, S. 2012. Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. Molecular and Cellular. Endocrinology. 355: 192 – 200.

24. Contri, A., Valorz, C., Faustini, M., Wegher, L., Carluccio, A., 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. Theriogenology 74, 424-435.

25. Cos, P., De Bruyne, T., Apers, S., Berghe, D. V., Pieters, L., Vlietinek, A. J. 2003. Phytoestrogens: Recent developments. Planta Med. 69: 589 – 599.

26. Devreese, P. I., De Backer, P., Croubels, S. 2013. Overview of the most important mycotoxins for the pig and poultry husbandry. Vlaams Diergeneeskundig Tijdsehrift. 82: 171 – 180.

27. Dixon, R. A. 2004. Phytoestrogens. Annu. Rev. Plant Biol. 55:225 – 261.

28. Döll, S., Dänicke, S. 2011. The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) abd zearalenone (ZON) in animal feeding. Preventive Veterinary Medicine. 102: 132 – 145.

29. Dusza, L., Ciereszko, R., Skarczyński, D. J., Nogowski, L., Opalka, M., Kamińska, B., Nynca, A., Kraszewska, O., Stomczyńska, M., Woclawek – Potocka, I., Korzekwa, A., Pruszyńska – Oszmatek, E., Szkudelska, K. 2006. Mechanism of phytoestrogen action in reproductive processes of mammals and birds. Reproductive biology. 6(1): 151 – 173.

30. Dzyuba, V., Cosson, J., Dzyuba, B., Rodina, M. 2015. Oxidative stress and motility in tench *Tinca Tinca* spermatozoa. Czech Journal of Animal Science. 60: 250 – 255.

31. Faqi, A. S., Johnson, W. D., Morrissey, R. L., McCormic, D. L. 2004. Reproductive toxicity assesment of chronic dietary exposure to soy isoflavone in male rats. Reproductive Toxicology. 18: 605 – 611.

32. Fink – Gremmels, J., Malekinejad, H. 2007. Clinical effects and biochemical mechanism associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. Animal Feed Science and Technology. 137: 326 – 341.

33. Ford, J. A., Clark, S. G., Walters, E. M., Wheeler, M. B., Hurley, W. L. 2006. Estrogenic efffects of genistein in reproductive tissues of ovariectomized gilts. Journal of Animal Science. 84(4): 834 – 842.

34. Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V., Oteiza, P. I. 2010. Basic biochemical mechanism behind the health benefits of polyphenols. Molecular Aspects of Medicine. 31:435 – 445.

35. Fraser, L. R., Beyret, E., Milligan, S. R., Adeoya – Osiguwa, S. A. 2006. Effect of estrogenic xenobiotics on human and mouse spermatozoa. Human Reproduction. 21(5): 1184 – 1193.

36. Filannino, A., Stout, T. A. E., Gadella, B. M., Sostaric, E., Pizzi, F., Colebrander, B., Dell ´Aquila, M. E., Minervini, F. 2011. Dose – response effects of estrogenic mycotoxins (zearalenone, alpha- and beta- zearalenol) on motility, hyperactivation and the acrosome reacrion of stallion sperm. Reproductive Biology and Endocrinology. 9:134. ISSN: 1477 – 7827.

37. Fitzpatrick, L.A., Fordyce, G., McGowan, M.R., Bertram, J.D., Doogan, V.J., De Faveri, J., Miller, R.G., Holroyd, R.G., 2002. Bull selection and use in northern Australia. Part 2. Semen traits. Animal Reproduction Science 71, 39-49.

38. Freitas, B. V., Mota, M. M., Del Santo, T. A., Afonso, E. R., Silva, C. C., Utimi, N. B. P., Barbosa, L. C. G. S., Vileta, F. G., Araújo, L. F. 2012. Mycotoxicosis in Swine: a Review. Journal of Animal Production Advances. 2(4): 174 – 181.

