

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 8: Ochrana a tvorba životního prostředí

Mužské reprodukční zdraví a látky kolem nás

Klára Synková
Jihomoravský kraj

Kyjov 2024

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 8: Ochrana a tvorba životního prostředí

Mužské reprodukční zdraví a látky kolem nás

Male reproductive health and the substances around us

Autor: Klára Synková

Škola: Klvaňovo gymnázium a střední zdravotnická škola Kyjov,
příspěvková organizace, třída Komenského 549/23, 697 01 Kyjov

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultant: RNDr. Iva Sovadinová, Ph.D.; Mgr. Eliška Sychrová, Ph.D.;
Mgr. Eliška Řehůřková

Kyjov 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Kyjově dne 28. 1. 2024

Klára Synková

Poděkování

Můj veliký dík patří mé školitelce RNDr. Ivě Sovadinové, Ph.D. za perfektní vedení, za její obětavost, ochotu a také laskavý a pozitivní přístup, se kterým mě provázela po celou dobu mé práce. Dále bych ráda poděkovala svým konzultantkám Mgr. Elišce Řehůrkové a Mgr. Elišce Sychrové, Ph.D. za jejich trpělivost, vstřícnost a pomoc s provedením praktické části.

Také bych chtěla poděkovat výzkumnému centru RECETOX za možnost využití zdejších laboratoří a celému kolektivu za jejich přátelský přístup. Práce byla provedena za podpory výzkumné infrastruktury RECETOX (ID LM2023069, MŠMT, 2023–2026) a projektu Grantové agentury České republiky č. GA22-30004S.

Ráda bych poděkovala také svým rodičům za jejich velkou podporu.

Na závěr bych chtěla poděkovat JCMM a JMK za jejich pomoc po finanční stránce. Tato práce byla vypracována za finanční podpory JMK.



STŘEDOŠKOLSKÁ
ODBORNÁ ČINNOST

MUNI | RECETOX
S C I

jihomoravský kraj



Anotace

Problémy mužského reprodukčního zdraví, zahrnující např. neplodnost a vzrůstající výskyt testikulárních nádorů, jsou v současné společnosti závažným tématem spojeným s narůstajícím množstvím chemických látek kolem nás. Má práce se zaměřuje na potenciální negativní vliv těchto látek na mužské reprodukční zdraví, zejména na hodnocení reprotoxicity perfluorovaných látek (PFAS). V teoretické části poskytnu přehled problematiky mužského reprodukčního zdraví a zapojení *in vitro* přístupů a modelů. Cílem bylo nejen představit oblast hodnocení reprotoxicity látek a jejich vliv na mužský reprodukční systém, ale také zkoumat alternativy k tradičním testům na zvířatech a aktivně přispívat k jejich zdokonalení. V praktické části jsem proto využila *in vitro* trojrozměrný model Leydigových TM3 buněk k hodnocení reprodukční toxicity vybraných směsí PFAS prostřednictvím obrazové analýzy. Na závěr bylo navrženo řešení, které by mohlo významně zlepšit proces hodnocení bezpečnosti látek, zejména s ohledem na jejich potenciálně reprotoxické účinky.

Klíčová slova

Endokrinní disruptory; *in vitro* modely; mužské reprodukční zdraví; perfluorované látky; reprodukční toxicita

Annotation

Male reproductive health concerns, encompassing issues such as infertility and the escalating occurrence of testicular tumors, are a serious topic in modern society. These issues are closely linked to the rising prevalence of chemicals in our environment. My research focuses on investigating the potential adverse impact of these substances on male reproductive health, with a specific focus on evaluating the reproductive toxicity of perfluorinated substances (PFAS). In the theoretical part of my work, I present an overview of challenges surrounding male reproductive health and the utilization of *in vitro* approaches and models. Beyond introducing the field of reprotoxicity evaluation, my goal is to explore alternatives to traditional animal testing and actively contribute to their improvement. In the practical phase of my study, I utilized an *in vitro* three-dimensional model of Leydig TM3 cells to assess the reproductive toxicity of selected real-life PFAS mixtures through detailed image-based analysis. The results led to a proposed solution that holds the potential to enhance the safety evaluation process for substances, particularly in relation to their potential reprotoxic effects. In conclusion, my research aims to illuminate the intricate relationship between environmental chemicals and male reproductive health. Simultaneously, it advocates for improved methodologies that prioritize individual well-being and contribute to the refinement of safety assessment practices.

Keywords

Endocrine disruptors; *in vitro* models; male reproductive health; perfluorinated substances; reproductive toxicity

Obsah

ÚVOD	11
CÍLE PRÁCE.....	12
PODÍL AUTORKY NA PRÁCI.....	13
TEORETICKÁ ČÁST	14
1 Mužské reprodukční zdraví.....	14
1.1 Momentální situace	14
1.2 Mužský reprodukční systém.....	15
1.2.1 Leydigovy buňky	17
1.3 Faktory ovlivňující mužské reprodukční zdraví.....	21
2 Životní prostředí a mužské reprodukční zdraví	22
2.1 Endokrinní disruptory	22
2.2 Perfluorované látky (PFAS).....	26
3 Hodnocení reprotoxicity	28
3.1 Epidemiologické studie	28
3.2 Tradiční testování na zvířatech	29
3.3 Alternativní <i>in vitro</i> metody a modely	31
PRAKTICKÁ ČÁST	37
4 Materiál a metody	37
4.1 Použitá buněčná linie	37
4.2 Tvorba mikrogelů 3D Petri Dish®.....	37
4.2.1 Materiál	38
4.2.2 Postup.....	38
4.3 Kultivace a pasážování Leydigových TM3 buněk.....	39
4.3.1 Materiál	40
4.3.2 Postup.....	40
4.4 Nasazení mnohobuněčných sféroidů.....	41
4.4.1 Materiál	41
4.4.2 Postup.....	41
4.5 Hodnocení reprotoxicity směsí PFAS	41
4.5.1 Materiál	41
4.5.2 Postup.....	42

4.6	Hodnocení životaschopnosti pomocí resazurinu.....	43
4.6.1	Materiál.....	43
4.6.2	Postup.....	43
4.7	Analýza dat.....	44
5	Výsledky	44
5.1	Optimalizace analýzy sféroidů	44
5.2	Optimalizace složení kultivačního média	46
5.3	Hodnocení reprotoxicity reálných směsí PFAS	50
6	Diskuze	62
	ZÁVĚR	66
	POUŽITÁ LITERATURA	67
	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	76

Seznam zkratek

15P-1 – linie myších Sertoliho buněk

2D – dvourozměrné prostředí

3D – trojrozměrné prostředí

3R – 3R koncept: „Replacement” – nahrazení, „Reduction“ – snížení a „Refinement” – zlepšení

3 α HSD – 3 α -hydroxysteroid dehydrogenáza

ACR – protein pro regulaci aktivity cytoskeletu

ALCs – dospělé Leydigovy buňky

ATCC – „The American Type Culture Collection“

BMI – index tělesné hmotnosti

BPA – bisfenol A

BTB – hematotestikulární bariéra

C8 – zdravotní projekt „The C8 Health Project“

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CSTEE – Vědecký výbor pro toxicitu, ekotoxicitu a životní prostředí EU

DAZL – protein „deletováno v azoospermii“ („deleted in azoospermia“)

DDT – 1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan

DHH – protein „desert hedgehog protein“

DMEM/F12 – Dulbeccovo a Eaglovo modifikované médium a Hamovo F-12 médium („Dulbecco's Modified Eagle Medium and Ham's F-12 Medium“)

DMSO – dimethylsulfoxid

EDCs – endokrinní disruptory

EDS – ethandimethansulfonát

EU – Evropská unie

FLCs – fetální Leydigovy buňky

FSH – folikulostimulační hormon

FSHR – receptor pro folikulostimulační hormon, marker funkčních Sertoliho buněk

GC-1 spg – linie myších diferencovaných spermatogonií typu B

GnHR – hormon uvolňující gonadotropin

GPF – zelený fluorescenční protein

hCG – lidský choriový gonadotropin produkovaný placentou

HSD3B1 – 3beta-hydroxysteroid dehydrogenáza/delta-deltaizomeráza typu I nebo hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenáza, 3 beta- a steroidní delta-izomeráza 1

ILCs – nezralé Leydigovy buňky

JECS – japonský projekt „The Japan Environment and Children’s Study“

LCs – Leydigovy buňky

LH – luteinizační hormon

LHCGR – receptor pro luteinizační hormon a lidský choriový gonadotropin

LHR – receptor pro luteinizační hormon

MA10 – linie myších Leydigových buněk

miR-140-3p/5p – microRNA miR-140-3p/5p

MLTC-1 – linie myších Leydigových buněk

MRHI – Iniciativa mužského reprodukčního zdraví

NC – negativní kontrola

NLCs – neonatální Leydigovy buňky

PKA – proteinkináza A

PBDE – polybromované difenyletery

PBR – periferní benzodiazepinový receptor

PBS – Fosfátem pufovaný fyziologický roztok

PC – pozitivní kontrola

PDGFR α – růstový faktor α odvozený od trombocytů

PFAS – poly- a perfluoroalkylované sloučeniny

PFDA – kys. perfluorodekanová

PFHPA – kys. perfluoroheptanová

PFHXS – kys. perfluorhexansulfonová

PFNA – kys. perfluornonanová

PFOA – kyselina perfluorooktanová

PFOS – perfluorooktansulfonát

PFUnDA – kys. perfluoroundekánová

PLCs – progenitorové Leydigovy buňky

PRM1 – protein protamin 1

RCF – relativní centrifugační síla („Relative Centrifugal Force“)

REACH – registrace, evaluace a autorizace chemických látek

ROS – reaktivní druhy kyslíku

SB431542 – („potent inhibitor of activin receptor-like kinase“)

SC – stimulační kontrola

SLCs – kmenové Leydigovy buňky

SSCs – spermatogoniální kmenové buňky

StAR – steroidogenní akutní regulační protein

TCDD – 2,3,7,8-tetrachlordibenzodioxin

TM3 – linie myších Leydigových buněk

TM4 – linie myších Sertoliho buněk

WT1 – protein Wilmsova tumoru 1

ÚVOD

V současné době se setkáváme s řadou případů, kdy jsou u mužů diagnostikovány různé poruchy jejich reprodukčního systému, což pro ně znamená zásadní změnu v běžném životě. Tyto poruchy se často projevují neschopností reprodukce, výskytem malformací mužských pohlavních orgánů a bohužel i zvýšenou pravděpodobností vzniku nádorů. Tyto neblahé skutečnosti mohou souviset s nezdravým životním stylem jednotlivce nebo s častým vystavením se chemickým látkám.

Řada těchto látek, s jejichž vlastnostmi a rozšířením souvisí mnoho zdravotních problémů, představuje velké riziko. Abychom mohli posoudit, zda mají tyto látky skutečně negativní dopad na člověka, potřebujeme hodnotit jejich (ne)bezpečnost. Dlouhou dobu byla pro tyto účely využívána zvířata, což však přinášelo řadu komplikací. Díky stále se rozvíjejícím moderním technologiím byly představeny nové modely, metody a přístupy, které by mohly testování na zvířatech nahradit. Inovace ve formě trojrozměrných (3D) tkáňových a buněčných modelů jsou schopny napodobit funkci a stavbu orgánů i jejich systému, a to včetně mužské reprodukční soustavy. Avšak tyto alternativy jsou stále na začátku svého vývoje, a pro dosažení dokonalosti je nezbytné iniciovat rozsáhlejší a detailnější výzkumy.

V rámci své práce jsem se snažila přispět k dalšímu ověření kvality těchto modelů a zároveň jsem se pokoušela zjistit co nejvíce o řešení, díky kterému by zvířata nemusela trpět při hodnocení (ne)bezpečnosti chemických látek a jejich směsí kolem nás. S ohledem na všechny tyto faktory a na dosavadní znalosti jsem v teoretické části své práce nastínila okruh hodnocení reprodukční toxicity látek a možné využití alternativních testikulárních modelů. V praktické části jsem tyto informace aplikovala na konkrétním 3D modelu, který se skládá ze samčích Leydigových buněk, a zhodnotila reprotoxicitu několika vybraných reálných směsí látek, se kterými se dennodenně setkáváme.

CÍLE PRÁCE

Ve své práci jsem si vymezila následující cíle:

- 1) **Představit problematiku hodnocení reprotoxicity látek** a jejich vlivu na mužské reprodukční zdraví se zaměřením na alternativní modely a metody oproti tradičním přístupům využívajícím zvířata
- 2) **Přispět ke zdokonalení testikulárního *in vitro* modelu** založeného na Leydigových buňkách, který by mohl být využit k lepšímu hodnocení mužské reprotoxicity látek
- 3) **Využít tento *in vitro* testikulární model k hodnocení mužské reprotoxicity reálných směsí** perfluorovaných látek identifikovaných v seminální plazmě hasičů
- 4) **Navrhnout řešení, jak vylepšit hodnocení bezpečnosti látek a jejich směsí s ohledem na jejich účinky na mužské reprodukční zdraví** na základě výsledků z teoretické a praktické části mé práce

PODÍL AUTORKY NA PRÁCI

Při práci v laboratoři jsem se aktivně podílela na provádění většiny experimentů, včetně pasážování buněk, vytváření mikrogelů 3D Petri Dish®, zakládání experimentů, výměny médií, fotodokumentace a stanovování životaschopnosti buněk. Pokud se jednalo o manipulaci se škodlivými chemickými látkami, jako jsou např. perfluorované látky PFAS, se kterými jsem z bezpečnostních důvodů sama nemohla pracovat, tak jsem alespoň přihlížela.

Významnou část mé práce tvořila analýza obrazu a následné zpracování těchto dat, což jsem úspěšně zvládala samostatně s přímou podporou od konzultantek. Průběžně jsem aktivně vyhodnocovala výsledky a prezentovala je konzultantkám, což mi umožnilo získat cenné zpětné vazby a vylepšit analýzu dat a tvorbu obrázků v praktické části experimentů.

Během celé SOČ jsem se pravidelně potkávala s konzultantkami ohledně celkové struktury a obsahu mé práce, jedná se ale o mé vlastní dílo.

TEORETICKÁ ČÁST

1 MUŽSKÉ REPRODUKČNÍ ZDRAVÍ

Mužským reprodukčním zdravím rozumíme správnou funkci pohlavních orgánů, tvorbu spermií a hormonů. Precizně kontrolovaná hormonální funkce hraje klíčovou roli v prenatálním vývoji včetně zrání mozku, regulaci růstu, stárnutí, mužském sexuálním dospívání, plodnosti a vývoji sekundárních pohlavních znaků. V prenatálním období je dítě vysoce citlivé na působení okolních faktorů a jeho vývoj závisí právě na hormonální aktivitě. Hormonální teorie sexuality tvrdí, že působení hormonů hraje důležitou roli nejen při diferenciaci pohlaví plodu, ale také ovlivňuje sexuální orientaci, která se později u jedince rozvíjí (Garcia-Falgueras a Swaab 2010; Sychrová et al. 2022).

Pokud dojde k narušení hormonální hladiny v průběhu života jedince, může se s tím pojít řada problémů a rizik. Mezi nejběžnější patří vrozené vady mužského pohlavního ústrojí, rakovina varlat či infertilita. Tato onemocnění a dysfunkce jsou vzájemně propojeny a mohou se projevovat v různých fázích života člověka, přičemž vedou k dalším negativním důsledkům pro mužské reprodukční zdraví. Je tedy klíčové porozumět těmto souvislostem a hledat efektivní způsoby prevence a léčby, aby bylo možné zachovat optimální funkci mužské reprodukční soustavy (Skakkebaek et al. 2016; Sychrová et al. 2022; Adachi et al. 2019; Garcia-Falgueras a Swaab 2010).

1.1 Momentální situace

V poslední době se ocitáme v globální krizi mužského reprodukčního zdraví, která je způsobena mnoha faktory, jako jsou genetické a epigenetické predispozice, životní styl, životospráva nebo kvalita životního prostředí. Tento problém je pozorován po celém světě a projevuje se zejména stále se snižujícím počtem a kvalitou spermií, narůstajícím výskytem vrozených abnormalit mužského reprodukčního systému a zvyšující se incidencí nádorů mužského reprodukčního systému. Mezi nejčastější onemocnění patří kryptorchismus, nádory varlat a opožděný nebo předčasný nástup puberty (De Jonge a Barratt 2019).

Kryptorchismus patří mezi nejčastější vrozené vady mužského reprodukčního systému. V normálních případech varlata sestupují do šourku už před narozením. Když však jedno nebo obě varlata neseštoupí, hovoříme o kryptorchismu. Většina případů této poruchy může být úspěšně řešena operativním zákrokem po narození dítěte, čímž se výrazně snižuje riziko vzniku nádoru varlat i ohrožení neplodnosti (Skakkebaek et al. 2016; Minhas et al. 2021).

Hypospadiie představuje další častou vrozenou vadu mužského reprodukčního systému, manifestující se rozštěpem močové trubice na spodní straně penisu. Závažnost hypospadiie je daná umístěním rozštěpu, které ovlivňuje volbu optimálního řešení, podobně jako u kryptorchismu – a to chirurgický zákrok (Skakkebaek et al. 2016).

Kryptorchismus a hypospadiie jsou typicky považovány za vrozené poruchy, jež se projevují v období po narození. Naopak rakovina varlat a vznik zhoubných nádorů bývají identifikovány v průběhu

puberty, dospělosti i během stárnutí. Rizikové faktory spojené s tímto onemocněním jsou především genetické a environmentální. Terapie těchto nádorových onemocnění často zahrnuje chirurgické zákroky, chemoterapii nebo radioterapii (Skakkebaek et al. 2016; Minhas et al. 2021).

Stále více lidí se potýká s problémy spojenými s neplodností. Mužský faktor neplodnosti je zodpovědný za průměrně 40–50 % těchto případů. Často jsou s neplodností spojeny i další zdravotní problémy, jako je cukrovka, poruchy metabolismu nebo kardiovaskulární onemocnění. Se zdravím muže je spojeno i zdraví jeho partnerky, jejich dětí a další generace potomků. Situaci zhoršuje skutečnost, že většina mužů neklade dostatek důrazu na pravidelné zdravotní kontroly a odbornou pomoc vyhledává pouze v akutních situacích (De Jonge a Barratt 2019).

V rámci japonského projektu a kohorty JECS („The Japan Environment and Children’s Study“) byl proveden výzkum týkající se sekundárního poměru pohlaví. Byla zjištěna souvislost mezi vystavováním otců chemickým látkám na jejich pracovišti a pohlavím jejich narozených dětí. Otcům, kteří byli v pravidelném kontaktu s insekticidy, se rodilo méně chlapců než děvčat (Adachi et al. 2019).

Je klíčové, aby se problémy týkající se zhoršujícího mužského reprodukčního zdraví dostaly do povědomí lidí a aby se podnikly kroky k jejich řešení. Bez zásahu člověka budou muži čelit stále častějším chronickým onemocněním a nevědomky předávat pozměněné geny dalším generacím, čímž se tyto problémy budou stále opakovat. Existují globální organizace, jako je např. Iniciativa mužského reprodukčního zdraví (MRHI – „The Male Reproductive Health Initiative“), které se touto problematikou zabývají a snaží se informovat společnost i muže o důležitosti ochrany jejich zdraví (De Jonge a Barratt 2019). Moje práce bude aspoň malým střípkem do této velké mozaiky.

1.2 Mužský reprodukční systém

Mužský reprodukční systém se skládá z vnitřních struktur, mezi něž patří varlata, nadvarlata, chámovody a prostata, a z vnějších struktur – šourku a pyje. Funkce a stavba všech těchto komponentů mužského reprodukčního systému může být narušena, což může nakonec ovlivnit kvalitu mužského reprodukčního zdraví. Protože praktická část mé práce je zaměřena na experimenty s testikulárními buňkami, proto se zde budu věnovat zejména varlatům.

Varlata jsou dobře prokrvena a protkána kanálky, známými jako semenotvorné kanálky (Obrázek 1), jež podporují tvorbu a vývoj spermií (Obrázek 1a). Dále varlata produkují důležité pohlavní hormony pro mužský vývoj, zejména tzv. androgeny. Hlavním mužským pohlavním hormonem je testosteron, který je v samčím těle vytvářen, spolu s dalšími pohlavními hormony, hlavně ve varlatech Leydigovými buňkami (Obrázek 1b). Dalšími důležitými buňkami jsou podpůrné Sertoliho buňky, které právě spolu s vyvíjejícími se spermiemi tvoří semenotvorné kanálky (Obrázek 1b). Úlohou Sertoliho buněk je podporovat spermatogenezi (Obrázek 1a), tzn. vývoj zárodečných buněk směrem ke zdravým a početným spermiím (Gurung et al. 2023).

a nakonec dosáhne močového měchýře, kde se rozšíří do tzv. ampule. Spermie, které sem dorazí, se smísí s hlenovitým sekretem z přidružených měchýřkovitých žláz a následně se sekretem prostaty. Tímto procesem vzniká tekutina zvaná ejakulát, která postupuje dále do močové trubice uvnitř penisu, a nakonec je vypuzena ven (Betts et al. 2022).

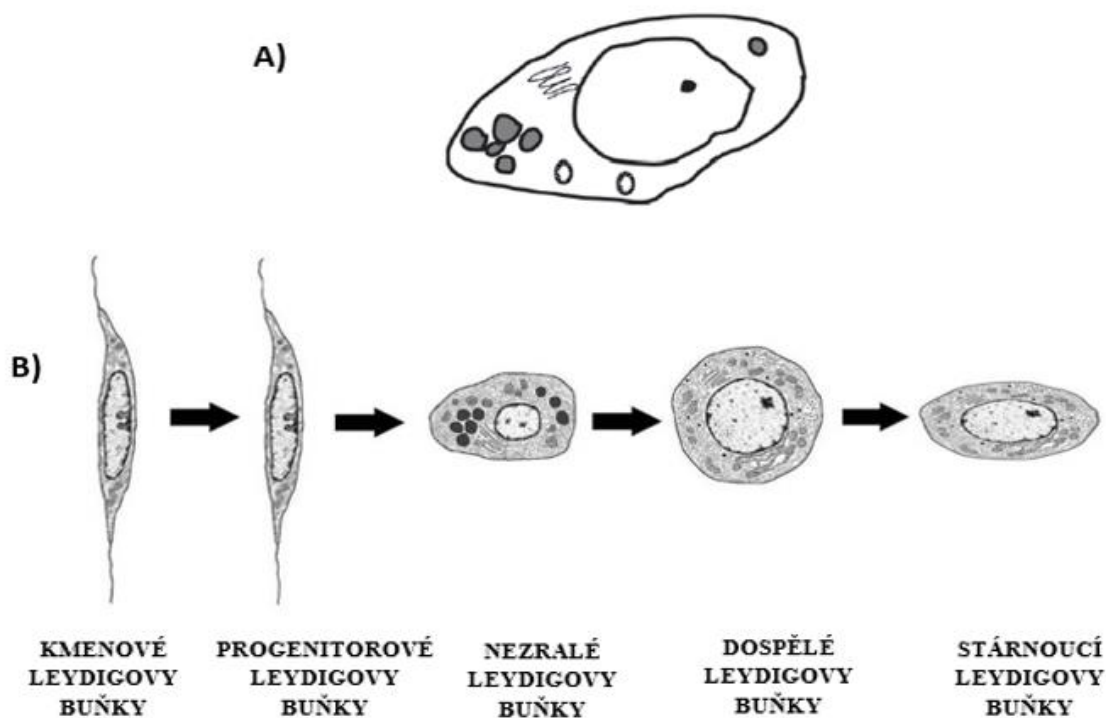
1.2.1 Leydigovy buňky

Jelikož v praktické části využívám Leydigovy buňky, zaměřím se v této kapitole na ně. V poslední době získává stále větší pozornost výzkum Leydigových buněk (Obrázek 2), které jsou klíčovými aktéry v procesu tvorby testosteronu, hlavního samčího pohlavního hormonu, a zároveň zajišťují správný hormonální vývoj jedince. Tyto intersticiální buňky se nacházejí mezi semenotvornými kanálky uvnitř varlat (Aladamat a Tadi 2023). První zmínka o Leydigových buňkách sahá až do roku 1850, kdy byla jejich přítomnost ve varlatech zvířat popsána anatomem Franzem von Leydigem, po němž získaly i jméno. Mezi jejich charakteristické rysy patří výrazně vyvinuté hladké endoplazmatické retikulum, vysoký počet mitochondrií a tukových kapének a tzv. Reinkeho (eozinofilní) krystaly (Shima 2019).

Leydigovy buňky se dělí do dvou hlavních linií – fetální (FLCs) (Obrázek 2a) a dospělé (ALCs) (Obrázek 2b). U lidí byla ještě identifikována populace tzv. neonatálních Leydigových buněk, ale není zatím moc prozkoumána. Existuje mnoho hypotéz týkajících se společného nebo odlišného původu FLCs a ALCs, avšak předpokládá se, že u lidí se obě linie vyvíjí nezávisle na sobě. Během procesu dospívání se postupně FLCs vytrácí a dávají prostor ALCs (Chen et al. 2009; Landreh 2014; Shima 2019).

FLCs (Obrázky 2a a 3) plní zásadní funkci, a to produkci pohlavních hormonů, zejména androgenů, které stojí za sexuální diferenciací a maskulinizací jedince. Tyto buňky se začínají vyskytovat už při embryonálním vývoji. Podle několika hypotéz pocházejí z tzv. progenitorového fondu („progenitor pool“), který tvoří progenitorové buňky. Ty pak postupně procházejí diferenciací, dále rostou a následně za pomoci několika faktorů dospívají do podoby zralých FLCs. Faktory, které těmto procesům napomáhají, jsou proteiny (jako DHH – „Desert hedgehog protein“), mitogeny (jako PDGFR α – růstový faktor A odvozený od trombocytů), transkripční faktory (jako WT1 – protein Wilmsova tumoru 1) a také microRNA (jako miR-140-3p/5p), které jsou produkovány Sertoliho buňkami (Svechnikov et al. 2010b).

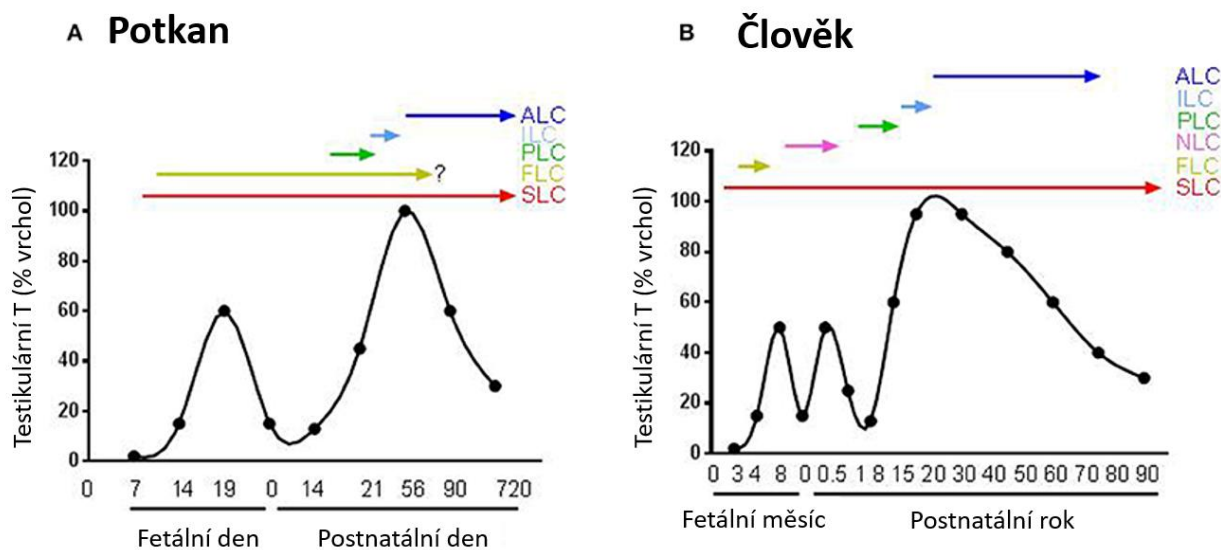
Ve spolupráci se Sertoliho buňkami jsou FLCs schopny tvořit výsledný testosteron. Během prenatalního vývoje dosahuje vrchol tvorby testosteronu u lidských plodů mužského pohlaví v 8. měsíci (Obrázek 3b), zatímco u potkana kolem 17. až 18. dne (Obrázek 3a). Po této době FLCs postupně zanikají a přestávají se podílet na tvorbě testosteronu. Tuto roli postupně přebírají ALCs. Některé studie však naznačují, že FLCs ve varlatech přetrvávají i v dospělosti a tvoří až 20% populace Leydigových buněk (Wen et al. 2016; Landreh 2014; Svechnikov et al. 2010b).



Obrázek 2: Leydigovy buňky: **A)** Schématické zobrazení fetální Leydigovy buňky (FLCs), která obsahuje velké jádro, jadérko, lipidové kapénky (šedé), hladké ER a mitochondrie; **B)** Diagram vývoje dospělých Leydigových buněk (ALCs) začínající kmenovými Leydigovými buňkami a končící zralými Leydigovými buňkami, posléze s poklesem testosteronu vývoj končí stárnoucími Leydigovými buňkami (Chen et al. 2009; Landreh 2014).

Informace o vývoji a funkci samčího reprodukčního systému pocházejí zejména z *in vivo* nebo z *in vitro* experimentů na hlodavcích. Ovšem existují nezanedbatelné rozdíly mezi Leydigovými buňkami hlodavců a těmi lidskými. Mezi tyto rozdíly patří například závislost produkce pohlavních hormonů na aktivaci receptoru pro luteinizační hormon (LHCGR u lidí, Lhr u hlodavců). LH je tvořen v podvěsku mozkovém a stimuluje Leydigovy buňky k produkci pohlavních hormonů přes vazbu právě na LHR. Tento receptor může být u lidí aktivován i lidským choriovým gonadotropinem produkovaným placentou (hCG – „human chorionic gonadotropin“). Hlodavčí FLCs nejsou pro produkci hormonů závislé na vazbě LH na Lhr, přestože se Lhr u nich začíná objevovat už od 16. dne embryonálního vývoje. Fetální varlata hlodavců jsou sice schopna na přítomnost LH reagovat a spustit tvorbu androgenů a dalších pohlavních hormonů, nejsou však na něm závislá. Oproti tomu po narození je LH nezbytný pro spuštění steroidogeneze v hlodavčích ALCs (Chen et al. 2009; Teerds a Huhtaniemi 2015).

