

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



**Bc. Martina Stiborová**

Vliv diabetes mellitus 2. typu na myší reprodukční parametry  
Effect of Type 2 diabetes on the mouse reproductive parameters

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc.

Praha, 2019

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 23.4.2019

Podpis.....

Martina Stiborová

**Poděkování:**

Mé poděkování patří především doc. RNDr. Janě Pěkníkové, CSc. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Aleně Kubátové, Mgr. Hasmik Margaryan a Ing. Romaně Bohuslavové Ph.D., které mi předaly své zkušenosti a naučily mě spoustu užitečných laboratorních metod a Mgr. Elišce Valáškové za cenné připomínky při sepisování diplomové práce. Mé poděkování patří též mé rodině za pomoc a podporu během studia.

## Abstrakt

Neplodnost je definována jako neschopnost počít potomka do jednoho roku při pravidelném pohlavním styku. Postihuje až 15 % párů po celém světě (WHO, 2010). k celkové neplodnosti mužský faktor přispívá z více jak 50 % případů. Plodnost muže je ovlivněna řadou faktorů, jako je genetické pozadí, životní prostředí a různé onemocnění, například diabetes mellitus (DM). Diabetes mellitus je závažný zdravotní problém, který postihuje 451 miliónů lidí po celém světě (ve věku 18-99 let) a počet jedinců s tímto onemocněním stále přibývá (Cho a spol., 2018). Navíc je mateřství odkládáno do pozdějšího věku, kdy klesá plodnost jedinců a zároveň se objevují metabolická onemocnění jako je diabetes mellitus 2. typu (DM2).

Cílem této práce bylo zjistit vliv metabolického onemocnění diabetes mellitus 2. typu na reprodukční parametry myši inbrední linie C57BL/6J v porovnání s kontrolní skupinou a možný vliv paternálního diabetu na první filialní generaci. Při hodnocení vlivu DM2 byly použity inovativní metody, pomocí nichž byly studovány interní proteiny spermie a semenotvorného kanálku.

Výsledky naší práce ukázaly, že navozený DM2 ovlivnil váhu těla, prostaty a jater paternální generace. u experimentálních potomků byla snížena váha testes, epididymu a jater. Dále byla ovlivněna u obou generací morfologie spermií a stav intraakrozomálních proteinů. u potomků byla hlavička spermie častěji separována od bičíku. Dalším hodnoceným parametrem byl stav jádra spermií hodnocený pomocí jaderných proteinů protaminů. Poměr protaminu 1 a protaminu 2 byl u diabetických jedinců v paternální generaci snížen. u potomků diabetických otců byla snížena reprodukční schopnost.

Dále byl hodnocen histologický stav testes. u diabetických myši byl snížen průměr kanálku a tloušťka semenotvorného epitelu a došlo k ovlivnění meiotické fáze spermatogeneze. Kromě toho byla změněna exprese proteinů účastnících se mezibuněčné komunikace v intersticiálním prostoru kanálku.

Naše výsledky na zvířecím modelu naznačují, že metabolické onemocnění diabetes mellitus 2. typu může ovlivňovat některé reprodukční parametry jako je kvalita spermií a histologický stav testes. Diabetes mellitus 2. typu u otců může ovlivnit reprodukční parametry potomků i jejich reprodukční schopnost. Vlivem DM2 došlo k parentálnímu přenosu epigenetické dědičnosti.

**Klíčová slova:** diabetes mellitus (DM), vysokotučná dieta (HFD), streptozotocin, reprodukční parametry, neplodnost, spermie

## **Abstract**

Infertility is defined as an inability to conceive a child within one year of regular sexual intercourse. It affects up to 15 % of couples worldwide (WHO, 2010). The male factor contributes to the total infertility with more than 50 %. Fertility of a man is influenced by several factors such as genetic background, environment and various diseases such as diabetes mellitus (DM). Diabetes mellitus is a serious health problem that affects 451 million people worldwide (18-99 years) and the number of people with this disease still increases (Cho a spol., 2018). In addition, parenthood is postponed to middle age when the fertility decreases and metabolic diseases such as type 2 diabetes mellitus (DM2) appear.

The aim of this thesis was to investigate the effect of type 2 diabetes on reproductive parameters of mouse inbred line C57BL/6J compared to the control group and the possible effect of paternal diabetes on the first filial generation. In the evaluation of the effect of DM2 on reproductive parameters, we used innovative methods to study internal state of sperm and testes.

Results of our work showed that DM2 influenced the weight of body, prostate and liver. The weight of testes, epididymis and liver was reduced in the offspring. Furthermore, sperm morphology and intraacrosomal protein status were affected in both generations. In offspring the sperm head was separated from the flagellum more often. Another evaluated parameter was the state of the nucleus using protamine nuclear proteins. The protamine ratio of protamine 1 and protamine 2 was reduced in diabetic subjects in the paternal generation. The fertility ratio was reduced in the offspring.

Further, the histological status of the testes was evaluated. In diabetic mice, the diameter of the tubule and the thickness of the epidermal epithelium was reduced, and the meiotic phase of spermatogenesis was affected. The expression of proteins involved in the intercellular communication in the interstitial space of the tubules was altered.

Our results in the animal model suggest that metabolic disease type 2 diabetes may affect some reproductive parameters such as sperm quality and testes histology. Diabetes type 2 affects the reproductive parameters and fertility ratio of offspring. According to our results, the paternal transmission of epigenetic inheritance was affected by DM2.

**Key words:** diabetes mellitus (DM), high fat diet (HFD), streptozotocin, reproductive parametres, infertility, sperm

## Obsah

Seznam zkratk	8
1. Úvod	10
1.1 Samčí pohlavní buňky	10
1.2 Spermatogeneze	10
1.3 Spermioogeneze	12
1.3.1 Akrozom	13
1.3.2 Remodelace chromatinu – nahrazení histonů protaminy	13
2. Diabetes mellitus	17
2.1 Diabetes mellitus 1. typu	18
2.2 Diabetes mellitus 2. typu	19
2.3 Modely studia Diabetes mellitus 2. typu	20
2.4 Genetické a epigenetické příčiny diabetes mellitus 2. typu	22
2.5 Vliv diabetes mellitus 2. typu na reprodukci	23
2.5.1 Vliv diabetes mellitus 2. typu na váhu reprodukčních orgánů	24
2.5.2 Vliv diabetes mellitus 2. typu na morfologii a morfometrii testes	25
2.5.3 Vliv diabetes mellitus 2. typu na kvalitu spermií	26
2.5.4 Vliv onemocnění diabetes mellitus na genetickou informaci spermie	27
3. Cíle diplomové práce	29
4. Metody	30
4.1 <i>In vivo</i> pokus na myším modelu	30
4.2 Zjištění hmotnosti těla a vybraných orgánů, měření anogenitální vzdálenosti	31
4.3 Zpracování spermií a příprava preparátů	31
4.3.1 Detekce apoptózy pomocí Annexinu V	31
4.3.2 Chromomycinové barvení a morfologie spermií	32
4.3.3 Nepřímé imunofluorescenční značení intraakrozomálních proteinů	32
4.4 Izolace protaminů	33
4.4.1 Elektroforetická separace proteinů protaminů	34
4.5 Histologie testes	34
4.5.1 Hematoxylin-eosinové barvení a hodnocení morfologie testes	34
4.5.2 Imunofluorescence s reaktivací antigenů	35
4.6 Izolace proteinů z testes	36
4.7 Elektroforetická separace proteinů	36
4.8 Western Blot – přenos proteinů na nitrocelulóзовou membránu	37

4.9	Imunodetekce vybraných proteinů .....	37
4.10	Statistická analýza .....	37
5.	Výsledky.....	39
5.1	Výsledky experimentů <i>in vivo</i> .....	39
5.2	Váha těla a orgánů, AGD a počet potomků .....	40
5.3	Parametry spermií .....	44
5.4	Histologická analýza testes .....	48
5.4.1	Morfologická analýza testes .....	48
5.4.2	Morfometrická a imunohistochemická analýza testes .....	50
5.5	Analýza exprese proteinů .....	53
6.	Diskuze .....	55
7.	Závěr.....	64
8.	Literatura .....	66

## Seznam zkratek

ADA	„American diabetes association“ – Americká diabetická asociace
Akt kináza	Protein kináza B
Bcl2	„B cell lymphoma 2“ – lymfom B buněk 2
Bax	„Bcl2 asociated X protein“ – Bcl2 asociovaný X protein
CMA3	Chromomycin A3
Cx43	Protein konexin 43
DAPI	4', 6-diamino-2-fenylindolyl
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
DM (1,2)	Diabetes mellitus (1,2. typu)
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EzBlue	Barvivo na barvení proteinů
FFA	„Free fatty acids“ – Volné mastné kyseliny
FSH	Folikulostimulační hormon
GA	Golgiho aparát
GAPDHS	Glyceraldehyd fosfát dehydrogenáza specifická pro spermie
GJ	„Gap junction“ – mezerový spoj
GLUT	Glukózový transportér
GnRH	„Gonadotropine releasing hormone“ – Gonadotropiny uvolňující hormon
HCl	Kyselina chlorovodíková
HFD	„High fat diet“ – Vysokotučná dieta
HPT	Hypothalamo-Pituary-Testes axis“ – Hypothalamo-hypofyzární-testikulární osa
IR	Inzulínová rezistence
IRS	Inzulínový receptorový substrát
LB	Leydigovy buňky
LH	Luteinizační hormon
MAPK	Mitogenem aktivovaná protein kináza
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NGS	„Normal goat serum“ – Normální kozí sérum
(O)GTT	(Orální) Glukózový toleranční test
OS	Oxidační stres



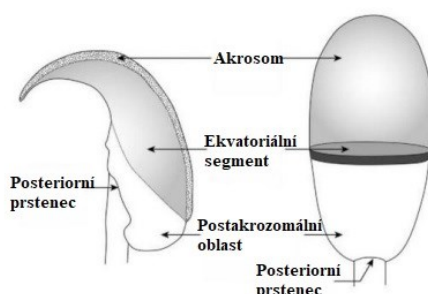
P (1, 2, 3, 4)	Protamin (1, 2, 3, 4)
PBS	„Phosphate buffer saline“ – Fosfátový pufr (fyziologický roztok)
PBT	PBS s přídavkem Tweenu
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kináza
PKC	Proteinkináza C
PMSF	Fenylmethylsulfonyl fluorid
<i>Prm</i> (1, 2)	Gen myšího protaminu (1, 2)
ROS	„Reactive oxygen species“ – Reaktivní formy kyslíku
SB	Sertoliho buňky
SDS	Sodium dodecyl sulfát
TERA=VCP	„Transitional endoplasmatic reticulum ATPase“ – Protein tranzitní endoplazmatická ATPáza
	„Valosine containing protein“ – Protein obsahující valosin
TP	Transiční protein
TNF- $\alpha$	„Tumor necrosing factor $\alpha$ “ – Faktor nádorové nekrózy $\alpha$
TUNEL	„TdT-mediated dUTP nick-end labelling“
WHO	„World health organization“ – Světová zdravotnická organizace

# 1. Úvod

## 1.1 Samčí pohlavní buňky

Spermie jsou samčí pohlavní buňky, které se začínají tvořit s nástupem puberty v testikulární tkáni. Odtud putují do epididymu, kde dozrávají a následně jsou ejakulací uvolněny. Spermie po ejakulaci nejsou schopny oplodnit oocyt. Nejprve musí projít maturačními procesy uvnitř samičího pohlavního traktu, k oocytu se dostane jen malý počet těch nejlepších spermií a jen jedna jej oplodní. Proto je nutné zajistit jejich kvalitu již od jejich samotného vzniku. Jakékoliv narušení vzniku, vývoje i maturace může vést k případné subfertilitě. Přičemž mužský faktor přispívá k více jak 50 % všech případů neplodnosti (Agarwal a spol., 2015).

Spermie jsou vysoce diferenciované buňky. Skládají ze dvou morfologicky i funkčně odlišných částí – hlavičky a bičíku, které spojuje krček tzv. „connecting piece“. v hlavičce se nachází kondenzované haploidní jádro, akrozomální váček, cytoskeletální struktury a cytoplazma. v akrozomálním váčku jsou uloženy lytické enzymy, jež pomáhají průniku spermie skrz ochranné obaly vajíčka. Enzymy se uvolňují exocytózou při akrozomální reakci (Alberts a spol., 2002). Tvar hlavičky je druhově specifický. Hlodavci mají typicky srpkovitý tvar, králičí spermie oválný (Obr.1), a mužské spermie mají hlavičky kulaté. Bičík je rozdělen na 3 části, a to na střední segment, v němž se nachází mitochondrie poskytující energii k pohybu, hlavní segment a koncový segment. Svým pohybem umožňuje spermii dostat se k vajíčku, projít jeho obaly a následně s ním fúzovat (Neill, 2006).



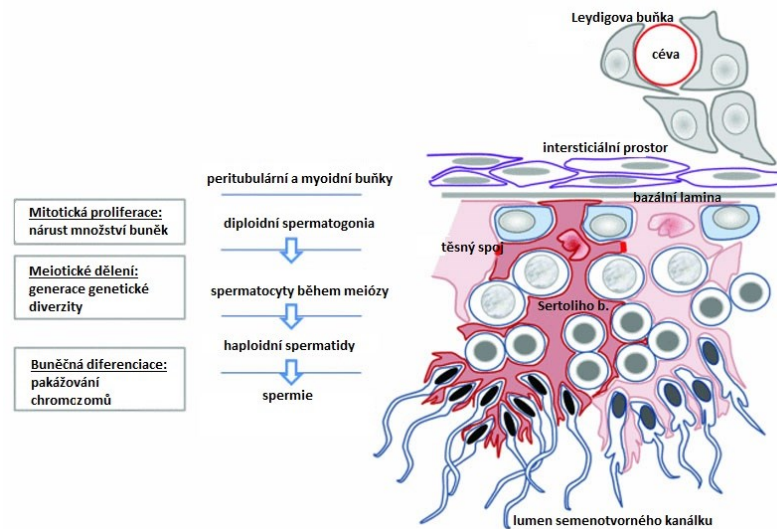
Obrázek 1: Hlavička myší a králičí spermie

Převzato od: Eddy & O'Brien, 1994

## 1.2 Spermatogeneze

Spermatogeneze je klíčový proces, při kterém vznikají mužské pohlavní buňky v semenotvorných kanálcích testes. Může být rozdělena do tří hlavních fází – proliferativní fáze, kdy se mitoticky dělí kmenové buňky; meiotické fáze zahrnující dvě meiotická dělení; a poté spermiogenezi, při níž spermie získává svůj typický tvar (Huckins, 1971; Oakberg,

1971; Matson a spol., 2010). Sertoliho (SB) a Leydigovy buňky (LB) pomáhají správnému průběhu spermatogeneze (Obr.2).



Obrázek 2: Schéma zobrazující průběh spermatogeneze se spermiogenezí v průřezu testes s buňkami důležitými pro správný vývoj spermie.