39. Frizzel, C., Ndossi, D., Verhaegen, S., Dahl, E., Sørlie, M., Ropstad, E., Muller, M., Elliot, C. T., Connolli, L. 2011. Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta – zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. Toxicology Letters. 206: 210 – 217.

40. Gadea. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. Theriogenology. 63(2): 431 – 444.

41. Galeati, G., Vallorani, C., Bucci, D., Bernardini, Ch., Tamanini, C., Parmeggiani, A., Spinaci, M. 2010. Daidzein does affect progesteron secretion by pig cumulus cells but it does not impair oocytes IVM. Theriogenology. 74: 451 – 457.

42. Gibson, D. A., Saunders, P. T. K. 2012. Estrogen dependent signaling in reprouctive tissues – A role for estrogen receptors and estrogen related receptors. Molecular and Cellular Endocrinology. 348: 361 – 372.

43. Gray, S. L., Lackey, B. R., Boone, W. R. 2016. Effects of Panax ginseng, zearalenol, and estradiol on sperm function. Journal of Ginseng Research. 40:251-259.

44. Gromadzka, K., Waskiewicz, A., Chelkowski, J., Golinski, P. 2008. Zearalenone and its metabolites: occurence, detection, toxicity and guidelines. Worl Mycotoxin Journal. 1(2): 209 – 220.

45. Hinsch, K. – D., Aires, V., Hägele, W., Hinsch, E. 2000. In vitro tests for Essentials sperm functions using the phyto – oestrogens genistein as a test substance. Andrologia. 32: 225 – 231

46. Holmes, P., Rumsby, P., Harrison, P. T. C. 2004. Endocrine disruptors and menopausal health. Menopause International. 10(2): 54 – 59.

47. Huang, R., Singh, M., Dillon, G. H. 2010. Genistein directly inhibits native and recombinant NMDA receptors. Neuropharmacology. 58: 1246 – 1251.

48. Chan, W. – H. 2009. Impact of genistein on maturation of mouse oocytes fertilization, and fetal development. Reproductive Toxicology. 28: 52 – 58.

49. Irvine, C. H. G., Fitzpatrick, M. G., Alexander, S. L. 1998. Phytoestrogens in Soy – Based Infant Foods: Concentrations, Daily Intake and Possible Biological Effects. Experimental Biology and Medicine. 217(3):247 – 253.

50. Januskauskas, A., Gil, J., Soderquist, L., Haard, M.G.M., Haard, M.C., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H., 1999. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. Theriogenology 52, 641-658.

51. Jefferson, W. N., Patisaul, H. B., Williams, C. J. 2012. Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. Reproduction. 143:247 – 260.

52. Johnson, L. A., Weitye, K. F., Fiser, P., Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of boar semen. Animal Reproduction Science. 62: 143 – 172.

53. Jung, F., Fulka Jr., J., Lee, C., Moor, R. M. 1993. Effects of the protein phosphorylation inhibitor genistein on maturation of pig oocytes in vitro. Journal of Reproduction and Fertility. 98: 529 – 535.

54. Kang, L., Zhang, X., Xie, Y., Tu, Y., Wang, D., Liu, Z., Wang, Z. – Y. 2010. Ivolvement of Estrogen Receptor Variant ER – α, Not GPR30, in Nongenomic Estrogen Signaling. Mol Endocrinol. 24˘4): 709 – 721.

55. Kanora, A., Maes, D. 2009. The role of mycotoxins in pig reproduction: a review. Veterinární Medicína. 12: 565 – 576.

56. Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K., Kadirvel, G., 2011. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System - A Review. Reproduction in Domestic Animals 46, 165-172.

57. Katila, T. 2001. In Vitro Evaluation of Frozen – Thawed Stallion Semen: A review. Acta Veterinaria Scandinavica. 42(2): 199 – 217.

58. Katz, D. F., Davis, R. O., Delandmeter, B. A., Overstreet, J. W. 1985. Real – time analysis of sperm motion using automatic video image digitization. Comput. Meth. Prog. Biomed. 21(3): 173 – 182.