Lidské FLCs musí být pro produkci pohlavních hormonů aktivovány přes LHCGR, ovšem spíše přes působení hCG. Během vývoje lidského plodu je totiž při vrcholu produkce testosteronu koncentrace hCG desetkrát vyšší než LH. Z toho vyplývá, že lidské FLCs jsou tedy zcela závislé na hCG, nikoliv na LH. LH zůstává klíčovým pro steroidogenezi ALCs (Obrázek 3), a při jeho nedostatku by mohlo dojít např. k hypogonadismu, což je porušení funkce varlat, které může vést až k neplodnosti (Teerds a Huhtaniemi 2015; Oduwole et al. 2021; Chen et al. 2009; Zirkin a Papadopoulos 2018).

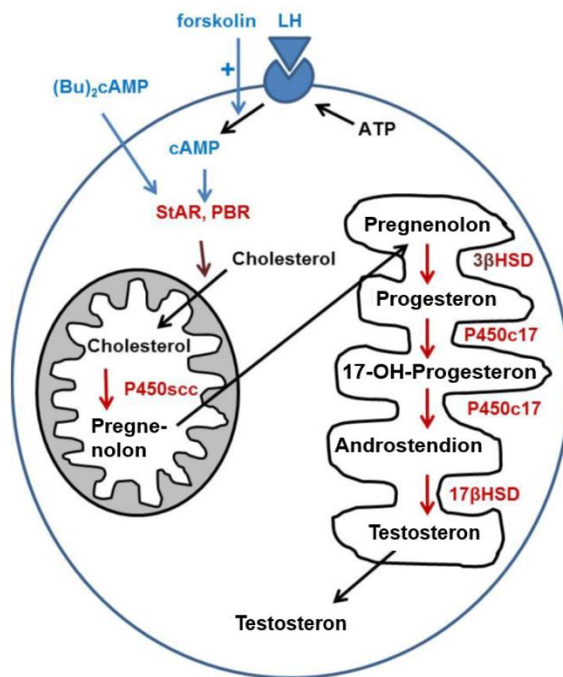


Obrázek 3: Schéma steroidogeneze: **A)** Schéma potkaní steroidogeneze se dvěma androgenními vrcholy; **B)** Schéma lidské steroidogeneze se třemi androgenními vrcholy. Zkratky: **ALC** – dospělé Leydigovy buňky, **FLC** – fetální Leydigovy buňky, **ILC** – nezralé Leydigovy buňky, **NLC** – neonatální Leydigovy buňky, **PLC** – progenitorové Leydigovy buňky, **SLC** – kmenové Leydigovy buňky (Ye et al. 2017).

ALCs se vyvíjejí během puberty z kmenových Leydigových buněk (SLCs) a procházejí celkem čtyřmi stádii: SLCs, progenitorové Leydigovy buňky (PLCs), nezralé Leydigovy buňky (ILCs) a nakonec zralé dospělé a posléze stárnoucí ALCs. V průběhu tohoto vývoje Leydigovy buňky postupně ztrácejí schopnost proliferace, zatímco se dále diferencují a zvyšují svou steroidogenní kapacitu (Obrázky 2b a 3) (Li et al. 2022).

Nediferenciované SLCs se u hlodavců začínají vyvíjet v neonatálních varlatech už těsně po narození, u lidí až v prepubertálním období. Tyto buňky mají vřetenovitý tvar a podobají se mezenchymálním buňkám. SLCs neprodukují androgeny, jelikož neprodukují dostatečné množství steroidogenních enzymů. Namísto toho však mají, stejně jako všechny kmenové buňky, schopnost proliferace (regenerace, samoobnovy) a přeměnit se na jiný buněčný typ. Během 10.–14. postnatálního dne u hlodavců a před třetím rokem u člověka procházejí SLCs diferenciací do druhého stádia, kterým jsou PLCs (Ye et al. 2017; Landreh 2014; Prince 2001; Svechnikov et al. 2010a).

PLCs jsou drobné vřetenovité buňky podobné SLCs (Chen et al. 2009). Na rozdíl od SLCs však exprimují vyšší hladinu steroidogenních enzymů a jsou schopny produkovat malé množství androgenů, konkrétně androsteronu. Při jejich vývoji se PLCs postupně zvětšují a získávají oválný tvar, ale zároveň se snižuje jejich proliferační kapacita (Ye et al. 2017). Poté jsou PLCs transformovány na ILCs (Wu et al. 2007).



Obrázek 4: Schéma steroidogeneze ve zralé Leydigové buňce (ALC): Steroidogenní akutní regulační protein (StAR) a periferní benzodiazepinový receptor (PBR) se podílejí na transportu cholesterolu do vnitřní mitochondriální membrány. Uvnitř mitochondrie dochází k přeměně cholesterolu na pregnenolon. Následně je pregnenolon transportován do hladkého endoplazmatického retikula, kde je přeměněn na testosteron, který je poté uvolňován do cytoplazmy předtím, než opustí buňku. **Modře:** stimulatory steroidogeneze, **červeně:** konverzní kroky a zapojené enzymy (Landreh 2014).

Ve své práci využívám myši Leydigovy TM3 buňky, což jsou právě nezralé Leydigovy buňky, takže teď podrobněji popíši právě toto vývojové stádium ALCs. Mezi 28.–56. dnem u potkanů, 10.–12. dnem u myši a 3.–8. rokem u člověka převažují ve varlatech ILCs (Landreh 2014). ILCs jsou v této fázi oválného tvaru a obsahují velké množství lipidových kapének a hladkého endoplazmatického retikula (Wu et al. 2007). U ILCs se začíná objevovat vysoká hladina enzymů metabolizujících testosteron (jako 5α reduktáza typu II a 3α HSD – 3α -hydroxysteroid dehydrogenáza), které přeměňují testosteron na androgenní metabolit, androstendion (Landreh 2014). Počet těchto buněk se v obou varlatech hlodavců pohybuje kolem 25 milionů, což je polovina finálního počtu Leydigových buněk (Chen et al. 2009). Potkaní ILCs se mezi 28. a 56. dnem svého vývoje dělí jenom jedenkrát a vznikají ALCs (Landreh 2014).

V patnácti letech u člověka a v 56. dni života potkana je proces vývoje Leydigových buněk ukončen, v této chvíli jsou ve varlatech dominantním typem zralé dospělé ALCs. Celkový počet ALCs ve varlatech dospělých jedinců je 50 milionů u hlodavců a 200 milionů u člověka (Landreh 2014). ALCs jsou kulatého tvaru a v porovnání s ILCs mají větší množství hladkého endoplazmatického retikula a mnohem menší počet lipidových kapének (Chen et al. 2010). Zralé ALCs normálně neprocházejí proliferací, ale dokážou se zregenerovat z SLCs, pokud by byly eliminovány např. chemicky ethandimethansulfonátem (EDS), který zabíjí pouze zralé Leydigovy buňky (Benton et al. 1995), jak bylo prokázáno u potkana. Hlavní androgen produkovaný ALCs je testosteron (Obrázek 4). S přibývajícím věkem se koncentrace testikulárního testosteronu postupně snižuje. Je to výsledkem ztráty steroidogenní funkce u ALCs, nikoliv snížením počtu buněk. S tímto poklesem testosteronu se

u člověka pojí změny ve složení těla, snížená vitalita, svalová činnost a fyzická a sexuální výkonnost nebo také depresivní nálada a snížená kognitivní funkce (Chen et al. 2010).

1.3 Faktory ovlivňující mužské reprodukční zdraví

Narušení funkcí a stavby mužského reprodukčního systému může být zapříčiněno různými faktory, mezi které patří genetické a epigenetické predispozice, stáří jedince, nezdravý životní styl nebo znečištění životního prostředí (Rehman et al. 2018; WHO 2023). Ze znečištění se jedná zejména o chemické látky, které narušují endokrinní systém, o tzv. endokrinní disruptory (viz následující kapitola).

Náš věk, genetické předpoklady ani expozici endokrinním disruptorům, které se nacházejí v našem okolí, zásadně neovlivníme, na tyto faktory máme pouze malý vliv. Naopak, náš životní styl ovlivnit můžeme. Mezi prvky nezdravého životního stylu patří např. obezita, nadměrné požívání alkoholu, kouření, užívání drog, stres atd. (Rehman et al. 2018).

Stav obezity se definuje indexem tělesné hmotnosti (BMI) s hodnotou převyšující 25. V dnešní době trpí obezitou více než 2 miliardy lidí po celém světě. Některé studie a výzkumy (Dubeux et al. 2016; Alshahrani et al. 2016) poukazují na negativní vztah obezity a kvality spermatu, ale také na možné hormonální poruchy s tím spojené. Další studie (Bardisi et al. 2016) zkoumaly účinek bariatrické operace a úbytku váhy na hladinu testosteronu jedince. Po provedení operace se hladina testosteronu zvýšila a obnovila se také hormonální rovnováha (Rehman et al. 2018). Je důležité na tomto místě zdůraznit, že endokrinní disruptory s nejvyšší pravděpodobností přispívají i ke vzniku nebo progresi metabolických onemocnění včetně obezity, a tím také negativně ovlivňují mužské reprodukční zdraví (Gupta et al. 2020).

Dalším faktorem, který má dopad na kvalitu spermatu, je konzumace alkoholu. Největší spotřebu alkoholu v krátkém časovém intervalu mají mladí muži v reprodukčním věku. Jedna vědecká studie (Jensen et al. 2014) srovnávala tři typy konzumentů alkoholu. U prvních dvou typů studovaných, kteří konzumovali alkohol v rozmezí 5–25 alkoholických nápojů za týden, byl pozorován pokles kvality spermatu. Avšak muži, kteří pravidelně požívali nadměrné množství alkoholu a přesahovali toto rozmezí, měli podstatně horší výsledky. Alkoholismus může způsobit mimo jiné i poškození funkce Leydigových buněk, tedy mít vliv na hormonální rovnováhu (Rehman et al. 2018).

Většina studií se shoduje, že kouření může negativně ovlivňovat kvalitu a kvantitu spermatu. Asare-Anane et al. (2016) došli při svém výzkumu k závěru, že u kuřáků jsou všechny parametry a hodnoty spermatu horší v porovnání s nekuřáky. Rozsah poškození spermií přímo závisí také na dávkách nikotinu u jedince (Rehman et al. 2018; Asare-Anane et al. 2016).

V neposlední řadě se mezi faktory negativně ovlivňující mužský reprodukční systém a zdraví řadí nadměrný emoční i psychický stres a užívání drog. Oba tyto faktory podporují sníženou kvalitu spermatu u mužů a jdou ruku v ruce s různými psychologickými poruchami (Kumar Mahat a Arora 2016).

Uvedené příklady nezdravých prvků životního stylu jsou jenom jedny z mnoha. Pokud se nám podaří snížit nebo eliminovat aspoň tyto hlavní faktory, bude možné podstatně zredukovat incidenci mužské neplodnosti i další onemocnění a poruchy mužského reprodukčního zdraví.

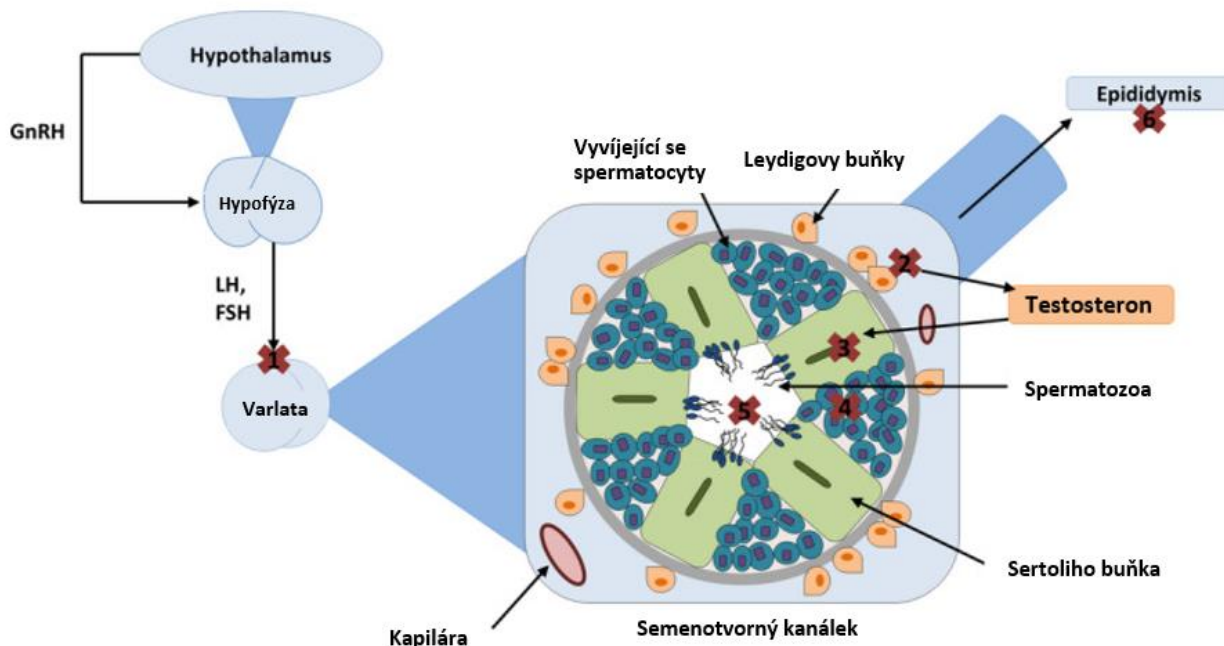
2 ŽIVOTNÍ PROSTŘEDÍ A MUŽSKÉ REPRODUKČNÍ ZDRAVÍ

2.1 Endokrinní disruptory

Jak už bylo zmíněno v předchozí kapitole, mužské reprodukční zdraví je ovlivňováno několika faktory, mezi něž patří i expozice endokrinním disruptorům. Endokrinní systém člověka se skládá ze žláz vylučujících chemické přenašeče (hormony), které nepřetržitě interagují s určitými cíli (receptory). Tyto interakce regulují mnoho klíčových funkcí, včetně růstu, vývoje, reprodukce, energetické rovnováhy, metabolismu a regulace tělesné hmotnosti (La Merrill et al. 2020). Vědecký výbor pro toxicitu, ekotoxicitu a životní prostředí EU (CSTEE – „the European Union Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment“) definuje endokrinní disruptor jako exogenní látku nebo směs látek, které narušují funkce endokrinního systému a způsobují tak nepříznivé zdravotní efekty v organismu, potomstvu nebo celé (sub)populaci. Lidé jsou těmto látkám vystavováni prakticky každý den, protože jsou všudypřítomné v životním prostředí a také v předmětech každodenní potřeby (Sharma et al. 2020; Diamanti-Kandarakis et al. 2009).

Endokrinní disruptory mohou omezit funkci endokrinního systému na úrovni příslušných receptorů a jednotlivých typů buněk. Tyto látky působí prostřednictvím různých mechanismů, např. napodobením funkcí endogenních hormonů (tzn. jsou jejich agonisty), blokováním jejich činností (tzn. jsou jejich antagonisty) nebo zasahováním do jejich metabolismu a transportu. Vývoj spermií a jejich dozrávání i produkce pohlavních hormonů jsou pečlivě regulovány několika úrovněmi kontroly, což znamená, že existuje riziko narušení těchto procesů v několika fázích (Obrázek 5) (Diamanti-Kandarakis et al. 2009).

Účinky endokrinních disruptorů na testikulární funkce zahrnují i další cíle, např. poškození Sertoliho buněk vedoucí ke zvýšení programované buněčné smrti (apoptózy) spermatocytů. Právě Sertoliho buňky hrají klíčovou roli ve vývoji spermií tím, že podporují jejich dozrávání, absorbují přebytečnou cytoplazmu a maximalizují spermatogenezi. Zásah endokrinních disruptorů do spermatogenních procesů vede k narušení tohoto procesu a následnému zhoršení kvality a počtu spermií (Sharma et al. 2020).



Obrázek 5: Hlavní mechanismy, kterými endokrinní disruptory ovlivňují produkci hormonů i počet a kvalitu spermií. Hormon uvolňující gonadotropin (GnHR) stimuluje tvorbu luteinizačního hormonu (LH), který aktivuje tvorbu pohlavních hormonů, a folitropinu (folikulostimulační hormon, FSH), který spouští spermatogenezi. Působením endokrinních disruptorů dochází k následujícím procesům: 1) narušení receptorů pro LH a FSH v Leydigových nebo Sertoliho buňkách, 2) ovlivnění procesu steroidogeneze (tvorby pohlavních hormonů) v Leydigových buňkách, 3) přímé poškození Leydigových nebo Sertoliho buněk, 4) tlumení a zamezení vývoje spermatoocytů, 5) narušení zralých spermií, 6) narušení spermií v nadvarlatech (Sharma et al. 2020).

Endokrinní disruptory jsou strukturálně různorodé látky přírodního nebo umělého původu, které se liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a svým uplatněním (Tabulka 1). Patří mezi ně látky, které se v těle člověka rychle metabolizují, jako ftaláty a bisfenoly, i látky, které přetrvávají v životním prostředí mnohem déle, protože jsou odolné vůči odbourávání (perzistentní), což vede k jejich všudypřítomnosti a následnému hromadění v lidském těle i tělech dalších organismů (bioakumulace) s potenciálem negativních dopadů. Mezi tyto druhy patří např. organochlorované pesticidy, dioxiny a perfluorované látky (PFAS) (Rodprasert et al. 2021).

Tabulka 1: Příklady potenciálních endokrinních disruptorů spolu s jejich využitím a výskytem (Sharma et al. 2020).

Potenciální EDCs	Využití / výskyt
Bisfenoly, např. bisfenol A	<ul style="list-style-type: none"> • Výroba plastů, konkrétně polykarbonátů a epoxidových pryskyřic • Vyskytují se v obalových materiálech, např. při balení potravin nebo vody, také v zubních výplních
DDT	<ul style="list-style-type: none"> • Organochlorovaná látka • 1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan • Pesticid, např. se stále používá proti komárům přenášejícím malárii
Dioxiny, např. TCDD	<ul style="list-style-type: none"> • Skupina polychlorovaných organických heterocyklických sloučenin • Vedlejší produkty bělení buničiny a papíru chlorem, součást pesticidů, vznikají při nedokonalém spalování chlorovaných organických látek, např. při spalování zdravotnického odpadu a plastů

Ftaláty	<ul style="list-style-type: none"> • Změkčovadla do plastů (plastifikátory) • Vyskytují se v obalových materiálech, průmyslových plastech, zdravotnických pomůckách, výrobcích pro osobní péči nebo lécích
Genistein	<ul style="list-style-type: none"> • Přírodní látka ze skupiny isoflavonů • Vyskytuje se v sóji a sójových výrobcích, hormonálních přípravcích, přírodní léčivech a potravinových doplňcích
Glyfosát	<ul style="list-style-type: none"> • N-(fosfonomethyl)glycin • Širokospektrální systémový herbicid („Roundup“)
Insekticidy	<ul style="list-style-type: none"> • Nejrozšířenější produkty využívané v zemědělství • Bioakumulace v prostředí
Mikrocystin-LR	<ul style="list-style-type: none"> • Toxická látka produkovaná sinicemi • Vyskytuje se ve vyšších koncentracích ve sladké vodě během přemnožení sinic v tzv. vodním květu
Nanočástice stříbra (nanostříbro)	<ul style="list-style-type: none"> • Malý shluk atomů stříbra, jehož nejmenší rozměr nepřesahuje 100 nm („koloidní stříbro“) • Staly se nedílnou součástí zdravotního, kosmetického i oděvního průmyslu – rehabilitační, preventivní a léčebné preparáty, obvazy na popáleniny, chirurgické nástroje, protézy, sportovní a funkční oblečení, menstruační pomůcky
Nonylfenol a nonylfenol ethoxyláty	<ul style="list-style-type: none"> • Neionické tenzidy, průmyslové detergenty • Vyskytují se v barvách, pesticidech, výrobcích pro osobní péči, plastech, jsou součástí pracích a čisticích prostředků
Oktylfenol a oktylfenol ethoxyláty	<ul style="list-style-type: none"> • Neionické tenzidy, průmyslové detergenty • Používají se jako povrchově aktivní látky v nejrůznějších mycích, odmašťovacích, čisticích a desinfekčních prostředcích, k výrobě změkčovadel plastů, součást fungicidů, herbicidů nebo bakteriálních přípravků
Parabeny	<ul style="list-style-type: none"> • Konzervační látky • Nalezeny v jídle, kosmetice, výrobcích pro osobní péči a v lécích
Perfluorované sloučeniny (PFAS)	<ul style="list-style-type: none"> • Chemické látky, které patří do skupiny fluorovaných uhlovodíků, ale které obsahují vazby atomů uhlíku pouze s atomy fluoru (nikoli vodíku) a dále vazby mezi uhlíkovými atomy • Všudypřítomné, používají se k povrchové úpravě např. textilií (koberce) a kůže, papíru, stavebních materiálů, chrání proti poškození
Polybromované difenylethery (PBDE)	<ul style="list-style-type: none"> • Uměle vyráběné organické sloučeniny sloužící jako zpomalovače hoření • Vyskytují se ve stavebních materiálech, vybavení bytů a domů, elektronice
Polycyklické aromatické uhlovodíky, např. benzo[a]pyren	<ul style="list-style-type: none"> • Vznikají nedokonalým spalováním organického materiálu, např. spalováním uhlí, benzínu, oleje a dřeva

	<ul style="list-style-type: none"> • Vyskytují se např. ve výfukových plynech naftových motorů, cigaretovém kouři, pokrmech připravovaných na dřevěném uhlí, výparech z kuchyňského oleje, vedlejších produktech průmyslového odpadu
Triazinové herbicidy substituované chlorem (např. atrazin)	<ul style="list-style-type: none"> • Součástí přípravků používaných jako herbicidy v zemědělství • Dostávají se až do podzemních vod
Tributylcín a jeho sloučeniny	<ul style="list-style-type: none"> • Biocidní látky bránící růstu řas a sinic na ponořených konstrukcích, lodních trupech, ve vodárenských věžích • Součástí přípravků na ochranu dřeva, rodenticidů i biocidních přípravků proti měkkýšům, dezinfekčních přípravků
Triklosan	<ul style="list-style-type: none"> • 5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenol • Protibakteriální a protihoubové činidlo vyskytující se ve výrobcích pro osobní péči, domácích potřebách, průmyslových a veterinárních produktech
Vinklozolin a jeho metabolity	<ul style="list-style-type: none"> • Organochlorovaná látka • Fungicid aplikovaný na ovoce a zeleninu

Pesticidy jsou běžně se vyskytující látky v prostředí, nacházející se nejen v půdě, ale také v konzumovaných rostlinách. DDT (1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan) byl jedním z nejznámějších a nejvíce používaných pesticidů, který byl v Evropské unii zakázán kvůli svým disruptivním účinkům na reprodukční a sexuální vývoj jedinců. Studie ukázaly, že muži vystavení pesticidům vykazují vyšší incidenci rakoviny prostaty a nižší kvalitu spermatu mechanismy znázorněnými na Obrázku 5 (Czarnywojtek et al. 2021).

Dioxiny, deriváty organických chemických sloučenin obsahujících chlor, se přirozeně uvolňují během lesních požárů nebo vulkanických erupcí nebo během nedokonalého spalování chlorovaných organických látek, např. při spalování zdravotnického odpadu a plastů. Dále jsou součástí pesticidů a nejčastěji je přijímáme konzumací potravin kontaminovaných právě těmito toxickými látkami. Jejich negativní vliv na zdraví lidí je možné ukázat na konkrétních epidemiologických studiích. Např. byla zjištěna možná souvislost mezi přítomností dioxinu TCDD (2,3,7,8-tetrachlordibenzodioxin) v těle těhotných žen a nízkou porodní váhou a hladinou testosteronu u narozených synů (Czarnywojtek et al. 2021).

PFAS, hojně využívané v průmyslu, textilní výrobě a při balení potravin, zahrnují široké spektrum látek, z nichž nejznámější jsou PFOS (perfluorooktansulfonát) a PFOA (kyselina perfluorooktanová) (Lymperi a Giwercman 2018). Jelikož jsem se těmito látkami zabývala v praktické části mé práce, tak se jim budu podrobněji věnovat v následující samostatné podkapitole.

Mezi méně perzistentní látky, které v našem prostředí přetrvávají kratší dobu, patří bisfenoly (např. bisfenol A, BPA), parabeny a ftaláty (Tabulka 1) (Rodprasert et al. 2021). BPA je organická sloučenina spadající do skupiny fenolů, která je hojně užívána v různých odvětvích průmyslu, často

k výrobě polykarbonátů, epoxidové pryskyřice, zpomalovačů hoření nebo hliníkových plechovek. BPA je také součástí zubních plomb, termopapíru a mnohých parfémů a deodorantů. Lidé s ním přicházejí do styku inhalací, konzumací nebo dermálně přes kůži. BPA může zapříčinit sníženou hladinu FSH, LH a testosteronu u mužů přes mechanismy znázorněné na Obrázku 5. Navíc prochází přes placentu a může narušit správný vývoj plodu. Není vyloučené ani riziko předčasné puberty nebo vzniku rakoviny prostaty (Rodprasert et al. 2021; Czarnywojtek et al. 2021).

Parabeny, estery kyseliny p-hydroxybenzoové, mají antibakteriální a fungicidní účinky a prodlužují životnost kosmetických výrobků, výrobků denní péče, potravin a některých farmaceutik. Stejně jako ostatní potenciální endokrinní disruptory mohou způsobovat negativní změny v endokrinním systému a byla zjištěna možná souvislost mezi jejich působením a obezitou (Kolatorova et al. 2018; Nowak et al. 2018; Darbre 2017).

Ftaláty jsou všudypřítomné chemikálie, které jsou široce používané jako změkčovadla, komponenty plastů, rozpouštědel nebo lepidel. Člověk je vystaven těmto látkám jejich inhalací, konzumací, přímým kontaktem s kůží nebo nitrožilně např. při dialýze. Ftaláty jsou spojeny s možnou schopností snižovat koncentraci testosteronu v krvi a také počet spermií přes mechanismy znázorněné na Obrázku 5. Tyto látky také mohou zvyšovat riziko poruch mužských pohlavních orgánů a vzniku rakoviny prostaty (Czarnywojtek et al. 2021).

V moderním světě jsme vystaveni endokrinním disruptorům a dalším chemickým sloučeninám téměř nepřetržitě. Je důležité zvážit jejich přínos pro náš život a jejich potenciální negativní účinky na naše zdraví, (tzv. analýza nákladů a přínosů). Také by bylo vhodné hledat šetrnější alternativy s předem známým vlivem na naše zdraví (Czarnywojtek et al. 2021).

2.2 Perfluorované látky (PFAS)

PFAS – poly- a perfluoroalkylované sloučeniny představují širokou skupinu více než 3 000 různých sloučenin. Tyto látky, vyráběné již více než 70 let, se vyznačují dlouhými uhlíkovými řetězci a vysokou odolností díky pevné vazbě mezi uhlíkem a fluorem, což je činí mimořádně stálými a perzistentními v životním prostředí. Jejich vysoká pohyblivost jim umožňuje se přesouvat na dlouhé vzdálenosti, podporuje jejich tendenci k bioakumulaci a zvyšování koncentrace v tkáních organismů skrze potravní řetězce (biomagnifikace) (Panieri et al. 2022; Tarapore a Ouyang 2021).

Některé PFAS, jako například PFOS a PFOA, byly zjištěny v krvi, mateřském mléku, moči, tkáních a orgánech u různých lidí po celém světě a jejich přítomnost byla spojena s několika nepříznivými vlivy na zdraví (Panieri et al. 2022; Tarapore a Ouyang 2021).

Díky své odolnosti vůči vysokým teplotám, chemické stabilitě a hydrofilním a hydrofobním vlastnostem (závisí na délce řetězce a funkčních skupinách) se PFAS staly součástí mnoha odvětví průmyslu, nacházejí se v elektronických zařízeních, balicích materiálech, kosmetice, kobercích a textilích a jsou používány jako zpomalovače hoření v hasicích pěnách (Tabulka 1) (Panieri et al. 2022; Tarapore a Ouyang 2021).

kvůli svému neukončenému vývoji citlivější a méně odolné vůči působení těchto látek. Ukázala se možná asociace těchto látek se sníženou hladinou některých protilátek, tedy PFAS mohou u dětí být imunotoxické (Grandjean et al. 2017).

Další epidemiologická studie od Petersen et al. (2022) hodnotila účinky působení jednotlivých PFAS u mladých mužů. Zjistila se asociace těchto perfluorovaných látek a zvýšené hladiny FSH, což může být jedním z vedlejších příznaků hypogonadismu. Tedy, podobně jako další endokrinní disruptory, expozice PFAS může představovat rizikový faktor ovlivňující lidské zdraví (Petersen et al. 2022; Panieri et al. 2022; Fenton et al. 2021).

3 HODNOCENÍ REPROTOXICITY

V současné populaci jsou reprodukční problémy docela běžné. Přibližně 5 až 10 % párů se potýká s problémy spojenými s početím dítěte, 10 až 15 % rozpoznávaných těhotenství není úspěšně dokončeno, přibližně 3 až 5 % novorozenců má vážné vrozené vady a přibližně 10 % dětí trpí neurovývojovými poruchami (Svingen 2023). Také pozorujeme zvýšení výskytu nádorů v populaci, včetně nádorů varlat, které postihují jedince stále mladšího věku (di Martino et al. 2022).

Je pravděpodobné, že expozice chemickým látkám přispívá k tomuto problému, protože některé chemikálie, část z nich s rozsáhlou environmentální, spotřebitelskou nebo pracovní expozicí, jsou reprodukčními toxikanty u zvířat. Podle zprávy Národní akademie věd Spojených států („the US National Academy of Sciences“) je přibližně 28 % všech hlavních vývojových poruch přičítatelných zcela nebo částečně expozici látkám z prostředí. Hlavní pozornost je zaměřena zejména na účinky vyvolané během prenatálního vývoje. V tomto mimořádně citlivém období mohou být chemickými látkami indukovány nevratné účinky. Hodnocení bezpečnosti látek je ale velmi limitované. Z tisíce látek a jejich směsí, jimž můžeme být vystaveni, většina nebyla dostatečně hodnocena z hlediska reprodukční toxicity (Svingen 2023). V následujícím textu vysvětlím, proč tomu tak je.