Převzato od: Hunter a spol., 2012

SB jsou velmi důležité pro správný vývoj spermií. Endocytují a degradují apoptické zárodečné buňky, čímž udržují homeostatický stav v testes (Chemes, 1986). SB také přispívají ke vzniku hematotestikulární bariéry (Liu a spol., 2018). Dále vytváří specifické mikroprostředí tzv. niku, která se nachází u bazální laminy semenotvorného kanálku (Chiarni-Garcia a spol., 2003) a produkují řadu růstových faktorů, čímž ovlivňují životní osud zárodečných buněk (Chiarni-Garcia a spol., 2003; Naughton a spol., 2006; Yang a spol., 2013).

LB tvoří většinu intersticiálních buněk, přičemž jejich hlavní funkcí je produkce testosteronu pod kontrolou luteinizačního hormonu (LH), produkovaného hypothalamo-hypofyzární osou. Tím se podílí na správném mikroprostředí testes. Testosteron produkovaný LH je nezbytný pro správný průběh spermatogeneze (Singh a spol., 1995). Při absenci testosteronu během spermatogeneze dochází k zastavení procesu v časných fázích meiózy a vývoj spermií dále nepokračuje (Yeh a spol., 2002).

Komunikace mezi testikulárními buňkami je velmi důležitá. Je zprostředkována několika způsoby, které zahrnují parakrinní signalizaci a mezerové spoje „gap junctions“ (GJ). Kontakty mezi LB, SB a zárodečnými buňkami se účastní lokální regulace spermatogeneze. Kontakt mezi LB umožňuje synchronizovat produkci androgenních hormonů. GJ také umožňuje výměnu malých metabolitů a molekul tzv. druhých posílů. Jedním z proteinů tvořící GJ jsou konexiny. Risley a spol. (1992) a Varanda a Decarvalho (1994) jako jedni z prvních prokázali přítomnost proteinu konexinu 43 (Cx43) v gap junction mezi myšími LB. Kromě Cx43 jsou v testes přítomny i jiné druhy konexinů,

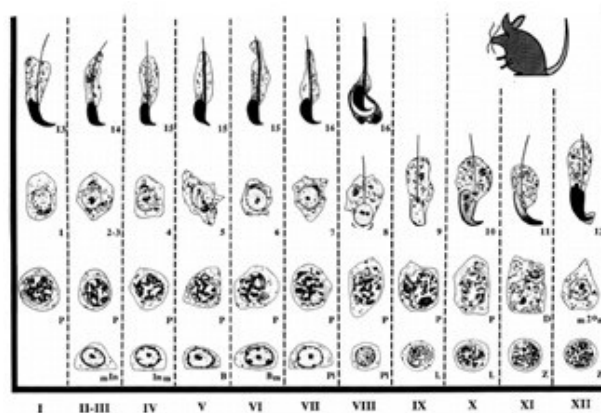
například Cx36 a Cx45 (Li a spol., 2013). v dospělosti u zdravých jedinců dochází ke zvýšené expresi Cx43 v Leydigových buňkách (Risley a spol., 1992).

### 1.3 Spermioogeneze

Na základě morfologických kritérií je spermioogeneze v semenotvorném kanálku myši rozdělena do 12 stádií buněčných sdružení a 16 kroků spermioogeneze (Obr.3) (Oakberg, 1956; Russell a spol., 1993). Tento proces je kontinuální, probíhá směrem do lumen kanálku. z kulatých spermatid se procesem spermioogeneze stávají spermie, čímž získávají svůj typický tvar. Dochází ke kondenzaci a elongaci jádra, vzniku akrozomu odvozeného od Golgiho aparátu (GA), vzniku bičíku a odvrhování residuálních tělísek z cytoplazmy (Obr.3). Bičík se začíná vytvářet ve spermatidě během prvního kroku spermioogeneze z centrioly na pólu spermatidy. Skládá se z mikrotubulárních struktur tvořících axonemu. Vývoj bičíku je kontinuální proces, který je ukončen až na konci spermioogeneze. Odstranění cytoplazmy je důležitý proces zajišťující typický vzhled spermie, který probíhá ve třech fázích. Většina cytoplazmy je odstraněna pomocí tubulobulbárního komplexu a Sertoliho buněk (Jan a spol., 2012).

Akrozom se nachází anteriorně od jádra. Obsahuje lytické enzymy důležité pro penetraci skrz obaly oocyty (MartinezMenarguez a spol., 1996). Biogeneze akrozomu je kontinuální proces začínající v kroku 2 spermioogeneze a končící v kroku 12. Během kroků 2-4 proakrozomální váček z Golgiho aparátu je transportován na horní pól spermatidy, kde fúzuje a vytváří akrozomální váček na vrcholu jádra. Akrozomální váček se v krocích 5-12 kondenzuje a zplošťuje (Jan a spol., 2012).

V elongační fázi spermioogeneze dochází k rozsáhlé remodelaci chromatinu, která má za výsledek kondenzaci jádra a umlčení transkripce. u saveců začíná u kroků 11-12 a výsledkem je nahrazení histonů protaminy (Jan a spol., 2012).



Obrázek 3: Stádia spermatogeneze a kroky spermioogeneze u myši. Stádia popsaná římskými číslicemi znázorňují fáze buněčných sdružení a arabská čísla znázorňují postupné kroky spermioogeneze.

Převzato od: Guan, 2009

### 1.3.1 Akrozom

Hlavička spermie má vnitřní akrozomální membránu, která překrývá anteriorní část vnější membrány jádra; kontinuálně přechází ve vnější akrozomální membránu, která leží u plazmatické membrány spermie. Akrozom se skládá z akrozomální čepičky a ekvatoriálního segmentu. Během akrozomální reakce vnější akrozomální membrána a plasmatická membrána fúzí a obsah akrozomu je uvolněn. Vnitřní akrozomální membrána zůstává a ekvatoriální segment se dostává do kontaktu s oocytem (Eddy a O'Brien, 1994).

Akrozom obsahuje lytické enzymy, které usnadňují průchod spermie obaly oocyty a proteiny důležité pro vazbu spermie-oocyt. u proteázy akrozinu bylo zjištěno, že mimo lytické funkce se účastní i sekundární vazby spermie-zona pellucida. (Peknicova a spol., 2001). Tito autoři také prokázali, že při imunofluorescenčním testování protilátky proti akrozinu, byly intenzivně značeny spermie s intaktním akrozomem oproti spermii s podstoupenou akrozomální reakcí. Další intraakrozomální strukturou je glykoprotein tranzitní endoplazmatická retikulární ATPáza (TERA) také nazývaná valosin obsahující protein (VCP) (Capkova a spol., 2000; 2015). Během kapacitace spermie je fosforylován (Ficarro a spol., 2003), účastní se fúze membrán a prezentuje ubikvitinované proteiny, které jsou směřovány do proteazomu (Dai a Li, 2001). Dalším intraakrozomálním proteinem je glycerinaldehyd fosfát dehydrogenáza specifická pro spermii (GAPDHS). Autoři Peknicova a spol. (2001) předpokládali, že se účastní sekundární vazby spermie-zona pellucida a v další práci prokázali vazebnou úlohu GAPDHS (Margaryan a spol., 2015). Protilátkami proti těmto intraakrozomálním proteinům je možné hodnotit stav akrozomu (Peknicova a Moos, 1990; Peknicova a spol., 2005). Bylo zjištěno, že dochází ke snížené expresi intraakrozomálních proteinů u jedinců se zhoršenou kvalitou spermatu (Capkova a spol., 2016).

### 1.3.2 Remodelace chromatinu – nahrazení histonů protaminy

Protaminy (P) jsou jaderné proteiny, specificky exprimované v pohlavních buňkách samce. Hlavní funkce protaminů je kondenzace paternálního chromatinu s více kompaktním a hydrodynamickým jádrem a ochrana genetické informace před negativními vlivy okolního prostředí (Oliva & Dixon, 1991). Savčí spermie obsahují různé typy protaminů: protein P1 a rodinu proteinů P2, obsahující proteiny P2, P3 a P4, přičemž P2 je nejvíce zastoupený (Domenjoud a spol., 1991).

Záporně nabitá DNA se váže na kladně nabitě arginin-bohaté protaminy a tvoří vysoce stabilní toroidální strukturu (Ballhorn a spol., 2000; DeRouchev a spol., 2013).

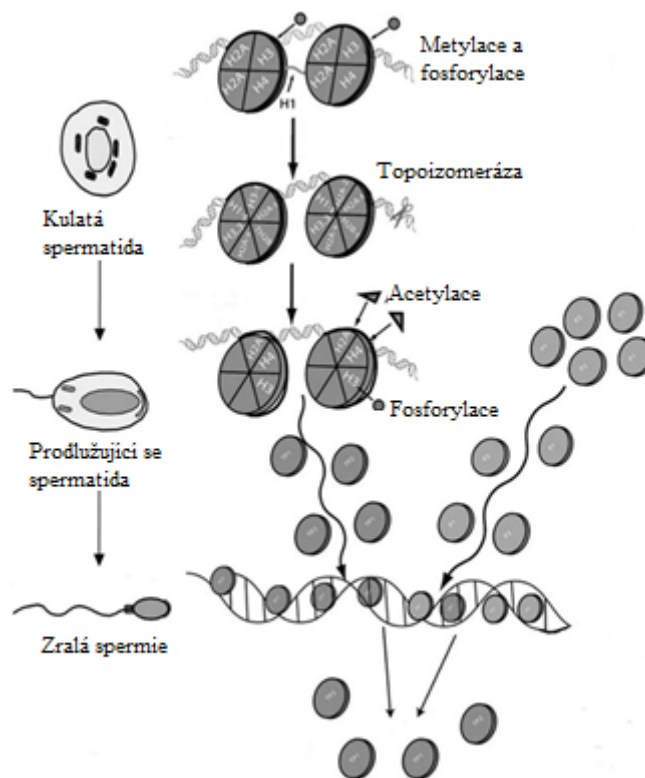
k správné kondenzaci chromatinu také přispívají disulfidické můstky mezi cysteinovými zbytky (Vilfan a spol., 2004).

P1 je translatován u všech savců, avšak rodina P2 (proteiny P2, P3 a P4) je translatována druhově specificky (Domenjoud a spol., 1991), například je translatována u člověka, myši, potkana a křečka (Bower a spol., 1987; Johnson a spol., 1988). Lidský i myší gen kódující P1 a P2 se nachází na chromosomu 16 (Reeves a spol., 1989). P1 je translatován jako jeden protein. Rodina P2 je tvořena proteolýzou prekurzorů kódovaných jedním genem. Komponenty P2, P3 a P4 se od sebe liší 1–4 aminokyselinami na svém N konci (Sautiere a spol., 1988; Oliva & Dixon, 1991).

Primární struktura protaminu má centrální vazebnou doménu DNA, která je bohatá na arginin, terminální doménu, která je bohatá na cysteinové zbytky (Vilfan a spol., 2004). P má krátké segmenty obsahující serin a threonin, jež jsou fosforylovány. P obsahuje cysteinové zbytky, které jsou schopné tvořit disulfidové můstky mezi molekulami protaminu a těsně je spojují (Balhorn a spol., 2000). Centrální doména P1 bohatá na arginin se váže na DNA do velkého žlábků, kde váže 10-11 párů bází (Bench a spol., 1996; Vilfan a spol., 2004). v komplexu převažují interakce, které přispívají k velké stabilitě. Jsou to kombinace vodíkových vazeb a elektrostatických vazeb (Hud a spol., 1994). P2 je z 50 - 70 % identický s P1. Váže až 15 párů bází a obsahuje jeden atom zinku na molekulu (Bench a spol., 2000).

Během spermiogeneze jsou histony postupně nahrazovány transičními proteiny (TP) a ty jsou poté nahrazeny protaminy (Meistrich a spol., 2003) (Obr.4). v myších spermiích je nahrazeno 99 % histonů protaminy a u lidských spermií 85 % (Brunner a spol., 2014). v důsledku posttranslačních modifikací histonů, jako je acetylace, fosforylace, ubiquitinilace a metylace, a indukci DNA zlomů pomocí topoizomerázy II jsou histony z chromatinu vytěsněny (McPherson & Longo, 1993; Brunner a spol., 2014; ; Jha a spol., 2017). Po translaci jsou protaminy fosforylovány, což je nezbytné pro správné navázání P do žlábků DNA. Jakmile je P navázaný v DNA, dochází k defosforylaci protaminu a správné kondenzaci chromatinu (Carrell a spol., 2007).

Brunner a spol. (2014) naznačují existenci "protaminového kódu" vedle "histonového kódu" u spermií, přičemž může mít úlohu v transgenerační epigenetické dědičnosti.



Obrázek 4: Přechod nukleohiston-nukleoprotamin během spermiogeneze. Dochází k hyperacetylaci histonů a aktivaci topoizomerázy, k indukci nahrazení histonů za TP1 a TP2. Ty jsou následně nahrazeny fosforylovanými protaminy P1 a P2, které indukují kondenzaci DNA v jádře. Protaminy se pak defosforylují a mezi protaminy se tvoří disulfidové vazby pro stabilizaci struktury nukleoprotaminu.

Převzato od: Francis a spol., 2014

### 1.3.2.1 Protaminy a neplodnost

Elektroforetické studie izolovaných protaminů myší, křečků a lidí odhalily, že relativní zastoupení P1 a P2 se u každého druhu liší. Rozdíl v poměru nastává substitucí P2 místo P1 (Bench a spol., 1996; Corzett a spol., 2002). Poměr protaminů je také ovlivňován působením vnějších faktorů na daný organismus (Zatecka a spol., 2014).

Autoři Deyebra a Oliva (1993) optimalizovali elektroforetickou analýzu jaderných proteinů, což umožnilo snadnější klinickou aplikaci. To vyvolalo významný zájem v hodnocení poměru P1/P2 jako možného biomarkeru mužské neplodnosti. Bylo zjištěno, že změny úzkého rozsahu poměru protaminu u lidí (0,8-1,2) jsou spojeny s neplodností (Francis a spol., 2014), u myší se hodnota poměru protaminů pohybuje okolo 0,5 (Corzett a spol., 2002).

Autoři Cho a spol. (2003) zjistili, že u myší deficientních v genu *Prm2* dochází k značnému poškození DNA a abnormální morfologii hlavičky. Následně Schneider a jeho kolegové (2016) pozorovali, že *Prm2* heterozygotní samci vykazovali sníženou hladinu proteinu P2 ve srovnání s kontrolními vzorky. Tyto myši měly normální počet potomků. Avšak *Prm2* deficientní myši byly sterilní. Spermie u myší s mutovanými oběma alelami

*Prm2* měly vážné morfologické vady hlavičky. Celkově více než 80 % spermií s deficiencí *Prm2* mělo silně poškozenou DNA. Přestože u heterozygotních zvířat v *Prm2* došlo k mírnému zvýšení poškození spermií ve srovnání s kontrolní skupinou, více než 90 % spermií bylo v pořádku.