59. Keung, W. – M. 1995. Dietary estrogenic isoflavones are potent inhibitors of β – hydroxysteroid dehydrogenase of *P. Testosteronii*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 215(3): 1137 – 1144.

60. Kim, T., Peterson, T. G., Barnes, S. 1998. Mechanism of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor β signaling pathways. American journal of clinical nutrition. 68: 1418s – 1425s.

61. Kim, S. H., Park, M. J. 2012. Effects of phytoestrogen on sexual development. Korean Journal of Pediatrics. 55(8): 265 – 271.

62. 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.

63. Kimura, H. 1996. Studies on protein tyrosin phosphorylation in mouse oocyte maturation. Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi. 48(12): 1149 – 1156.

64. Klein, K. O. 1998. Isoflavones, Soy – based Infant Formulas, and Relevance to Endocrine Function. Nutrition Reviews. 56(7): 193 – 204.

65. Lamartiniere, C. A., Wang, J., Smith – Johanson, M., Eltorum, I. – E. 2002. Daidzein: Bioavailibility, Potential for Reproductive Toxicity and Breast Cancer Chemoprevention in Female Rats. Toxicological Sciences. 65: 228 – 238.

66. Lazari, M. F. M., Lucas, T. F. G., Yasuhara, F., Gomes, G. R. O., Siu, E. R., Royer, C., Fernandes, S. A. F., Porto, C. S. 2009. Estrogen in the male reproductive systém. Ary Bras Endocrinol Metab. 53(8): 923 – 933.

67. Le Bail, J. C., Laroche, T., Marre – Fournier, F., Habrioux, G. 1998. Aromatase and 17β – hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids. Cancer Letters. 133(1): 101 – 106.

68. Lee, B. J., Kang, J. – K., Jung, E. – Y., Yun, Y. W., Baez, I. – J., Yon, J. – M., Lee, Y. – B., Sohn, H. – S., Lee, J. – Y., Kim, K. – S., Nam, S. – Y. 2004. Exposure to genistein does not adversly affect the reproductive system in adult male mice adapted to a soy – based commercial diet. Journal of Veterinary Science. 5(3): 227 – 234.

69. Lee, H. – R., Jeung, E. – B., Cho, M. – H., Kim, T. – H., Leung, P. C. K., Choi, K. – Ch. 2013. Molecular mechanism(s) of endocrine-disrupting chemicals and their potent oestrogenicity in diverse cells and tissues that express oestrogen receptors J. Cell. Mol. Med. 17(1): 1 – 11.

70. Levin, E. R. 2011. Minireview: Extranuclear Steroid Receptors: Role in Modulation of Cell Functions. Molecular Endocrinology. 25(3): 377 – 384.

71. Li, Y., Burns, K. A., Arao, Y., Luh, C. J., Korach, K. S. 2012. Differential Estrogenic Actions of Endocrine – Disrupting Chemicals Bisphenol A, Bisphenol AF, and

Zearalenone through Estrogen Receptor α and β in vitro. Environmental Health Perspectives. 120(7): 1029 – 1035.

72. Long, M., Yang, S., Dong, S., Chen, X., Zhang, Y, He, J. 2017. Characterization of semen quality, testicular marker enzyme activities and gene expression changes in the blood testis barrier of Kunming mice following acute exposure to zearalenone. Environmental Science and Pollution Research. 24 (35): 27235 – 27243.

73. Luconi, M.; Forti, G.; Baldi, E. 2002. Genomic and nongenomic effect of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 80: 369 – 381.

74. Magee, P. J., Rowland, I. R. 2004. Phyto - oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. British Journal of Nutrition. 91(4): 513 – 531.

75. Majdič, G. 2010. Endocrine disrupting chemicals and domestic animals. Slovenian Veterinary Research. 47(1): 5 – 11.

76. Malekinejad, H., Maas – Bakker, R., Fink – Gremmels, J. 2006. Species differences in the hepatic biotransformation of Zearalenone. The Veterinary Journal. 172: 96 – 102.