3.1 Epidemiologické studie

Reprotoxicitu, tj. negativní účinky chemických látek na vývoj a funkci reprodukční soustavy, lze studovat a hodnotit prostřednictvím epidemiologických studií. Epidemiologické studie sledují a dokazují spojitost mezi příčinou a následkem. Existuje jich široká škála – od pozorování až po řízené experimenty. Experimentální řízené studie se provádí zejména u léčiv, pro ostatní typy chemických látek a znečištění jsou z etického hlediska nepoužitelné, proto přinášejí pouze možnou souvislost mezi přítomností chemické látky a zdravotním problémem. Potvrzení této kauzality je nutné pomocí experimentálních studií *in vivo*, *in vitro* nebo *in silico* (Petersen et al. 2020).

Jelikož jsem se v praktické části zabývala vlivem PFAS na testikulární buňky, ukážu na příkladu těchto látek, jaké informace epidemiologické studie mohou přinést. Vybrané studie pocházejí ze souhrnného rešeršního článku Petersena et al. (2020), který shrnuje negativní účinky PFAS na mužskou reprodukční soustavu. Negativní účinky těchto studií zahrnovalo působení PFAS na kvalitu a množství spermií nebo hladinu pohlavních hormonů, zatímco jiné sledovaly možnou zvýšenou

incidenci vzniku zhoubných nádorů a malformací pohlavních orgánů v souvislosti s expozicí PFAS (Petersen et al. 2020).

Např. studie Vested et al. (2013) se zaměřila na prenatální expozici PFAS v krvi těhotných žen v Dánsku a její možné následky pozorovatelné u mladých mužů narozených těmto ženám. Výhodou tohoto výzkumu bylo jeho rozvržení a pozorování s odstupem několika let. Díky tomu mohly být studovány účinky expozice PFOS a PFOA během prenatálního období a vývoje mužských pohlavních orgánů, a jak se projeví u dospělých jedinců. Výsledky této studie naznačují, že fetální mužský reprodukční systém je citlivý vůči expozici PFOA a může přispívat později k nižšímu počtu spermií a snížené hladině FSH a LH v krvi mladých mužů (Vested et al. 2013).

Další epidemiologické studie se zaměřovaly na možnost, že PFAS jsou nějak zapojeny do vzniku a rozvoje nádorů mužských pohlavních orgánů. Ve své studii se Barry, Winquist, a Steenland (2013) zabývali incidencí rakoviny varlat a expozicí PFAS. Jejich výzkum se zaměřil na oblast Západní Virginie v USA poblíž chemického závodu DuPont. Vzorky pro tuto studii pocházely od mužů, kteří žili, pracovali nebo chodili do školy v blízkosti DuPontu a zúčastnili se projektu C8 (Frisbee et al. 2009) mezi lety 2005–2006. Tento chemický závod aktivně využíval PFAS od roku 1946 pro výrobu nepřilnavého kuchyňského nádobí a část jich bylo vypuštěno do řeky Ohio, do ovzduší a následně byla kontaminována i podzemní voda, kterou využívali místní obyvatelé. Největší průměrná hladina PFOA byla zjištěna u zaměstnanců DuPontu. Výsledky této studie doložily spojitost narůstající incidence rakoviny varlat s narůstající hladinou PFOA. (Barry et al. 2013; Frisbee et al. 2009).

Kvůli limitovanému počtu studií zabývajících se problematikou reprotoxicity nejsou jejich závěry vždy konzistentní a všeobecně přenositelné. K těmto nejasným výsledkům může přispívat také několik faktorů. Patří mezi ně např. studování vlivu různých PFAS látek na rozdílné věkové skupiny a jejich vzájemné porovnávání nebo testování hypotéz, které čerpají ze stejných dat. Také vybírání účastníků v zájmu úspěšného výsledku studií může vést k zaujatosti a nepřesnosti. Proto je třeba uskutečnit větší a kvalitnější epidemiologické studie, které by pomohly objasnit a lépe definovat tuto problematiku (Petersen et al. 2020).

3.2 Tradiční testování na zvířatech

Během života jsme vystaveni mnoha chemickým látkám a jejich směsím. Abychom mohli posoudit, zda a do jaké míry jsou tyto látky toxické a škodlivé pro člověka, je nutné hodnotit jejich bezpečnost. Toto hodnocení (ne)bezpečnosti látek pro člověka se dle platné legislativy stále provádí primárně *in vivo* metodami na zvířatech, konkrétně zejména na vyšších obratlovcích. Testy na zvířatech jsou však značně nákladné, časově náročné, málo propustné (hodnotí málo látek najednou), málo prediktivní pro člověka a také jsou z etického hlediska označovány jako kontroverzní. Proto je reprodukční toxicita látek pro člověka studována velice omezeně. V poslední době proto dochází k rozvoji a hledání nových alternativních metod a přístupů. Tím by se zredukovalo množství zvířat potřebných pro hodnocení toxicity látek včetně reprotoxicity a zvětšil by se také počet látek, u kterých by byl jejich reprotoxický potenciál stanoven (Kubincová et al. 2016).

S hodnocením škodlivosti/bezpečnosti látek na zvířatech se začalo již v padesátých letech minulého století. Spolu s tím ve druhé polovině 20. století, konkrétně v roce 1959, byl oficiálně představen koncept tří R – „Replacement“ (nahrazení), „Reduction“ (snížení) a „Refinement“ (zlepšení) (3R Centrum ČR 2023; Tannenbaum a Bennett 2015). Tyto tři zásady se staly milníkem pro etický a vědecký přístup k používání zvířat ve výzkumu, ke studiu lidské biologie, zdraví a bezpečnosti látek a staly se o několik let později nedílnou součástí vědeckých, etických a legislativních požadavků na experimentální činnost se zvířaty v EU. Jejich cílem je nahradit zvířecí testování alternativními metodami („replacement“), snížit počet testovaných zvířat („reduction“) a vylepšit podmínky užití zvířat, aby se minimalizoval jejich stres, bolest a utrpení („refinement“) (Kubincová et al. 2016; Díaz et al. 2021).

Např. dle nařízení REACH (registrace, evaluace a autorizace chemických látek) (EC/2006/1907), které vstoupilo v platnost v červnu 2007, je testování na zvířatech přípustné jen v případě, kdy neexistuje jiná, plně funkční náhrada. Těchto alternativ, mezi které patří i *in vitro* metody a přístupy, zatím není mnoho, nicméně se stále vyvíjí nová možná řešení. Jelikož ale nařízení REACH nařizuje získat toxikologická data pro všechny chemické látky vyráběné v EU nebo do ní dovážené v množství větším než 1 t ročně a těchto látek je velké množství, řádově více než 14 000, není prakticky možné všechny kompletně otestovat pouze za pomoci zvířat. Dle studie Knight et al. (2023) bylo od roku 2009 pro testování REACH použito 2,9 milionu zvířat a dalších 1,3 milionu je stále používáno. I proto je nutné vyvíjet jejich alternativy a funkční náhrady (EU-OSHA 2006; Kubincová et al. 2016; Saldutti et al. 2013; Knight et al. 2023).

Studie reprodukční toxicity u samců se většinou zabývají pozorováním účinků testované látky na jejich reprodukční systém. Pro hodnocení reprotoxicity látek se monitorují parametry, jako je vývoj tělesné hmotnosti, klinické příznaky, hmotnost varlat a nadvarlat, kvalita a kvantita spermií, stádia spermatogeneze nebo hladina testosteronu v krvi. Pro lepší názornost účinků reprotoxicity se také provádí kompletní histopatologie varlat a nadvarlat (Brannen et al. 2016; Aulmann 2012).

Na příkladu studií reprotoxicity PFAS na zvířatech ukážu, jak se při nich postupuje. Ve své studii Qu et al. (2016) pozorovali účinky PFOS u dospělých myších samců (staří 6–8 týdnů). Těmto myším bylo PFOS podáváno orálně sondou po dobu pěti týdnů v množství 0,05 nebo 10 mg/kg/den. Myši s menším množstvím PFOS v těle nevykazovaly žádné významné změny. Naopak u myši vystaveným vyššímu množství PFOS byl zaznamenán výrazný pokles hladiny testosteronu, počtu spermií a úbytek váhy varlat. To mohlo být zapříčiněno sníženou proliferací a zvýšenou apoptózou zárodečných buněk (Qu et al. 2016).

Studie Zhang et al. (2020) zkoumala souvislost mezi expozicí PFOS a vývojem fetálních a dospělých Leydigových buněk u potkanů. Těhotné samice dostávaly dávku 1 nebo 5 mg/kg/den PFOS od 5. do 20. dne embryonálního vývoje potomka. U narozených samců byly zaznamenávány jejich testikulární funkce 1., 35. a 90. den po narození. Byl zaznamenán pokles hladiny testosteronu ve všech třech dnech měření. Působení PFOS na těhotné samice potkanů může ve výsledku tedy negativně ovlivnit vývoj FLCs i ALCs (Zhang et al. 2020).

Tyto studie ukazují možnou spojitost mezi působením PFAS na zvířata a jejich negativními účinky. Existuje však stále několik překážek, které brání jednoznačnému porozumění problematice, jakým mechanismem PFAS tyto negativní účinky způsobují. Je proto žádoucí provádět podrobnější experimenty zahrnujících různé toxikologické modely a metody, které by lépe zmapovaly mechanismy působení PFAS (Zeng et al. 2019).

3.3 Alternativní *in vitro* metody a modely

V posledních letech dochází k výrazným změnám v oblasti hodnocení bezpečnosti chemických látek, kdy tradiční *in vivo* metody na zvířatech ustupují novým, inovativním přístupům. Tyto alternativní metody musí splňovat alespoň jeden z principů 3R. Aby mohly být tyto metody využívány pro hodnocení bezpečnosti dle platné legislativy, musí projít složitým a zdoluhavým procesem vývoje, validace a implementace, což prodlužuje a znesnadňuje jejich využití, platí to zejména pro *in vitro* metody a modely, které se stávají jedním z klíčových hráčů v revoluci hodnocení toxicity (Kubincová et al. 2016).

Latinský výraz *in vitro* znamená česky „ve skle“ a *in vitro* metody a modely představují širokou škálu adaptivních postupů, metod a modelů snažících se napodobit biologickou stavbu a procesy mimo celý organismus. Oproti tradičním metodám využívajícím zvířata pracuje *in vitro* metoda pouze s buněčnými a tkáňovými systémy nebo izolovanými orgány. Díky pokrokům v molekulární biologii, biotechnologii a počítačovém modelování toxicity se tyto progresivní metody neustále zdokonalují. Tímto způsobem můžeme lépe hodnotit zdravotní rizika potenciálně toxických látek a současně minimalizovat potřebu laboratorních testů na zvířatech (Kubincová et al. 2016).

Snaha o zdokonalení hodnocení bezpečnosti látek a upouštění od *in vivo* metod na zvířatech vedou k vytváření prostředí, které co nejlépe simuluje složitost biologických procesů a struktur. K dosažení tohoto cíle se vyvíjí soubory, tzv. baterie testů, a stupňovité schéma testování. V tomto schématu jsou výsledky jednoho stupně použity pro následující komplexnější kroky, kde se po každém kroku posuzuje nutnost dalšího testování. Dalším krokem směrem ke zdokonalení *in vitro* metod a modelů je náhrada savčích rakovinných buněčných linií za lidské nerakovinné ekvivalenty a zdokonalení způsobu jejich kultivace a pěstování. Tradičně se buňky pěstují na Petriho misce v jedné vrstvě, což se nazývá dvojrozměrná (2D) kultivace (Obrázek 7). Jelikož v těchto podmínkách buňky nepolarizují a ztrácí svou funkčnost, tak se od nich upouští a přechází se k tzv. trojrozměrné (3D) kultivaci (Tabulka 2). 3D modely se snaží co nejpřesněji napodobit živý organismus (Kubincová et al. 2016; Saldutti et al. 2013).

Na příkladu varlat budu představovat jednotlivé typy *in vitro* modelů. V kvalitním a funkčním *in vitro* modelu varlat musí probíhat procesy spermatogeneze i steroidogeneze. 2D model varlat využívá primární, immortalizované nebo nádorové buňky, které rostou na povrchu plastových destiček a tvoří monovrstvu nejčastěji jednoho typu testikulárních buněk (Obrázek 7). Příkladem buněčných linií testikulárních buněk jsou myši Leydigovy TM3, MA10 nebo MLTC-1 buňky, myši Sertoliho TM4 nebo 15P-1 buňky nebo myši diferencované spermatogonie B GC-1 spg (ATCC 2023). Lidské linie testikulárních buněk nejsou komerčně dostupné, pouze primární, ale i těch je velice omezené

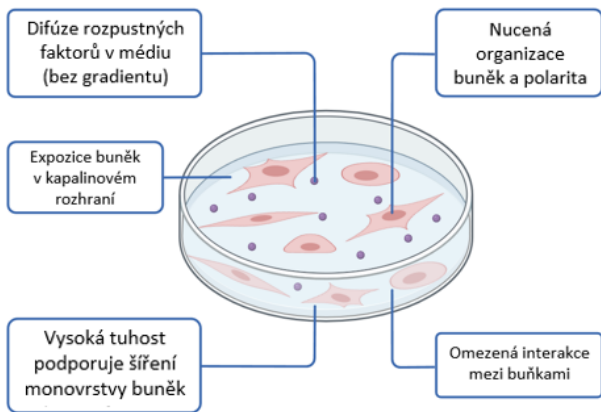
množství, proto většina mechanistických informací o reprotoxicitě látek pochází z *in vitro* studií využívajících hlodavčí testikulární buňky (Blažková 2018).

Výhodou 2D modelů je jejich snadné a nízkonákladové provedení, které i přes své nedokonalosti umožnilo lepší porozumění mužské reprodukční biologii a reprotoxicitě látek. 2D ko-kultury hlavních typů testikulárních buněk, jako jsou Sertoliho, Leydigovy a zárodečné buňky, umožnily jejich vzájemnou buněčnou interakci a snažily se lépe imitovat proces spermatogeneze i steroidogeneze *in vitro*, což se ale nepovedlo dokonale. Kultury a ko-kultury testikulárních buněk pěstované ve 2D ztrácí svou funkčnost, jako je produkce hormonů nebo zrání spermií, a jsou tedy použitelné omezeně (Kubincová et al. 2016; Saldutti et al. 2013; Blažková 2018).

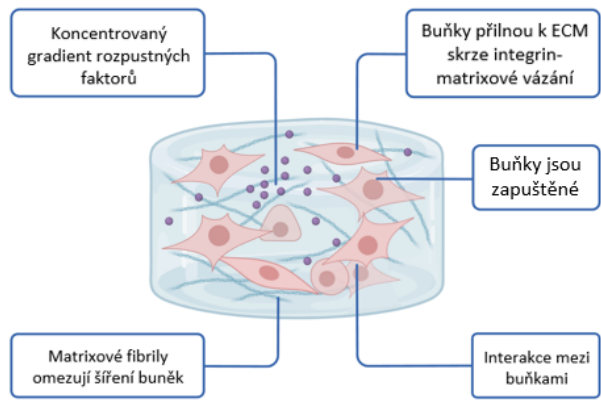
Aby se docílilo požadovaného výsledku rekonstrukce autentického prostředí varlat, ustupuje se od tradiční (konvenční) kultivace testikulárních buněk ve 2D modelu a přechází se na 3D model (Obrázek 7) (Kubincová et al. 2016; Sakib et al. 2019; Saldutti et al. 2013). 3D buněčné struktury se svojí organizací podobají skutečným tkáním a přibližují se tak *in vivo* prostředí. Existuje mnoho 3D modelů, které samostatně kultivují a zkoumají jeden typ testikulárních buněk, nebo kultivují více typů testikulárních buněk dohromady (Tabulka 2). 3D modely relevantní pro testování reprotoxicity jsou multicelulární sféroidy, organoidy, mikrofluidní zařízení i orgánové a tkáňové explantáty (Obrázek 8) (Kubincová et al. 2016; Blažková 2018).

Srovnání 2D vs. 3D buněčné kultury

Buňky rostoucí na 2D kultivační misce

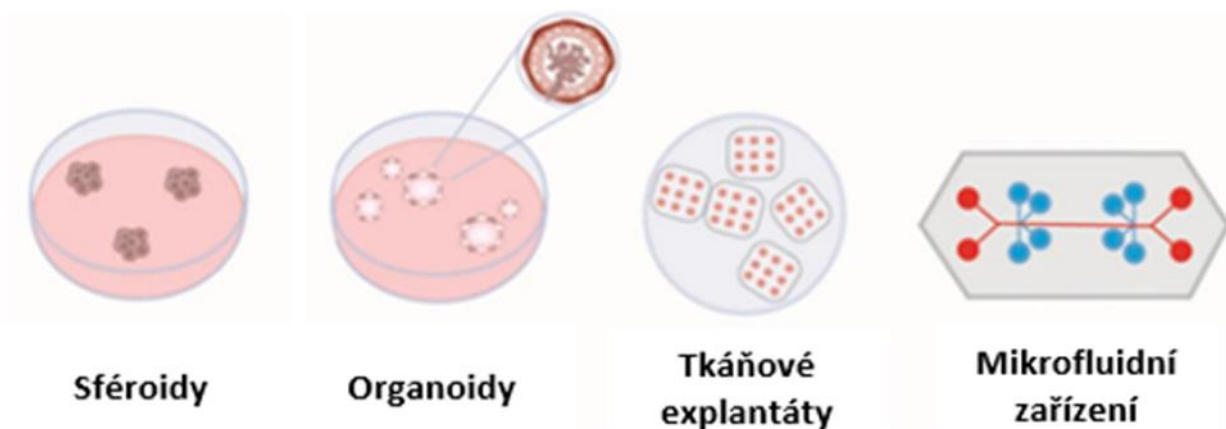


Buňky rostoucí v 3D ECM



Obrázek 7: Srovnání dvourozměrných (2D) vs trojrozměrných (3D) *in vitro* modelů kultivovaných buněk (AAT Bioquest 2023).

Nejnovějším milníkem v oblasti *in vitro* modelů je tzv. orgán na čipu („organ-on-chip“). Tento revoluční systém umožňuje růst miniaturních tkání uvnitř mikrofluidního čipu, který je designován tak, aby reprodukoval buněčné a extracelulární charakteristiky orgánů. Tyto čipy jsou schopny reagovat na biochemické a fyzikální podněty, což umožňuje udržet a simulovat funkci příslušného orgánu. Mikrofluidní čip samotný představuje jemné síť mikrokáňků, kterými prochází minimální množství média (Leung et al. 2022).



Obrázek 8: Srovnání *in vitro* 3D modelů podle jejich komplexnosti a fyziologického významu. Řada začíná modelem sféroidů, pokračuje modelem organoidů, tkáňového explantátu a končí mikrofluidním zařízením (převzato z Blyth et al. 2023 a upraveno).

Tabulka 2: Příklady 3D *in vitro* modelů a jejich obecná charakteristika (Blažková 2018; Kubincová et al. 2016; Sakib et al. 2019; Pendergraft et al. 2017; Sychrová et al. 2022; Komeya et al. 2016; Sato et al. 2015).

3D <i>in vitro</i> model	Charakteristika
Multicelulární sféroidy	<ul style="list-style-type: none"> • Agregáty primárních buněk nebo buněčných linií, nejsou založeny na kmenových buňkách • Složitá architektonická struktura • Kultivují se několika metodami: <ul style="list-style-type: none"> · Využitím neadhezivních povrchů · Metodou visící kapky („hanging drop“) · Agitačním mícháním (bioreaktor) · Využitím gravitace (mikrogravitace), magnetické nebo elektrické síly a akustického vlnění • Procesem samsopřádání vzniká kompaktní sféroid • Výhodou je rychlé provedení, nenákladnost přípravy a kultivace a také automatizace procesu kultivace a hodnocení toxicity látek • Příkladem využití sféroidů pro testikulární buňky jsou sféroidy Leydigových TM3 buněk (Sychrová et al. 2022)
Organoidy	<ul style="list-style-type: none"> • Zjednodušené 3D orgány vzniklé ko-kultivací jednotlivých typů buněk představující požadovaný orgán <ul style="list-style-type: none"> · Primární, nádorové, kmenové nebo progenitorové buňky a buněčné linie • Využití v personalizované medicíně a při hodnocení vlivů látek na lidské zdraví • Příprava je časově a finančně náročná a je třeba důkladně kontrolovat kultivační podmínky • Úspěšně vytvořený testikulární model z lidských spermatogoniálních kmenových buněk (SSCs), Sertoliho a Leydigových buněk (Pendergraft et al. 2017) produkoval: <ul style="list-style-type: none"> · Markery – DAZL, ACR, PRM1, HSD3B1, FSHR · Androgeny
Mikrofluidní zařízení	<ul style="list-style-type: none"> • Systém s cirkulujícím médiem simulující krevní řečiště organismu <ul style="list-style-type: none"> · Do systému je přiváděn kyslík a živiny, odváděny jsou pak odpadní metabolity • Zařízení je velice složité a je nutné stále udržovat průtok média • V testikulárním systému zvyšuje účinnost a udržuje proces spermatogeneze • Příkladem využití tohoto zařízení pro model varlat je úspěšné udržování spermatogeneze <i>ex vivo</i> (Komeya et al. 2016) <ul style="list-style-type: none"> · Při tomto pokusu byla použita tkáň z myších varlat · Tato tkáň produkovala testosteron a reagovala na stimulaci luteinizačním hormonem

Orgánové explantáty

- Tvořeny částmi tkáně izolované z odebraného orgánu nebo celým izolovaným orgánem
- Buňka rostoucí na živé tkáni si zachovává původní architekturu tkáně a mezibuněčnou komunikaci
- Špatná dostupnost tkání a orgánů pro využití této metody
- Nutnost důkladně kontrolovat kultivační podmínky, finančně náročné
- Sato et al. (2015) využil orgánový explantát z transgenní myši *Acrosin*-GFP and *Gsg2*-GFP nesoucí GFP marker meiotických a haploidních zárodečných buněk pro imitaci procesu spermatogeneze *in vitro*
 - Ke kultivaci byly použity fragmenty z myších varlat
 - Testikulární buňky přitom produkovaly GFP

Zkratky: **ACR** – protein pro regulaci aktivity cytoskeletu, **DAZL** – gen („deleted in azoospermia-like“); **FSHR** – receptor pro folikulostimulační hormon a marker funkčních Sertoliho buněk; **GPF** – zelený fluorescenční protein; **HSD3B1** – marker funkčních Leydigových buněk; **PRM1** – protamin 1; **SSCs** – spermatogoniální kmenové buňky.

V závislosti na konkrétním designu může být do čipu integrována primární tkáň, např. orgánový řez z biopsie, nebo uměle vytvořená tkáň, jako např. sféroid nebo organoid. Při postupu shora dolů se primární nebo uměle vytvořená tkáň integruje do čipu, zatímco při postupu zdola nahoru jsou izolované buňky z primárních nebo immortalizovaných linií nebo z kmenových buněk kultivovány v mikrofluidním prostředí, což vede k vytvoření nové tkáně (Leung et al. 2022).

Orgány na čipu lze rozdělit do dvou hlavních typů: pevné orgánové čipy a čipy s bariérovou tkání. V prvním typu jsou buňky kultivovány jako 3D tkáňová hmota, což umožňuje vzájemnou interakci buněk a jejich interakci s médii. Tento přístup je běžný u čipů varlat, jater, nádorů, srdce a tuku. Ve druhém typu je podporováno přirozené formování bariéry mezi tekutinovými kompartmenty, což umožňuje sledovat selektivní transportní procesy přes bariéru. Tato metoda se často využívá u čipů modelujících střev, plíce, kůži a opět varlata (tzv. hematotestikulární bariéra, BTB) (Leung et al. 2022).

AbuMadighem et al. (2022) vytvořil model varlete na čipu, aby otestoval jeho funkčnost a schopnost průběhu spermatogeneze *in vitro*. Testikulární buňky byly izolované ze semenotvorných kanálků sexuálně nezralých myší a kultivované v mikrofluidním čipu. Buňky se vyvinuly do sféroidů a pokračovaly v jejich proliferaci a diferenciaci. Během experimentu byla zkoumána schopnost buněk reagovat na přidání testosteronu a kyseliny retinové do kultivačního media. Jako srovnávací měřítko použili konvenční 3D buněčné kultury v jamkové destičce. Po srovnání vykazoval model čipu větší potenciál napodobit varlata *in situ* než jamková destička. V čipu se nacházelo více diferenciovaných buněk, což demonstruje výhodu čipového modelu (AbuMadighem et al. 2022). I přesto, že tato nejnovější 3D technologie otevírá nové možnosti v oblasti biologického výzkumu, její nevýhodou je vysoká finanční náročnost a potřeba složitějšího školení a postupů pro její obsluhu (Leung et al. 2022).

Na příkladu studií reprotoxicity PFAS pomocí *in vitro* modelů a metod ukáží, jak se při nich prakticky postupuje. Ve své studii Eggert et al. (2019) pozorovali účinky PFOA na fetálních a zralých potkaních varlatech kultivovaných *in vitro*. Kultury fetálních nebo dospělých varlat byly kultivovány po dobu 24 h v 0 až 100 µg/ml (0 až 242 µM) PFOA. PFOA ve vyšších koncentracích snížila v kultuře fetálních varlat hladinu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), expresi proteinu StAR a následně i produkci hormonů progesteronu a testosteronu, což naznačuje její negativní dopad na testikulární steroidogenezi. Tento pokles byl dán do souvislosti s indukcí apoptózy fetálních Leydigových buněk. V dospělých semenotvorných kanálcích byla naopak zjištěna apoptóza zárodečných buněk. Touto studií autoři poukázali na negativní vlivy PFOA na fetální i dospělá varlata (Eggert et al. 2019).

Další studie Qiu et al. (2013) se snažila nalézt spojitost mezi expozicí PFOS a indukovanou dysfunkcí samčí reprodukce v závislosti na narušení funkce a stavby Sertoliho buněk a bariéry BTB. Ověřovali přitom výsledky jejich *in vivo* studie, kdy myším byly po dobu 4 týdnů podávány různé koncentrace PFOS (0.25–50 mg/kg/den) a expozice PFOS zvýšila vakuolizaci Sertoliho buněk a narušila strukturu a permeabilitu BTB. K ověření použili *in vitro* metody na primárních myších Sertoliho buňkách kultivovaných ve 2D modelu. *In vitro* model a metody potvrdily poškození nebo zánik Sertoliho buněk a zároveň také porušení integrity BTB *in vitro* působením PFOS v koncentracích 20 až 60 µM. Právě toto oslabení BTB nejspíš umožnilo průnik PFOS přímo do varlat a následný vznik samčích reprodukčních dysfunkcí, např. snížení počtu spermií (Qiu et al. 2013).

V těchto studiích jsou shrnuty možné toxické efekty PFAS látek postihující funkce testikulárních *in vitro* modelů. Do budoucna by bylo dobré zvážit využívání a vyvíjení názornějších a prediktivnějších lidských modelových systémů pro expozici PFAS. Tato inovace by sloužila jako základ pro budoucí porozumění mechanismu spermatogeneze a steroidogeneze a vlivu PFAS na tyto důležité procesy probíhající ve varlatech (Tarapore a Ouyang 2021).

Díky neustále rostoucím poznatkům ve všech oblastech věd o živé přírodě se objevují nové a sofistikované objevy, metody a inovace, které nám umožňují lépe porozumět a posuzovat biologické procesy, hodnotit bezpečnost látek a zkoumat jejich dopady na lidské tělo. Oblast hodnocení bezpečnosti látek prochází dlouhým vývojem, a i když jsme nyní schopni limitovaně rozpoznat jejich nebezpečnost jinými způsoby, než pouze pomocí testů na zvířatech, tento vývoj stále pokračuje a je otázkou času, než budeme schopni plně pochopit dosažitelnost našich současných očekávání a identifikovat hranice našeho poznání (Kubincová et al. 2016).

PRAKTICKÁ ČÁST

Praktická část mé práce se zaměřuje na hodnocení reprodukční toxicity látek prostřednictvím *in vitro* 3D modelu testikulárních buněk. Konkrétně využívám mnohobuněčné sféroidy vytvořené z linie myších Leydigových buněk. Prvním krokem bylo vytvoření optimálních podmínek pro kultivaci a monitorování sféroidů, což zahrnovalo optimalizaci složení kultivačního média a automatizování kroku hodnocení velikosti a tvaru sféroidů. Druhým krokem bylo využití tohoto modelu pro konkrétní hodnocení reprotoxicity látek.

Hodnocení reprotoxicity zahrnovalo analýzu velikosti, tvaru a životaschopnosti sféroidů v reakci na expozici vybraným chemickým látkám. Pro monitorování velikosti a tvaru sféroidů jsem využila metodu založenou na analýze obrazu. Ke stanovení životaschopnosti 3D buněčné kultury jsem použila metodu stanovující metabolickou aktivitu buněk sféroidu založenou na detekci resazurinu. V tomto konkrétním případě jsem se zaměřila na tři směsi sedmi PFAS, které simulují reálnou pracovní expozici hasičů, kteří používají hasicí pěny s obsahem PFAS. Tyto PFAS jsou známé chemické látky, které mohou ovlivnit reprodukční zdraví, jak jsem popsala v teoretické části v kapitole 3.1. Výsledky mé studie budou přínosem pro lepší pochopení potenciálních rizik spojených s expozicí těmto látkám a přispějí k ochraně reprodukčního zdraví pracovníků vystavených nebezpečným podmínkám.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Použitá buněčná linie

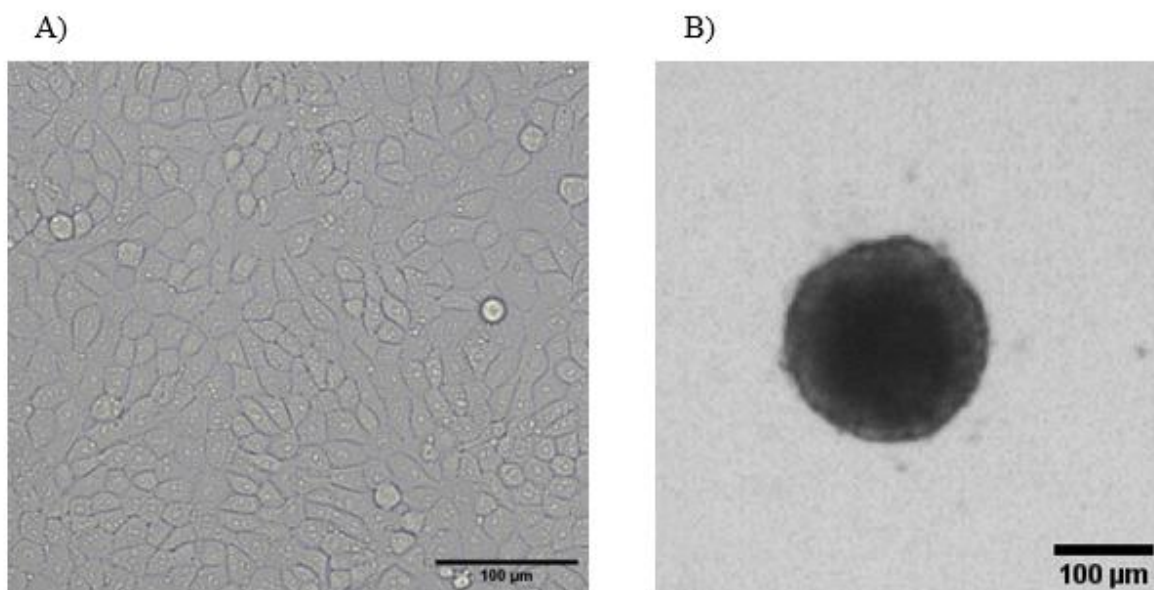
Obecná charakteristika Leydigových TM3 buněk (Blažková 2018) (Obrázek 9):

- samčí epiteliální buňky izolované z varlat 11–13 dnů staré myši (*Mus musculus*)
- zakoupeno z ATCC („American Type Culture Collection“; kat. č. CRL-1714™)
- optimální ředění pro kultivaci je 1 : 20 – 1 : 100
- doba zdvojení buněk se pohybuje v rozmezí 18–22 h.