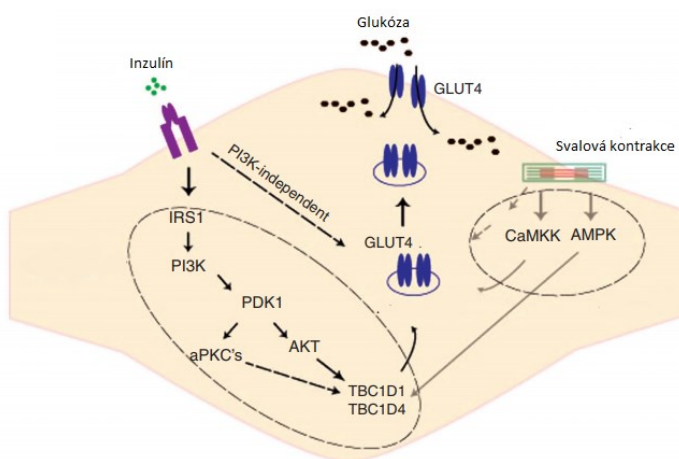
Amor a spol. (2017) zkoumali poškození DNA spermií. Zjistili, že úzce souvisí s nedostatkem protaminů. Proto navrhli, že poměr P1/P2 může sloužit také jako dobrá alternativa pro hodnocení poškození DNA spermií mimo použití metody TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), což je metoda pro detekci fragmentace DNA značením 3'-hydroxylových konců ve dvouřetězcové DNA.



## 2. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) je skupina metabolických onemocnění charakterizovaných hyperglykemií (vysokou hladinou glukózy v krvi) způsobenou různými procesy vedoucími k nedostatečné sekreci inzulínu, snížené tkáňové odpovědi na inzulín, či kombinaci obojího (ADA, 2014). Celosvětová prevalence diabetu a narušená glukózová tolerance u dospělých se v posledních letech zvyšuje. Dle Mezinárodní diabetické federace, v roce 2017 trpělo diabetem prvního i druhého typu 451 miliónů lidí po celém světě (ve věku 18-99 let), a očekává se, že do roku 2045 by počet nemocných mohl vzrůst až na 693 miliónů (Cho a spol., 2018).

Jednu z klíčových rolí k udržení homeostázy glukózy mají hormony glukagon a inzulín. Jsou sekretovány buňkami pankreatu. Glukagon, produkovaný  $\alpha$  buňkami, zvyšuje hladinu glukózy v krvi. Naopak inzulín, produkovaný  $\beta$  buňkami, hladinu snižuje. Při zvýšené hladině glukózy, inzulín inhibuje její produkci v játrech, a zároveň podporuje její příjem do buněk, čímž dochází k poklesu glukózy v krvi. Ve svalích a v tukové tkáni je glukóza přijímána pomocí inzulín-senzitivních transportérů GLUT4. Inzulín se váže na inzulínový receptor, který má vnitřní tyrosin-kinázovou aktivitu. Dochází k fosforylaci inzulín-receptorového substrátu (IRS) a následné signalizaci vedoucí k aktivaci Akt kinázy, PI3K kinázy a atypických PKC kináz, které ovlivňují translokaci GLUT4 z cytosolu na plasmatickou membránu a dochází k příjmu glukózy do buňky (Obr.5) (Deshmukh, 2016).



Obrázek 5: Signalizační kaskáda regulující příjem glukózy u zdravého jedince. Signalizační kaskáda reguluje translokaci glukózového transportéru GLUT4 a umožňuje transport glukózy. Inzulín i svalová kontrakce spouští signalizační kaskádu.

Převzato od: Deshmukh, 2016

Deregulace metabolismu glukózy může mít za následek hyperglykémii, způsobenou relativní inzulínovou deficiencí, nebo hypoglykémii, která vzniká relativní

nadprodukcí inzulínu (ADA, 2014). Mezi nemoci s narušeným metabolismem glukózy patří diabetes mellitus. DM může způsobovat dlouhodobé poškození, dysfunkce a selhání různých orgánů, zahrnující: retinopatii s možnou ztrátou zraku, nefropatii vedoucí k selhání ledvin, neuropatii s možným vznikem vředů na nohách, autonomní neuropatii způsobující gastrointestinální, genitourinární příznaky a sexuální dysfunkci. Pacienti s diabetem mají často hypertenzi a abnormality metabolismu (ADA, 2014).

Diabetes mellitus se u lidí diagnostikuje na základě biomarkerů – hladiny glukózy v krevní plazmě na lačno („fasting plasma glucose“ – FPG), 2 h orálního glukózového tolerančního testu (2hOGTT) a glykovaného hemoglobinu HbA1c (WHO, 2011).

Diagnostická kritéria diabetu jsou:

- Koncentrace glukózy v plazmě na lačno  $\geq 7,0$  mmol/l (126 mg/dl)
- Koncentrace glukózy v plazmě při orálním glukózovém tolerančním testu  $\geq 11,1$  mmol/l (200 mg/dl)
- Množství glykovaného hemoglobinu z celkového hemoglobinu v krvi  $\geq 6,5$  % (WHO, 2016).

Diabetu je známo několik typů. Nejznámějšími typy diabetu jsou diabetes mellitus 1. typu (DM1), který vzniká autoimunitní destrukcí  $\beta$  buněk slinivky břišní. DM 2. typu (DM2), je daný nerovnováhou mezi sekrecí a účinkem inzulínu v metabolismu glukózy s rozsahem od inzulínové rezistence s relativní nedostatečností inzulínu až k inzulínovému sekrečnímu selhání s inzulínovou rezistencí (ADA, 2014).

## 2.1 Diabetes mellitus 1. typu

U DM1 kvůli autoimunitní destrukci  $\beta$  buněk pankreatu nedochází k produkci inzulínu, a následné aktivaci signální kaskády vedoucí k translokaci glukózových transportérů GLUT 4 (Obr.5). Pacienti s tímto typem diabetu představují 5-10 % pacientů s diagnózou diabetes mellitus. Data z velkých epidemiologických studií naznačují, že stabilně průměrný roční nárůst incidence DM1 je 2-5 % (Maahs a spol., 2010; ADA, 2014; WHO, 2016).

DM1 je považován za dětskou a juvenilní chorobu, ale může vzniknout i u dospělých jedinců. Navíc u dospělých je obtížnější jej zjistit, vzhledem k tomu, že u nich převládá DM2, a tudíž je za něj zaměňován (Thomas a spol., 2018).

Destrukce  $\beta$  buněk je selektivní. Imunitní systém vytváří protilátky proti specifickým proteinům  $\beta$  buněk: inzulínu, glutamát dekarboxyláze, protein tyrozinové fosfatáze IA2, transportéru zinku-8 a tetraspaninu-7 (McLaughlin a spol., 2016). Tyto protilátky je možné detekovat měsíce až roky před plným propuknutím DM1 (Couper a Donaghue, 2009).

## 2.2 Diabetes mellitus 2. typu

DM2 je onemocnění charakterizované relativní inzulínovou deficiencí způsobenou dysfunkcí  $\beta$  buněk a inzulínovou rezistencí (IR) v cílových orgánech. Tato forma DM postihuje 90-95 % osob s diabetem (ADA, 2014). Globálně vzrůstá počet obézních lidí, příjem vysokoenergetické potravy a sedavý životní styl, což má za následek nárůst počtu lidí trpících DM2 (WHO, 2016). v minulosti se DM2 projevoval především u lidí ve středním a starším věku a do roku 2002 nebyl považován za pediatrický problém. Avšak nyní se vyskytuje u dětí a mladých lidí stále častěji, přičemž tento trend je představován mezinárodně (WHO, 2016; Kasmauski, 2018). Dlouhodobá data naznačují, že prevalence DM2 u mladistvých se zvyšuje o 7 % ročně, avšak nárůst není rovnoměrný s ohledem na etnikum (Mayer-Davis a spol., 2017).

DM2 je způsobován relativním nedostatkem inzulínu a inzulínovou rezistencí (IR). IR je stav, kdy cílové buňky a tkáně neodpovídají řádně na danou dávku inzulínu. Existují různé mechanismy narušující regulaci homeostázy glukózy na úrovni glukózového receptoru, včetně mutací anebo posttranslačních modifikací v inzulínovém receptoru, IRS nebo v „downstream“ signalizaci. Nejběžnějšími změnami v inzulínové rezistenci jsou snížený počet inzulínových receptorů a jejich katalytické aktivity, změny ve fosforylačním stavu serin/threonin inzulínového receptoru a IRS, zvýšení aktivity tyrosinové fosfatázy, IRS defosforylace, snížení aktivity PI3K a Akt kináz a defektů exprese a funkce GLUT4 (Garvey a spol., 1998; Gutierrez-Rodelo a spol., 2017).

Vzhledem k tomu, že IR hraje zásadní roli v patogenezi DM2, bylo vyvinuto značné úsilí k objasnění odpovědných faktorů. Faktory způsobující IR a DM2 jsou obezita, zánět, a s nimi spojená hyperglykémie, hyperinzulinémie, lipotoxicita a hyperlipidémie; genetické pozadí a oxidační stres (OS). Tyto faktory se vzájemně ovlivňují (Ye, 2008).

V případě akutního vystavení  $\beta$  buněk vysoké koncentraci glukózy je stimulována exprese inzulínového genu. Ale v případě chronické hyperglykémie jsou  $\beta$  buňky stále vystavovány zvýšené koncentraci glukózy. To postupně snižuje schopnost  $\beta$  buněk sekretovat inzulín, což vede k zhoršení hyperglykémie. Tato smyčka nakonec vede k celkové neschopnosti  $\beta$  buněk produkovat inzulín (Kawahito a spol., 2009).

Chronická hyperglykémie je přímo spojená se vznikem OS, který může mít za následek poškození lipidů, proteinů, nukleových kyselin, mitochondrií a dalších organel (Dandona a spol., 1996). Vlivem OS dochází ke zvýšení peroxidovaných lipidů, reaktivních druhů kyslíku (ROS) a ke snížení hladiny antioxidantních enzymů (Nogueira a Hay, 2013). OS v hyperglykemickém stavu je zvyšován různými cestami (Kawahito a spol., 2009). Jedna z drah vede ke vzniku konečných produktů pokročilé glykace, které mají důležitou roli v patogenezi DM (Kaneto a spol., 1996). Glykace proteinů interferuje

s jejich normálními funkcemi tím, že narušuje konformaci proteinu, mění jeho enzymatickou aktivitu, snižuje schopnost jeho degradace a interferuje s rozpoznáváním receptorů. Tím hrají důležitou roli ve vzniku patogeneze diabetu, jako je retinopatie, nefropatie, či neuropatie (Singh a spol., 2014; Greifenhagen a spol., 2016).

Jednou z hlavních příčin způsobujících DM2 je obezita (ADA, 2014). Tuková tkáň je nejen hlavní zásobárnou energie, ale také aktivním endokrinním orgánem, který vylučuje hormony a ovlivňuje metabolismus lipidů a neesterifikovaných mastných kyselin, které mohou ovlivňovat celkovou citlivost na inzulín (Scherer, 2006).

V tukové tkáni může docházet k zánětu. Zánět tukové tkáně nastává během vývoje obezity a může vést k rozvoji DM2 (Vojarova a spol., 2002). Vzhledem k tomu, že se adipocyty zvětšují, začínají vylučovat nízké hladiny TNF- $\alpha$ . Tím dochází k akumulaci makrofágů v tukové tkáni. Makrofágy produkují další prozánětlivé cytokiny. v těle dochází k cirkulaci těchto cytokinů a již slabý zánět negativně ovlivňuje funkci  $\beta$  buněk pankreatu (Dula a spol., 2010). Vlivem zánětu a jím způsobeného OS dochází k apoptotické smrti  $\beta$  buněk a jejich úbytku až o 63 % v porovnání se zdravým jedincem (Butler a spol., 2003).

Vlivem diabetického prostředí se z tukové buňky uvolňují volné mastné kyseliny (FFA) a vstupují do krevního oběhu a do jiných orgánů a tím mohou indukovat IR (Kaneto a spol., 2001; 2010), a to již během 4-6 hodin, snížením aktivity PI3K kinázy asociované s IRS-1 a snížením inzulínem zprostředkovaného vylučování glukózy (Boden, 1994; 1997; Roden a spol., 1996; Dresner a spol., 1999). Tento stav zhoršuje schopnost adipocytů ukládat tuky, což vede k větší akumulaci ektopického tuku, rezistenci na inzulín a hyperinzulinémií způsobující negativní zpětnovazebnou smyčku (Skovso, 2014).

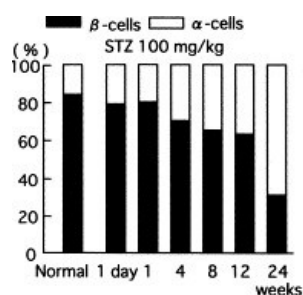
### 2.3 Modely studia Diabetes mellitus 2. typu

Studium na zvířecích modelech značně přispělo k objevení a charakterizaci patofyziologie onemocnění diabetes mellitus 1. i 2. typu. Vědci mají příležitost studovat různé faktory ovlivňující vývoj onemocnění, různé komplikace a také možnou léčbu onemocnění *in vivo*. Navíc díky zvířecím modelům je možné studovat vliv onemocnění na jednotlivé orgány, a tím získávat nové informace o přibližném průběhu onemocnění u lidí. u zvířecích modelů se DM2 navozuje buď spontánně pomocí diety, nebo pomocí chemických, chirurgických a genetických technik.

Nejběžněji používanou diabetogenní chemikálií je streptozotocin (STZ). STZ je antibiotikum produkované bakterií *Streptomyces achromogenes*. Jako diabetogenní chemikálie je používána od roku 1963 (Bohuslavova a spol., 2013; Pavlinkova a spol., 2017; Rakieten a spol., 1963).

Streptozotocin je analog nitrosomočoviny, ve kterém je skupina N-methyl-N-nitrosomočovina (MNU) spojena s hexózou. Toxický účinek streptozotocinu a chemicky příbuzných alkylačních sloučenin vyžaduje jejich přítomnost v buňce (Lenzen, 2008). Streptozotocin je selektivně akumulován v pankreatických  $\beta$  buňkách. Vzhledem ke své analogii s glukózou, je do nich transportován prostřednictvím nízko afinitního glukózového transportéru GLUT2 (Wang & Gleichmann, 1998). Toxicita STZ závisí na jeho DNA alkylační aktivitě. Přenos methylové skupiny ze STZ na molekulu DNA způsobuje její poškození a vede k fragmentaci DNA. v  $\beta$  buňkách je inhibována produkce inzulínu a dochází k jejich nekrotické smrti (Lenzen, 2008). Zároveň při aplikaci STZ nedochází k ovlivnění DNA jiných typů buněk (např. spermií) (Wei a spol., 2014). Jedna dávka STZ 100 mg/kg je schopna indukovat pomalý progresivní nástup DM2 u dospělých myši (Obr.6) (Ito a spol., 2001).

Normální krmivo pro hlodavce obvykle obsahuje cca 11 % tuků, 63 % sacharidů a 26 % bílkovin (na bázi kalorií). Při vysokotučné dietě (HFD), kdy je většina energie metabolizována z tuků v potravě, dochází k nárůstu hmotnosti. Přestože nárůst hmotnosti může být zaznamenán již jeden týden po zahájení diety, je často nutný delší časový úsek pro vyvolání výrazného zvýšení tělesné hmotnosti (8 týdnů nebo více). Zvýšená hmotnost je spojována s inzulínovou rezistencí a narušeným metabolismem glukózy. Důležitý je výběr vhodného kmene myši s ohledem k náchylnosti k obezitě a diabetu (King & Bowe, 2016). Vhodným modelem je myši kmen C57BL/6 s genetickou predispozicí k rozvoji DM2, a k rozvoji onemocnění dojde za pomoci HFD (Surwit a spol., 1988; Gallou-Kabani a spol., 2007).