77. Malekinejad, H., Schoevers, E. J., Daemen, I. J. J. M., Zijlstra, C., Colenbrander, B., Fink – Gremmels, J., Roilen, B. A. I. 2007. Exposure of Oocytes to the Fusarium Toxins Zearalenone and Deoxynivalenol Causes Aneuploidy and Abnormal Embryo Development in Pigs. Biology of Reproduction. 77: 840 – 847.

78. Marino, M., Pellegriny, M., La Rosa, P., Acconcia, F. 2012. Susceptibility of estrogen receptor rapid responses to xenoestrogens: Physiological outcomes. Steroids. 77: 910 – 917.

79. Martínez – Pastor, F., Tizado, E. J., Garde, J. J., Anel, L., de Paz, P. 2011. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. Theriogenology. 75 (5): 783 – 795.

80. McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., Varner, D. D. 2011. Equine reproduction. 2nd ed. Wiley – Blasckwell. P. 3132. ISBN: 978 – 8138 – 1971 -6.

81. Menzel, V. A., Hinsch, E., Hägele, W., Hinsch, K. – D. 2007. Effect of genistein on acrosome reaction and zona pellucida binding independent of protein tyrosin kinase inhibition in bull. Asian Journal of Andrology. 9(5): 650 – 658.

82. Metzler, M., Pfeiffer, E., Hildebrand, A. A. 2010. Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. World Mycotoxin Journal. 3(4): 385 – 401.

83. Milicévić, D. R., Škrinjar, M., Baltić, T. 2010. Real and Perceived Risk for Mycotoxin Contamination in Foods and Feed: Challenges for Food Safety Control. Toxins. 2: 572 – 592.

84. Minervini, F., Dell´Aquilla, M. E., Maritato, F., Minoia, P., Visconti, A. 2001. Toxic efffects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovine oocytes and 17β – estradiol levels in mural granulosa cell cultures. Toxicology in Vitro. 15(4-5): 489 – 495.

85. Minervini, F., Giannoccaro, A., Cavallini, A., Visconti, A. 2005. Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivates in relation to the estrogenic parameters. Toxicology Letters. 159: 272 – 283.

86. Minervini, F., Dell´Aquilla, M. E. 2008. Zearalenone and Reproductive Function in Farm Animals. International Journal of Molecular Science. 9: 2570 – 2584.

87. Mitchell, J. H., Gardner, P. T., McPhail, D. B., Morrice, P. C., Collins, A. R., Duthie, G. G. 1998. Antioxidant Efficacy of Phytoestrogens in Chemical and Biological Model Systems. Archives of Biochemistry and Biophysics. 360(1): 142 – 148.

88. Mitchell, J. H., Cawood, E., Kinniburgh, D., Provan, A., Collins, A. R., Irvine, D. S. 2001. Effects of a phytoestrogen food supplement on reproductive healt in normal males. Clinical Science. 100: 613 – 618.

89. Mohamed, E – S. A., Park, Y – J., Song, W – H., Shin, D – H., You, Y – A., Ryu, B – Y., Pang, M – G. 2011. Xenoestrogenic compounds promote capacitation and an acrosome reaction in porcine sperm. Theriogenology. 75: 1161 – 1169.

90. Moravcová, J. 2008. Vliv fytoestrogenů na symptomy menopauzy a rakovinu prsu. Interní medicína pro praxi. 1011: 517-519.

91. Morito, K., Hirose, T., Kinjo, J., Hirakawa, T., Okawam M., Nohara, T., Ogawa, s., Inoue, S., Muramatsu, M., Masamunem Y. 2001. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 24(4): 351 – 356.

92. Mortimer, S. T. 1994. Practical Laboratory Andrology. Oxford University Press. P. 393. ISBN: 0 – 19 – 506595 – 6.

93. Mortimer, S. T. 1997. Critical reviiew of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. Human Reproduction Update. 3(5): 403 – 439.