4.2 Tvorba mikrogelů 3D Petri Dish®

Pomocí speciálních formiček typu „24-35 Large Spheroids“ jsem vytvořila agarózové mikrogely zvané 3D Petri Dish®, ve kterých se kultivují mnohobuněčné sféroidy (Obrázek 10). Díky neadhezivnímu povrchu agarózy buňky nepřilnou k povrchu, ale shluknou se do podoby sféroidu. Tímto se 3D model přibližuje svou funkcí a tvarem tkáním *in vivo*. Použitý typ formičky umožňuje tvorbu 35 sféroidů v každé jamce 24jamkové kultivační destičky. Metoda 3D Petri Dish® mi taky

umožnila vytvořit sféroidy, které budou mít na začátku kultivace stejný počet buněk, v mém případě 4 000 buněk/sféroid, což zvyšuje opakovatelnost celé procedury.



Obrázek 9: Názorná ukázka Leydigových TM3 buněk kultivovaných ve 2D (A) a 3D (B) modelu (Zdroj: autor).

4.2.1 Materiál

- Kultivační médium pro Leydigovy TM3 buňky – DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, kat. č. D2906) s přidaným koňským (5% v/v, Sigma-Aldrich, kat. č. H1270) a fetálním bovinním sérem (5% v/v, Biosera, kat. č. FB-1001/500) (toto složení média doporučuje ATCC)
- Mikro-formičky pro tvorbu 3D Petri Dish® typu „24-35 Large Spheroids“ (Microtissues, dostupné od firmy Sigma-Aldrich, kat. č. Z764051-6EA)
- Agaróza (Sigma-Aldrich, kat. č. A9539)
- Chlorid sodný NaCl – 0,9% ◐ (w/v) (Lach-Ner, kat. č. 30093-AP0)
- Skleněná lahvička s autoklávovatelným víčkem (100 ml); centrifugační zkumavka (15 ml)
- 24jamková sterilní kultivační destička (TPP, dostupné od firmy Sigma-Aldrich, kat. č. Z707805-72EA)
- Sterilizované kleště; špachtle a pipety
- Autokláv; mikrovlnná trouba; termoblok; centrifuga s rotorem pro mikrodestičky

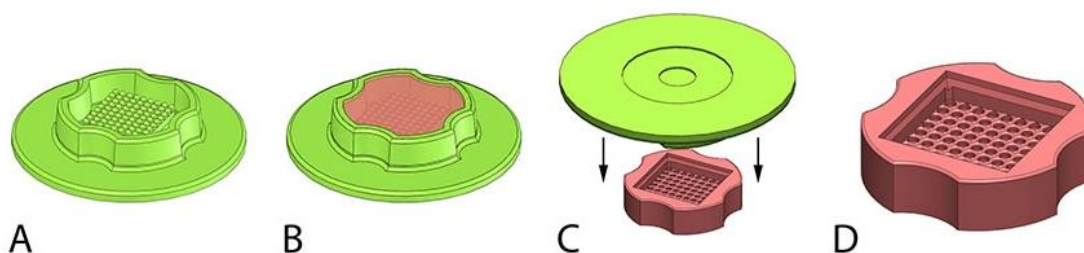
4.2.2 Postup

Pro vytvoření 3D Petri Dish® jsem následovala standardní operační postup (SOP) dostupný v laboratoři a diplomovou práci Elišky Blažkové (Blažková 2018). Začala jsem přípravou 2% (w/v) agarózového roztoku. Do skleněné lahvičky jsem vážila 1 g agarózy a přidala 50 ml 0,9% sterilního

roztoku NaCl (w/v). Směs byla pečlivě promíchána a poté autoklávována po dobu 30 min. Ztuhlý agarózový roztok byl následně rozpuštěn v mikrovlnné troubě. Po krátkém zchlazení rozpuštěné agarózy na 60–70 °C jsem převedla 15 ml roztoku do sterilní centrifugační zkumavky.

Pro vytvoření 1 mikrogelu jsem počítala se 400 μ l 2% agarózy. Zkumavka s roztokem byla umístěna do termobloku nastaveného na 65 °C, který byl umístěn uvnitř laminárního boxu, aby se zabránilo tuhnutí agarózy. Do mikro-formy jsem napipetovala 330 μ l agarózy, dbala jsem na odstranění bublinek a po ztuhnutí agarózy byly gely uspořádány do jednotlivých jamek v 24jamkové destičce výsevnou komůrkou vzhůru. Aby se mikrogel pevně uchytil ke dnu jamky, nechala jsem zbylou agarózu zchladnout na 50–60 °C a poté přidala 150 μ l ke dnu jamky.

Poté jsem provedla ekvilibraci gelů v kultivačním médiu. To zahrnovalo výměnu roztoku NaCl v agaróze za kultivační médium. Do každé jamky bylo přidáno 1 000 μ l média. Destička byla opatrně přenesena do inkubátoru (37 °C, 5% CO₂) na 15 min. Po vyjmutí destičky jsem odsála médium Pasteurovou pipetou a celý proces byl zopakován. Všechny manipulace s laboratorními pomůckami a materiálem pro výrobu mikrogelů probíhaly v biohazardním boxu třídy II. s laminárním prouděním. Všechny předměty přenesené do biohazardního boxu byly očištěny 70% ethanolem.



Obrázek 10: Schématický postup tvorby mikrogelů 3D Petri Dish® ((Microtissues, Inc. 2023).

4.3 Kultivace a pasážování Leydigových TM3 buněk

Proces kultivace buněk zahrnuje pěstování buněk v optimálním médiu za optimálních podmínek. Proces pasážování obecně označuje přenos buněčných kultur z původní kultivační nádoby do nové. Tento postup je klíčový pro zabránění 100% pokrytí celé plochy nádoby buňkami, čímž se předejde kontaktní inhibici, kdy buňky přestanou růst, nebo začnou přerůstat přes sebe.

4.3.1 Materiál

- Kultivační médium pro Leydigovy TM3 buňky – viz kapitola 4.2.1
- Trypsin – 0,25 % w/v Trypsin-EDTA (Biosera, kat. č. XC-T1717)
- PBS – Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (pH 7,2) – 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄ a 1,47mM KH₂PO₄ (byly použity reagentie vhodné pro kultivaci buněk v nejvyšší kvalitě, Sigma-Aldrich)
- Sterilní kultivační nádoby pro tkáňové kultury o velikostech 25 nebo 75 cm² (TPP, kat. č. 90026 nebo 90076)
- Sterilní pipety a mikropipety, sterilní plastové Pasteurovy pipety
- Cellometer Auto T4 Bright Field Cell Counter (BioTek)

4.3.2 Postup

Nejprve bylo nezbytné nechat kultivační médium a trypsin vyhřát na teplotu 37 °C ve vodní lázni. Před započítáním práce s buňkami byla v biohazardním boxu spuštěna UV germicidní lampa, která prostředí sterilizovala po dobu minimálně 15 min. Pracovní plocha byla dezinfikována 70% ethanolem, a vše, co bylo umístěno do biohazardního boxu, prošlo stejnou procedurou, aby se minimalizovalo riziko kontaminace. Pod světelným mikroskopem byly buňky pečlivě zkontrolovány, zda nejsou kontaminovány a morfologie zůstala nezměněna.

Následně proběhl proces pasáže buněk dříve, než by mohly pokrýt celou plochu kultivační nádoby (70–90% konfluence, tzn. 70–90% pokrytí povrchu kultivační nádoby buňkami). Staré kultivační médium bylo odsáto a dovnitř bylo přidáno PBS (1,5 nebo 2,5 ml podle velikosti kultivačních lahvíček). Po opláchnutí buněk bylo PBS odsáto a celý proces byl zopakován dvakrát. K odlepení buněk od dna byl přidán trypsin (0,5 nebo 1,5 až 2 ml podle velikosti kultivačních lahvíček), a následně byly buňky inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 2–5 min. Po odlepení buněk ode dna bylo nutné trypsin neutralizovat médiem (1,5 nebo 4,5 ml podle velikosti kultivačních lahvíček), aby nedošlo k následnému poškození buněk. Část buněk se přenesla do nové kultivační láhve a čerstvého média a dále se kultivovala v inkubátoru při teplotě 37 °C a v atmosféře s 5% CO₂ a 95% vlhkostí, zbytek buněk se použil do následných experimentů.

Aby bylo možno zjistit koncentrace buněk ve vzniklé suspenzi, bylo 20 µl buněčné suspenze přeneseno do počítací komůrky přístroje Cellometer Auto T4. Na základě výsledku bylo dopočítáno, kolik µl buněčné suspenze je potřeba přenést pro tvorbu daného počtu sféroidů, kdy se počítalo 4 000 buněk na sféroid. Pokud bylo nutné buňky zakoncentrovat, jelikož jejich koncentrace v suspenzi byla nižší, než bylo požadováno, tak byla suspenze přenesena sérologickou pipetou do centrifugační zkumavky a následně centrifugována při 290 RCF po dobu 5 min. Po vyjmutí zkumavky byly buňky na dně. Staré kultivační médium bylo odsáto, zanechávajíc pouze buňky, a následně bylo přidáno nové kultivační médium o požadovaném objemu. Celý roztok byl resuspendován pipetou pro maximální rozptýlení buněk v médiu.

4.4 Nasazení mnohobuněčných sféroidů

4.4.1 Materiál

- Kultivační médium pro Leydigovy TM3 buňky – viz kapitola 4.2.1
- Stimulační médium – kultivační médium obohacené o forskolin (20 μ M, Sigma-Aldrich, kat. č. 344270); luteinizační hormon LH (10 ng/mL, Sigma-Aldrich, kat. č. L6420); 20 α -hydroxycholesterol (1 μ g/ml, Sigma-Aldrich, kat. č. 700156P) a SB431542 (1 μ M, Sigma-Aldrich, kat. č. 616461); látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu DMSO, finální koncentrace DMSO v médiu nepřesáhla 0,1 v/v (toto médium bylo použito pouze pro experiment porovnávající dvě rozdílná kultivační média)
- 24jamková kultivační destička s ekvilibrovanými mikrogely
- Automatická pipeta

4.4.2 Postup

Láhev s kultivačním médiem, případně se stimulačním médiem, byla přenesena do biohazardního boxu a ořena 70% ethanolem. Z vnější části ekvilibrované 3D Petri Dish® i z výsevné komůrky bylo odsáto kultivační médium a do výsevné komůrky bylo přeneseno 65 μ l buněčné suspence, postupovalo se tak pro všechny plánované mikrogely. Během nasazování buněk musela být buněčná suspenze několikrát propipetována, aby buňky neklesaly ke dnu zkumavky. Po nasazení buněk do výsevné komůrky se čekalo 10 min. než buňky přisedly ke dnu mikro-jamek 3D Petri Dish®. Následovalo přidání 1 ml kultivačního, popř. stimulačního, média do každé jamky. Kultivační destička obsahující nasazené buňky a médium byla opatřena mými iniciály, datem a názvem experimentu a byla umístěna do inkubátoru (37 °C, 5% CO₂). V experimentu porovnávajícím kultivační médium se stimulačním, se médium měnilo každý druhý den. V tyto dny se také monitorovaly velikost a tvar sféroidů pomocí invertovaného mikroskopu Zeiss Axio Z1 Observer (Carl Zeiss, Německo) a systému TissueFAXS (TissueGnostics, Rakousko) ve spojení s CMOS kamerou Baumer HXG40c a s použitím objektivu se zvětšením 2,5 \times .

4.5 Hodnocení reprotoxicity směsí PFAS

Při tomto typu experimentu byly tři dny staré sféroidy exponované směsím PFAS. Na základě průběžného focení, sledování změn velikosti, tvaru a životaschopnosti sféroidů a výsledného zpracování dat se zhodnotilo, zda mají tyto látky nějaký negativní vliv na Leydigovy TM3 buňky.

4.5.1 Materiál

- PFAS látky (čistota: \geq 98%) – seznam a jejich poměr ve směsích je v Tabulce 3 a jejich struktury v Obrázku 11
- DMSO – dimethylsulfoxid
- Sterilní skleněné vialky; automatická pipeta

Směsi byly namíchány ze zásobních roztoků jednotlivých PFAS rozpuštěných v DMSO v daných poměrech (Tabulka 3), následně byly tyto roztoky směsi dále naředěny v kultivačním médiu na požadované výsledné sumární koncentrace (0,8; 4; 20 a 100 μM ; c1–c4). Z mikrogelů s vytvořenými sféroidy bylo odsáto staré kultivační médium a následně vyměněno za 1 ml nového expozičního média obsahujícího studované směsi. Na každé desce byly přítomny nejen expoziční varianty, ale také sféroidy ničím neexponované (pouze v kultivačním médiu), exponované rozpouštědlem (0,1% DMSO, tzv. rozpouštědlová kontrola) a v pozitivní toxické látce (10% DMSO, tzv. pozitivní kontrola). Sedmý den inkubace, tj. čtvrtý den expozice, bylo médium vyměněno opět za expoziční médium a desátý den inkubace, tj. sedmý den expozice, byl pokus ukončen. Tvar a velikost sféroidů byly monitorovány pomocí invertovaného mikroskopu Zeiss Axio Z1 Observer (Carl Zeiss, Německo) a systému TissueFAXS (TissueGnostics, Rakousko) ve spojení s CMOS kamerou Baumer HXG40c a s použitím objektivu se zvětšením $2,5\times$ v tyto dny inkubace: 1., 3., 7. a 10. den. Experiment byl zopakován třikrát nezávisle.

4.6 Hodnocení životaschopnosti pomocí resazurinu

Na konci expozice (10. den inkubace a zároveň 7. den expozice) byla hodnocena životaschopnost sféroidů metodou využívající resazurin. Princip této metody spočívá v přeměně modrého nefluoreskujícího resazurinu na jeho fluoreskující růžový protějšek resorufin, ke které může dojít pouze v živých buňkách pomocí mitochondriálních dehydrogenáz. Dá se proto říci, že množství přeměněného resazurinu je úměrné metabolické aktivitě buněk sféroidu a jejich životaschopnosti.

4.6.1 Materiál

- Bezsérové médium pro Leydigovy TM3 buňky – viz kapitola 4.2.1 (neobsahuje koňské a fetální bovinní sérum)
- Resazurin (MW = 229, Sigma Aldrich, kat. č. R7017)
- Sterilní mikrocentrifugační zkumavka; automatická pipeta
- 24jamková kultivační destička s multiceulárními sféroidy uvnitř mikro-gelu 3D Petri Dish®
- 96jamková černá destička (např. Greiner Bio-one, kat. č. P/N 655098)
- Mikrosdestičkový fluorimetr (Synergy 4, BioTek)
- Třepačka

4.6.2 Postup

Nejprve se kultivační médium vytemperovalo ve vodní lázni na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po ukončení expozice bylo ze všech jamek kultivační destičky se sféroidy odsáto staré médium, které se vyměnilo za 1 ml bezsérového média a deska byla umístěna na 15 min do inkubátoru ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2). Tento proces se zopakoval ještě jednou. Médium bylo opět odstraněno a bylo přidáno bezsérové kultivační médium (1 ml) obsahující resazurin ($20\text{ }\mu\text{M} = 4,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ v PBS) do každé jamky obsahující sféroidy. Následně byla deska umístěna do inkubátoru ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) na 4 h. Po skončení inkubace byla kultivační

destička vložena na třepačku a 5 min mírně třepána. Do černé 96jamkové destičky se z každé jamky 24jamkové desky přeneslo 3× 250 µl média (triplikát z každé jamky) a byla změřena fluorescence při vlnových délkách 530/590 nm Ex/Em.

4.7 Analýza dat

Získané snímky monitorující sféroidy byly vyhodnocovány pomocí automatického makra v programu ImageJ/Fiji (NIH, USA; Basu et al. 2020) nebo CellProfiler (Stirling et al. 2021). Přestože jsou sféroidy 3D prostorové modely, jejich velikost a tvar byly hodnoceny z jejich 2D projekce. Geometrické parametry, které byly tímto způsobem získány, sloužily k charakteristice tvaru a velikosti mnohobuněčných sféroidů. Vybranými parametry byly plocha, obvod, Feretův průměr, objem, kruhovitost, kulatost, poměr stran (poměr hlavní a vedlejší osy) a celistvost. Jejich charakteristika a výpočet jsou podrobně uvedeny v Blažková (2018).

Hodnoty měřených parametrů byly poté zpracovány a vykresleny v prostředí programu Microsoft Excel (Microsoft 365). U experimentu srovnávajícího dvě rozdílná média (obyčejné kultivační a stimulační), který byl proveden na 6 různých deskách (až 5 040 sféroidů) pro každý inkubační čas, byl vypočítán aritmetický průměr, medián a 25% a 75% kvartil. U experimentu hodnotícího reprotoxicitu směsí PFAS, který byl zopakován třikrát nezávisle, byly rozměrové parametry určující velikost sféroidu normalizovány na negativní kontrolu (pouhé kultivační médium a sféroidy) v daném čase a vypočítalo se procento kontroly. Bezrozměrné parametry charakterizující tvar sféroidů normalizovány nebyly. Z hodnot charakterizujících velikost nebo tvar jednotlivých sféroidů v jednom nezávislém experimentu byly vypočítány aritmetické průměry. Nakonec byla sloučena dohromady všechna nezávislá opakování a byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka (n = 3).

Při hodnocení životaschopnosti sféroidů byla pozad'ová fluorescence (blank – pouze médium s gelem bez sféroidů) odečtena od každé hodnoty naměřené fluorescence. Následně byly hodnoty fluorescence normalizovány na fluorescenci negativní kontroly a výsledky jsou vyjádřeny jako procento této negativní kontroly. Nakonec byly sloučeny dohromady nezávislá opakování a byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka (n = 3).

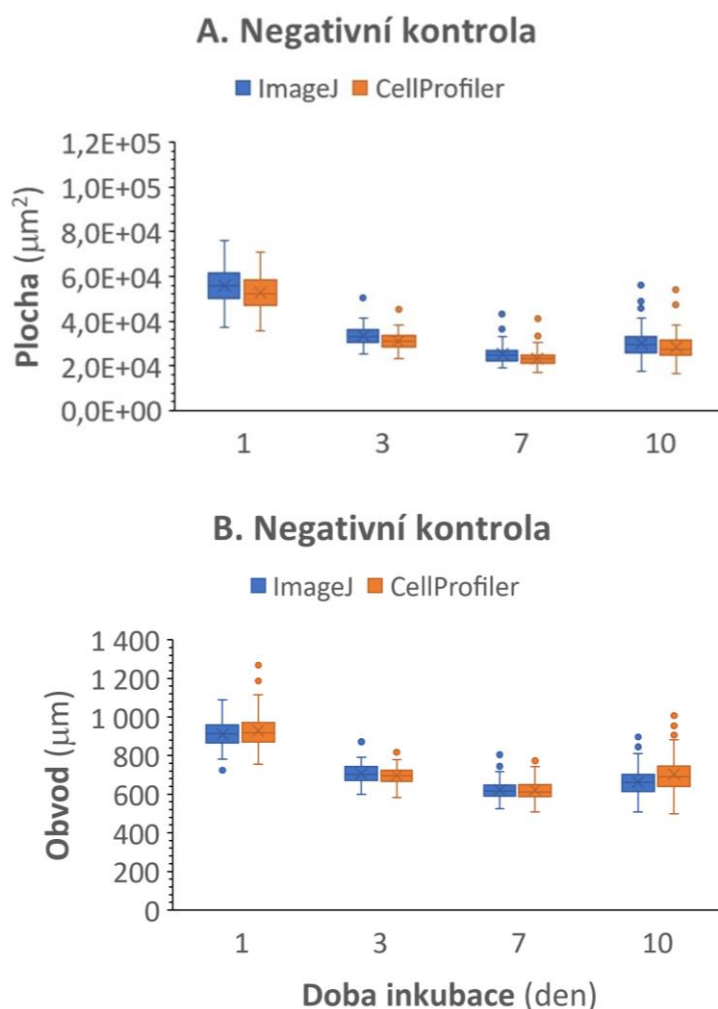
5 VÝSLEDKY

5.1 Optimalizace analýzy sféroidů

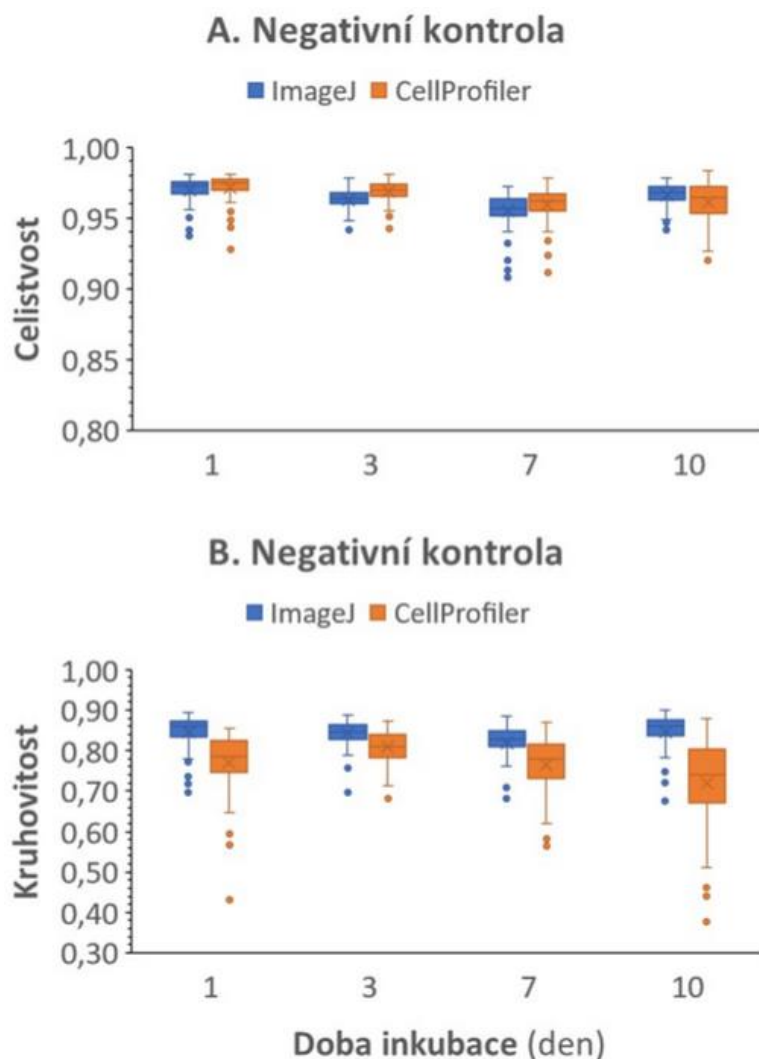
Pro analýzu všech snímků sféroidů a sledování jejich změn v průběhu jednotlivých experimentů jsem původně využívala makro vytvořené v programu ImageJ/Fiji umožňující automatickou analýzu obrazu (NIH, USA; Basu et al. 2020). Avšak nedávno jsem dostala příležitost vyzkoušet nový nástroj jménem CellProfiler (Stirling et al. 2021), který sliboval urychlení a zjednodušení zpracování dat. Rozhodla jsem se porovnat tento nový program s dosavadním makrem v ImageJ a otestovat jeho efektivitu, praktičnost a rychlost.

Porovnání obou programů jsem provedla na snímcích zachycujících tvorbu a zrání sféroidů kultivovaných v běžném kultivačním médiu během 10 dnů. V obou programech jsem pro každý sféroid získala údaje o jeho ploše a obvodu, které odrážely jeho velikost, a o celistvosti a kruhovitosti, které charakterizovaly jeho tvar. Po zpracování a převedení všech těchto parametrů pro jednotlivé dny inkubace do grafů jsem pečlivě porovnávala výsledky. Velikost sféroidů se v zásadě lišila jen minimálně (Obrázek 12), nicméně při analýze tvaru sféroidů se projevil významný rozdíl, zejména v programu CellProfiler, kde variabilita parametrů, zejména kruhovitosti, byla větší (Obrázek 13).

Po zvážení všech kladů a záporů jsem i nadále používala makro v programu ImageJ/Fiji. I když CellProfiler do určité míry urychloval a usnadňoval práci, tak pro rutinní používání by byla potřeba nejprve vyřešit jeho nepřesnost a variabilitu při určování tvarů sféroidů. Jelikož jsem s programem ImageJ/Fiji pracovala delší dobu a postupy při vyhodnocování snímků jsem měla již zautomatizované, tak výhoda rychlejšího hodnocení v programu CellProfiler nebyla tak výrazná. Nelze ale vyloučit, že by se CellProfiler v budoucnu stal užitečným nástrojem pro efektivnější a snazší vyhodnocování mikroskopických snímků sféroidů, kdyby se vyřešily zjištěné nedostatky.



Obrázek 12: Porovnání funkčnosti maker vytvořených v programech ImageJ/Fiji a CellProfiler pro sledování velikosti sféroidů Leydigových TM3 buněk kultivovaných v běžném kultivačním médiu. Velikost je vyjádřena plochou (µm²; A.) a obvodem (µm; B.) a byla monitorována v průběhu 1., 3., 7. a 10. dne inkubace sféroidů. Krabicový graf znázorňuje rozdělení dat do kvartilů (25%, 50%, 75% kvartil), zvýrazňuje průměr (křížek), a ukazuje minimum a maximum i odlehlé hodnoty. Celkově bylo hodnoceno 70 sféroidů pro každý den inkubace (Zdroj: autor).



Obrázek 13: Porovnání funkčnosti maker vytvořených v programech ImageJ/Fiji a CellProfiler pro sledování tvaru sféroidů Leydigových TM3 buněk kultivovaných v běžném kultivačním médiu. Tvar je vyjádřen celistvostí (A.) a kruhovitostí (B.) a byl monitorován v průběhu 1., 3., 7. a 10. dne inkubace sféroidů. Krabicový graf znázorňuje rozdělení dat do kvartilů (25%, 50%, 75% kvartil), zvýrazňuje průměr (křížek), a ukazuje minimum a maximum i odlehlé hodnoty. Celkově bylo hodnoceno 70 sféroidů pro každý den inkubace (Zdroj: autor).

5.2 Optimalizace složení kultivačního média

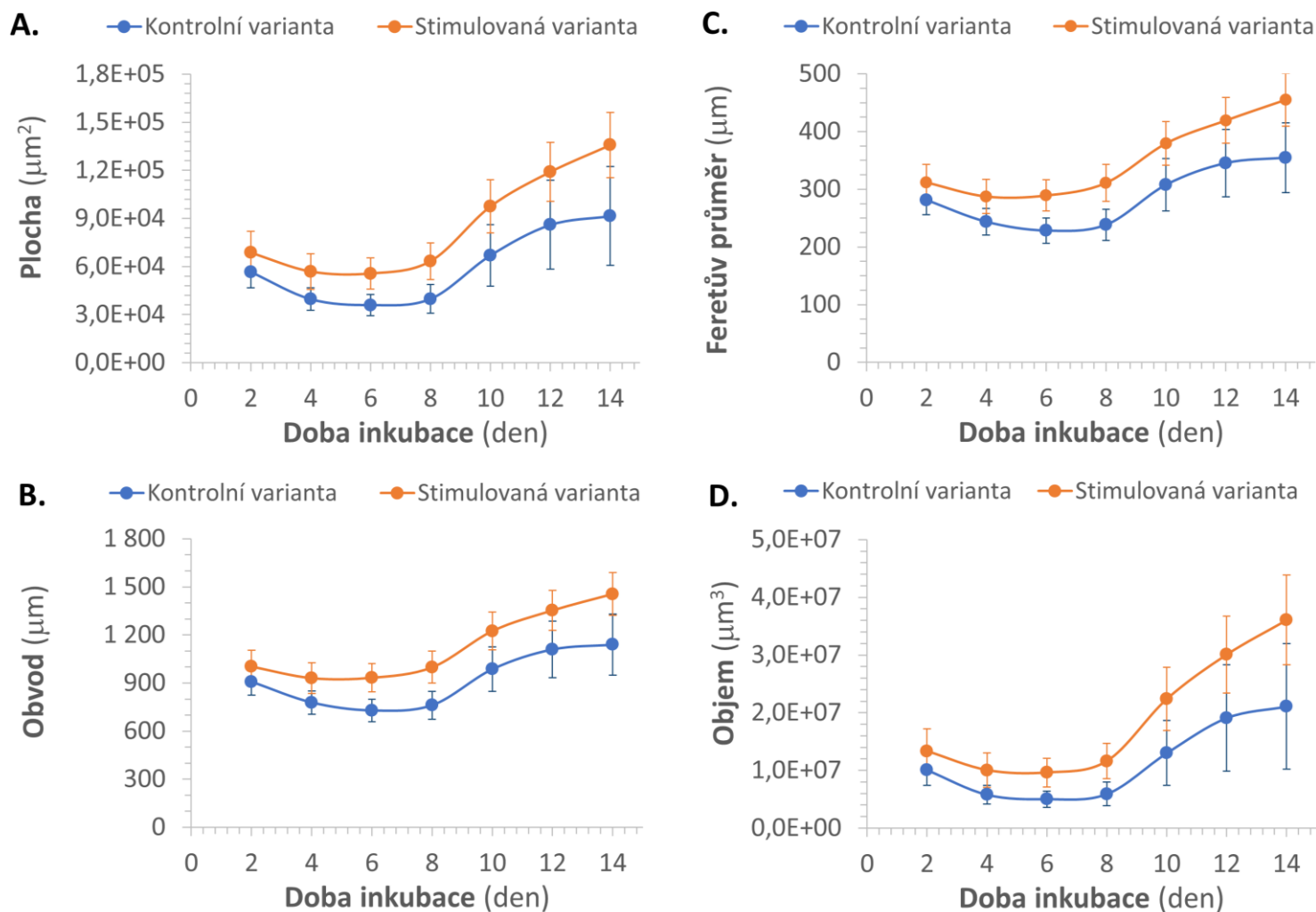
Aby *in vitro* modely co nejlépe odrážely příslušné buňky, tkáně, orgány či dokonce soustavy orgánů, které napodobují, je potřeba zvolit co neoptimálnější kultivační podmínky. Jednou z nich je volba ideálního složení kultivačního média, ve kterém jsou sféroidy dlouhodobě životaschopné a funkčnost příslušných buněk odráží realitu. Z tohoto důvodu jsem provedla experiment, který srovnával dvě rozdílná kultivační média a hodnotil, které je pro kultivaci sféroidů Leydigových TM3 buněk vhodnější. Jednalo se o běžné kultivační médium (složení viz kapitola 4.2.1) a o stimulační médium, což je toto běžné kultivační médium obohacené o čtyři faktory – forskolin, luteinizační hormon, 20 α -hydroxycholesterol a SB431542 (složení viz kapitola 4.4.1), které měly podporovat funkčnost Leydigových buněk, tedy zvyšovat jejich steroidogenní potenciál.