Obrázek 6: Změny v procentech počtu  $\alpha$  buněk a  $\beta$  buněk v ostrůvkách pankreatu u myši po jedné dávce 100 mg/kg STZ po 1 dni až 24 týdnech.

Převzato od: Ito a spol., 2001

Velmi často se k navození DM2 využívá kombinace HFD s následnou aplikací STZ (Luo a spol., 1998). Tím je modelován přechod z prediabetu a inzulínové rezistence k plně rozvinutému onemocnění. Hlavní výhodou tohoto modelu spočívá v tom, že dochází k napodobení pomalého rozvoje patogeneze DM2, ke kterému dochází u většiny lidí. Tento způsob navození zahrnuje pomalý vývoj od navození obezity k zhoršenému metabolismu

glukózy, inzulínové rezistenci, dekompenzaci inzulínu, a nakonec pomocí streptozotocinu indukované částečné smrti  $\beta$  buněk pankreatu (Kleinert a spol., 2018).

## 2.4 Genetické a epigenetické příčiny diabetes mellitus 2. typu

Existují přesvědčivé důkazy, že individuální riziko DM2 je silně ovlivněno genetickými faktory, kdy heritabilita je odhadována na 72 % (Willemsen a spol., 2015). Celoživotní riziko vývoje DM2 je 40 % u jedinců, kteří mají jednoho rodiče s DM2 a 70 %, pokud oba rodiče mají DM2 (Ali, 2013). DM2 je považován za polygenní onemocnění, které se vyvíjí na základě ne úplně prozkoumaným interakcím mezi několika geny a faktory okolí. Genetická složka rizika DM2 není soustředěna v jedné oblasti jako u DM1, ale zdá se být výsledkem interakce více genů rozptýlených po celém genomu (Ali, 2013).

DM2 vyskytující se v různých rodinných studiích, není zcela způsoben genetickými faktory. Ke zdědění onemocnění mohou přispívat i epigenetické procesy v zárodečných buňkách, které mohou být děděny i po několik generací (Ali, 2013). Několik studií prokázalo mezigenerační účinek na parametry související s metabolismem a růstem, kvůli ovlivnění epigenetické informace (Anderson a spol., 2006; Carone a spol., 2010; Ng a spol., 2010).

Ng a spol. (2010) jako první publikovali na zvířecím modelu (potkanech) výsledky negenetického, paternálního a mezigeneračního přenosu metabolického onemocnění od otce krmeného vysokotučnou dietou (HFD). Samci krmení HFD měli zvýšenou tělesnou hmotnost, adipositu, zhoršenou glukózovou toleranci a citlivost na inzulín. Potomci oproti kontrolám měli časnější nástup zhoršené inzulínové sekrece a glukózové tolerance, která se časem zhoršovala. Také byla u potomků změněna exprese 642 pankreatických genů. Navíc došlo k epigenetickému ovlivnění některých genů.

I v další studii byli dospělí samci myši krmení HFD. Dieta způsobila obezitu u otcovské myši linie bez rozvoje metabolického syndromu. u první filiální F1 generace F1 došlo ke vzniku glukózové intolerance a inzulínové rezistence. Dále u samic F2 generace byly pozorovány abnormality v metabolismu (Fullston a spol., 2013).

Wei a spolupracovníci (2014) publikovali zajímavou studii o prediabetu na myším modelu. Prediabetes byl navozen pomocí HFD (33 % energie z tuku) a nízké dávky streptozotocinu (100 mg/kg). u samců P generace se zvýšila tělesná hmotnost, obezita, plazmatická hladina glukózy, inzulínu, leptinu, cholesterolu a hladiny triglyceridů. u F1 potomků prediabetických samců se vyvinula glukózová intolerance a inzulínová rezistence. Dále autoři ukázali, že u F1 generace byla ovlivněna exprese 402 genů exprimovaných pankreatem. Dále byla provedena celogenomová DNA metylační analýza. u potomstva více než 8000 oblastí (včetně 5'UTR, 3'UTR (UTR, netranslatovaná oblast), kódujících sekvencí a intronových oblastí) mělo ovlivněnou metylaci v ostrůvcích

pankreatu. Autoři předpokládají, že prediabetes u P generace ovlivňuje epigenom, což může u potomstva ovlivnit expresi klíčových genů v pankreatu. Dále hodnotili metabolické změny a u F2 generace ve věku 16 týdnů a zjistili, že F2 generace vykazuje sníženou glukózovou toleranci a sníženou inzulínovou citlivost. Vzhledem k tomu, že zvířata od F1 žila ve standardním laboratorním prostředí bez jakékoliv léčby a jejich potomci vykazovali podobné fenotypy a epigenetické změny, pozorované účinky epigenetické dědičnosti jsou pravděpodobně způsobeny navozeným prediabetem u otců.

## 2.5 Vliv diabetes mellitus 2. typu na reprodukci

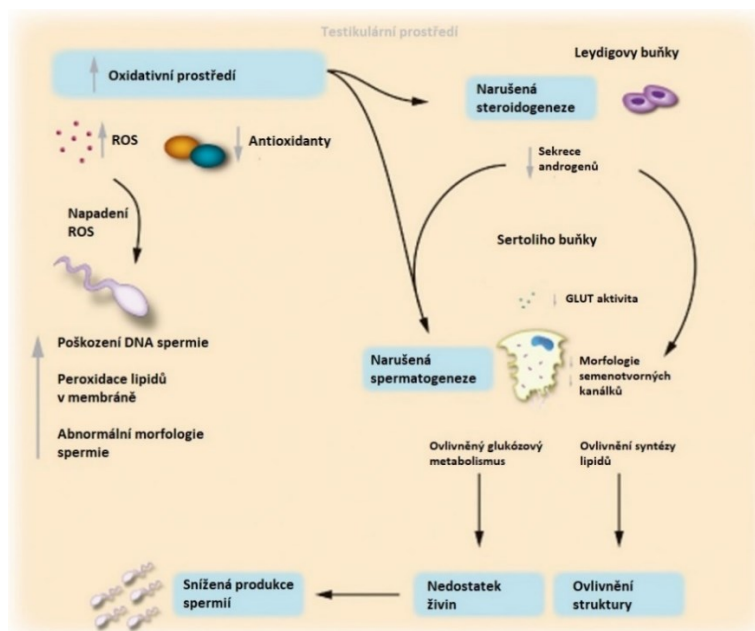
DM2 může způsobovat dlouhodobé poškození, dysfunkce a selhání různých orgánů, mezi něž patří i orgány reprodukčního traktu (ADA, 2014). Vzhledem k výskytu DM2 u stále mladších jedinců, je možné, že ovlivní i fertilitu těchto jedinců (Bener a spol., 2009).

Samčí pohlavní orgány a schopnost reprodukce jsou řízeny pomocí hypothalamo-hypofyzární-testikulární osy (HPT). Hypothalamus produkuje gonadotropin-uvolňující hormon (GnRH), který stimuluje hypofýzu k sekreci folikulostimulačního hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH). FSH ovlivňuje funkci SB, které usnadňují průběh spermatogeneze. LH ovlivňuje funkci LB produkujících testosteron (Ramaswamy a Weinbauer, 2014). Vlivem diabetu je narušena tato osa a dochází ke snížené odpovědi gonadotropinů na GnRH (Rossi & Bestetti, 1981; Baccetti a spol., 2002). u jedinců s DM2 často dochází k hypogonádismu, který je definován jako klinický stav, při kterém je snížena hladina pohlavních hormonů. v tomto případě je pozorován pokles hladiny luteinizačního, folikulostimulačního hormonu a testosteronu (Obr.6) (Dhindsa a spol., 2004; Pontes a spol., 2011; Fan a spol., 2015; Condorelli a spol., 2018; Soliman a spol., 2018).

Vlivem mikro a makro vaskulárních problémů (WHO, 2016) vznikají sexuální dysfunkce. Mezi ně patří: erektilní dysfunkce, která postihuje jedince s DM 3,5 x častěji než kontrolní jedince (Korani & Sonbol, 2018); ejakulační dysfunkce – předčasná ejakulace, anejakulace a retrográdní ejakulace (Pontes a spol., 2011; Fedder a spol., 2013; Lu a spol., 2014; Majzoub a spol., 2016); a snížené libido (Bondarenko a spol., 2012; Al-Kuraishy a Al-Gareeb, 2016).

Důležitou složkou patogeneze DM2 je oxidativní stres působící na reprodukční systém (Obr.7). Snížená aktivita antioxidantních enzymů u varlat a zvýšené množství peroxidovaných lipidů naznačuje, že gonády jsou vystaveny oxidačnímu stresu (Shrilatha a Muralidhar, 2007b; Aguirre-Arias a spol., 2017; Soliman a spol., 2018; Verma a spol., 2018). Vlivem oxidačního stresu při DM2 dochází k regulaci aktivity NADPH oxidázy a MAPK dráhy v testes. MAPK působí jako klíčový regulátor signálních drah souvisejících s buněčnou apoptózou a buněčnou proliferací (Zha a spol., 2018). Při vývoji spermií je

důležitá rovnováha mezi proliferací, diferenciací a apoptózou zárodečných buněk, což je rozhodující pro kontrolu spermatogeneze a vznik kvalitních spermií (Giampietri a spol., 2005). Vlivem metabolické nerovnováhy a oxidačního prostředí v reprodukčních orgánech při DM2 dochází ke zvýšení buněčné smrti a ovlivnění morfologie a funkce reprodukčních tkání (Kushwaha & Jena, 2013).



Obrázek 7: Schéma vlivu DM2 na testes. Dochází k narušení steroidogeneze. Testikulární metabolismus je narušen, což vede k nedostatečnému rozvoji vývoje zárodečných buněk (GC). Vysoká hladina FFA narušuje metabolismus testikulárních lipidů. Dochází k nadprodukci ROS, které cílí na testikulární lipidy, proteiny a plazmatickou membránu spermie.

Převzato od: Rato a spol., 2014

## 2.5.1 Vliv diabetes mellitus 2. typu na váhu reprodukčních orgánů

Normální morfologie a váha reprodukčních orgánů ovlivňuje správný průběh spermatogeneze (Markey a spol., 1995). DM2 ovlivňuje velikost testikulární tkáně a přídatných pohlavních žláz. Již v roce 1963 Hellman a spol. (1963) zkoumali vliv obezity a hyperglykémie na velikost reprodukčních orgánů myši. Zjistili signifikantní zmenšení testes u diabetických jedinců a semenných vaků oproti kontrolním jedincům. Ve studii provedené Ahangarpour a spol. (2015) došlo k signifikantnímu snížení váhy těla u myši s DM2, avšak nepozorovali vliv DM2 na váhu, šířku, délku a objem testikulární tkáně. Ani v další studii tito autoři nepozorovali ovlivnění parametrů testikulární tkáně diabetem (Ahangarpour a spol., 2016).

Naopak Pontes a spol. (2011) ve své studii pozorovali, že diabetičtí potkani měli signifikantně nižší váhu semenných vaků a prostaty než u kontrolní skupiny. Také Long a spol. (2015) pozorovali signifikantní snížení váhy testes a epididymis u potkanů. Váha



testes i epididymu byla signifikantně snížena i v jejich následující studii (Long a spol., 2018).

V další studii Kianifard a spol. (2012) pozorovali signifikantní snížení váhy testes oproti kontrolní skupině. Sníženou váhu reprodukčních orgánů potkanů také pozorovali Soliman a spol. (2018), kdy došlo k signifikantnímu snížení vah testes, epididymis, seminálních vaků a prostatě oproti kontrolní skupině. Shrilatha a Muralidhar (2007a) pozorovali váhu testes potkanů v jednotlivých týdnech od aplikace streptozotocinu. Během 6 týdnů došlo k poklesu váhy testes o 27-49 % oproti kontrolám. Podobně došlo ke snížení váhy epididymis o 26 %, 32 % a 64 % ve 2., 4. a 6. týdnu měření. Tito autoři Shrilatha a Muralidhara (2007b) v další studii tentokrát na myším modelu pozorovali, že ve 2. a 4. týdnu od aplikace streptozotocinu došlo k významnému snížení váhy testes (11-43 %) oproti kontrolám. Váha epididymu poklesla o 18-46 % u diabetických myší ve 2. a 4. týdnu oproti kontrolám.

### **2.5.2 Vliv diabetes mellitus 2. typu na morfologii a morfometrii testes**

Poškození testes vlivem DM2 a jím způsobeným oxidačním stresem je běžné, jelikož dochází k zvýšené apoptotické smrti buněk testes (Kushwaha & Jena, 2013). Hellman a spol. (1963) pozorovali výskyt atrofie Leydigových buněk v testikulární tkáni u diabetických myší oproti kontrolám. Diabetes neměl signifikantní vliv na průměr semenotvorných kanálků. Nezaznamenali známky degenerativních změn v semenotvorném epitelu diabetických myší a správný průběh spermatogeneze nebyl narušen, avšak došlo ke snížení obsahu spermií v lumen kanálku oproti kontrolám.

Shrilatha a Muralidhara (2007b) zkoumali vliv diabetu indukovaného streptozotocinem na testikulární tkáň myší. Během prvních 3 týdnů nepozorovali patologické změny, avšak od 4. týdne v tkáni byly patrné léze u diabetických myší. Také došlo k zmenšení průměru semenotvorných kanálků snížení počtu LB a zhoršení průběhu spermatogeneze. Vlivem zvýšeného oxidativního prostředí došlo k signifikantnímu poškození DNA v testes.

Long a spol. (2018) publikovali, že potkani kontrolní skupiny měli normální testikulární strukturu se spoustou zárodečných buněk a spermií. v diabetické skupině detekovali atrofické semenotvorné kanálky s malým počtem zárodečných buněk a abnormálními spermiemi. Dále pomocí metody TUNEL odhalili značné množství apoptotických buněk v testes, index apoptózy byl 4,8 % u kontrolní skupiny a 23,5 % u diabetické skupiny. Jejich data naznačují, že vlivem hyperglykemie došlo ke zhroucení testikulární struktury a zvýšení počtu apoptotických buněk. i v další práci zárodečné buňky v testes vykazovaly abnormální změny včetně degenerace, dezorganizace a intersticiálního edému. Při hodnocení apoptotického stavu testikulárních buněk, TUNEL-pozitivní buňky

byly zřídka pozorovány v kontrolní skupině. u zárodečných buněk byla pozorována apoptóza, včetně kondenzace chromatinu a cytoplazmatických výběžků (Zha a spol., 2018).

Také další autoři se zabývaly vlivem DM2 na reprodukční parametry, především stav, morfologii a histologii testes. Bondarenko a spol. (2012) pomocí histologické analýzy hodnotili stav testes diabetických potkanů. u diabetické skupiny byly zjištěny degenerativní změny, jako je odchlípnutí epitelu z bazální membrány tubulů, trombóza cév a kanálky bez buněk.