94. Mortimer, S. T. 2000. CASA – Practical Aspects. Journal of Andrology. 21(4): 515 – 524.

95. Moutsatsou, P. 2007. The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. Hormones. 6(3): 173 – 193.

96. Mueller, S. O. 2004. Xenoestrogens: mechanism of action and detection method. Anal Bioanal Chem. 378: 582 – 587.

97. Muino, R., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., Pena, A.I., 2008. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. Animal Reproduction Science 109, 27-39.

98. Murkies, A.L., Wilcox, G., Davis, S.R. 1998. Phytoestrogens. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 83(2): 298 – 303.

99. Nadal, A., Ropero, A. B., Laribi, Q., Maillet, M., Fruenres, E., Soria, B. 2000. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor α and β. PNAS. 97(21): 11603 – 11608.

100. Nynca, A., Ciereszko, R. E. 2006. Effect of genistein on steroidogenic response og ranulosa cell populations from porcine preovulatory follicles. Reproductive Biology. 6(1): 31 – 50.

101. Nynca, A., Sløнina, D., Jablońska, O., Kamińska, B., Ciereszko, R. E. 2013. Daidzein affects steroidogenesis and oestrogen receptor expression in medium ovarian follicles of pigs. Acta Veterinaria Hungarica. 61(1): 85 – 98.

102. 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.

103. Omoni, A. O., Aluko, R. E. 2008. Soybean Foods and Their Benefits: Potential Mechanism of Action. Nutrition Reviews. 63(8): 272 – 283.

104. Ososki, A. L., Kenelly, E. J. 2003. Phytoestrogens: a Review of the Present State of Research. Phytotherapy research. 17: 845 – 869.

105. Pang, J., Zhou, Q., Sun, X., Li, L., Zhou, B., Zeng, F., Zhao, Y. 2017. Effect of low dose zearalenone exposure on reproductive capacity of male mice. Toxicology and Applied Pharmacology. 333: 60 – 67.

106. Park, Y – J., Mohamed, E – S. A., Kwon, W – S., You, Y – A., Ryu, B – Y. 2011. Xenoestrogenic chemicals effectively alter sperm functional behavior in mice. Reproduction Toxicology. 32: 418 – 424.

107. Parveen, M., Zhu, Y., Kiyama, R. 2009. Expression prifiling of genes responding to zearalenone and its analogues using estrogen – responsive genes. FEBS Letters. 583: 2377 – 2384.

108. Petelák, A., Krylov., V. 2016. Cryopreservation of fluorescence activated cell sorted boar spermatozoa based on extracellular ubiquitination. Czech Journal of animal Science. 61: 310 – 316.

109. Pilšáková, L., Riečanský, I., Jagla, F. 2010. The Physiological Action of Isoflavone Phytoestrogens. Physiol. Res. 59: 651 – 664.

110. Polkowski, K., Mazurek, A. P. 2000. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug research. 57(2): 135 – 155.

111. Prelusky, D. B. 2014. Residues in Food Products of Animal Origin. In: Miller, J. D., Trenholm, H. L. (eds.). Mycotoxins in Grain – Compounds Other Than Aflatoxin. Eagan Press. St. Paul, Minnesota, U.S.A. p. 552. ISBN: 0-9624407-5-2.

112. Quintero – Moreno, A., Miró, J., Rigau, A. T., Rodriguez – Gil, J. E. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion

ejaculates. Theriogenology. 59(9): 1973 – 1990.

113. Quintero – Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez – Gil., J. E. 2007. Multivariate Cluster Analysis Regression Procedures as Tools to Identify Motile Sperm Subpopulations In Rabbit Semen and to Predict Semen Fertility and Litter Size. Reproduction in Domestic Animals. 42: 312 – 319.

114. Ranzenigo, G., Caloni, F., Cremonesi, F., Aad, P. Y., Spicer, L. J. 2008. Effects of Fusarium mycotoxins on steroid production by porcine granulosa cells. Animal Reproduction Science. 107 (1-2): 115 – 130.