Bylo připraveno celkem 6 kultivačních desek obsahujících sféroidy (hodnotila jsem 770 až 2 450 sféroidů na variantu, tedy nasadilo se 22 až 70 jamek), část sféroidů byla dále kultivována v běžném médiu a druhá část ve stimulačním médiu po dobu 14 dnů. Během jejich kultivace byla každé dva dny prováděna fotodokumentace, analyzovaly se fotografie sféroidů makrem v programu ImageJ/Fiji a porovnávaly se rozdíly v parametrech určujících tvar a velikost sféroidů. Dále se sbíralo médium pro analýzu hladin hormonů (pregnenolon, progesteron, androstenedion, testosteron, 17β-estradiol) a v jednotlivé časové body i sféroidy pro izolaci RNA a hodnocení exprese enzymů zapojených do produkce hormonů (proto bylo tolik desek). To však již nebylo součástí mé práce a tyto analýzy stále probíhají.

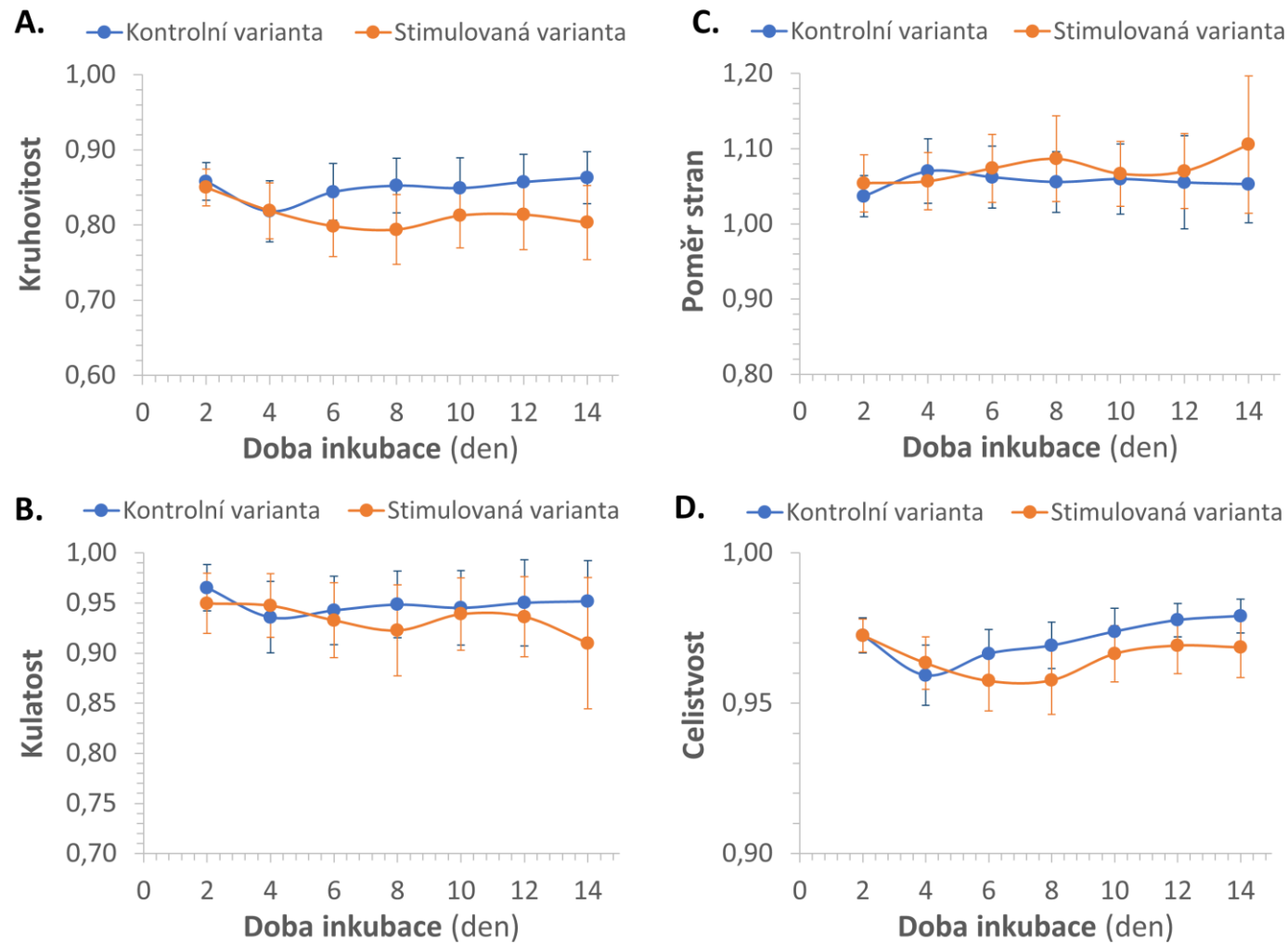
Nejprve popíšu, jak se sféroidy tvořily a prospívaly v běžném kultivačním médiu doporučeném sbírkou buněčných kultur ATCC. Během jednoho až dvou dnů se vytvořil kompaktní celistvý sféroid kulatého tvaru o průměrné ploše $56\,677\ \mu\text{m}^2$, průměrném obvodu $908\ \mu\text{m}$, průměrném Feretově průměru $282\ \mu\text{m}$ a průměrném objemu $10\,075\,573\ \mu\text{m}^3$ (Obrázky 14 a 16). Sféroidy byly téměř ideálně celistvé, kruhovitě či kulaté, jelikož hodnoty kulatosti, kruhovitosti či celistvosti se blížily hodnotě 1, podobně jako poměr stran (Obrázky 15 a 16). Během následujících šesti dnů se velikost sféroidů snižovala, což je patrné u všech parametrů charakterizujících velikost, např. objem se zmenšil $1,7\times$ (na $5\,917\,569\ \mu\text{m}^3$), ale tvar se podstatně neměnil, pouze celistvost se po propadu ve 4. dnu inkubace mírně zvětšovala. Během dalších šesti dnů se velikost opět začala zvětšovat až se definitivně ustálila na objemu kolem $20\,000\,000\ \mu\text{m}^3$, tedy asi $2\times$ větším než na začátku. Z parametrů, které popisují tvar, se měnila pouze celistvost a během posledních šesti dnů se dále mírně zvyšovala.

Při porovnání sféroidů kultivovaných v běžném a stimulačním médiu bylo hned patrné, že stimulační médium od začátku podporovalo růst a zvětšování sféroidů a na konci inkubace byly asi $1,7\times$ větší než sféroidy v běžném médiu (objem = $36\,076\,956\ \mu\text{m}^3$; Obrázky 14 a 16). Jinak ale křivky velikosti u všech sledovaných parametrů kopírovaly trend sféroidů v běžném médiu, tedy nejdříve pokles následovaný růstem, přičemž růst byl akcelerovanější.

Sféroidy se nelišily pouze velikostně, ale také tvarově. Ačkoliv se na parametrech poměr stran a kulatost změna média neprojevila, hodnoty kruhovitosti byly podstatně nižší, tedy sféroidy se mírně odchylují od ideálně kruhovitěho tvaru (Obrázky 15 a 16). Celistvost sféroidů, která popisuje jejich hladkost okrajů a kompaktnost, byla také menší, což je vidět i na fotografiích, sféroidy ve stimulačním médiu jsou viditelně členitější a méně kompaktní (Obrázek 16).



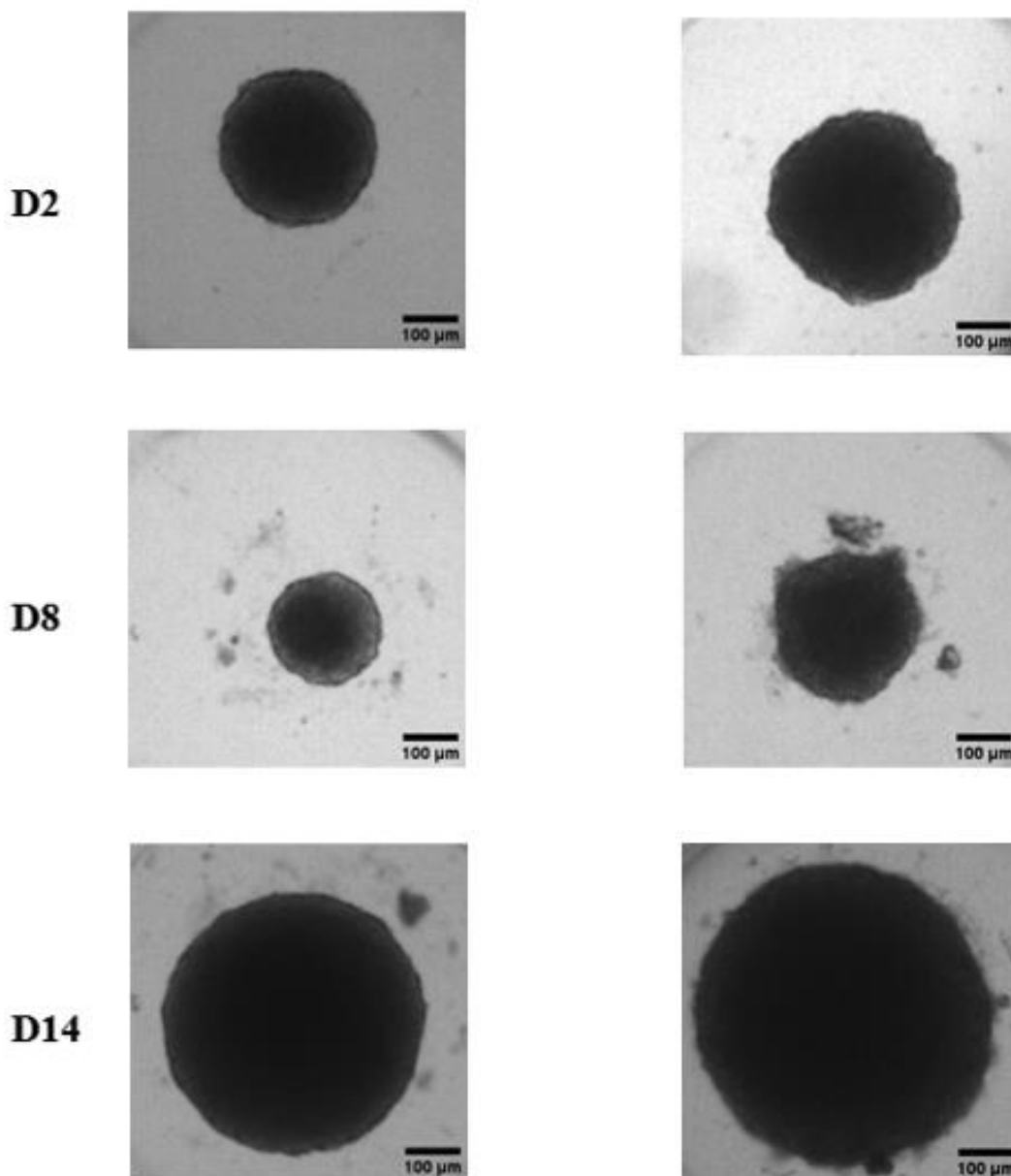
Obrázek 14: Porovnání vlivu běžného a stimulačního kultivačního média na velikost sféroidů Leydigových TM3 buněk během kultivace. Velikost sféroidů je vyjádřena plochou (μm^2 ; A.), obvodem (μm ; B.), Feretovým průměrem (μm ; C.) a objemem (μm^3 ; D.). Fotodokumentace byla prováděna 2., 4., 6., 8., 10., 12. a 14. den inkubace. Bodový graf prezentuje průměrné hodnoty parametrů pro každý inkubační den a směrodatné odchylky ($n = 770-2\ 450$ sféroidů; Zdroj: autor).



Obrázek 15: Porovnání vlivu běžného a stimulačního kultivačního média na tvar sféroidů Leydigových TM3 buněk během kultivace. Tvar sféroidů je vyjádřen kruhovitostí (A.), kulatostí (B.), poměrem stran (C.) a celistvostí (D.). Fotodokumentace byla prováděna 2., 4., 6., 8., 10., 12. a 14. den inkubace. Bodový graf prezentuje průměrné hodnoty parametrů pro každý inkubační den a směrodatné odchylky (n = 770-2 450 sféroidů; Zdroj: autor).

Obyčejné kultivační médium

Stimulační kultivační médium



Obrázek 16: Porovnání sféroidů Leydigových TM3 buněk kultivovaných v běžném a stimulačním médiu. Fotografie ukazují reprezentativní sféroidy pro zvolenou variantu a inkubační čas (2., 8. a 14. den inkubace; Zdroj. autor).

5.3 Hodnocení reprotoxicity reálných směsí PFAS

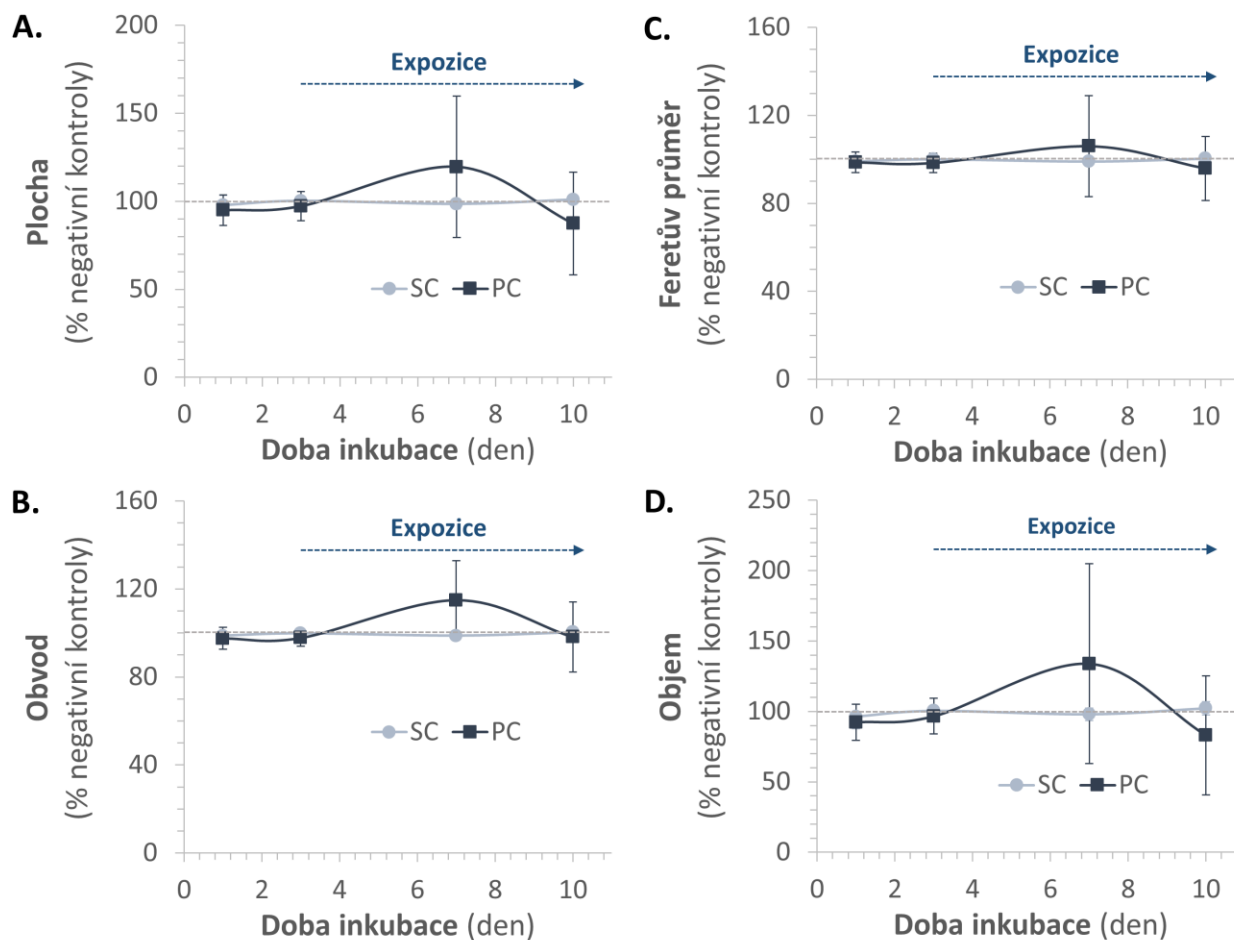
Potenciál tří směsí PFAS (PFAS-MIX1-3), které modelují reálnou distribuci PFAS v ohrožené pracovní skupině hasičů, tedy jejich pracovní expozici, byl studován v pokročilém *in vitro* modelu multicelulárních sféroidů Leydigových TM3 buněk. Jakmile se vytvořily kompaktní sféroidy (3. den inkubace), byly exponovány směsmi PFAS-MIX1-3 v běžném médiu (viz kapitola 4.2.1) v koncentracích 0,8; 4; 20 a 100 µM (viz kapitola 4.5.1) po dobu 7 dní. Na každé expoziční 24jamkové desce byly kromě studované směsi i negativní a pozitivní kontroly. Negativní kontroly zahrnovaly neexponované sféroidy (negativní kontrola; NC) a sféroidy vystavené rozpouštědlové kontrole (0,1%

DMSO; SC). Jako pozitivní kontrolu jsem zvolila vysokou koncentraci použitého rozpouštědla (10% DMSO; PC), jelikož tato koncentrace opakovaně a reprodukovatelně působila cytotoxicky na sféroidy Leydigových TM3 buněk v předchozích experimentech (Blažková 2018). Experiment byl prohlášen za validní, když negativní kontroly neměly žádný vliv na tvar, velikost a životaschopnost sféroidů a pozitivní kontrola naopak ovlivnila negativně sledované parametry. Dle prezentovaných výsledků je zřejmé, že rozpouštědlo (0,1% DMSO) neovlivnilo velikost, tvar ani životaschopnost sféroidů (Obrázky 17–19).

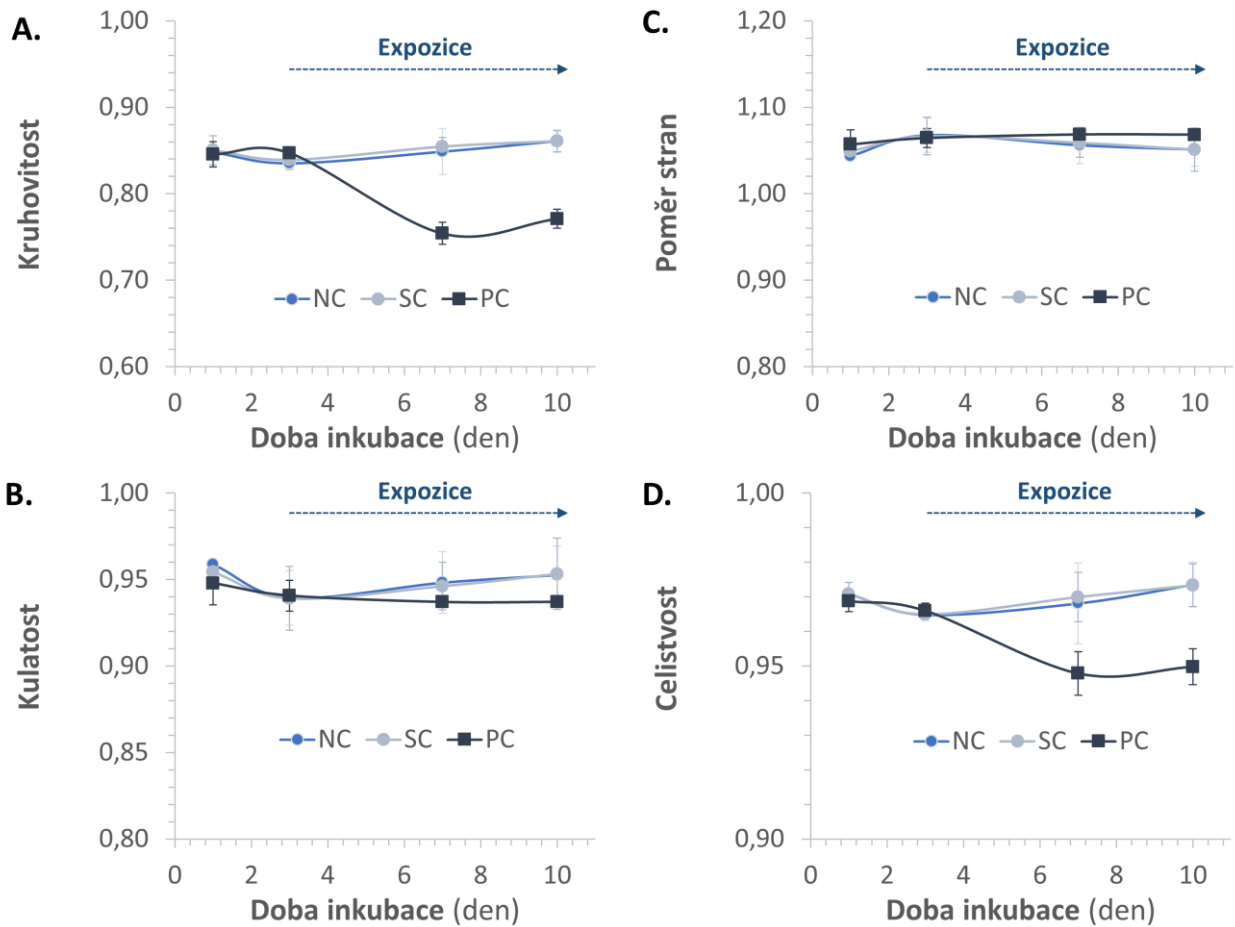
Nejdříve popíšu vliv pozitivní kontroly, 10% DMSO, na sféroidy během 7denní expozice. Tato cytotoxická látka způsobila zvětšení velikosti sféroidů Leydigových TM3 buněk oproti negativním kontrolám po 3 dnech expozice, což se prokázalo u všech parametrů popisujících velikost sféroidů (106–134% negativní kontroly) (Obrázky 17 a 20). Výsledky ale ukázaly velkou variabilitu účinku pozitivní kontroly u všech sledovaných parametrů oproti rozpouštědlové kontrole. Sféroidy vystavené pozitivní kontrole se podstatně lišily tvarem (Obrázky 18 a 20), který se odchýlil od ideálně kruhovitěho a kulatěho objektu (kruhovitost a kulatost <1). Dále se poměr stran mírně zvýšil, tzn. elipsa se prodloužila ve směru horizontálním, a celistvost byla narušena (<1), což je patrné i z reprezentativní fotografie (Obrázek 20). Po 7 dnech se velikost sféroidů exponovaných pozitivní kontrole výrazně nelišila od účinku rozpouštědlové kontroly, ale tvar byl stále narušen. Na konci expozice byla životaschopnost Leydigových TM3 sféroidů po zásahu pozitivní kontroly blízko nule (Obrázek 19A), i když sféroidy stále držely pohromadě.

Účinky směsí PFAS-MIX1-3 se od sebe nelišily, ale byly odlišné od účinku pozitivní kontroly. Sféroidy vystavené všem třem směsím PFAS mírně zvětšovaly svou velikost (až 120% objemu negativní kontroly u nejvyšší koncentrace PFAS-MIX2) ve vyšších koncentracích (20 a 100 μM) (Obrázky 20, 21–23). Variabilita byla ale větší u účinků sféroidů vystavených směsím než u rozpouštědlové kontroly. Pro finální rozhodnutí, zda směsi zvětšují velikost Leydigových TM3 sféroidů by bylo třeba zopakovat tento experiment alespoň ještě jednou nebo dvakrát (což právě probíhá) a udělat statistickou analýzu výsledků.

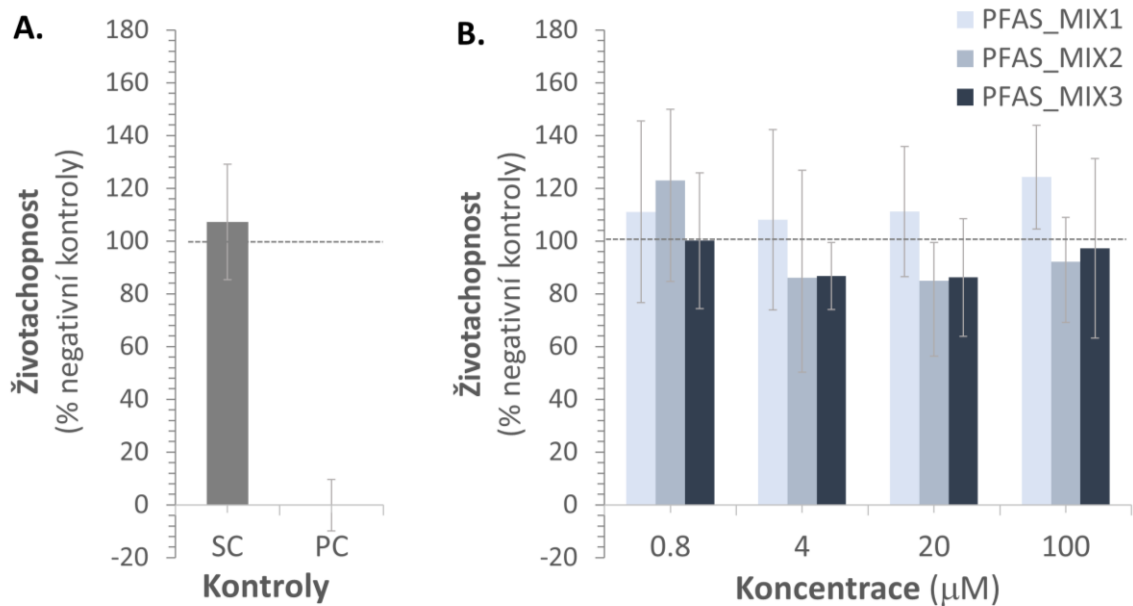
Expozice směsím měla na rozdíl od pozitivní kontroly minimální vliv na tvar sféroidů, tvar se nelišil od tvaru sféroidů v rozpouštědlové kontrole (Obrázky 20, 24–26). Sféroidy zůstaly kompaktní, celistvé a měly skoro ideální tvar kruhového sféroidu s podobnou maximální horizontální a vertikální vzdáleností. Taky nebyl zjištěn podstatný účinek studovaných směsí, na rozdíl od pozitivní kontroly, na životaschopnost buněk, i když opět se ukázala velká variabilita u směsím exponovaných sféroidů (Obrázek 19).