V další zajímavé studii Ricci a spol. (2009) zkoumali vliv indukovaného diabetu u prepubertálních a dospělých potkanů. Zjistili, že v testes obou skupinách diabetických jedinců byl průměr semenotvorných kanálků oproti kontrolám snížený. u mladých potkanů se morfologie kanálků lišila. a to od úplně dezorganizovaného epitelu po částečně dezorganizovaný epitel se zhoršenou organizací buněk. Také u dospělých jedinců byla detekována různá míra poškození kanálků. v lumen většiny poškozených kanálků byly pozorovány oddělené zárodečné buňky v různých vývojových stádiích. u vážněji poškozených kanálků epitel postrádal diferenciované buňky, počínaje meiotickými buňkami. Dále hodnotili stav Leydigových buněk pomocí imunohistochemického barvení. u DM2 jedinců byly LB přítomny, ale jejich distribuce v intersticiálním prostředí byla odlišná oproti kontrolám. Výskyt diabetu v prepubertálním věku zvyšuje procento vážně poškozených tubulů.

### **2.5.3 Vliv diabetes mellitus 2. typu na kvalitu spermií**

Zvýšený obsah tuků ve stravě při vysokotučné dietě (HFD) ovlivňuje složení membrány spermií, kdy v nich narůstá obsah cholesterolu. To má následky ovlivnění integrity membrány spermie a následných dvou dějích spojených s vlastnostmi membrány spermie, a to kapacitaci a akrozomální reakci (Visconti a spol., 1999; Lancellotti a spol., 2010).

Fan a spol. (2015) zkoumali vliv HFD diety na kvalitu myších spermií a zjistili, že celková motilita a progresivní motilita výrazně poklesla ve skupině s HFD oproti kontrole. Dále zjistili, že procento akrozom reaktivních spermií v HFD skupině je výrazně nižší než procento u kontrolní skupiny. To vysvětlilo i nižší procento oplozených samic po připuštění se samci. Ve studii provedené na myším modelu autoři Ahangarpour a spol. (2015) pozorovali u diabetické skupiny signifikantně sníženou koncentraci spermií získaných z epididymu i jejich životnost. v publikaci autorů Shrilatha a Muralidhara (2007b) došlo u diabetických myší k signifikantnímu snížení počtu spermií ve srovnání s kontrolami již během 1. týdne. Pokles koncentrace spermií byl progresivní a časově

závislý. u diabetických jedinců došlo až k 12násobnému zhoršení morfologie a výskytu abnormálních spermií.

Řada dalších autorů se zabývala hodnocením kvality i kvantity spermií v diabetickém prostředí. Bondarenko a spol. (2012) ve své studii hodnotili koncentraci spermií u diabetických potkanů a zjistili pokles koncentrace spermií u diabetických jedinců o 39 % oproti kontrolní skupině. Další autoři Long a spol. (2018) zjistili, že u diabetické skupiny potkanů došlo k významnému snížení koncentrace spermií oproti kontrolní skupině, narušení morfologie hlavičky, střední části a bičíku spermie u diabetických jedinců oproti kontrole.

Aguirre-Arias a spol. (2017) zjistili, že došlo u diabetické skupiny k nárůstu imotilních spermií oproti kontrolám. Spermie vykazovaly zvýšený podíl apoptotických buněk oproti kontrole. Podobné výsledky získali i další autoři, kteří publikovali významné snížení pohyblivosti a životaschopnosti spermií u diabetických potkanů ve srovnání s kontrolní skupinou (Bahmanzadeh a spol., 2016).

Wei a spol. (2014) zjistili, že prediabetes navozený pomocí HFD a dávky STZ ovlivňuje metylační vzor v jádře spermie. Jejich výsledky ukazují, že epigenom spermie je ovlivňován životním stylem a životním prostředím.

#### **2.5.4 Vliv onemocnění diabetes mellitus na genetickou informaci spermie**

Relativně novým přístupem v hodnocení kvality spermatu při vyšetřování fertility je hodnocení chromatinu spermií. Vzhledem k tomu, že samčí gamety přispívají z 50 % svou genetickou informací do embryonálního genomu, případné anomálie mohou ovlivnit embryonální vývoj.

Autoři Mangoli a spol. (2013) zkoumali vliv DM1 na spermie v myším modelu. Výsledky ukázaly škodlivé účinky diabetu na integritu DNA spermií, jejich studie je první, která prokazuje vztah mezi kvalitou chromatinu spermií a DM. i další studie zkoumající vliv DM1 na myší spermie (Talebi a spol., 2014). i tito autoři prokázali vliv DM1 na integritu DNA spermie.

Autoři Pavlinkova a spol. (2017) zkoumali vliv navozeného DM1 u paternální linie na kvalitu spermií s možným přenosem na potomstvo. u otcovské diabetické skupiny došlo k signifikantnímu poklesu koncentrace spermií oproti kontrole, u F1 a F2 nebyly pozorovány rozdíly. Dále zjistili změny u barvení pomocí standardních cytochemických technik, a to jen otcovské generace, kdy došlo ke snížení kvality sbalené DNA. Pro přesnější hodnocení kvality jaderné DNA, byl hodnocen poměr protaminů (P1 a P2). k pozměnění poměru protaminů došlo u všech 3 zkoumaných generací.

Doposud nebylo publikováno příliš mnoho studií, kde by byl hodnocen vliv DM2 na genetickou informaci spermií. v jedné studii byl zkoumán vliv DM2 na kvalitu DNA potkanů pomocí cytochemických metod. Autoři Bahmanzadeh a spol. (2016) zjistili, že průměrný podíl ssDNA u diabetických potkanů byl vyšší než u kontrolní skupiny.

### **3. Cíle diplomové práce**

Cílem této práce bylo zjistit vliv indukovaného onemocnění diabetes mellitus 2. typu na vybrané reprodukční parametry u myši inbrední linie C57BL/6J v porovnání s kontrolní skupinou a možný vliv paternálního diabetu na první filiální generaci.

Specifické cíle:

1. Určit vliv DM2 na váhu těla a reprodukční orgány.
2. Zhodnotit kvalitu spermií (koncentrace, morfologie, separace bičíku, apoptotický stav, přítomnost intraakrozomálních proteinů).
3. Zjistit poměr jaderných proteinů protaminů P1/P2.
4. Otestovat histologii testes (morfologie, morfometrie, imunohistochemie).
5. Semikvantitativně detekovat vybrané testikulární proteiny.

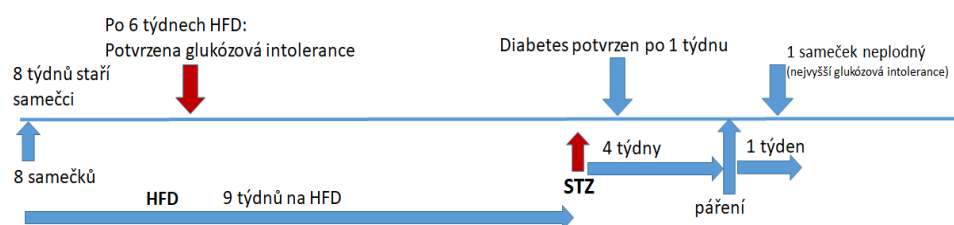
## 4. Metody

### 4.1 *In vivo* pokus na myším modelu

Vliv diabetu byl zkoumán na myším inbredním kmenu C57BL/6J. Vybrán byl tento myší kmen, protože při krmení vysokotučnou dietou dochází ke vzniku obezity, mírné až střední hyperglykémii a hyperinsulinémií (Jackson Laboratory, 2019). Všechny myši byly chovány ve zvěřinci Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v.v.i v Praze. Zvířata byla chována za standardních podmínek tzn. 12 hodinový světelný režim, stálá teplota a přístup k vodě a potravě *ad libitum*. Experiment byl proveden se souhlasem Etické komise a v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992.

Studie probíhala na rodičovské (P) a první filiální generaci potomků připravených zkřížením rodičovských jedinců (F1). Navození diabetes mellitus 2. typu probíhalo od 7. týdne života. Samci byli krmeni vysokotučnou dietou (60 % energie z tuků, ssniff® EF acc. D12492 (I) mod.). Myším byla každý týden experimentu měřena hladina glukózy v krvi. Po 6, 7 a 8 týdnech na vysokotučné dietě byl myším udělán glukózový toleranční test. Po 8 týdnech vysokotučné diety byla myším aplikována jedna dávka streptozotocinu - 100 mg/kg živé hmotnosti zvířete. Streptozotocin byl před injekcí čerstvě připraven rozpuštěním v 0,1 M sodno-citrátovém pufru (pH 6) (Bio-optica). Po dvou týdnech od injekce streptozotocinu byli samci P generace připuštěni na 1 týden k samicím k přípravě F1 generaci (Obr. 8). v F1 generaci byli všichni samci již na standardní stravě. Samci F1 generace byli připuštěni k samicím ve věku 9 týdnů, aby dali vzniknout F2 generaci.

Kontrolní skupina a F1 skupina byla krmena standardní stravou, granulemi bez obsahu sóji (LASvendi, Soest). Všechny testy u kontrolní skupiny byly dělány v adekvátním věku ve vztahu k experimentální skupině. v P generaci bylo použito v experimentální skupině 8 samců a v kontrolní skupině 10 samců, v F1 generaci bylo použito 9 samců v kontrolní skupině (1 v průběhu testování uhynul) a v experimentální skupině bylo 8 samců.



Obrázek 8: Schéma postupu navození Diabetes mellitus 2. typu

K zjištění hladiny glukózy v krvi byl použit glukózový toleranční test, který měří úbytek hladiny glukózy v krvi v čase. Používá se k detekci poruch metabolismu glukózy, které mohou být spojeny s metabolickým syndromem či diabetem.

Myšim byla 6 hodin před provedením testu odebrána potrava, voda jim byla ponechána. Myši byly nejprve zváženy, následně jim byla změřena hladina glukózy v krvi pomocí glukometru (COUNTOUR TS, Bayer) v čase 0. Čerstvě připravený 20% glukózový roztok (2 g glukózy/ kg živé váhy zvířete) byl dle váhy zvířete ( $V(\mu\text{l}) = 10 \times \text{váha těla (g)}$ ) intraperitoneálně injikován. Následně byla změřena hladina glukózy v krvi v intervalu 15, 30, 60 a 120 minut od podání glukózy. Hladiny glukózy v krvi nad 13,9 mmol/l byla klasifikována jako diabetická. Po ukončení testu byla myšim navrácena potrava.

#### **4.2 Zjištění hmotnosti těla a vybraných orgánů, měření anogenitální vzdálenosti**

Po usmrčení myši byla změřena anogenitální vzdálenost (od středu konečníku po začátek šourku) a zvážena hmotnost těla. Očištěné vypreparované orgány byly váženy na analytický vahách (testes, epididymis, semenné vaky, prostata, játra, ledviny a slezina). k dalšímu zpracování použity obě caudy epididymis a levé testes.

#### **4.3 Zpracování spermií a příprava preparátů**

Vypreparované caudy epididymis byly vloženy do mikrozkušavky s 1 ml fosfátového pufovaného fyziologického roztoku (PBS) temperovaného na 37 °C. Orgány byly v mikrozkušavce nastříhány na drobné kousky, aby došlo k snadnějšímu vyplavení spermií. Vzorky byly vloženy do 5% CO<sub>2</sub> inkubátoru při teplotě 37 °C na dobu 15 minut, přičemž byly opakovaně protřepány v intervalu 5 minut, aby bylo usnadněno vyplavení spermií z tkáně. Buněčná suspenze byla přefiltrována přes 30 μm síto (Partec) a doplněna do objemu 1 ml roztokem PBS.

Z takto připravené buněčné suspenze bylo přeneseno 20 μl suspenze k 180 μl PBS. Takto připravená suspenze byla použita pro zjištění koncentrace buněk pomocí Bürkerovy hematocytometrické komůrky podle pokynů výrobce. 10 μl suspenze bylo nanášeno do počítací komůrky a spermie byly spočítány při 200násobném zvětšení na světelném mikroskopu (Nikon Eclipse 50i). z této suspenze byly připraveny preparáty pro další testy.

##### **4.3.1 Detekce apoptózy pomocí Annexinu V**

Pro mikroskopické preparáty byl využit kit APO-AF (Annexin v – FITC Apoptosis Detection kit, Sigma-Aldrich). k 90 μl dH<sub>2</sub>O bylo přidáno 10 μl 10x koncentrovaného vazebného pufru – vznikl 1x koncentrovaný vazebný pufr, do něhož byl přidán 1 μl spermií, které byly odebrány z pelety, která vznikla centrifugací při 1000 g 15 minut. Nakonec byl přidán 1 μl roztoku Annexin V. Vše bylo resuspendováno a uloženo

k 10minutové inkubaci ve tmě při pokojové teplotě. z resuspendované suspenze bylo odebráno 2 x 10  $\mu$ l, nakapáno na podložní sklíčko a necháno v temnu v termostatu zaschnout při 37 °C. Zaschlé sklo bylo opláchnuto roztokem PBS s 0,02% Tween-em (PBT) a následně dH<sub>2</sub>O. Na osušený preparát bylo nanášeno montovací médium (Vectashield with DAPI, Vector Laboratories) s obsahem DAPI pro obarvení buněčných jader. Připravené preparáty byly hodnoceny na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse E400 a objektivu Plan Apo VC 60x s imerzním olejem. Hodnoceno bylo 200 buněk.

### **4.3.2 Chromomycinové barvení a morfologie spermií**

Zhotovené preparáty na podložním sklíčku byly fixovány v Carnoyova roztoku (methanol a kyselina octová v poměru 3:1) po dobu 15 minut při 4 °C. Poté byl roztok promýván 5 minut v McIlvainově roztoku (pH 7.0; 16,47 ml 0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 2,53 ml 0,1M kyselina citrónová). Na preparáty byl nanášen roztok chromomycinu A3 (CMA3, Sigma – Aldrich) (0,25 mg/ml CMA3 v McIlvainově pufru s 10 mM MgCl<sub>2</sub>). Preparáty byly inkubovány 25 minut při 37 °C. Následně byly promývány McIlvainovým roztokem 2 x 5 minut a destilované vodě 1 x 5 minut. Po osušení bylo na preparáty nanášeno montovací médium Vectashield s DAPI. Vzorky byly hodnoceny na fluorescenčním mikroskopu (Nikon Eclipse E-400, objektiv Plan Apo VC 60x, kanál FITC vlnová délka excitace 495 nm/ emise 519 nm) s imerzním olejem. Bylo hodnoceno 200 buněk, přičemž pozitivně značené buňky značily špatně sbalenou DNA v jádře.

#### **4.3.2.1 Morfologický stav spermie**

Pro hodnocení morfologie spermií a separaci hlavičky byly rovněž používány spermie značené chromomycinem A3. Při vyhodnocování byl využit fázový kontrast a objektiv Plan Apo VC 60x. Hodnoceno bylo 200 buněk, jak pro hodnocení morfologie hlavičky, tak i pro hodnocení separace hlavičky.