115. Ren., M. Q., Kuhn, G., Wegner, J., Chen, J. 2001. Isoflavones, substances with multi – biological and clinical properties. European journal of nutrition. 40(4): 135 – 146.

116. Retana – Márquez, S., Hernández, H., Flores, J. A., Muñoz – Gutirrez, M., Duarte, G., Vielma, J., Fitz – Rodríguez, G., Fernández, I. G., Keller, M., Delgadillo, J. A. 2012. Effects of phytoestrogens on mammalian reproductive physiology. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 15(1): 129 – 145.

117. Rice, S., Mason, H. D., Whitehead, S. A. 2006. Phytoestrogens and their low dose combinations inhibit mRNA expression and activity of aromatase in human granulosa – luteal cells. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 101(4 – 5): 216 – 226.

118. Ropero, A. B., Alonso – Magdalena, P., Ripol, C., Fuentes, E., Nadala, A. 2006. Rapid endocrine disruption: Environmental estrogen actions triggered outsider the nucleus. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 102: 163 – 169.

119. Rosselli, M., Reinhart, K., Imthurn, B., Keller, P. J., Dubey, R. K. 2000. Cellular and biochemic mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive fiction. Human Reproduction Update. 6(4): 332 – 350.

120. Ryu, D. – Y., Kim, Y. – J., Lee, J. S., Rahman, S., Kwon, W. – S., Yoon, S. – J., Pang, M. – G. 2014. Capacitation and acrosome reaction differences of bovine, mouse and porcine spermatozoa in responsivness to estrogenic compounds. Journal of Animal Science and Technology. 56:26.

121. Sambuu, R., Takagi, M., Namula, Z, Otoim T., Shiga, S., Rodrigues Dos Santos, R., Fink – Gremmels. 2011. Effects of Exposure to Zearalenone in Porcine Oocytes and Sperm During Maturation and Fertilization *In Vitro*. Journal of Reproduction and Development. 57(4): 547 – 550.

122. Sambuu, R., Takagi, M., Namula, Z., Nii, M., Taniguchi, M., Uno, S., Kokushi, E., Tshering, C., dos Santos, R. R. 2013. Effects of long – term in vitro exposure of ejaculated boar sperm to zearalenone and α – zearalenol in sperm liquid storage medium. Animal Science Journal. 84(1): 28 – 34.

123. Santell, R. C., Chang, Y. Ch., Nair, M. G., Helferick, W. G. 1997. Dietary Genistein Exerts Estrogenic Effects upon the Uterus, Mammary Gland and the Hypotalamic/Pituitary Axis in Rats. The Journal of Nutrition. 127(2): 263 – 269.

124. Sarkar, F. H., Li, Y., Wang, Z., Kong, D. 2009. Cellular signaling perturbation by natural products. Cellular Signaling. 21: 1541 – 1547.

125. Setchell, K. DR. 1998. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health and soy isoflavones. The American Journal of Clinical Nutrition. 68: 1333 – 1346.

126. Shemes, M., Shore, L. S. 2012. Effects of Environmental Estrogens on Reproductive Parameters in Domestic Animals. Israel Journal of Veterinary Medicine. 67(1): 6 – 10.

127. Shojaei, H., Kroetsch, T., Wilde, R., Blondin, P., Kastelic, J.P., Thundathil, J.C., 2012. Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. Theriogenology 77, 940-951.

128. Schmieder, P. K., Ankley, G., Mekenyan, O., Walker, J. D., Bradbury, S. 2003. Quantitative structure – activity relationship models for prediction of estrogen receptor binding affinity of structurally diverse chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry. 22(8): 1844 – 1854.

129. Schoevers, E. J., Santos, R. R., Colenbrander, B., Fink – Gremmels, J., Roclin, B. A. 2012. Transgenerational toxicity of Zearalenone in pigs. Reproductive Toxicology. 34: 110 – 119.