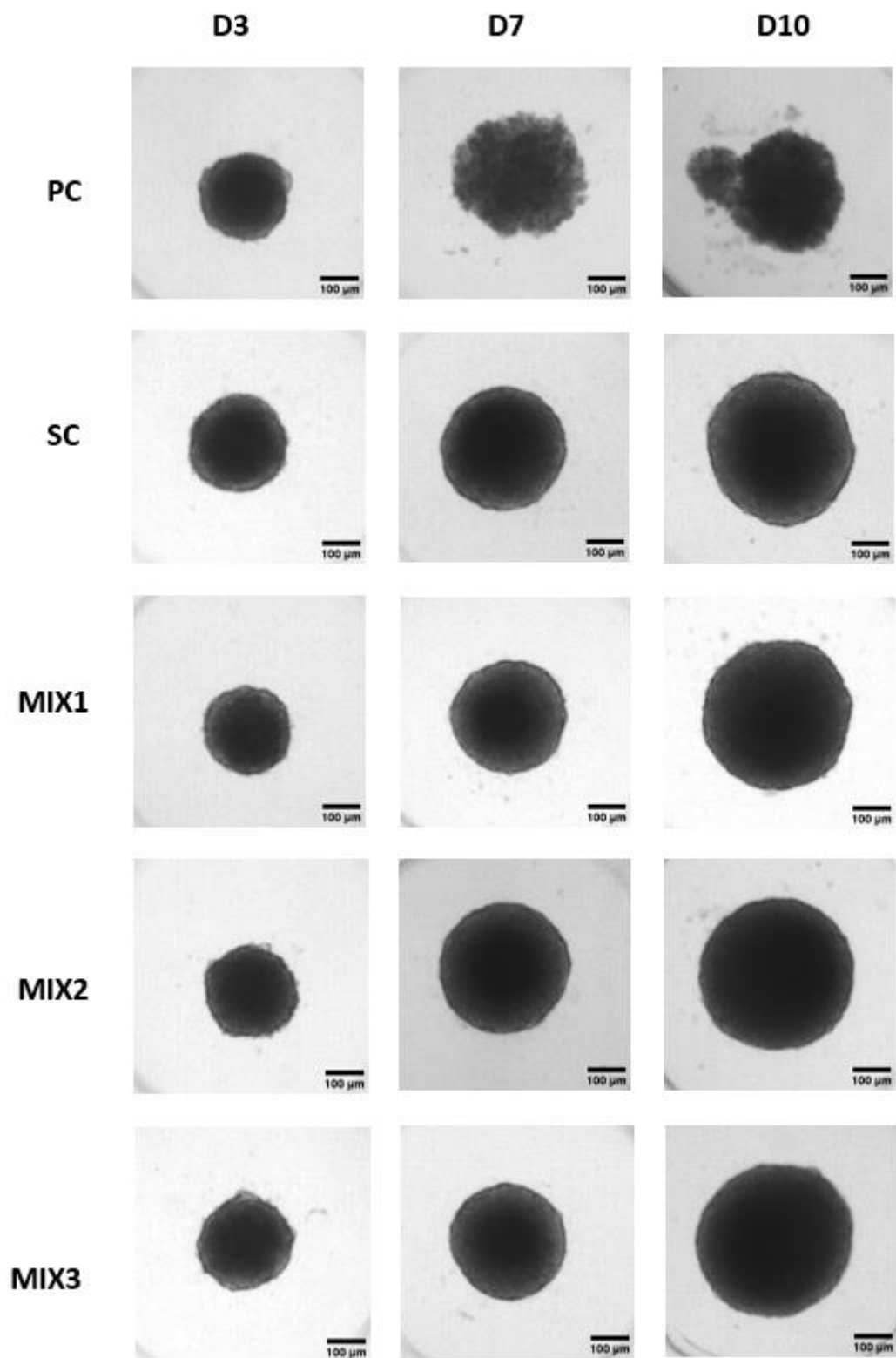
Obrázek 17: Vliv pozitivní kontroly (10% DMSO, PC) na velikost sféroidů Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici v běžném médiu. Velikost sféroidů je vyjádřena plochou (μm^2 ; **A.**), obvodem (μm ; **B.**), Feretovým průměrem (μm ; **C.**) a objemem (μm^3 ; **D.**). Parametry byly normalizovány na negativní kontrolu (neexponované sféroidy) a vyjádřeny jako % negativní kontroly. V jednotlivém experimentu bylo hodnoceno 35 nebo 70 sféroidů (1 nebo 2 jamky), experiment se opakoval třikrát nezávisle. Jednotlivá nezávislá opakování byla zprůměrována a v grafu je znázorněn jejich aritmetický průměr a směrodatné odchylky ($n = 3$). V bodovém grafu je naznačeno, kdy začala expozice (3. den inkubace). Snímky byly pořizovány 1., 3., 7. a 10. den inkubace. SC = rozpouštědlová kontrola (0,1% DMSO; Zdroj: autor).



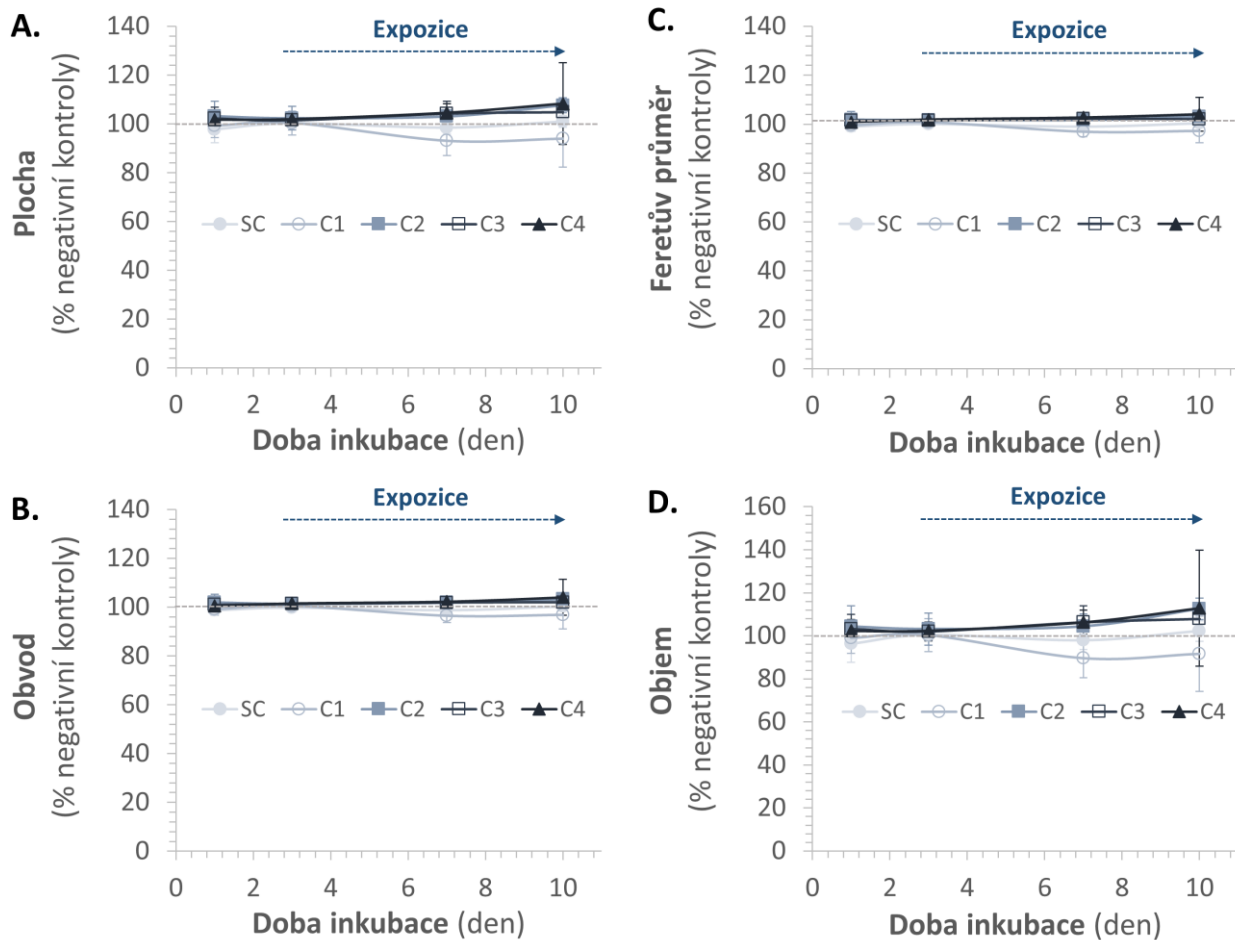
Obrázek 18: Vliv pozitivní kontroly (10% DMSO, PC) na tvar sféroidů Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici v běžném médiu. Tvar sféroidů je vyjádřen kruhovitostí (A.), kulatostí (B.), poměrem stran (C.) a celistvostí (D.). Parametry nebyly normalizovány na negativní kontrolu. V jednotlivém experimentu bylo hodnoceno 35 nebo 70 sféroidů (1 nebo 2 jamky), experiment se opakoval třikrát nezávisle. Jednotlivá nezávislá opakování byla zprůměrována a v grafu je znázorněn jejich aritmetický průměr a směrodatné odchylky (n = 3). V bodovém grafu je naznačeno, kdy začala expozice (3. den inkubace). Snímky byly pořizovány 1., 3., 7. a 10. den inkubace. SC = rozpouštědlová kontrola (0,1% DMSO; Zdroj: autor).



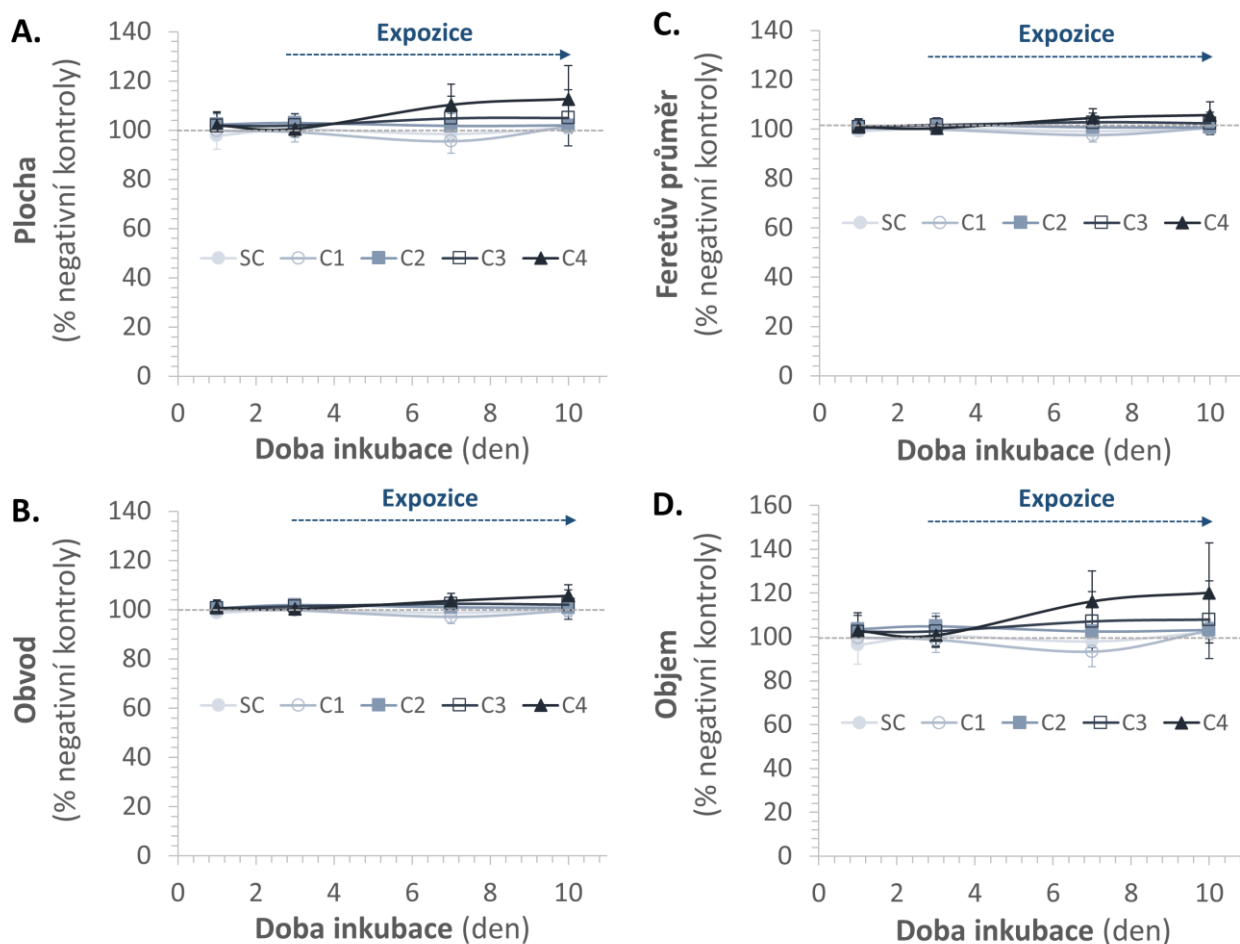
Obrázek 19: Životaschopnost Leydigových TM3 buněk po expozici pozitivní kontrole (A., 10% DMSO) a třem směsím perfluorovaných látek (PFAS-MIX1–3) (B.) hodnocena resazurinovou metodou. Hodnoty fluorescence byly normalizovány na negativní kontrolu (neexponované sféroidy) a jsou zobrazeny jako % negativní kontroly. Experiment byl opakován třikrát nezávisle. Jednotlivá opakování byla zprůměrována a v grafech je vyjádřen jejich aritmetický průměr a směrodatné odchylky (n = 3). SC = rozpouštědlová kontrola (0,1% DMSO; Zdroj: autor).



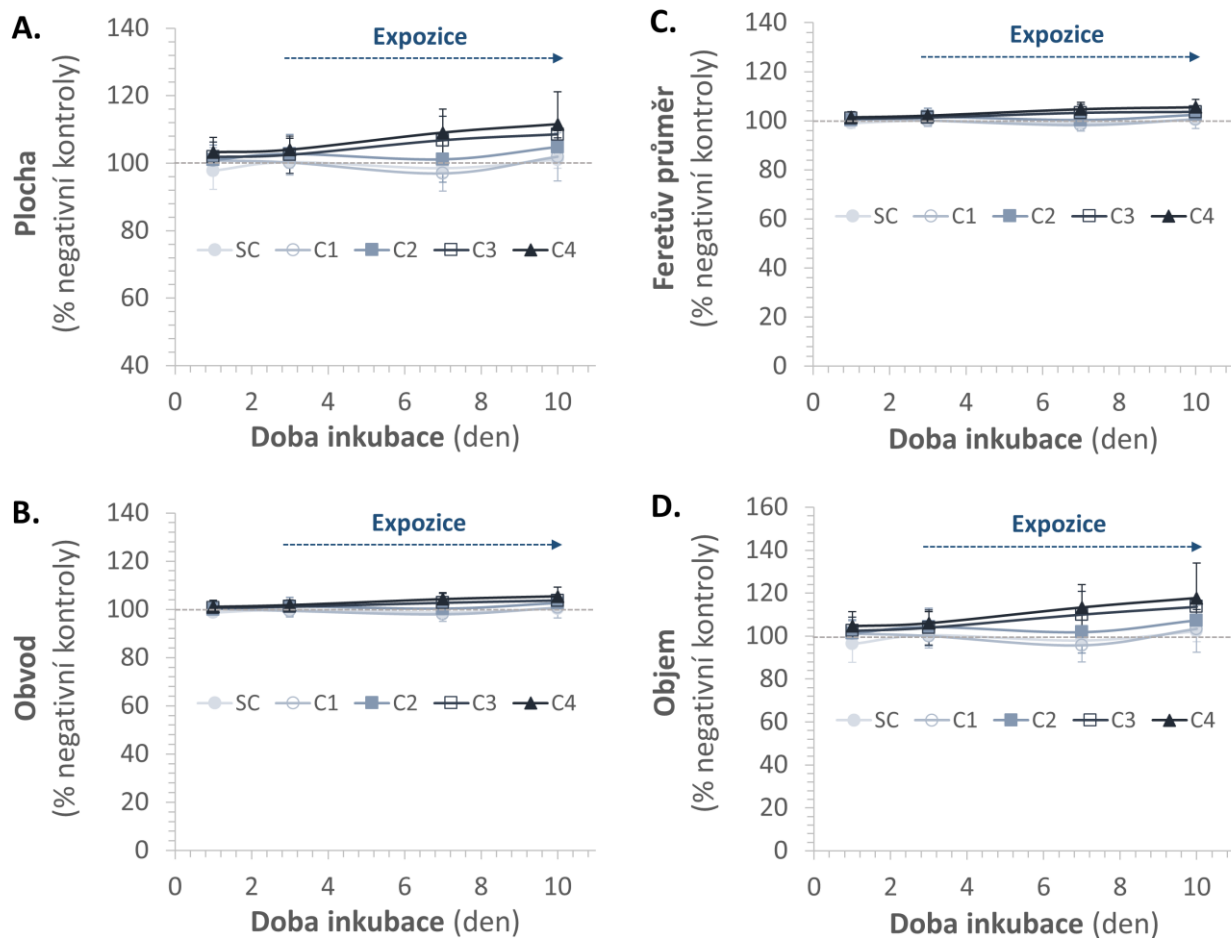
Obrázek 20: Vliv pozitivní kontroly (10% DMSO) a tří směsí poly- a perfluorovaných látek PFAS-MIX1–3 na sféroidy Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici. Sféroidy byly 3. den inkubace vystaveny rozpouštědlové kontrole (SC, 0,1% DMSO), pozitivní kontrole (PC, 10% DMSO) a 3 směsím PFAS látek (MIX1, MIX2, MIX3) v koncentraci 100 μ M. Fotografie ukazují reprezentativní sféroidy pro zvolenou variantu a inkubační čas (3., 7. a 10. den inkubace sféroidů; Zdroj: autor).



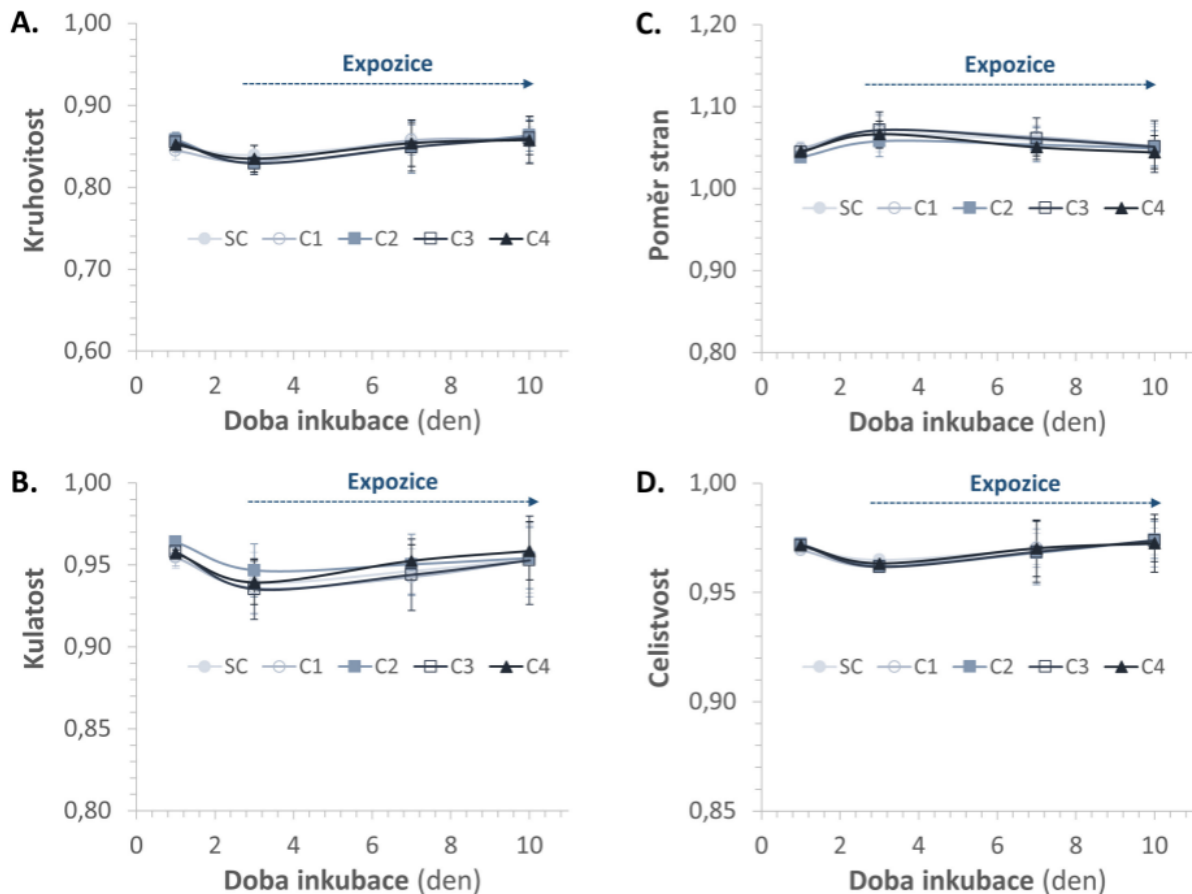
Obrázek 21: Vliv směsi perfluorovaných látek PFAS-MIX1 na velikost sféroidů Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici v běžném médiu. Koncentrace směsi: 0,8 (c1); 4 (c2); 20 (c3) a 100 (c4) μM . Velikost sféroidů je vyjádřena plochou (μm^2 ; **A.**), obvodem (μm ; **B.**), Feretovým průměrem (μm ; **C.**) a objemem (μm^3 ; **D.**). Parametry byly normalizovány na negativní kontrolu (neexponované sféroidy) a vyjádřeny jako % negativní kontroly. Pro porovnání byla vykreslena i rozpouštědlová kontrola (SC; 0,1% DMSO). V jednotlivém experimentu bylo hodnoceno 35 nebo 70 sféroidů (1 nebo 2 jamky), experiment se opakoval třikrát nezávisle. Jednotlivá nezávislá opakování byla zprůměrována a v grafu je znázorněn jejich aritmetický průměr a směrodatné odchylky ($n = 3$). V bodovém grafu je naznačeno, kdy začala expozice (3. den inkubace). Snímky byly pořizovány 1., 3., 7. a 10. den inkubace (Zdroj: autor).



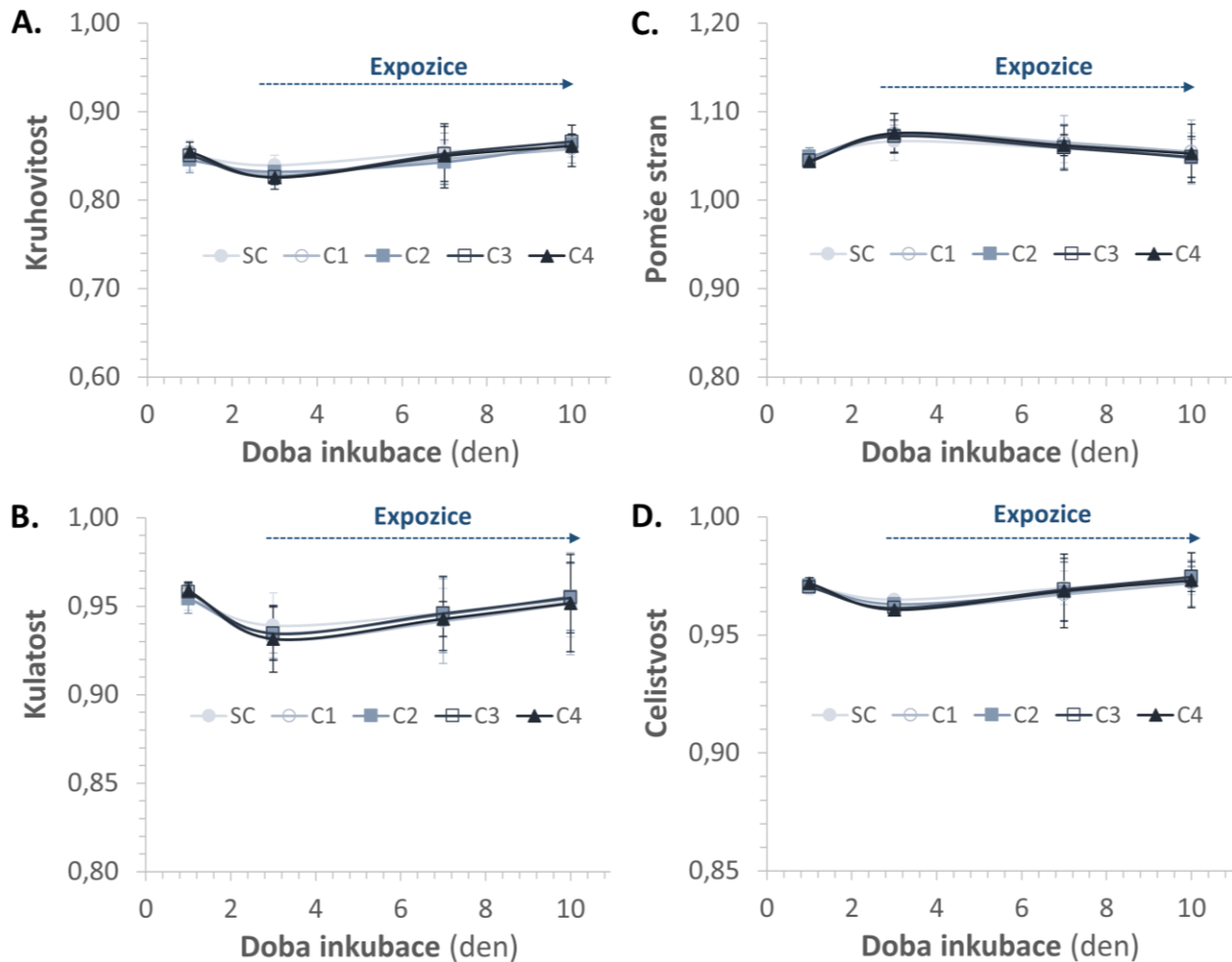
Obrázek 22: Vliv směsi perfluorovaných látek PFAS-MIX2 na velikost sféroidů Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici v běžném médiu. Koncentrace směsi: 0,8 (c1); 4 (c2); 20 (c3) a 100 (c4) μM . Velikost sféroidů je vyjádřena plochou (μm^2 ; A.), obvodem (μm ; B.), Feretovým průměrem (μm ; C.) a objemem (μm^3 ; D.). Pro porovnání byla vykreslena i rozpouštědlová kontrola (SC; 0,1% DMSO). Parametry byly normalizovány na negativní kontrolu (neexponované sféroidy) a vyjádřeny jako % negativní kontroly. V jednotlivém experimentu bylo hodnoceno 35 nebo 70 sféroidů (1 nebo 2 jamky), experiment se opakoval třikrát nezávisle. Jednotlivá nezávislá opakování byla zprůměrována a v grafu je znázorněn jejich aritmetický průměr a směrodatné odchylky ($n = 3$). V bodovém grafu je naznačeno, kdy začala expozice (3. den inkubace). Snímky byly pořizovány 1., 3., 7. a 10. den inkubace (Zdroj: autor).



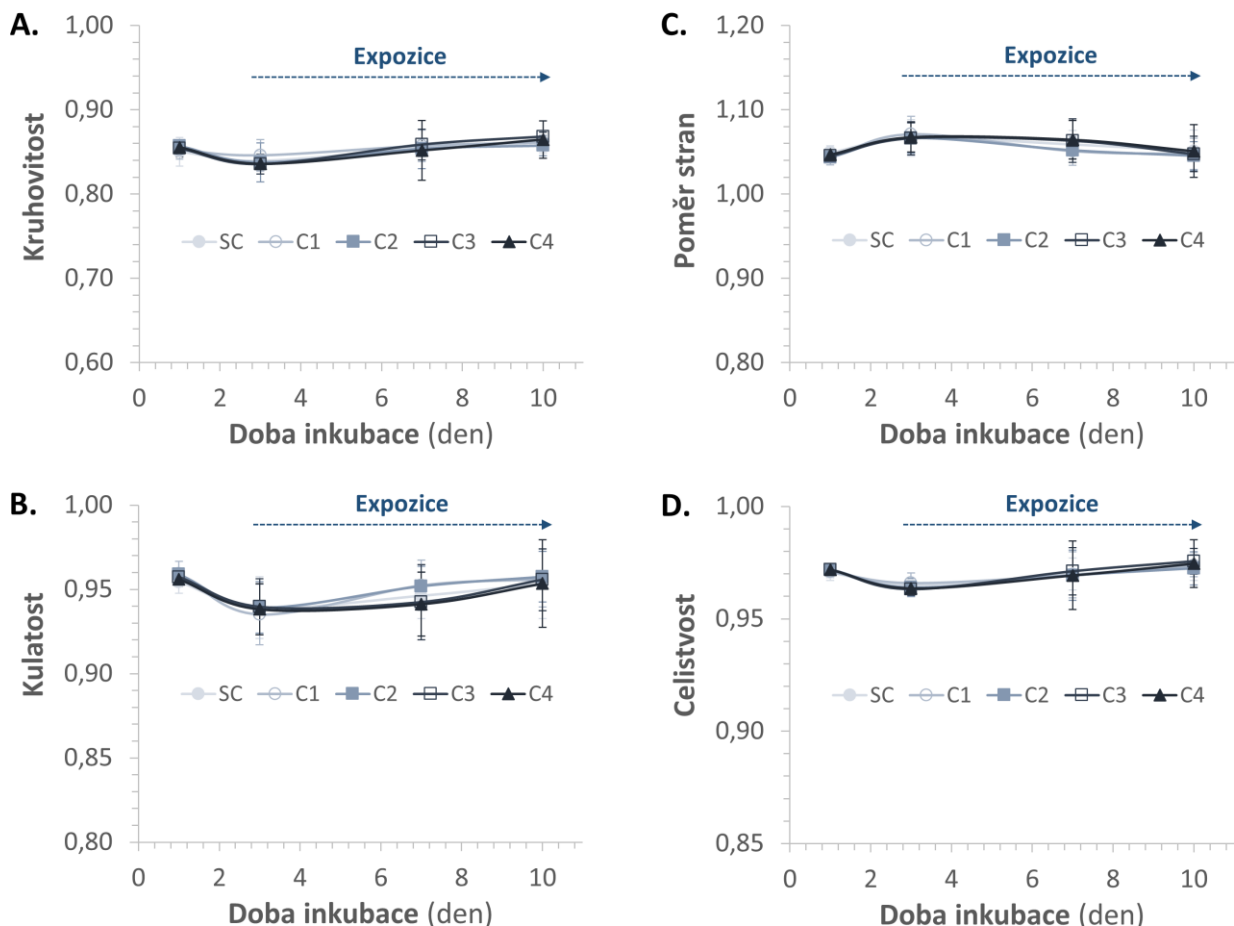
Obrázek 23: Vliv směsi perfluorovaných látek PFAS-MIX3 na velikost sféroidů Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici v běžném médiu. Koncentrace směsi: 0,8 (c1); 4 (c2); 20 (c3) a 100 (c4) μM . Velikost sféroidů je vyjádřena plochou (μm^2 ; **A.**), obvodem (μm ; **B.**), Feretovým průměrem (μm ; **C.**) a objemem (μm^3 ; **D.**). Pro porovnání byla vykreslena i rozpouštědlová kontrola (SC; 0,1% DMSO). Parametry byly normalizovány na negativní kontrolu (neexponované sféroidy) a vyjádřeny jako % negativní kontroly. V jednotlivém experimentu bylo hodnoceno 35 nebo 70 sféroidů (1 nebo 2 jamky), experiment se opakoval třikrát nezávisle. Jednotlivá nezávislá opakování byla zprůměrována a v grafu je znázorněn jejich aritmetický průměr a směrodatné odchylky ($n = 3$). V bodovém grafu je naznačeno, kdy začala expozice (3. den inkubace). Snímky byly pořizovány 1., 3., 7. a 10. den inkubace (Zdroj: autor).