### **4.3.3 Nepřímé imunofluorescenční značení intraakrozomálních proteinů**

Spermie byly permeabilizovány 15 minut při pokojové teplotě pomocí 50  $\mu$ l permeabilizačního roztoku SpermFlowEx Kit (Exbio). Sklíčka byla opláchnuta roztokem PBT. Na vlhká sklíčka bylo nanášeno 50  $\mu$ l 2% blokačního roztoku (hovězí sérový albumin s PBS, Sigma-Aldrich) + 10% normální kozi sérum (NGS v PBS, Vector Laboratories) na 60 minut při pokojové teplotě. Byly použity primární protilátky proti intraakrozomálním proteinům GAPDHS a TERA, které byly připravené v naší laboratoři. Primární protilátky byly ředěny blokačním roztokem 1:3. Preparáty byly inkubovány s 60  $\mu$ l roztoku protilátky, při 4 °C přes noc. Vzorky byly opláchnuty roztokem PBT. Byla nanášena



sekundární protilátka Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgM (H+L) (1:500, Invitrogen). Vzorek byl inkubován 60 minut při 37 °C. Opláchnutý vzorek s PBT a následně s dH<sub>2</sub>O, byl vysušen a bylo nanášeno montovací médium Vectashield s DAPI. Takto připravené vzorky byly hodnoceny na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse E400 a objektivu Plan Apo VC 60x. Hodnoceno bylo 200 buněk a bylo spočítáno procentuální zastoupení pozitivně značených akrozomů vůči negativním.

#### 4.4 Izolace protaminů

Pro izolaci jaderných proteinů protaminů byl použit aliquot buněk o koncentraci  $4 \times 10^6$  buněk spermií/ml. k peletě buněk bylo přidáno 56  $\mu$ l permeabilizačního pufru (20 mM Tris-HCl (pH 8), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% Triton Tx-100) a suspenze byla důkladně resuspendována a následně centrifugována 5 minut při 9 000 g a 4 °C. Po odsátí supernatantu bylo k peletě přidáno 56  $\mu$ l 1 mM roztoku fenylmethylsulfonyl fluoridu (PMSF) (Sigma-Aldrich), který inhibuje proteázy. Suspenze byla důkladně resuspendována a následně centrifugována 5 minut při 9 000 g a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v 15  $\mu$ l extrakčního roztoku (1 mM PMSF, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH=8)). k této suspenzi bylo přidáno 15  $\mu$ l denaturačního roztoku (575 mM dithiotreitol, 6 M guanidinium chlorid) a vše bylo velmi důkladně resuspendováno.

A dále bylo přidáno 15  $\mu$ l roztoku 0,8% vinylpyridinu pro inhibici disulfidických můstků a následně inkubováno při teplotě 37°C po dobu 30 minut s pravidelným protřepáváním v intervalu 5 minut. Po inkubaci bylo přidáno 250  $\mu$ l 100% ethanolu o teplotě -20 °C. Suspenze byla důkladně protřepávána do objevení se vysrážené DNA a poté byly jednotlivé vzorky inkubovány po dobu minimálně 2 hodin při teplotě -20 °C. Po inkubaci byla buněčná suspenze centrifugována při 13 000 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl odsát a k peletě bylo přidáno 143  $\mu$ l 0,5 M HCl, vše bylo resuspendováno. s následnou inkubací při 37°C po dobu 5 a 2 minuty s protřepáním. Po ukončení inkubace byl vzorek centrifugován 10 minut při otáčkách 17 600 g při 4 °C. Pro další kroky byl použit supernatant, který byl přenesen do nové popsané mikrozkuhavky. k supernatantu bylo přidáno 36  $\mu$ l kyseliny trichloroctové a suspenze byla inkubována při 4 °C po dobu 10 minut, přičemž každé 2 minuty byla mikrozkuhavka protřepána. Poté byl vzorek po dobu 10 minut při 4 °C centrifugován při otáčkách 17 600 g. Supernatant byl odstraněn a do mikrozkuhavky bylo přidáno 143  $\mu$ l 1% b-mercaptoethanolu v acetonu. Vzorky byly sušeny v centrifugačním vakuovém koncentrátoru (Modul 4080C, Hanil science medical) 10 minut při 4 °C. Vzorky byly resuspendovány ve 12  $\mu$ l vzorkovém pufru (5,5 M urea, 20% b-mercaptoethanol a 5 % kyselina octová), a nanášeny do gelu pro elektroforetickou

separaci proteinů. Veškeré výše zmíněné chemikálie byly od firmy Sigma-Aldrich, pokud není uvedeno jinak.

#### **4.4.1 Elektroforetická separace proteinů protaminů**

Pro elektroforetickou separaci byl použit kyselý urea polyakrylamidový gel (2,5 M ureu, 12,5 mM thioureu, 0,9 M kyselinu octovou, 15% akrylamid, 0,1% bis-akrylamid a 0,12% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (vše Sigma-Aldrich). Po polymeraci gelu byla sestavena elektroforetická aparatura a gely byly 5 minut ekvilibrovány v 0,9 M kyselině octové. Do jamek bylo nanášeno po 2,5 µl vzorků a do volných jamek bylo nanášeno 5 µl vzorkového pufru s 10% metylovou zelení. Vzhledem k tomu, že protaminy jsou bazické proteiny, byla použita přepólovaná elektroforéza při stálém napětí 110 v po dobu 90 minut. Gel byl nabarven roztokem EZBlue (Sigma-Aldrich) dle doporučení výrobce. Gel byl naskenován. Pomocí programu Image-J (Image-J) byl u každého vzorku hodnocen poměr denzit proteinů P1 a P2.

#### **4.5 Histologie testes**

Pro přípravu histologických preparátů bylo použito levé testes, které bylo po zvážení vloženo do zkumavky s 10% formalínem. Po 48 hodinách až jednom týdnu ve 4 °C bylo testes promýváno v PBS, 25%, 50% a 70% ethanolu a to vždy minimálně půl dne. Takto promyté testes bylo vloženo do kazety a odvodňováno v laboratoři Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i. v odvodňovacím procesoru IKEM like, Formol/Ethanol START RMS. Připravený vzorek byl zalit do parafínu (Histovax). Testes byla nařezána na tloušťku 6 µm a přichycena na podložní sklíčka.

Pro další testování musely být řezy odparafinovány. Sklíčka byla vložena na 3 x 5 minut do roztoku Diasolv (DiaPath). Řezy byly rehydratovány v ethanolové řadě – 96%, 80%, 70%, 50%, a nakonec v destilované vodě, přičemž každý krok trval 5 minut.

##### **4.5.1 Hematoxylin-eosinové barvení a hodnocení morfologie testes**

Po rehydrataci byly řezy barveny. Vzorky byly vloženy na 1 minutu do roztoku Mayerův Haematoxilin (DiaPath), aby se obarvila jádra buněk. Po 5minutovém propláchnutí destilovanou vodou byly vzorky zkontrolovány pod mikroskopem a opláchnuty kyselým alkoholem (96% ethanol + HCl), aby se odbarvila okolní tkáň. Dále byl použit 0,5% Eosin Goy (Dia-Path), do které byly preparáty vloženy na cca 3 sekundy. Vzorky byly propláchnuty a zkontrolovány pod mikroskopem. Poté byly vzorky odvodňovány v ethanolové řadě 70%, 80%, 90%, 96%, kam byly na 3 vteřiny vloženy. Ve

100% alkoholu byly vzorky ponechány 5 minut. Dále byly vloženy do roztoku Diasolv na 2 x 3 minuty.

Na podložní sklíčka bylo nanášeno montovací médium (DPX Mountant for histology, Sigma-Aldrich), které bylo položeno krycí sklíčko. Vzorek byl ponechán do druhého dne v digestoři, aby montovací médium zaschlo.

Histologie testes byla hodnocena ve světelném mikroskopu (Nikon Eclipse 50i) při 200násobném zvětšení. Byly pořízeny snímky tkáně (kamera Nikon DS-Fi2), které byly vyhodnoceny. Na každý vzorek bylo spočítáno 100 kanálků, přičemž pro každou skupinu, experimentální a kontrolní, bylo použito 8 vzorků. Hodnoceny byly morfologicky normální, prázdné, nediferenciované a patologické kanálky a bylo spočítáno jejich procentuální zastoupení.

#### **4.5.2 Imunofluorescence s reaktivací antigenů**

Odparafinované a rehydratované preparáty byly propláchnuty 1 x 5 minut v PBS, 2 x 5 minut v čerstvě připraveném roztoku PBT a 2 x 5 minut v PBS. Reaktivace antigenu probíhala v papíňáku v 10mM citrátovém pufru pH 6,00 po dobu 15-20 minut. Vzorky byly chlazeny v 200 ml čerstvě připraveného 0,1% PBT, kde byly nechány 10 minut. Poté byly propláchnuty 2 x 5 minut v PBS. Lehce osušená skla byla inkubována 60 minut s 10% NGS (Jackson) v 0,1 % PBT (1 NGS : 10 PBT). Primární protilátka byla ředěna v 10% NGS v PBT. Použity byly následující protilátky:

1. Rabbit polyclonal antibody anti-Connexin 43 (1:2000, Sigma)
2. Mouse monoclonal antibody anti-SCP3 (SYCP3) (1:100, Abcam)
3. Negativní kontrola

Vzorky byly inkubovány s primární protilátkou přes noc při teplotě 4 °C. Následujícího dne byly vzorky 3 x 10 minut promývány v PBS. Inkubovány byly se sekundární protilátkou při pokojové teplotě po dobu 2 hodin. Sekundární protilátka byla ředěna v 10% NGS v PBT. Použity byly následující protilátky:

1. Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG (H+L) (1:500, Invitrogen)
2. Alexa Fluor 594 goat anti rabbit IgG (H+L) (1:400, Invitrogen)

Vzorky byly promyty 3 x 5 minut v PBS a 1 x 10 minut v destilované vodě. Následně byly montovány pomocí montovacího média Vectashield s DAPI.

Preparáty byly hodnoceny na fluorescenčním mikroskopu (Nikon Eclipse E-400) při 200násobném zvětšení. Byly pořízeny snímky tkáně (CCD Progres MF), které byly následně hodnoceny.

Vzorky značené primární protilátkou proti SYCP3 (meiotický marker, protein synaptonemálního komplexu) byly hodnoceny v programu Adobe Photoshop CS3. Bylo hodnoceno 6 vzorků experimentální skupiny a 6 vzorků kontrolní skupiny. z každého

vzorku bylo hodnoceno minimálně 30 kanálků. Byla spočítána plocha kanálku, obvod kanálku, průměr kanálku a průměr lumen kanálku, z čehož byla spočítána tloušťka epitelu, počet značených SYCP3 buněk na plochu kanálku, a také bylo zhodnoceno, v jaké fázi spermiogeneze se kanálek nachází – a: I-III, b: IV-VI, c: VII-VIII a d: IX-XII.

Vzorky značené primární protilátkou proti konexinu 43 (marker Gap junction, jeden z proteinů tvořící gap junction) byly hodnoceny v programu ImageJ, kde byla udělána relativní kvantifikace značení konexinem 43 v intersticiální tkáni obsahující Leydigovy buňky. Bylo hodnoceno 6 experimentálních a 6 kontrolních jedinců, přičemž u experimentálních jedinců byla provedena kvantifikace 198 oblastí a u kontrolních jedinců 271 oblastí.

#### **4.6 Izolace proteinů z testes**

Proteiny byly izolovány z pravého testes pomocí Tri Reagent kitu (Sigma-Aldrich). Po zvážení na analytických vahách byl ke tkáni přidán 1 ml Tri Reagentu. Tkáň byla homogenizována (Precellys 24, Bertin Technologies) a nechána 5 minut inkubovat při pokojové teplotě. k homogenitu byl přidán 0,1 ml bromchlorpropan a preparát byl inkubován 15 minut. Směs byla stočena při 12 000 g po dobu 15 minut a 4 °C. Po tomto kroku došlo k rozdělení fázi – spodní proteiny, střední DNA a horní fáze RNA. Dále byla používána fáze s proteiny.

Předem byl připraven vymražený aceton. Na 100 µl vzorku byl přidán 1 ml acetonu. Vše bylo uchováno na ledu. Vzorky byly několikrát rozvolněny a přes noc byly nechány v mrazáku, aby došlo k vysrážení proteinů. Následující den byly vzorky opět rozvolněny a centrifugovány při 12 000 g po dobu 15 minut při 4 °C. Supernatant byl odstraněn a vzorky byly opět centrifugovány při 12 000 g a po dobu 1 minuty při 4 °C. Supernatant byl odstraněn a otevřená mikrozkuhavka byla vložena na led, aby došlo k odpaření zbylého acetonu. k peletě bylo přidáno 300 µl 10% SDS a peleta byla resuspendována. Vzorek byl zahřát na 95 °C na 1 minutu. Poté byl stočen na 5 000 g 90 sekund při pokojové teplotě. k 90 µl vzorku (supernatantu) bylo přidáno 10 µl 2x koncentrovaného SDS vzorkového pufru (20% glycerol, 40 ml 10% SDS, 16 ml 1M Tris (pH=6,8), 5 mg bromfenolová modř).

#### **4.7 Elektroforetická separace proteinů**

K elektroforetické separaci byla použita vertikální elektroforéza a 12% SDS-polyakrylamidový gel silný 1 mm. Do jamky bylo vneseno 6 µl vzorku. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad). Elektroforéza byla zalita Tris-glycinovým SDS pufrem (22 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1%

SDS, dH<sub>2</sub>O). Vlastní elektroforéza probíhala ve dvou stupních a to 15 minut při konstantním napětí 80V na zaostřovací gel a 50 minut při 140V na dělicí gel.

#### **4.8 Western Blot – přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu**

Nitrocelulózová membrána (Millipore membrane, Merck) byla 10 minut ekvilibrována v transferovém pufru (192 mM glycin, 25 mM Tris, 20% CH<sub>3</sub>OH, dH<sub>2</sub>O). Taktéž byl blotovacím pufrům opláchnut SDS-polyakrylamidový gel. Byla sestavena transferová souprava: houba, 2 vrstvy Whatmanova papíru, gel, nitrocelulózová membrána, 2 vrstvy Whatmanova papíru, houba. Transferová souprava byla uzavřena a vložena do blotovacího zařízení Biorad Mini-transblot modul s blotovacím pufrům a ledem. Uzavřená souprava byla vložena do nádoby s ledem. Transfer proteinů probíhal při konstantním proudu 500 mA 1 hodinu 10 minut.

#### **4.9 Imunodetekce vybraných proteinů**

Nitrocelulózová membrána byla propláchnuta roztokem PBT a inkubována v 5% roztoku mléka po dobu 1 hodiny za stálého třepání. Protilátka mouse anti-VCP (MA3-004, Pierce) byla ředěna v 1% mléku (1:300). Membrána byla s primární protilátkou inkubována přes noc při 4 °C za stálého třepání. Jako referenční protein byl použit  $\alpha$ -tubulin detekovaný pomocí protilátky (Mouse monoclonal anti- $\alpha$  tubulin, clone DM1A, Sigma; 1:5000). Membrána byla promývána v PBT 6 x 10 minut a poté inkubována se sekundární protilátkou Goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad, 1:3000), poté byly 6 x 10 minut promývány v PBT. Na membránu byl nanesen chemiluminiscenční substrát SuperSignal West Pico Chemiluminiscent (Thermo Pierce). Signál byl vyvolán na zařízení AZURE c600 (Azure Biosystems).