130. Stopper, H., Schmitt, E., Kobras, K. 2005. Genotoxicity of phytoestrogens. Mutation Research. 574: 139 – 155.

131. Sutkevičiene, N., Bakutis, B., Barys, A., Karvelienė, B., Putkauskas, A., Sabeckienė, J., Žilinskas, H. 2009. The effect of the estrogenic mycotoxin zearalenone on boar reproductive potential and the dynamic of asparate aminotransferaze and alanine aminotransferaze levels in the boar blood serum. Veterinarija ir zootechnika. 46(48): 73 – 77.

132. Šimoník, O., Šichtař, J., Krejcárková, A., Rajmon, R., Stádník, L., Beran, J., Doležalová, M., Biniová, Z. 2015. Computer assisted sperm analysis – the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: A review. Indian Journal of Animal Sciences. 85: 3 – 11.

133. Šimoník, O., Rajmon, R., Stádník, L., Beran, J., Ducháček, J., Hodek, P., Trefil, P. 2016. Effect of low-density lipoprotein addition to soybean lecithin – based extenders on bull spermatozoa following freezing – thawing – preliminary results. Czech Journal of Animal Science. 61: 560 -567.

134. Tamaya, T. 2005. Phytoestrogens and reproductive biology. Reproductive Medicine and Biology. 4:225 – 229.

135. Tao, J., Zhang, Y., Li, S., Sun, W., Soongm T. W. 2009. Tyrosine kinase – independent inhibition by genistein on spermatogenic T- type calcium channels attenuates mouse sperm motility and acrosome reaction. Cell Calcium. 45: 133 - 143

136. Tapiero, H., Nguyen Ba, G., Tew, K. D. 2002. Estrogens and environmental estrogens. Biomed Pharmacother. 56: 36 – 44.

137. Tsakmakidis, I. A., Lymberopoulos, A. G., Alexopoulos, C., Boscos, C. M., Kynakis, S. C. 2006. In vitro effect of zearalenone and α – zearalenol on boar sperm characteristics and acrosome reaction. Reproduction of Domestic Animals. 41: 394 – 401.

138. Tsakmakidis, I. A., Lymberopoulos, A. G., Vainas, E., Boscos, C. M., Kynakis, S. C., Alexopoulos, C. 2007. Study on the in vitro effect of zearalenone and α – zearalenol on boar sperm zona pellucida interaction by hemizona assay application. J. Appl. Toxicol. 27: 498 – 505.

139. Tsakmakidis, I. A., Lymberopoulos, A. G., Khalifa, T. A. A., Boscos, C. M., Sarats, A., Alexopoulos, C. 2008. Evaluation of zearalenone and α – zearalenol toxicity on boar sperm DNA integrity. J. Appl. Toxicol. 28: 681 – 688.

140. Turner, J. V., Agatonovic – Kustino, S., Glass, B. D. 2007. Molecular Aspects of Phytoestrogen Selective Binding at Estrogens Receptors. Journal of pharmaceutical Sciences. 96(8): 1879 – 1885.

141. Uma Devi, K., Jha, K., Patil, S. B., Padma, P., Shivaji, S. 2000. Inhibition of motility of hamster spermatozoa by protein tyrosine kinase inhibitors. Andrologia. 32(2): 95 – 106.

142. Vacek, J., Klejdus, B., Lojková, L., Kubán, V. 2008. Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavons: A review. Journal of Separation Science. 31(11):2054 – 2067.

143. Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J. J., Jacobs, jr. D. R., Lee, D. – H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., Myers, J. P. (2012): Hormones and Endocrine – Disrupting Chemicals: Low – Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. Endocrine Reviews, 33, 378 – 455.

144. Verstegen, J., Igner – Ouada, M., Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology. 53: 149 – 179.

145. Vrzáňová, M.; Heresová, J. 2004. Fytoestrogeny. Interní medicína pro praktické lékaře. 1:19 – 21.

146. Vodková, Z., Rajmon, R., Petr., J., Klabanová, P., Jílek, F. 2008. Effects of genistein and genistin on in vitro maturation of pig oocytes. Czech Journal of Animal Science. 53(1): 1 – 8.