Obrázek 24: Vliv směsi perfluorovaných látek PFAS-MIX1 na tvar sféroidů Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici v běžném médiu. Koncentrace směsi: 0,8 (c1); 4 (c2); 20 (c3) a 100 (c4) μM . Tvar sféroidů je vyjádřen kruhovitostí (A.), kulatostí (B.), poměrem stran (C.) a celistvostí (D.). Parametry nebyly normalizovány na negativní kontrolu. Pro porovnání byla vykreslena i rozpouštědlová kontrola (SC; 0,1% DMSO). V jednotlivém experimentu bylo hodnoceno 35 nebo 70 sféroidů (1 nebo 2 jamky), experiment se opakoval třikrát nezávisle. Jednotlivá nezávislá opakování byla zprůměrována a v grafu je znázorněn jejich aritmetický průměr a směrodatné odchylky (n = 3). V bodovém grafu je naznačeno, kdy začala expozice (3. den inkubace). Snímky byly pořizovány 1., 3., 7. a 10. den inkubace (Zdroj: autor).



Obrázek 25: Vliv směsi perfluorovaných látek PFAS-MIX2 na tvar sféroidů Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici v běžném médiu. Koncentrace směsí: 0,8 (c1); 4 (c2); 20 (c3) a 100 (c4) μM . Tvar sféroidů je vyjádřen kruhovitostí (A.), kulatostí (B.), poměrem stran (C.) a celistvostí (D.). Parametry nebyly normalizovány na negativní kontrolu. Pro porovnání byla vykreslena i rozpouštědlová kontrola (SC; 0,1% DMSO). V jednotlivém experimentu bylo hodnoceno 35 nebo 70 sféroidů (1 nebo 2 jamky), experiment se opakoval třikrát nezávisle. Jednotlivá nezávislá opakování byla zprůměrována a v grafu je znázorněn jejich aritmetický průměr a směrodatné odchylky ($n = 3$). V bodovém grafu je naznačeno, kdy začala expozice (3. den inkubace). Snímky byly pořizovány 1., 3., 7. a 10. den inkubace (Zdroj: autor).



Obrázek 26: Vliv směsi perfluorovaných látek PFAS-MIX3 na tvar sféroidů Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici v běžném médiu. Koncentrace směsi: 0,8 (c1); 4 (c2); 20 (c3) a 100 (c4) μM . Tvar sféroidů je vyjádřen kruhovitostí (A.), kulatostí (B.), poměrem stran (C.) a celistvostí (D.). Parametry nebyly normalizovány na negativní kontrolu. Pro porovnání byla vykreslena i rozpouštědlová kontrola (SC; 0,1% DMSO). V jednotlivém experimentu bylo hodnoceno 35 nebo 70 sféroidů (1 nebo 2 jamky), experiment se opakovat třikrát nezávisle. Jednotlivá nezávislá opakování byla zprůměrována a v grafu je znázorněn jejich aritmetický průměr a směrodatné odchylky ($n = 3$). V bodovém grafu je naznačena, kdy začala expozice (3. den inkubace). Snímky byly pořizovány 1., 3., 7. a 10. den inkubace (Zdroj: autor).

6 DISKUZE

Jak už bylo vysvětleno v teoretické části, problematika mužského reprodukčního zdraví se v poslední době stává stále častěji tématem k řešení, a to kvůli neustále se zvyšujícímu počtu infertilních jedinců, mužů s anomálií pohlavních orgánů a případů testikulárních nádorů (De Jonge a Barratt 2019). Všechny tyto negativní změny jsou ovlivněny a podníceny různými faktory. Může se jednat o nezdravý životní styl jedince (Rehman et al. 2018), anebo o expozici chemickým látkám, zejména endokrinním disruptorům, které jsou prakticky všude kolem nás (Sharma et al. 2020). Konkrétními látkami, které způsobují řadu zdravotních problémů (Panieri et al. 2022), a kterými se v práci přímo zabývám, jsou PFAS, tedy přesněji jejich reálnými směsmi.

PFAS (Obrázek 11) představují širokou skupinu více než 3 000 různých sloučenin (Tarapore a Ouyang 2021), které jsou hojně využívány ve spotřebních a průmyslových produktech. Například PFOA byla v minulosti využívána pro povrchovou úpravu textilu, k výrobě teflonu nebo čisticích prostředků (Sharma et al. 2020). Postupem času se začaly objevovat informace o škodlivosti těchto látek, což vedlo k jejich omezování. První PFAS, které se to týkalo, byl PFOS, jehož používání bylo široce zakázáno v EU od roku 2006, v roce 2020 následovala PFOA. V minulém roce (2023) se dokonce objevil návrh Evropské agentury pro chemické látky (ECHA) na zákaz výroby, používání a uvádění na trh (včetně dovozu) celé skupiny PFAS (BfR 2023). I když tyto látky již nebudou vyráběny, používány ani dováženy, jejich stabilita a nedegradovatelnost (Panieri et al. 2022) znamenají, že se s jejich negativními účinky budeme potýkat ještě dlouho, ne nadarmo se jim totiž říká věčné chemikálie („PFAS – the Forever Chemicals“) (Kwiatkowski et al. 2020).

PFOS a PFOA patří mezi nejvíce zkoumané PFAS, včetně jejich vlivu na mužské reprodukční zdraví, jak jsem shrnula ve své teoretické části. Obě tyto látky jsou spolu s dalšími PFAS součástí hasicích pěn, které používají hasiči nebo vojáci letectva během zásahu při hašení (Panieri et al. 2022). Tito uživatelé jsou kvůli častému používání hasicích pěn opakovaně vystavováni negativnímu působení PFAS v daleko vyšších koncentracích, než běžná populace, což může vyústit k poškození jejich zdraví, včetně reprodukčního systému. Několik studií s hasiči došlo k podobnému závěru (Mazumder et al. 2023), jak hasiči, tak vojáci letectva patří oproti běžné populaci do skupiny pracovníků se zvýšeným rizikem vzniku nádorů, včetně těch týkajících se mužského reprodukčního systému. Kvůli časté a opakované expozici jsou hasiči ideální skupinou, u které by se dala analyzovat reprotoxicita těchto nebezpečných látek a jejich výzkum by se mohl posunout na vyšší úroveň. Epidemiologické studie však nabízejí pouze potenciální spojitost mezi látkou v prostředí a negativními zdravotními důsledky. Pro potvrzení této spojitosti je nezbytné provést experimentální pokusy a hodnotit její nebezpečnost a spojená rizika.

Hodnocení nebezpečnosti a rizik spojených s toxicitou látek je většinou prováděno na jednotlivých látkách, což však nereprezentuje skutečné podmínky expozice člověka. Realita spočívá v tom, že lidé jsou vystaveni směsím s různorodým složením a koncentracemi látek. Z tohoto důvodu by mělo hodnocení směsí látek získat prioritu, aby výzkum odpovídal skutečným podmínkám v životním prostředí (Rotter et al. 2018). Abych se této skutečnosti dokázala co nejvíce přiblížit, hodnotila jsem

reálné směsi PFAS a zároveň jsem tak co nejvěrněji napodobila opravdovou pracovní expozici hasičů. Hodnocení bylo zaměřeno na reprodukční toxicitu těchto směsí.

Tradičně se pro hodnocení vlivu látek na mužské reprodukční zdraví pro vědecké, biomedicínské nebo regulační účely využívají zvířecí modely (Saldutti et al. 2013). Ty však mají několik podstatných omezení, včetně etických aspektů, nízké propustnosti, vysokých nákladů, časové náročnosti a omezené vypovídací hodnoty pro lidské zdraví. Například až 30 % léků selhává kvůli výrazným škodlivým vedlejším účinkům, včetně reprotoxicity. Toto jasně ukazuje, že preklinické testování nových léčiv založené převážně na testech na zvířatech je nedostatečné (Sun et al. 2022). Proto se úsilí zaměřuje na vývoj a zdokonalování alternativních metod testování, které jsou dostupnější, etičtější a schopné otestovat daleko více látek, přičemž poskytují relevantnější výsledky pro lidské zdraví. Jeden z takových modelů jsem si vybrala, snažila jsem se jej zdokonalit a aplikovala jej k hodnocení testikulární toxicity modelovaných reálných směsí PFAS. V rámci mé práce jsem zvolila hodnocení reprotoxicity reálných směsí látek na modelu, který je alternativou ke standardním testům na zvířatech, abych co nejlépe reflektovala aktuální trendy v oboru a přispěla alespoň částečně k posunutí této problematiky vpřed.

Pro svou praktickou část jsem využila *in vitro* model mnohobuněčných sféroidů vytvořený z myších Leydigových TM3 buněk, neboť lidská varianta buněčné linie Leydigových buněk bohužel zatím není dostupná. Leydigovy TM3 buňky byly izolovány z varlat nedospělých myší, představují tak nezralý typ Leydigových buněk (Sychrová et al. 2022). Volba nezralých prepubertálních Leydigových buněk bývá často záměrná, neboť jedinci, kteří nedosáhli úplného vývoje, včetně pohlavní a sexuální zralosti, jsou mnohem citlivější na působení chemických látek (Grandjean et al. 2017). Tímto výběrem tak testujeme nejhorší možný scénář působení PFAS. Tento typ buněk má rovněž potenciál vyvíjet se k zralejším Leydigovým buňkám a zvyšovat svůj steroidogenní potenciál, zejména v 3D prostředí (Sychrová et al. 2022). Optimalizace složení kultivačního média a automatizace fáze hodnocení velikosti a tvaru sféroidů byly provedeny s cílem vytvořit ideální kultivační a monitorovací podmínky pro hodnocení reprotoxického potenciálu směsí látek.

Analýza obrazu je využitelná v širokém spektru oborů, zahrnující i toxikologii (Li a Xia 2019). Pro snadné, objektivní a rychlé vyhodnocení pořízeného snímku je klíčové automatizovat tuto analýzu obrazu. Při srovnání dvou automatických nástrojů vytvořených v programu ImageJ/Fiji (NIH, USA; Basu et al. 2020) nebo CellProfiler (Stirling et al. 2021) bylo hlavním cílem zjistit, který by byl pro monitorování velikostí a tvarů sféroidů Leydigových TM3 buněk vhodnější. Z mého porovnání jedné sady mikrofotografií sféroidů analyzovaných v jednom nebo druhém programu jsem zjistila, že velikost byla naměřena podobně v obou případech, avšak tvar byl v programu CellProfiler velmi variabilní a nesouhlasil úplně s tvarem na fotografiích, což nevyvážilo ani rychlejší provedení analýzy v tomto programu. Jelikož se jedná o otevřené makro, dochází v současné době k vylepšení jeho nastavení, aby bylo možné ho následně efektivněji využívat. Jedna z možností, jak lze vylepšit efektivitu CellProfileru, by mohlo být spojení s dalším volně dostupným programem Ilastic, který umožňuje interaktivní segmentaci obrazu na základě strojového učení. Pro svou následnou práci jsem však raději využila makro v programu ImageJ.

V následujícím kroku optimalizace složení média jsem porovnávala standardní kultivační médium se stimulačním kultivačním médiem, abych určila lepší prostředí pro kultivaci sféroidů a analyzovala jejich vlastnosti v obou médiích. Stimulační médium bylo obohaceno o čtyři faktory – LH, forskolin, 20 α -hydroxycholesterol a SB431542 (viz kapitola 4.4.1.), které by měly zlepšit steroidogenní potenciál sféroidů a podpořit dozrání Leydigových buněk (Yang et al. 2020). LH přes LHR spouští steroidogenezí v Leydigových buňkách (Obrázek 4). Forskolin aktivuje enzym adenylát cyklázu a signální dráhu spuštěnou přes proteinkinázu A (PKA), což aktivuje první kroky syntézy testosteronu, podobně jako LH (Obrázek 4). 20 α -hydroxycholesterol je steroid, který slouží jako substrát pro produkci hormonů. SB431542 je selektivní inhibitor dráhy TGF- β /Activin/NODAL, která potlačuje expresi steroidogenních genů aktivovaných zvýšenou hladinou cAMP, spuštěnou právě LH a forskolinem. Nejprve jsem se zaměřila na vliv složení média na velikost a tvar sféroidů. Hodnocení steroidogenního potenciálu sféroidů probíhá právě nyní a není tak součástí této práce.

Model sféroidů Leydigových TM3 buněk byl již opakovaně využíván k hodnocení reprotoxicity látek (Sychrová et al. 2022; Blažková 2018). Pro kultivaci bylo v obou případech použito standardní médium doporučené ATCC. Podobně jako v mém případě byly pozorovány změny, zejména ve velikosti a v menší míře ve tvaru, v závislosti na čase. Během prvních tří dnů kultivace vznikly kompaktní kruhové sféroidy, jejich velikost se zmenšovala a jejich tvar se stabilizoval a s časem se už podstatně neměnil. Velikost i tvar byly na začátku srovnatelné s předchozími studii (Sychrová et al. 2022; Blažková 2018). Velikost klesala ještě několik dní, ale poté začala opět stoupat a ke konci kultivace překročila původní hodnoty. Tento nárůst velikosti nebyl v předchozích studiích pozorován při použití kompletního média v takovém rozsahu. Podobný trend však byl zjištěn při použití média s nižším obsahem hormonů (Blažková 2018). Rozdíl tedy lze vysvětlit tím, že následný růst je závislý na množství hormonů v médiu, které je dáno složením séra a liší se dle výrobce i mezi várkami těchto sér.

Ve stimulačním médiu sféroidy kopírovaly křivku růstu v běžném médiu, ale růst v něm byl akcelerován. Sféroidy se v tomto médiu ale také lišily tvarově. Odchýlily se od ideálně kruhovitěho tvaru a byly méně celistvé a viditelně členitější. Toto zjištění dokazuje, že složení kultivačního média a jeho kontrola jsou velice důležité. Ovšem v médiích obsahujících chemicky nedefinované složky, jako je sérum, je to velice těžké. Proto se začínají objevovat chemicky definovaná bezsérová média (Valk et al. 2018) jejichž používání povede ke zdokonalování modelu myších Leydigových TM3 buněk.

Po srovnání účinků obou médií na růst a vývoj sféroidů nelze jednoznačně určit, které médium je pro jejich kultivaci vhodnější. Obyčejné kultivační médium sice nepodporovalo růst sféroidů tolik jako stimulační médium, nicméně oproti tomuto médiu nijak zásadně neovlivňovalo a nerozrušovalo kompaktní tvar sféroidů. K definitivnímu výběru a upřednostnění jednoho z médií je třeba nejdříve porovnat hladinu hormonů v médiu a přítomnost charakteristických znaků Leydigových buněk. Proto jsem pro hodnocení reprotoxicity reálných směsí PFAS raději kultivovala sféroidy v běžném kultivačním médiu.

V praktické části mé práce jsem pracovala s reálnými směsmi PFAS, které byly modelovány podle výskytu a distribuce PFAS v seminální plazmě hasičů po zásahu, tedy po pracovní expozici hasičí pění obsahující PFAS. Složení směsí PFAS, se kterými jsem pracovala, bylo podobné skutečné situaci ve vzorcích seminální plazmy a odráželo jejich distribuci u jednotlivých hasičů. U hasičů bylo identifikováno 7 PFAS (Obrázek 11) s největší koncentrací zjištěnou pro PFOA a PFOS. Ve své práci jsem zkoumala působení tří různých směsí 7 PFAS látek, které se lišily nejvíce právě koncentrací PFOA a PFOS (viz kapitola 4.5.1.). Expozice těmto směsím probíhala na multicekulárních sféroidech Leydigových TM3 buňkách po dobu 7 dnů.

I přes odlišné složení PFAS byl jejich vliv na sféroidy Leydigových buněk téměř identický. Žádná ze směsí PFAS látek neměla vliv na tvar sféroidů, který zůstával ideálně kulatý, celistvý a sféroidy si zachovávaly svou kompaktnost. Žádné výrazné změny nebyly pozorovány ani při hodnocení životaschopnosti. Jediný vliv měly směsi na velikost sféroidů, kterou zvětšovaly. Ovšem tento účinek byl hodně variabilní a je nezbytné ho ještě ověřit v následných opakováních a statisticky vyhodnotit. Pro komplexní pochopení vlivu směsí na Leydigovy buňky je nutné zahrnout i další parametry, jako je vliv na produkci hormonů a expresi charakteristických znaků Leydigových buněk. Zatím lze vyloučit pouze přímý cytotoxický účinek směsí PFAS na sféroidy, což je v kontrastu s účinkem použité pozitivní kontroly.

Z další studie vyplývá, že jednotlivé PFAS mohou inhibovat testikulární steroidogenezi, konkrétně produkci progesteronu (Zhao et al. 2017). V tomto případě byl použit 2D model linie Leydigových buněk mLTC-1. Relativní rychlost inhibice progesteronu způsobená různými PFAS byla lineárně spojena s jejich délkou uhlovodíkového řetězce, jejich mírou celkové polarizability molu látky (molární refraktivitou) a také s jejich cytotoxickým účinkem. Z PFAS, které byly obsaženy ve studovaných směsích, byly v této studii zahrnuty – PFOA, PFOS, PFHXS a PFNA. Všechny tyto PFAS byly schopny inhibovat produkci progesteronu a současně snižovat mitochondriální membránový potenciál, přičemž obsah reaktivních kyslíkových druhů (ROS) se významně zvýšil. Účinné koncentrace způsobující 50% inhibici syntézy progesteronu byly: PFOA – 21 μM , PFOS – 42 μM , PFHXS – 450 μM a PFNA – 17 μM .

PFOA ve vyšších koncentracích (121 a 242 μM) také snížila hladinu cAMP, způsobila pokles exprese proteinu StAR a následně vedla k propadu produkce hormonů progesteronu a testosteronu ve fetální kultuře potkaních varlat *in vitro*, což opět naznačuje negativní dopad na steroidogenezi. V semenotvorných kanálcích izolovaných z dospělých potkaních varlat a kultivovaných a exponovaných *in vitro* byla naopak zjištěna pouze apoptóza zárodečných buněk. Tato studie poukázala na negativní vlivy PFOA na fetální i dospělá varlata (Eggert et al. 2019).

Z výsledků publikovaných v dostupné literatuře je tedy zřejmé, že je důležité podívat se také na jiné parametry, které by mohly reálné směsi PFAS v Leydigových buňkách ovlivňovat, předtím než bude možné posoudit, zda mají reprotoxický potenciál. Ideálně zahrnout do testování i další typy testikulárních buněk a následně je studovat i v mnohem komplexnějších *in vitro* modelech.

ZÁVĚR

V teoretické části jsem shrnula problematiku mužského reprodukčního zdraví v závislosti na působení reprotoxických látek. K hodnocení negativních efektů, které tyto látky způsobují, jsem využila nových alternativních metod a modelů, které mohou nahradit tradiční testování na zvířatech. V praktické části jsem se přímo zabývala zdokonalováním *in vitro* modelu složeného z Leydigových buněk. S využitím tohoto *in vitro* modelu a pokročilých metod vyhodnocování jsem studovala reprotoxicitu reálných směsí PFAS, které byly identifikovány v seminální plazmě hasičů. Na základě všech znalostí týkajících se této problematiky jsem navrhla řešení, která by mohla zdokonalit hodnocení (ne)bezpečnosti látek a jejich směsí. Všechny mé předem stanovené cíle byly tímto splněny.

- 1) Po srovnání dvou hodnotících programů byl nový program CellProfiler vyhodnocen jako rychlejší, ale zatím méně přesný nástroj pro proces obrazové analýzy
- 2) V mé práci jsem srovnávala účinky dvou rozdílných kultivačních médií. Ze zjištěných výsledků však zatím nelze jasně určit, které by bylo pro kultivaci sféroidů vhodnější. Sféroidy ve stimulačním médiu byly sice větší, ale mnohem členitější a méně kompaktní než v běžné variantě kultivačního média
- 3) Hodnocené směsi PFAS měly na sféroidy Leydigových buněk téměř identický účinek. Žádná ze směsí PFAS neměla vliv na tvar sféroidů a výrazné změny nebyly pozorovány ani při hodnocení životaschopnosti. Zaznamenáno bylo pouze nepatrné zvětšení rozměrů sféroidů. Vyhodnocování vlivu směsí na steroidogenní potenciál ještě probíhá.

Mé návrhy zefektivnění hodnocení (ne)bezpečnosti látek:

- 1) Jelikož kolem nás existují tisíce látek, především ve formě směsí, je nezbytné, aby hodnocení jejich (ne)bezpečnosti bylo co nejrychlejší a mohlo hodnotit velké množství látek a jejich směsí. Proto je potřeba co nejvíce automatizovat celý proces. Jako možné řešení, které by pomohlo při monitorování velikosti a tvaru sféroidů, se nabízí vylepšení a zdokonalení makra v programu CellProfiler. Tento program má potenciál být rychlejší a efektivnější při vyhodnocování snímků než v současnosti používaný program ImageJ. Je proto třeba vylepšit jeho nastavení, aby nedocházelo k nepřesnému určení tvaru *in vitro* modelů.
- 2) Složení média používaného ke kultivaci buněčných a tkáňových kultur je určující pro přesný výsledek hodnocení experimentů. Obsah séra v médiu je problematický, protože každá šarže může mít mírně odlišné hladiny hormonů a růstových faktorů. Řešením je kultivace buněčných a tkáňových kultur v bezsérovém médiu s jasně definovaným chemickým složením, které by mohlo zdokonalit model sféroidů a zlepšit jejich funkčnost. Spolu se způsobem kultivace (2D vs 3D, statická vs dynamická) a automatickým vyhodnocováním je to klíčový bod pro vývoj dokonalejších *in vitro* modelů, které mohou nahradit využívání zvířat ve vědě, ale i pro hodnocení (ne)bezpečnosti látek a jejich směsí.
- 3) Důležité je kromě jednotlivých látek hodnotit také toxicitu jejich směsí, aby tím byly lépe simulovány podmínky reálného života. Tato inovace přispěje k lepšímu porozumění a zhodnocení (ne)bezpečnosti látek a pomůže předejít možným neblahým účinkům na lidské zdraví.

POUŽITÁ LITERATURA

3R CENTRUM ČR, 2023. 3R Centrum ČR. SZÚ | *Oficiální web Státního zdravotního ústavu v Praze* [online] [vid. 2023-12-30]. Dostupné z: <https://szu.cz/odborna-centra-a-pracoviste/centrum-toxikologie-a-zdravotni-bezpecnosti/3r-centrum/>

AAT BIOQUEST, 2023. Unlocking the Potential of 3D Cell Culture: A Guide to Assay Optimization | AAT Bioquest. *AAT Bioquest* [online] [vid. 2023-12-30]. Dostupné z: <https://www.aatbio.com/resources/assaywise/2023-12-1/unlocking-the-potential-of-3d-cell-culture-a-guide-to-assay-optimization>

ABUMADIGHEM, Ali, Sholom SHUCHAT, Eitan LUNENFELD, Gilad YOSSIFON a Mahmoud HULEIHEL, 2022. Testis on a chip—a microfluidic three-dimensional culture system for the development of spermatogenesis in-vitro. *Biofabrication* [online]. **14**(3), 035004. ISSN 1758-5090. Dostupné z: doi:10.1088/1758-5090/ac6126

ADACHI, Sho, Junko SAWAKI, Narumi TOKUDA, Hiroyuki TANAKA, Hideaki SAWAI, Yasuhiro TAKESHIMA, Hiroaki SHIBAHARA a Masayuki SHIMA, 2019. Paternal occupational exposure to chemicals and secondary sex ratio: results from the Japan Environment and Children's Study. *The Lancet Planetary Health* [online]. **3**(12), e529–e538. ISSN 2542-5196. Dostupné z: doi:10.1016/S2542-5196(19)30239-6

ALADAMAT, Nameer a Prasanna TADI, 2023. Histology, Leydig Cells. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2023-12-30]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556007/>

ALSHAHRANI, S., A. -F. AHMED, A. H. GABR, M. ABALHASSAN a G. AHMAD, 2016. The impact of body mass index on semen parameters in infertile men. *Andrologia* [online]. **48**(10), 1125–1129. ISSN 1439-0272. Dostupné z: doi:10.1111/and.12549

ASARE-ANANE, H., S. B. BANNISON, Emmanuel K. OFORI, R. O. ATEKO, A. T. BAWAH, S. D. AMANQUAH, S. Y. OPPONG, B. B. N. GANDAU a J. B. ZIEM, 2016. Tobacco smoking is associated with decreased semen quality. *Reproductive Health* [online]. **13**, 90. ISSN 1742-4755. Dostupné z: doi:10.1186/s12978-016-0207-z

ATCC, 2023. Animal Cells. *ATCC* [online] [vid. 2024-01-02]. Dostupné z: [https://www.atcc.org/cell-products/animal-cells#t=productTab&numberOfResults=24&f:Tissue=\[Testis\]](https://www.atcc.org/cell-products/animal-cells#t=productTab&numberOfResults=24&f:Tissue=[Testis])

AULMANN, Walter, 2012. Assessment of reproductive toxicity under REACH. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. **63**(2), 286–290. ISSN 0273-2300. Dostupné z: doi:10.1016/j.yrtph.2012.03.003

BARDISI, Haitham El, Ahmad MAJZOUB, Mohamed ARAFA, Ahmad ALMALKI, Sami Al SAID, Kareim KHALAFALLA, Gaby JABBOUR, Moataz BASHA, Abdulla Al ANSARI a Edmund SABANEHGH, 2016. Effect of bariatric surgery on semen parameters and sex hormone concentrations: a prospective study. *Reproductive BioMedicine Online* [online]. **33**(5), 606–611. ISSN 1472-6483, 1472-6491. Dostupné z: doi:10.1016/j.rbmo.2016.08.008

BARRY, Vaughn, Andrea WINQUIST a Kyle STEENLAND, 2013. Perfluorooctanoic Acid (PFOA) Exposures and Incident Cancers among Adults Living Near a Chemical Plant. *Environmental Health*

Perspectives [online]. **121**(11–12), 1313–1318. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.1306615

BASU, Amrita, Aneta DYDOWICZOVÁ, James E. TROSKO, Luděk BLÁHA a Pavel BABICA, 2020. Ready to go 3D? A semi-automated protocol for microwell spheroid arrays to increase scalability and throughput of 3D cell culture testing. *Toxicology Mechanisms and Methods* [online]. **30**(8), 590–604. ISSN 1537-6516. Dostupné z: doi:10.1080/15376516.2020.1800881

BENEŠOVÁ, Marika, Hana HAMPLOVÁ, Kateřina KNOTOVÁ, Pavlína LEFNEROVÁ, Ivana SÁČKOVÁ a Hana SATRAPOVÁ, 2003. *Odmaturuj z biologie*. 1. vyd. Brno: ©Didaktis. ISBN 80-86285-67-7.

BENTON, Lauri, Li-Xin SHAN a Matthew P. HARDY, 1995. Differentiation of adult Leydig cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [online]. **53**(1), Hormonal Steroids, 61–68. ISSN 0960-0760. Dostupné z: doi:10.1016/0960-0760(95)00022-R

BETTS, J. Gordon, Kelly A. YOUNG, James A. WISE, Eddie JOHNSON, Brandon POE, Dean H. KRUSE, Oksana KOROL, Jody E. JOHNSON, Mark WOMBLE, Peter DESAIX, J. Gordon BETTS, Kelly A. YOUNG, James A. WISE, Eddie JOHNSON, Brandon POE, Dean H. KRUSE, Oksana KOROL, Jody E. JOHNSON, Mark WOMBLE a Peter DESAIX, 2022. 27.1 Anatomy and Physiology of the Testicular Reproductive System. *OpenStax* [online]. B.m.: OpenStax [vid. 2023-12-30]. Dostupné z: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology-2e/pages/27-1-anatomy-and-physiology-of-the-testicular-reproductive-system>

BFR, 2023. Here to stay: per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in food and in the environment - BfR. *BfR* [online] [vid. 2024-01-16]. Dostupné z: https://www.bfr.bund.de/en/here_to_stay_per_and_polyfluoroalkyl_substances_pfas_in_food_and_in_the_environment-244188.html

BLAŽKOVÁ, Eliška, 2018. *Studium testikulární toxicity pomocí in vitro modelů* [online]. B.m. [vid. 2023-12-30]. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/r64oz/>

BLYTH, Rhianna Rachael Romany, Charles N. BIRTS a Stephen A. BEERS, 2023. The role of three-dimensional in vitro models in modelling the inflammatory microenvironment associated with obesity in breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR* [online]. **25**, 104. ISSN 1465-5411. Dostupné z: doi:10.1186/s13058-023-01700-w

BRANNEN, Kimberly C., Robert E. CHAPIN, Abigail C. JACOBS a Maia L. GREEN, 2016. Alternative Models of Developmental and Reproductive Toxicity in Pharmaceutical Risk Assessment and the 3Rs. *ILAR Journal* [online]. **57**(2), 144–156. ISSN 1084-2020. Dostupné z: doi:10.1093/ilar/ilw026

CZARNYWOJTEK, A., K. JAZ, A. OCHMAŃSKA, M. ZGORZALEWICZ-STACHOWIAK, B. CZARNOCKA, N. SAWICKA-GUTAJ, P. ZIÓŁKOWSKA, I. KRELA-KAŻMIERCZAK, P. GUT, E. FLOREK a M. RUCHAŁA, 2021. The effect of endocrine disruptors on the reproductive system – current knowledge. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* [online]. **25**(15), 4930–4940. ISSN 1128-3602, 2284-0729. Dostupné z: doi:10.26355/eurrev_202108_26450

DARBRE, Philippa D., 2017. Endocrine Disruptors and Obesity. *Current Obesity Reports* [online]. **6**(1), 18–27. ISSN 2162-4968. Dostupné z: doi:10.1007/s13679-017-0240-4

DE JONGE, C. a C.I. R. BARRATT, 2019. The present crisis in male reproductive health: an urgent need for a political, social, and research roadmap. *Andrology* [online]. **7**(6), 762–768. ISSN 2047-2927. Dostupné z: doi:10.1111/andr.12673

DIAMANTI-KANDARAKIS, Evanthia, Jean-Pierre BOURGUIGNON, Linda C. GIUDICE, Russ HAUSER, Gail S. PRINS, Ana M. SOTO, R. Thomas ZOELLER a Andrea C. GORE, 2009. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews* [online]. **30**(4), 293–342. ISSN 0163-769X. Dostupné z: doi:10.1210/er.2009-0002

DÍAZ, Lorenza, Elena ZAMBRANO-GONZÁLEZ, María E. FLORES, Mariela CONTRERAS, José C. CRISPÍN, Gabriela ALEMÁN, César BRAVO, Alejandra ARMENTA-ESPINOSA, Victor J. VALDÉS, Armando TOVAR, Gerardo GAMBA, Jorge BARRIOS-PAYÁN a Norma A. BOBADILLA, 2021. Ethical Considerations in Animal Research: The Principle of 3R's. *Revista de Investigación Clínica* [online]. **73**(4) [vid. 2023-12-30]. Dostupné z: doi:10.24875/RIC.20000380

DI MARTINO, Erica, Lesley SMITH, Stephen H. BRADLEY, Scott HEMPHILL, Judy WRIGHT, Cristina RENZI, Rebecca BERGIN, Jon EMERY a Richard D. NEAL, 2022. Incidence trends for twelve cancers in younger adults—a rapid review. *British Journal of Cancer* [online]. **126**(10), 1374–1386. ISSN 1532-1827. Dostupné z: doi:10.1038/s41416-022-01704-x

DUBEUX, Victor T., Thaisa RENOVATO, Ana Clara ESTEVES, Lialyz ANDRÉ, Aylana DE OLIVEIRA a Ivan Araújo PENNA, 2016. The impact of obesity on male fecundity: a Brazilian study. *JBRA Assisted Reproduction* [online]. **20**(3), 137–141. ISSN 1517-5693. Dostupné z: doi:10.5935/1518-0557.20160031

EGGERT, Anna, Sheyla CISNEROS-MONTALVO, Sathyavathy ANANDAN, Stefania MUSILLI, Jan-Bernd STUKENBORG, Annika ADAMSSON, Mirja NURMIO a Jorma TOPPARI, 2019. The effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) on fetal and adult rat testis. *Reproductive Toxicology* [online]. **90**, 68–76. ISSN 0890-6238. Dostupné z: doi:10.1016/j.reprotox.2019.08.005

EU-OSHA, 2006. *Regulation (EC) No 1907/2006 - Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) | Safety and health at work EU-OSHA* [online]. 18. prosinec 2006. [vid. 2024-01-03]. Dostupné z: <https://osha.europa.eu/en/legislation/directives/regulation-ec-no-1907-2006-of-the-european-parliament-and-of-the-council>

FENTON, Suzanne E., Alan DUCATMAN, Alan BOOBIS, Jamie C. DEWITT, Christopher LAU, Carla NG, James S. SMITH a Stephen M. ROBERTS, 2021. Per- and Polyfluoroalkyl Substance Toxicity and Human Health Review: Current State of Knowledge and Strategies for Informing Future Research. *Environmental toxicology and chemistry* [online]. **40**(3), 606–630. ISSN 0730-7268. Dostupné z: doi:10.1002/etc.4890

FRISBEE, Stephanie J., A. Paul BROOKS, Arthur MAHER, Patsy FLENSBORG, Susan ARNOLD, Tony FLETCHER, Kyle STEENLAND, Anoop SHANKAR, Sarah S. KNOX, Cecil POLLARD, Joel A. HALVERSON, Verónica M. VIEIRA, Chuanfang JIN, Kevin M. LEYDEN a Alan M. DUCATMAN, 2009. The C8 Health Project: Design, Methods, and Participants. *Environmental Health Perspectives* [online]. **117**(12), 1873–1882. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.0800379

GARCIA-FALGUERAS, Alicia a Dick F. SWAAB, 2010. Sexual Hormones and the Brain: An Essential Alliance for Sexual Identity and Sexual Orientation. In: S. LOCHE, M. CAPPALÀ, L.