#### **4.10 Statistická analýza**

Statistická analýza dat byla vyhodnocena programem R Studio 8.2 (R-studio) a grafické výstupy byly připraveny v programu Graphpad Prism 8.0 (GraphPad, Software) a Microsoft Excel (Microsoft). Váhy orgánů a anogenitální vzdálenosti byly hodnoceny metodou analýzy kovariace (ANCOVA), jako kovariát byla použita váha těla a data byla hodnocena pro experimentální a kontrolní skupinu. Fertilizační schopnost jedinců byla hodnocena pomocí binomického testu. Data biochemických parametrů, parametrů spermií a histologické analýzy testes byla testována na normální rozložení hodnot pomocí Shapirova-Wilkova testu. v případě normálního rozložení dat, výsledky byly testovány pomocí t-testu. v případě nenormálního rozložení dat, výsledky byly testovány pomocí Wilcoxonova testu. Korelace mezi jednotlivými sety dat byla vypočítána pomocí

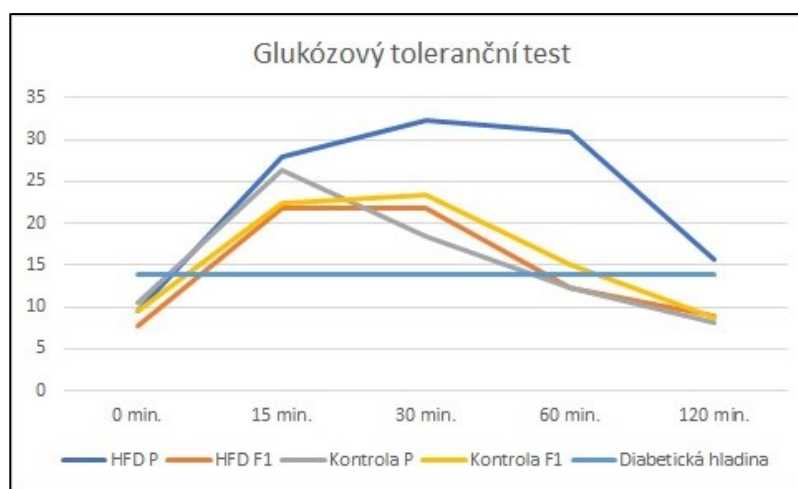
Pearsonova korelačního koeficientu (r). Výsledky byly zapisovány ve formátu mean ± SD. Hodnota P menší než 0,05 byla považována za statisticky signifikantní (\*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 a \*\*\*\*P<0,0001).

## 5. Výsledky

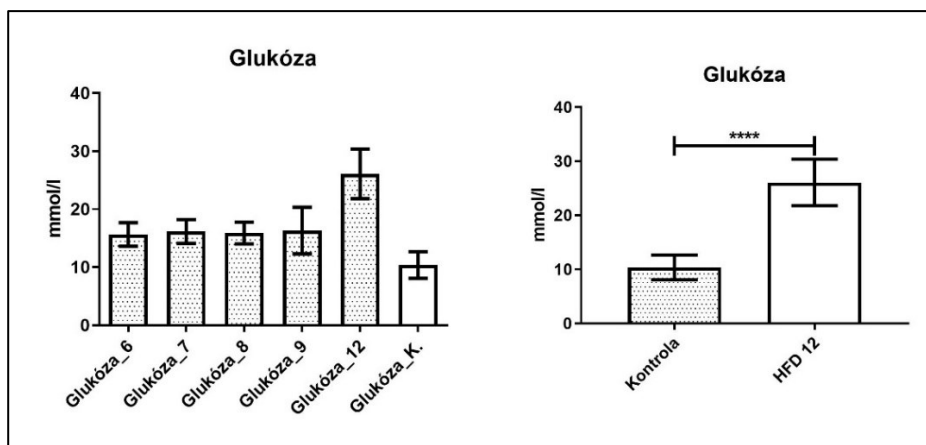
### 5.1 Výsledky experimentů *in vivo*

V experimentu byli porovnáváni experimentální samci s navozeným DM2 z parentální generace (P) s kontrolní skupinou myši, u první filiální generace (F1) byli srovnáváni potomci experimentální skupiny a kontrolní skupiny.

Pro potvrzení diabetického stavu byl zvířatům udělán glukózový toleranční test, kde byla sledována hladina glukózy v čase. z grafu 1 je patrné, že experimentální skupina paternální generace byla diabetická, jelikož se do 120 minut hladina glukózy nevrátila pod kritickou hladinu glukózy 13,9 mmol/l. Při pravidelném měření hladiny glukózy v krvi při navozování DM2 u P generace došlo k postupnému nárůstu hladiny glukózy v průběhu 12 týdnů. Ve 12. týdnu experimentu byly pozorovány signifikantní změny v hladině glukózy mezi kontrolní skupinou ( $10,39 \pm 2,29$  mmol/l) a diabetickou skupinou ( $26,09 \pm 4,28$  mmol/l) ( $P < 0,0001$ ; t-test) (Obr.9). v F1 generaci byli také pozorovány signifikantní změny v hladině glukózy mezi kontrolní ( $10,01 \pm 1,73$  mmol/l) a experimentální skupinou ( $12,46 \pm 1,31$  mmol/l) ( $P < 0,01$ ; t-test).

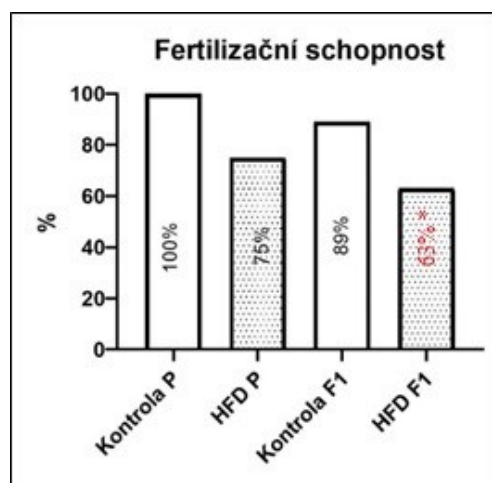


Graf 1: Glukózový toleranční test dělaný u P generace v 21.týdnu života a u F1 generace dělaný v 10. týdnu života



Obrázek 9: Hladina glukózy v krvi v 6,7, 8, 9 a 12 týdnu experimentu u experimentální skupiny a 12 týdnu kontrolní skupiny v P generaci Mean±SD.(\*\*\*\*P<0,0001). P generace kontrolní skupina N=10, experimentální skupina N=8

Vliv DM2 neměl vliv na počet potomků ve vrhu v parentální generaci. v případě experimentální skupiny porodilo 6 samic ze 7. u kontrolní skupiny porodilo 7 samic ze 7. Avšak došlo k ovlivnění počtu potomků ve vrhu F1 generace, kdy fertilizační schopnost kontrolní skupiny byla 89 % a experimentální skupiny byla 63% (P<0,05; binomický test) (Obr.10). v experimentální skupině porodilo 5 samic z 8 a v kontrolní skupině 8 samic z 9.



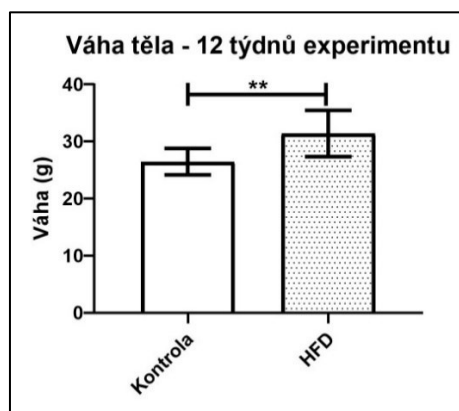
Obrázek 10: Grafické znázornění fertilizační schopnosti u parentální a první filiální generace Mean±SD. (\*P<0,05). P generace kontrolní skupina N=7, experimentální skupina N=7, F1 generace kontrolní skupina N=9, experimentální skupina N=8

## 5.2 Váha těla a orgánů, AGD a počet potomků

Po 12 týdnech na HFD experimentální myši měly o 16 % vyšší váhu těla ( $31,4 \pm 4,06$  g) než skupina kontrolní ( $26,47 \pm 2,31$  g) (P<0,01; t-test) (Obr.11). u F1 generace (stáří 9 týdnů) byl pozorován rozdíl ve váze těla mezi experimentální



( $24,95 \pm 1,73$  g) a kontrolní skupinou ( $26,33 \pm 1,51$  g) ( $P < 0,01$ ; t-test). Vzhledem k různému stáří myší v P a F1 generaci, váhy těla a orgánů nemohly být spolu porovnávány.



Obrázek 11: Váha těla ve před pářením u P generace. Mean $\pm$ SD (\*\* $P < 0,01$ ) P generace kontrolní skupina N=10, experimentální skupina N=8

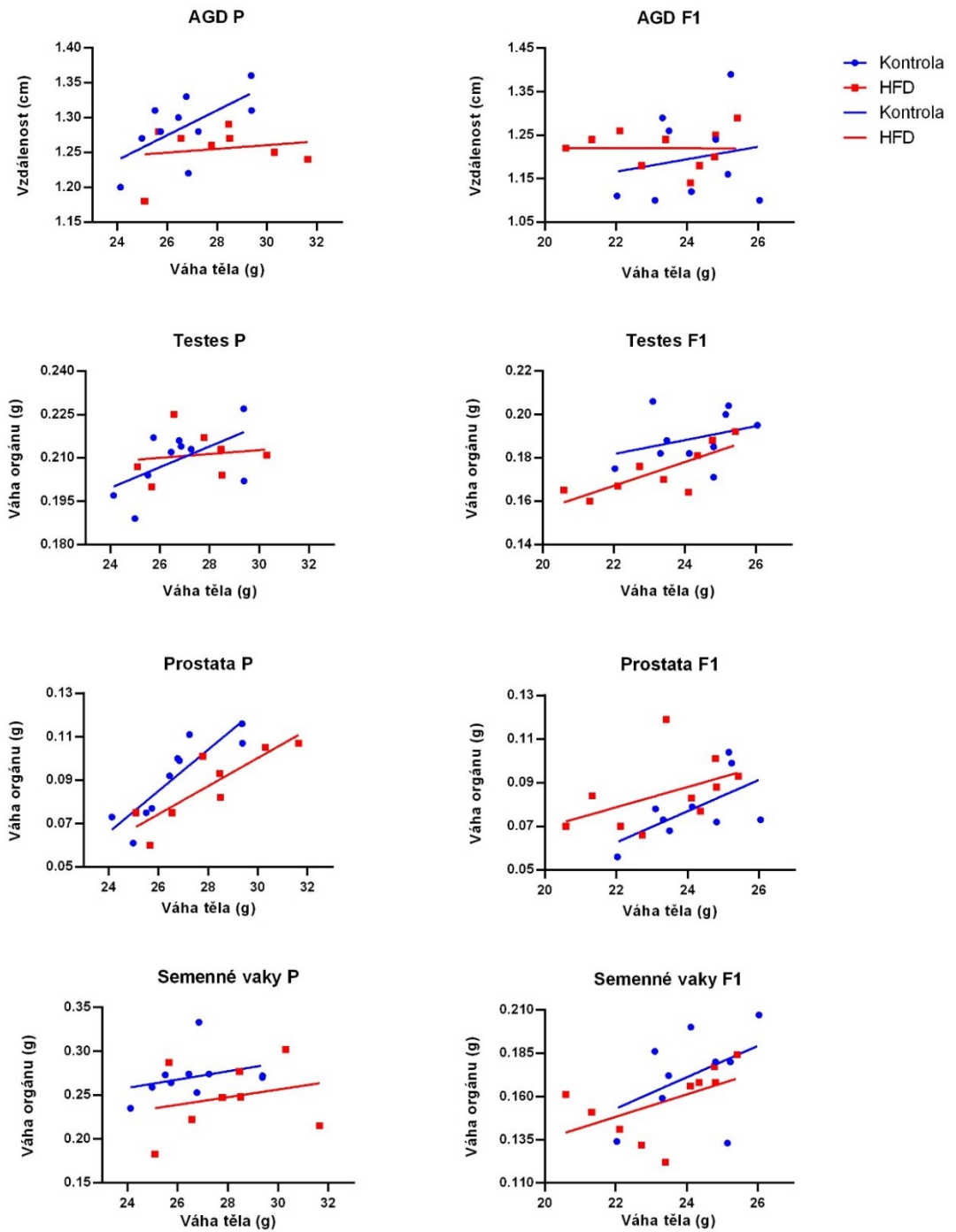
Po usmrcení myší byla měřena anogenitální vzdálenost a váha jednotlivých reprodukčních orgánů. Výsledky diabetické a kontrolní skupiny P a F1 generace jsou zobrazeny v Obr.12.