147. Wang, D., Zhang, N. Y., Peng, Y. Z., Qi, D. S. 2010. Interaction of Zearalenone and Soybean isoflavone on the development of reproductive organs, reproductive hormones and estrogen receptor expression in prepubertal gilts. Animal Reproduction Science. 122: 317 – 323.

148. Watson, Ch. S., Bulayeuva, N. N., Wozniak, A. L., Aleya, R. A. 2007. Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses. Steroids. 72: 124 – 134.

149. Watson, Ch, S., Jeng, Y. – J., Guptarak, J. 2011. Endocrine disruption via estrogen receptors that articipate in nongenomic signaling pathways. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 127: 44 – 50.

150. West, M. C. L., Anderson, L., McClure, N., Lewis, S. E. M. 2005. Dietary oestrogens and male fertility potential. Human reproduction. 8:3 (197 – 207).

151. Whitehead, S. A., Rice, S. 2006. Endocrine – disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 20(1): 45 – 61.

152. Whitlow, L. W., Hagler, W. M., Diaz, D. E. 2002. Mycotoxins in feeds. Feedstuffs. 74(28): 68 – 78.

153. Whitten, P. L., Naftolin, F. 1998. 8Reproductive actions of phytoestrogens. Bailliére´s Clinical Endocrinology and Metabolism. 12(4): 667 – 690.

154. Whitten, P. L., Patisaul, H. B. 2001. Cross – Species and Interassay Comparisions of Phytoestrogen Action. Environmental Health Perspectives. 109(1):5 – 20.

155. Wuttke, W., Jarry, H., Seidlova – Wuttke, D. 2010. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. Hormones. 9(1): - 15.

156. Ye, L., Se, Z. – J., Ge, R. – S. 2011. Inhibitors of Testosterone Biosynthetic and Metabolic Activation Enzymes. Molecules. 16: 9983 – 10001.

157. Yousef, M. S., Takagi, M., Talukder, A. K., Marey, M. A., Kowsar, R., Abdul – Razek, K. A. – R., Shimizu, T., Fink – Gremmels, J., Miyamoto, A. 2017. Zearalenone (ZEN) disrupts the anti – inflamatory response of bovine oviductal epithelial cells to sperm in vitro. Reproductive Toxicology. 74. 158 – 163.

158. Yuan, X. – X., Zhang, B., Li, L. – L., Xiao, Ch. – W., Fan, J. – X., Geng, M. – M., Yin, Y. – L. 2012. Effects of soybean isoflavones on reproductive parameters in Chines mini – pig boars. Journal of Animal Science and Biotechnology. 3(1): 1 – 8.

159. Zeman, L.; Doležal, P.; Kopřiva, A.; Mrkvicová, E.; Procházková, J.; Ryant, P.; Skládavka, J.; Straková, E.; Suchý, P.; Veselý, P.; Zelenka, J. 2006. Výživa a krmení hospodářských zvířat. 1. Vyd. Praha: Profi Press. 360 s. ISBN 80 – 86726 – 17 – 7.

160. Zhuang, X. – L., Fu, Y. – C., Xu, J. – J., Kong, X. – X., Chen, Z. – G., Luo, L. – L. 2010. Effects of genistein on ovarian follicular development and ovarian life span in rats. Fitoterapia. 81(8): 998 – 1002.

161. Zinedine, A., Soriano, J. M., Motó, J. C., Mañes, J. 2007. Review on the toxicity, occurence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. Food and Chemical Toxicology. 65: 1 – 18.

162. Zöllner, P., Jodlbauer, J., Kleinova, M., Kahlbacker, H., Kuhn, T., Hochsteiner, W., Linder, W. 2002. Concentration Levels of Zearalenone and Its Metabolites in Urine, Muscle Tissue, and Liver Samples of Pigs Fed with Mycotoxin – Contaminated Oats. J. Agric. Food Chem. 50(9): 2494 – 2501.