GHIZZONI, M. MAGHNIE a M.O. SAVAGE, ed. *Endocrine Development* [online]. B.m.: S. Karger AG, s. 22–35 [vid. 2024-01-02]. ISBN 978-3-8055-9302-1. Dostupné z: doi:10.1159/000262525

GRANDJEAN, Philippe, Carsten HEILMANN, Pal WEIHE, Flemming NIELSEN, Ulla B MOGENSEN, Amalie TIMMERMANN a Esben BUDTZ-JØRGENSEN, 2017. Estimated Exposures to Perfluorinated Compounds in Infancy Predict Attenuated Vaccine Antibody Concentrations at Age 5-Years. *Journal of immunotoxicology* [online]. **14**(1), 188–195. ISSN 1547-691X. Dostupné z: doi:10.1080/1547691X.2017.1360968

GUPTA, Radhika, Prashant KUMAR, Nighat FAHMI, Bhaskar GARG, Sriparna DUTTA, Shilpee SACHAR, Avtar S. MATHARU a Karani S. VIMALESWARAN, 2020. Endocrine disruption and obesity: A current review on environmental obesogens. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry* [online]. **3**, 100009. ISSN 2666-0865. Dostupné z: doi:10.1016/j.crgsc.2020.06.002

GURUNG, Purnima, Ekrem YETISKUL a Ishwarlal JIALAL, 2023. Physiology, Male Reproductive System. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2023-12-30]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538429/>

CHEN, Haolin, Ren-Shan GE a Barry R. ZIRKIN, 2009. Leydig cells: From stem cells to aging. *Molecular and cellular endocrinology* [online]. **306**(1–2), 9–16. ISSN 0303-7207. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2009.01.023

CHEN, Haolin, Erin STANLEY, Shiyong JIN a Barry R. ZIRKIN, 2010. Stem Leydig Cells: From Fetal to Aged Animals. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* [online]. **90**(4), 272–283. ISSN 1542-975X. Dostupné z: doi:10.1002/bdrc.20192

JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK, 2007. *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. 9. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc. ISBN 978-80-7182-213-4.

JENSEN, Tina Kold, Mads GOTTSCHAU, Jens Otto Broby MADSEN, Anne-Maria ANDERSSON, Tina Harmer LASSEN, Niels E SKAKKEBÆK, Shanna H SWAN, Lærke PRISKORN, Anders JUUL a Niels JØRGENSEN, 2014. Habitual alcohol consumption associated with reduced semen quality and changes in reproductive hormones; a cross-sectional study among 1221 young Danish men. *BMJ Open* [online]. **4**(9), e005462. ISSN 2044-6055. Dostupné z: doi:10.1136/bmjopen-2014-005462

KNIGHT, Jean, Thomas HARTUNG a Costanza ROVIDA, 2023. 4.2 million and counting... The animal toll for REACH systemic toxicity studies. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation* [online]. **40**(3), 389–407. ISSN 1868-8551. Dostupné z: doi:10.14573/altex.2303201

KOLATOROVA, L., M. SRAMKOVA, J. VITKU, J. VCELAK, O. LISCHKOVA, L. STARKA a M. DUSKOVA, 2018. Parabens and Their Relation to Obesity. *Physiological Research* [online]. S465–S472. ISSN 1802-9973, 0862-8408. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.934004

KOMEYA, Mitsuru, Hiroshi KIMURA, Hiroko NAKAMURA, Tetsuhiro YOKONISHI, Takuya SATO, Kazuaki KOJIMA, Kazuaki HAYASHI, Kumiko KATAGIRI, Hiroyuki YAMANAKA, Hiroyuki SANJO, Masahiro YAO, Satoshi KAMIMURA, Kimiko INOUE, Narumi OGONUKI, Atsuo OGURA, Teruo FUJII a Takehiko OGAWA, 2016. Long-term ex vivo maintenance of testis tissues producing fertile sperm in a microfluidic device. *Scientific Reports* [online]. **6**, 21472. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep21472

KUBINCOVÁ, P., J. NOVÁK a I. SOVADINOVÁ, 2016. Nový přístup při stanovení akutní systémové toxicity. *Chemické listy*. **110**(2), 118–125. ISSN 1213-7103.

KUMAR MAHAT, Roshan a Manisha ARORA, 2016. Risk Factors and Causes of Male Infertility- A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* [online]. **5**(2) [vid. 2023-12-30]. ISSN 21611009. Dostupné z: doi:10.4172/2161-1009.1000271

KWIATKOWSKI, Carol F., David Q. ANDREWS, Linda S. BIRNBAUM, Thomas A. BRUTON, Jamie C. DEWITT, Detlef R. U. KNAPPE, Maricel V. MAFFINI, Mark F. MILLER, Katherine E. PELCH, Anna READE, Anna SOEHL, Xenia TRIER, Marta VENIER, Charlotte C. WAGNER, Zhanyun WANG a Arlene BLUM, 2020. Scientific Basis for Managing PFAS as a Chemical Class. *Environmental science & technology letters* [online]. **7**(8), 532–543. ISSN 2328-8930. Dostupné z: doi:10.1021/acs.estlett.0c00255

LA MERRILL, Michele A., Laura N. VANDENBERG, Martyn T. SMITH, William GOODSON, Patience BROWNE, Heather B. PATISAUL, Kathryn Z. GUYTON, Andreas KORTENKAMP, Vincent J. COGLIANO, Tracey J. WOODRUFF, Linda RIESWIJK, Hideko SONE, Kenneth S. KORACH, Andrea C. GORE, Lauren ZEISE a R. Thomas ZOELLER, 2020. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nature Reviews. Endocrinology* [online]. **16**(1), 45–57. ISSN 1759-5029. Dostupné z: doi:10.1038/s41574-019-0273-8

LANDREH, Luise, 2014. *Identification and characterization of stem Leydig cells in the testis* [online]. Stockholm [vid. 2023-12-30]. Disertační práce. Karolinska Institutet. Dostupné z: <http://openarchive.ki.se/xmlui/handle/10616/42196>

LEUNG, Chak Ming, Pim DE HAAN, Kacey RONALDSON-BOUCHARD, Ge-Ah KIM, Jihoon KO, Hoon Suk RHO, Zhu CHEN, Pamela HABIBOVIC, Noo Li JEON, Shuichi TAKAYAMA, Michael L. SHULER, Gordana VUNJAK-NOVAKOVIC, Olivier FREY, Elisabeth VERPOORTE a Yi-Chin TOH, 2022. A guide to the organ-on-a-chip. *Nature Reviews Methods Primers* [online]. **2**(1), 1–29. ISSN 2662-8449. Dostupné z: doi:10.1038/s43586-022-00118-6

LGC, 2024. Perfluoroalkylated substances (PFAS) Reference Materials | LGC Standards. *LGC Standards* [online] [vid. 2024-01-27]. Dostupné z: <https://www.lgcstandards.com/GB/en/Food-and-Beverage-Reference-Materials/Food-contact-materials/Perfluoroalkylated-substances-PFAS-/cat/279603>

LI, Shuaizhang a Menghang XIA, 2019. Review of High-content Screening Applications in Toxicology. *Archives of toxicology* [online]. **93**(12), 3387–3396. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-019-02593-5

LI, Zhao-Hui, Jun-Dong LU, Shi-Jun LI, Hao-Lin CHEN a Zhi-Jian SU, 2022. Generation of Leydig-like cells: approaches, characterization, and challenges. *Asian Journal of Andrology* [online]. **24**(4), 335–344. ISSN 1008-682X. Dostupné z: doi:10.4103/aja202193

LYMPERI, Stefania a Aleksander GIWERCMAN, 2018. Endocrine disruptors and testicular function. *Metabolism - Clinical and Experimental* [online]. **86**, 79–90. ISSN 0026-0495, 1532-8600. Dostupné z: doi:10.1016/j.metabol.2018.03.022

MAZUMDER, Nur-Us-Shafa, Md Tanjim HOSSAIN, Fatema Tuj JAHURA, Arjunsing GIRASE, Andrew Stephen HALL, Jingtian LU a R. Bryan ORMOND, 2023. Firefighters' exposure to per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) as an occupational hazard: A review. *Frontiers in Materials*

[online]. **10** [vid. 2024-01-20]. ISSN 2296-8016. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmats.2023.1143411>

MICROTISSUES, INC., 2023. Protocols. *3D Petri Dish by Microtissues, Inc.* [online] [vid. 2024-01-09]. Dostupné z: <https://www.microtissues.com/protocols>

MINHAS, Suks, Carlo BETTOCCHI, Luca BOERI, Paolo CAPOGROSSO, Joana CARVALHO, Nusret Can CILESIZ, Andrea COCCI, Giovanni CORONA, Konstantinos DIMITROPOULOS, Murat GÜL, Georgios HATZICHRISTODOULOU, Thomas Hugh JONES, Ates KADIOGLU, Juan Ignatio MARTÍNEZ SALAMANCA, Uros MILENKOVIC, Vaibhav MODGIL, Giorgio Ivan RUSSO, Ege Can SEREFOGLU, Tharu THARAKAN, Paolo VERZE a Andrea SALONIA, 2021. European Association of Urology Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 Update on Male Infertility. *European Urology* [online]. **80**(5), 603–620. ISSN 0302-2838. Dostupné z: [doi:10.1016/j.eururo.2021.08.014](https://doi.org/10.1016/j.eururo.2021.08.014)

NOWAK, Karolina, Wioletta RATAJCZAK–WRONA, Maria GÓRSKA a Ewa JABŁOŃSKA, 2018. Parabens and their effects on the endocrine system. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. **474**, 238–251. ISSN 0303-7207. Dostupné z: [doi:10.1016/j.mce.2018.03.014](https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.03.014)

ODUWOLE, Olayiwola O., Ilpo T. HUHTANIEMI a Micheline MISRAHI, 2021. The Roles of Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone and Testosterone in Spermatogenesis and Folliculogenesis Revisited. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(23), 12735. ISSN 1422-0067. Dostupné z: [doi:10.3390/ijms222312735](https://doi.org/10.3390/ijms222312735)

PANIERI, Emiliano, Katarina BARALIC, Danijela DJUKIC-COSIC, Aleksandra BUHA DJORDJEVIC a Luciano SASO, 2022. PFAS Molecules: A Major Concern for the Human Health and the Environment. *Toxics* [online]. **10**(2), 44. ISSN 2305-6304. Dostupné z: [doi:10.3390/toxics10020044](https://doi.org/10.3390/toxics10020044)

PENDERGRAFT, Samuel S., Hooman SADRI-ARDEKANI, Anthony ATALA a Colin E. BISHOP, 2017. Three-dimensional testicular organoid: a novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity in vitro†. *Biology of Reproduction* [online]. **96**(3), 720–732. ISSN 0006-3363. Dostupné z: [doi:10.1095/biolreprod.116.143446](https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.143446)

PETERSEN, Kajsa Ugelvig, Katia Keglberg HÆRVIG, Esben Meulengracht FLACHS, Jens Peter BONDE, Christian LINDH, Karin Sørig HOUGAARD, Gunnar TOFT, Cecilia Høst RAMLAU-HANSEN a Sandra Søgaard TØTTENBORG, 2022. Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and male reproductive function in young adulthood; a cross-sectional study. *Environmental Research* [online]. **212**, 113157. ISSN 0013-9351. Dostupné z: [doi:10.1016/j.envres.2022.113157](https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113157)

PETERSEN, Kajsa Ugelvig, Josefine Rahbæk LARSEN, Laura DEEN, Esben Meulengracht FLACHS, Katia Keglberg HÆRVIG, Sidsel Dan HULL, Jens Peter Ellekilde BONDE a Sandra Søgaard TØTTENBORG, 2020. Per- and polyfluoroalkyl substances and male reproductive health: a systematic review of the epidemiological evidence. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* [online]. **23**(6), 276–291. ISSN 1093-7404. Dostupné z: [doi:10.1080/10937404.2020.1798315](https://doi.org/10.1080/10937404.2020.1798315)

PRINCE, F. P., 2001. The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comments on nomenclature. *Journal of Endocrinology* [online]. **168**(2), 213–216. ISSN 0022-0795, 1479-6805. Dostupné z: [doi:10.1677/joe.0.1680213](https://doi.org/10.1677/joe.0.1680213)

QIU, Lianglin, Xuhui ZHANG, Xiaoming ZHANG, Yudong ZHANG, Jun GU, Minjian CHEN, Zhan ZHANG, Xinru WANG a Shou-Lin WANG, 2013. Sertoli Cell Is a Potential Target for Perfluorooctane Sulfonate-Induced Reproductive Dysfunction in Male Mice. *Toxicological Sciences* [online]. **135**(1), 229–240. ISSN 1096-6080. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kft129

QU, Jian-Hua, Chun-Cheng LU, Cheng XU, Gang CHEN, Liang-Lin QIU, Jun-Kang JIANG, Shuai BEN, Yu-Bang WANG, Ai-Hua GU a Xin-Ru WANG, 2016. Perfluorooctane sulfonate-induced testicular toxicity and differential testicular expression of estrogen receptor in male mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. **45**, 150–157. ISSN 1382-6689. Dostupné z: doi:10.1016/j.etap.2016.05.025

REHMAN, Ibraheem, Gulfam AHMAD a Saad ALSHAHRANI, 2018. Lifestyle, Environment, and Male Reproductive Health. In: *Bioenvironmental Issues Affecting Men's Reproductive and Sexual Health* [online]. B.m.: Elsevier, s. 157–171 [vid. 2023-12-30]. ISBN 978-0-12-801299-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801299-4.00010-4

RODPRASERT, Wiwat, Jorma TOPPARI a Helena E. VIRTANEN, 2021. Endocrine Disrupting Chemicals and Reproductive Health in Boys and Men. *Frontiers in Endocrinology* [online]. **12**, 706532. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2021.706532

ROTTER, S., A. BERONIUS, A. R. BOOBIS, A. HANBERG, J. VAN KLAVEREN, M. LUIJTEN, K. MACHERA, D. NIKOLOPOULOU, H. VAN DER VOET, J. ZILLIACUS a R. SOLECKI, 2018. Overview on legislation and scientific approaches for risk assessment of combined exposure to multiple chemicals: the potential EuroMix contribution. *Critical Reviews in Toxicology* [online]. **48**(9), 796–814. ISSN 1040-8444. Dostupné z: doi:10.1080/10408444.2018.1541964

SAKIB, Sadman, Anna VOIGT, Taylor GOLDSMITH a Ina DOBRINSKI, 2019. Three-dimensional testicular organoids as novel in vitro models of testicular biology and toxicology. *Environmental Epigenetics* [online]. **5**(3), dvz011. ISSN 2058-5888. Dostupné z: doi:10.1093/eep/dvz011

SALDUTTI, Louise Parks, Bruce K. BEYER, William BRESLIN, Terry R. BROWN, Robert E. CHAPIN, Brian ENRIGHT, Elaine FAUSTMAN, Paul M. D. FOSTER, Thomas HARTUNG, William KELCE, James H. KIM, Elizabeth G. LOBOA, Aldert H. PIERSMA, David SEYLER, Katie J. TURNER, Henry YU, Xiaozhong YU a Jennifer C. SASAKI, 2013. In vitro testicular toxicity models: Opportunities for advancement via biomedical engineering techniques. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation* [online]. **30**(3), 353–377. ISSN 1868-8551. Dostupné z: doi:10.14573/altex.2013.3.353

SATO, Takuya, Kumiko KATAGIRI, Kazuaki KOJIMA, Mitsuru KOMEYA, Masahiro YAO a Takehiko OGAWA, 2015. In Vitro Spermatogenesis in Explanted Adult Mouse Testis Tissues. *PLoS ONE* [online]. **10**(6), e0130171. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0130171

SHARMA, Aditi, Josephine MOLLIER, Richard W. K. BROCKLESBY, Charlotte CAVES, Channa N. JAYASENA a Suks MINHAS, 2020. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Reproductive Medicine and Biology* [online]. **19**(3), 243–253. ISSN 1445-5781. Dostupné z: doi:10.1002/rmb2.12326

SHIMA, Yuichi, 2019. Development of fetal and adult Leydig cells. *Reproductive Medicine and Biology* [online]. **18**(4), 323–330. ISSN 1445-5781. Dostupné z: doi:10.1002/rmb2.12287

SKAKKEBAEK, Niels E., Ewa RAJPERT-DE MEYTS, Germaine M. BUCK LOUIS, Jorma TOPPARI, Anna-Maria ANDERSSON, Michael L. EISENBERG, Tina Kold JENSEN, Niels

JØRGENSEN, Shanna H. SWAN, Katherine J. SAPRA, Søren ZIEBE, Lærke PRISKORN a Anders JUUL, 2016. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiological Reviews* [online]. **96**(1), 55–97. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00017.2015

STIRLING, David R., Madison J. SWAIN-BOWDEN, Alice M. LUCAS, Anne E. CARPENTER, Beth A. CIMINI a Allen GOODMAN, 2021. CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability. *BMC Bioinformatics* [online]. **22**(1), 433. ISSN 1471-2105. Dostupné z: doi:10.1186/s12859-021-04344-9

SUN, Duxin, Wei GAO, Hongxiang HU a Simon ZHOU, 2022. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online]. **12**(7), 3049–3062. ISSN 2211-3835. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsb.2022.02.002

SVECHNIKOV, K., G. IZZO, L. LANDREH, J. WEISSER a O. SÖDER, 2010a. Endocrine Disruptors and Leydig Cell Function. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. **2010**, 684504. ISSN 1110-7243. Dostupné z: doi:10.1155/2010/684504

SVECHNIKOV, K., L. LANDREH, J. WEISSER, G. IZZO, E. COLÓN, I. SVECHNIKOVA a O. SÖDER, 2010b. Origin, Development and Regulation of Human Leydig Cells. *Hormone Research in Paediatrics* [online]. **73**(2), 93–101. ISSN 1663-2818. Dostupné z: doi:10.1159/000277141

SVINGEN, Terje, 2023. Reproductive Toxicology. *DTU National Food Institute* [online] [vid. 2023-12-30]. Dostupné z: <https://www.food.dtu.dk/english/topics/chemical-exposure/reproductive-toxicology>

SYCHROVÁ, Eliška, Affiefa YAWER, Petra LABOHÁ, Amrita BASU, Aneta DYDOWICZOVÁ, Ishita VIRMANI, Pavel BABICA a Iva SOVADINOVÁ, 2022. In vitro testicular toxicity of environmentally relevant endocrine-disrupting chemicals: 2D vs. 3D models of prepubertal Leydig TM3 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. **93**, 103869. ISSN 1382-6689. Dostupné z: doi:10.1016/j.etap.2022.103869

TANNENBAUM, Jerrold a B Taylor BENNETT, 2015. Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*. **54**(2), 120–132. ISSN 1559-6109.

TARAPORE, Pheruza a Bin OUYANG, 2021. Perfluoroalkyl Chemicals and Male Reproductive Health: Do PFOA and PFOS Increase Risk for Male Infertility? *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. **18**(7), 3794. ISSN 1661-7827. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph18073794

TEERDS, Katja J. a Ilpo T. HUHTANIEMI, 2015. Morphological and functional maturation of Leydig cells: from rodent models to primates. *Human Reproduction Update* [online]. **21**(3), 310–328. ISSN 1355-4786. Dostupné z: doi:10.1093/humupd/dmv008

VALK, Jan van der, Karen BIEBACK, Christiane BUTA, Brett COCHRANE, Wilhelm G. DIRKS, Jianan FU, James J. HICKMAN, Christiane HOHENSEE, Roman KOLAR, Manfred LIEBSCH, Francesca PISTOLLATO, Markus SCHULZ, Daniel THIEME, Tilo WEBER, Joachim WIEST, Stefan WINKLER a Gerhard GSTRAUNTHALER, 2018. Fetal bovine serum (FBS): Past – present – future. *ALTEX - Alternatives to animal experimentation* [online]. **35**(1), 99–118. ISSN 1868-8551. Dostupné z: doi:10.14573/altex.1705101

VESTED, Anne, Cecilia Høst RAMLAU-HANSEN, Sjurður Frodi OLSEN, Jens Peter BONDE, Susanne Lund KRISTENSEN, Thorhallur Ingi HALLDORSSON, Georg BECHER, Line Småstuen HAUG, Emil Hagen ERNST a Gunnar TOFT, 2013. Associations of in Utero Exposure to Perfluorinated Alkyl Acids with Human Semen Quality and Reproductive Hormones in Adult Men. *Environmental Health Perspectives* [online]. **121**(4), 453–458. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.1205118

WEN, Qing, C.Yan CHENG a Yi-Xun LIU, 2016. Development, function and fate of fetal Leydig cells. *Seminars in cell & developmental biology* [online]. **59**, 89–98. ISSN 1084-9521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcd.2016.03.003

WHO, 2023. Infertility. *World Health Organization* [online] [vid. 2023-12-30]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>

WU, Xiufeng, Shengqin WAN a Mary M. LEE, 2007. Key factors in the regulation of fetal and postnatal leydig cell development. *Journal of Cellular Physiology* [online]. **213**(2), 429–433. ISSN 1097-4652. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.21231

YANG, Yan, Chenxing ZHOU, Tiantian ZHANG, Quan LI, Jiabin MEI, Jinlian LIANG, Ziyi LI, Hanhao LI, Qi XIANG, Qihao ZHANG, Lei ZHANG a Yadong HUANG, 2020. Conversion of Fibroblast into Functional Leydig-like Cell Using Defined Small Molecules. *Stem Cell Reports* [online]. **15**(2), 408–423. ISSN 2213-6711. Dostupné z: doi:10.1016/j.stemcr.2020.07.002

YE, Leping, Xiaoheng LI, Linxi LI, Haolin CHEN a Ren-Shan GE, 2017. Insights into the Development of the Adult Leydig Cell Lineage from Stem Leydig Cells. *Frontiers in Physiology* [online]. **8**, 430. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2017.00430

ZENG, Zhuotong, Biao SONG, Rong XIAO, Guangming ZENG, Jilai GONG, Ming CHEN, Piao XU, Peng ZHANG, Maocai SHEN a Huan YI, 2019. Assessing the human health risks of perfluorooctane sulfonate by in vivo and in vitro studies. *Environment International* [online]. **126**, 598–610. ISSN 0160-4120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2019.03.002

ZHANG, De-Yong, Xiao-Lu XU, Xiu-Ying SHEN, Qin RUAN a Wen-Lang HU, 2015. Analysis of apoptosis induced by perfluorooctane sulfonates (PFOS) in mouse Leydig cells in vitro. *Toxicology Mechanisms and Methods* [online]. **25**(1), 21–25. ISSN 1537-6516. Dostupné z: doi:10.3109/15376516.2014.971140

ZHANG, Huishan, Hemin LU, Panpan CHEN, Xipo CHEN, Chengcheng SUN, Ren-Shan GE, Zhijian SU a Leping YE, 2020. Effects of gestational Perfluorooctane Sulfonate exposure on the developments of fetal and adult Leydig cells in F1 males. *Environmental Pollution* [online]. **262**, 114241. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2020.114241

ZHAO, Wei, Ruina CUI, Jianshe WANG a Jiayin DAI, 2017. Inhibition effects of perfluoroalkyl acids on progesterone production in mLTC-1. *Journal of Environmental Sciences* [online]. **56**, 272–280. ISSN 1001-0742. Dostupné z: doi:10.1016/j.jes.2016.08.026

ZIRKIN, Barry R a Vassilios PAPAPOULOS, 2018. Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biology of Reproduction* [online]. **99**(1), 101–111. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1093/biolre/i0y059

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1: Řez semenotvorným kanálkem	16
Obrázek 2: Leydigovy buňky.....	18
Obrázek 3: Schéma steroidogeneze	19
Obrázek 4: Schéma steroidogeneze ve zralé Leydigové buňce (ALC).....	20
Obrázek 5: Hlavní mechanismy, kterými endokrinní disruptory ovlivňují produkci hormonů i počet a kvalitu spermií	23
Obrázek 6: Schématická ilustrace environmentální distribuce poly- a perfluoroalkylovaných sloučenin (PFAS) a jejich expozice člověka a bioty.....	27
Obrázek 7: Srovnání dvourozměrných (2D) vs trojrozměrných (3D) <i>in vitro</i> modelů kultivovaných buněk	33
Obrázek 8: Srovnání <i>in vitro</i> 3D modelů podle jejich komplexnosti a fyziologického významu	33
Obrázek 9: Názorná ukázka Leydigových TM3 buněk kultivovaných ve 2D (A) a 3D (B) modelu	38
Obrázek 10: Schématický postup tvorby mikrogelů 3D Petri Dish®	39
Obrázek 11: Strukturní vzorce studovaných PFAS	42
Obrázek 12: Porovnání funkčnosti maker vytvořených v programech ImageJ/Fiji a CellProfiler pro sledování velikosti sféroidů Leydigových TM3 buněk kultivovaných v běžném kultivačním médiu	45
Obrázek 13: Porovnání funkčnosti maker vytvořených v programech ImageJ/Fiji a CellProfiler pro sledování tvaru sféroidů Leydigových TM3 buněk kultivovaných v běžném kultivačním médiu	46
Obrázek 14: Porovnání vlivu běžného a stimulačního kultivačního média na velikost sféroidů Leydigových TM3 buněk během kultivace	48
Obrázek 15: Porovnání vlivu běžného a stimulačního kultivačního média na tvar sféroidů Leydigových TM3 buněk během kultivace	49
Obrázek 16: Porovnání sféroidů Leydigových TM3 buněk kultivovaných v běžném a stimulačním médiu	50
Obrázek 17: Vliv pozitivní kontroly (10% DMSO, PC) na velikost sféroidů Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici v běžném médiu	52
Obrázek 18: Vliv pozitivní kontroly (10% DMSO, PC) na tvar sféroidů Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici v běžném médiu	53
Obrázek 19: Životaschopnost Leydigových TM3 buněk po expozici pozitivní kontrole (A., 10% DMSO) a třem směsím perfluorovaných látek (PFAS_MIX1–3) (B.) hodnocena resazurinovou metodou.....	54
Obrázek 20: Vliv pozitivní kontroly (10% DMSO) a tří směsí poly- a perfluorovaných látek PFAS_MIX1–3 na sféroidy Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici	55
Obrázek 21: Vliv směsi perfluorovaných látek PFAS_MIX1 na velikost sféroidů Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici v běžném médiu	56
Obrázek 22: Vliv směsi perfluorovaných látek PFAS_MIX2 na velikost sféroidů Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici v běžném médiu	57
Obrázek 23: Vliv směsi perfluorovaných látek PFAS_MIX3 na velikost sféroidů Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici v běžném médiu	58
Obrázek 24: Vliv směsi perfluorovaných látek PFAS_MIX1 na tvar sféroidů Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici v běžném médiu	59
Obrázek 25: Vliv směsi perfluorovaných látek PFAS_MIX2 na tvar sféroidů Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici v běžném médiu	60
Obrázek 26: Vliv směsi perfluorovaných látek PFAS_MIX3 na tvar sféroidů Leydigových TM3 buněk po 7denní expozici v běžném médiu	61
Tabulka 1: Příklady potenciálních endokrinních disruptorů spolu s jejich využitím a výskytem	23
Tabulka 2: Příklady 3D <i>in vitro</i> modelů a jejich obecná charakteristika	34
Tabulka 3: Seznam použitých PFAS látek a jejich poměr v jednotlivých studovaných směsích	42