Analýza ANCOVA ukázala, že naše prediktory neměly signifikantní vliv na anogenitální vzdálenost u P generace (experimentální skupina ( $1,26 \pm 0,03$  cm), kontrolní skupina ( $1,29 \pm 0,04$  cm)) ( $P=0,67$ ) ani u F1 generace (experimentální skupina ( $1,22 \pm 0,05$  cm), kontrolní skupina ( $1,20 \pm 0,1$  cm)) ( $P=0,85$ ). Váha testes u P generace nebyla experimentem ovlivněna (experimentální skupina ( $0,21 \pm 0,01$  g) jedna hodnota byla kvůli odlehlosti vyřazena, kontrolní skupina ( $0,21 \pm 0,01$  g)) ( $P=0,22$ ; ANCOVA). Avšak u F1 generace došlo k poklesu váhy testes u experimentální skupiny ( $0,17 \pm 0,01$  g) oproti skupině kontrolní ( $0,19 \pm 0,01$  g) ( $P < 0,01$ ; ANCOVA). Variační tabulka ukázala, že váha testes v F1 generaci byla signifikantně ovlivněna experimentem ( $P < 0,01$ ). v případě váhy epididymu u P generace nebyly pozorovány významné změny mezi experimentální ( $0,06 \pm 0,004$  g) a kontrolní skupinou ( $0,07 \pm 0,002$  g) ( $P=0,26$ ; ANCOVA). Ani v analýze epididymu u experimentální skupiny F1 generace ( $0,056 \pm 0,009$  g) oproti skupině kontrolní ( $0,059 \pm 0,004$  g) nebyl pozorován signifikantní rozdíl ( $P=0,14$ ; ANCOVA). Byly pozorovány statistické změny v analýze váhy prostaty u P generace, kdy došlo k poklesu váhy u experimentální skupiny ( $0,087 \pm 0,016$  g) oproti skupině kontrolní ( $0,09 \pm 0,019$  g) ( $P < 0,0001$ ; ANCOVA). Analýza variační tabulky prokázala, že výsledná hmotnost orgánu byla signifikantně ovlivněna experimentem ( $P < 0,01$ ). v případě váhy prostaty u F1 generace nebyly pozorovány významné rozdíly mezi experimentální ( $0,09 \pm 0,01$  g) a kontrolní skupinou ( $0,08 \pm 0,01$  g) ( $P=0,11$ ; ANCOVA). Diabetické

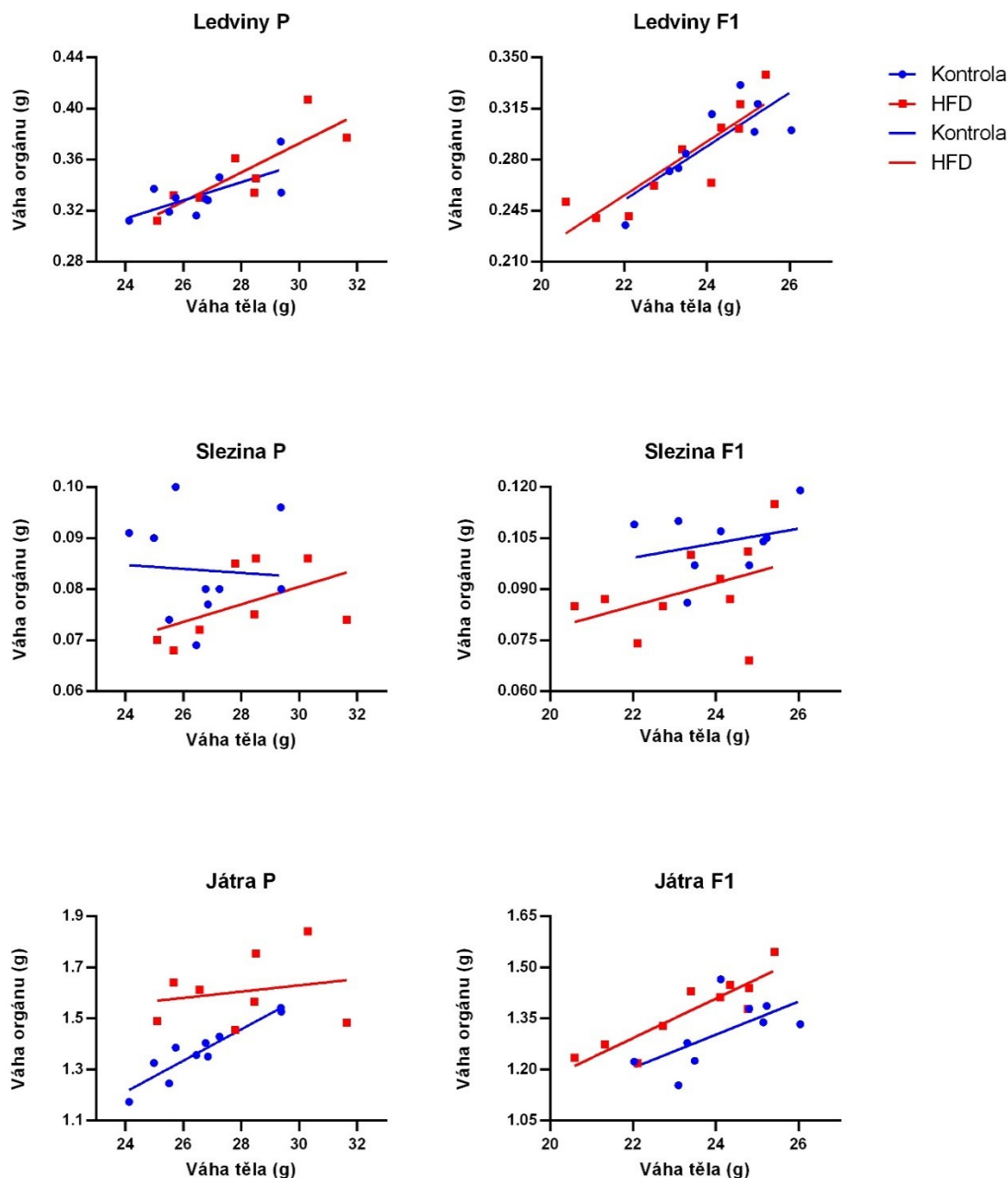
prostředí neovlivnilo váhu semenných vaků u P (experimentální skupina ( $0,25 \pm 0,04$  g), kontrolní skupina ( $0,27 \pm 0,03$  g)) ( $P=0,39$ ; ANCOVA) ani u F1 generace (experimentální skupina ( $0,16 \pm 0,02$  g), kontrolní skupina ( $0,17 \pm 0,03$  g)) ( $P=0,12$ ; ANCOVA).

Dalšími váženými orgány byly ledviny, slinivka a játra (Obr.13). Váha ledvin v P generaci experimentální skupiny vzrostla ( $0,35 \pm 0,03$  g) oproti kontrolní skupině ( $0,33 \pm 0,02$  g) ( $P<0,01$ ; ANCOVA). Avšak analýza variační tabulky ukázala, že hlavní vliv na váhu orgánů měla váha těla ( $P<0,001$ ) a ne experiment ( $P=0,6$ ). Váha ledvin v F1 generaci u experimentální skupiny poklesla ( $0,28 \pm 0,03$  g) oproti skupině kontrolní ( $0,29 \pm 0,03$  g) ( $P<0,001$ ; ANCOVA). Také v tomto případě analýza variační tabulky ukázala, že váha ledvin byla ovlivněna v závislosti na váze těla ( $P<0,001$ ), a ne vlivem experimentu ( $P=0,7$ ). v případě sleziny, váha orgánu dle analýzy nebyla ovlivněna v P generaci u experimentální skupiny ( $0,077 \pm 0,008$  g) oproti skupině kontrolní ( $0,084 \pm 0,01$  g) ( $P=0,35$ ; ANCOVA). Analýza ANCOVA ukázala, že ani v F1 generaci váha sleziny u experimentální skupiny ( $0,09 \pm 0,01$  g) nebyla signifikantně ovlivněna prediktory oproti kontrole ( $0,1 \pm 0,009$  g) ( $P=0,06$ ; ANCOVA).

Hmotnost orgánů spojených s metabolismem glukózy byla výrazně změněna u parentální generace. Váha jater vzrostla u experimentální skupiny ( $1,6 \pm 0,1$  g) oproti kontrolní skupině ( $1,4 \pm 0,1$  g) v P generaci ( $P<0,001$ ; ANCOVA). Výsledný efekt dle variační tabulky byl způsoben jak váhou těla ( $P<0,01$ ), tak vlivem experimentu ( $P<0,01$ ). v F1 generaci také došlo k nárůstu váhy jater u experimentální skupiny ( $1,37 \pm 0,1$  g) v porovnání s kontrolní skupinou ( $1,3 \pm 0,1$  g) ( $P<0,001$ ; ANCOVA), přičemž výsledný efekt byl ovlivněn váhou těla ( $P<0,001$ ) i vlivem experimentu ( $P<0,01$ ).



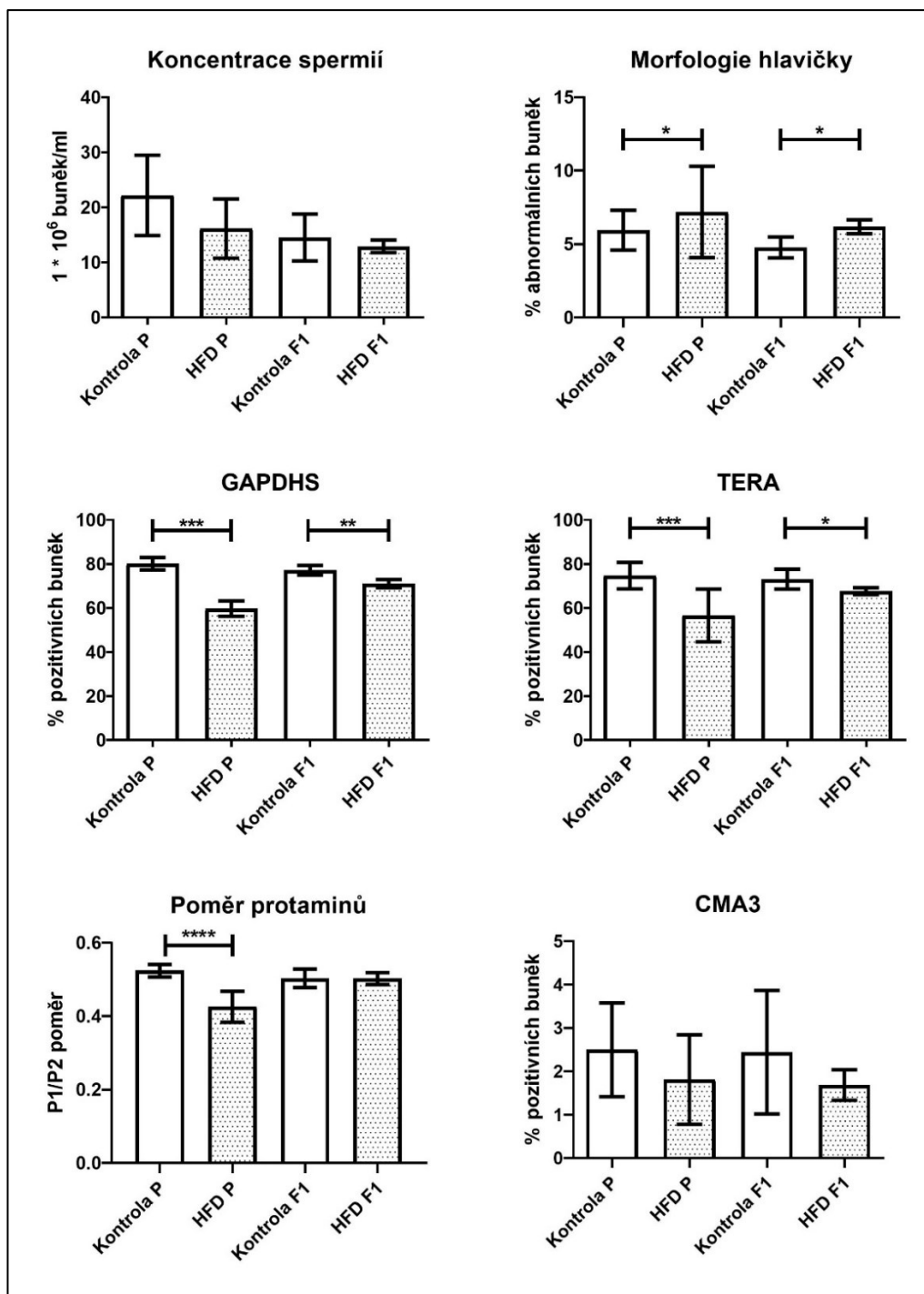
Obrázek 12: Grafické znázornění anogenitální vzdálenosti a váhy reprodukčních orgánů v závislosti na váze těla. P generace kontrolní skupina N=10, experimentální skupina N=8, F1 generace kontrolní skupina N=9, experimentální skupina N=10



Obrázek 13: Grafické znázornění váhy orgánů v závislosti na váze těla. P generace kontrolní skupina N=10, experimentální skupina N=8, F1 generace kontrolní skupina N=9, experimentální skupina N=10

### 5.3 Parametry spermií

Pomocí světelného a fluorescenčního mikroskopu byly hodnoceny následující parametry: koncentrace spermií, morfologie spermie, separace hlavičky, apoptotický stav spermie – Annexin V, stav intraakrozomálních proteinů – GAPDHS a TERA, stav jádra – CMA3 a poměr protaminů, který byl hodnocen pomocí elektroforetické separace (Obr.14).



Obrázek 14: Grafické znázornění hodnocených parametrů spermií: koncentrace, morfologie hlavičky, intraakrozomální proteiny GAPDHS a TERA, poměr P1 a P2 a chromomycin A3 pozitivně značené spermie. Mean±SD (\*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P< 0,001 a \*\*\*\*P<0,0001). P generace kontrolní skupina N=10, experimentální skupina N=8, F1 generace kontrolní skupina N=9, experimentální skupina N=8

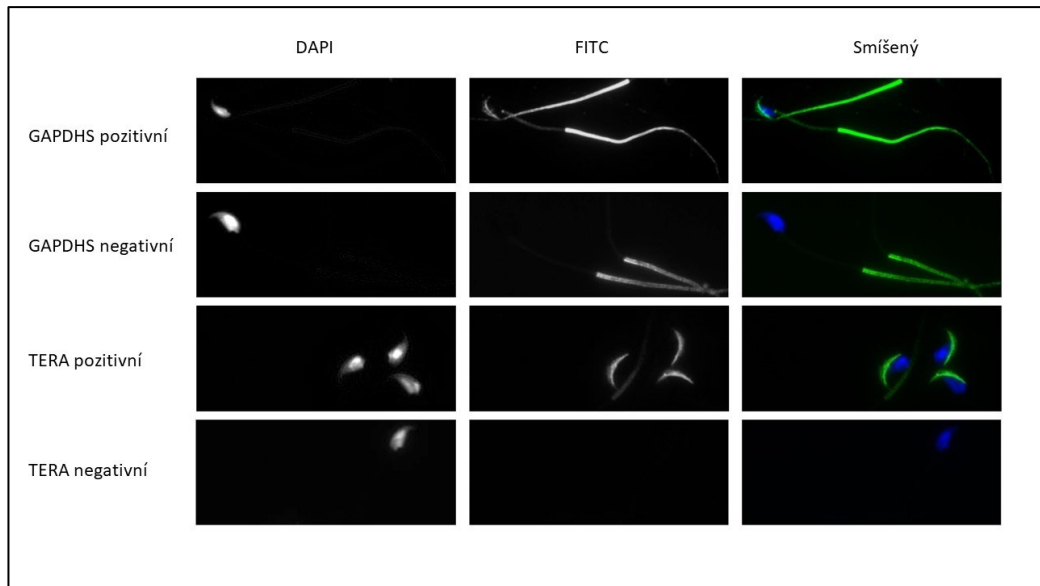
Diabetické prostředí neovlivnilo koncentraci spermií mezi experimentální (16,16 ± 5,36 \* 10<sup>6</sup> buněk/ml) a kontrolní skupinou (22,2 ± 7,3 \* 10<sup>6</sup> buněk/ml) u P (P=0,07; t-test) ani u F1 (P=0,4; t-test) (experimentální skupina (12,9 ± 3,3 10<sup>6</sup> buněk/ml), kontrolní skupina (14,5 ± 4,3 \* 10<sup>6</sup> buněk/ml).

U experimentálních zvířat byla zhoršena morfologie hlavičky (abnormální tvar), kdy počet abnormálních buněk se zvýšil ( $7,2 \pm 2,96$  %) oproti skupině kontrolní ( $5,95 \pm 1,4$  %) v P generaci ( $P < 0,05$ ; t-test). v F1 generaci morfologie hlavičky byla zhoršena u experimentální skupiny ( $6,2 \pm 1,3$  %) oproti skupině kontrolní ( $4,8 \pm 0,7$  %) ( $P < 0,05$ ; t-test).

Co se týče výsledků separace hlavičky, rozumí se oddělení hlavičky od bičíku, v P generaci nedošlo ke statisticky významným změnám (experimentální skupina ( $8,3 \pm 1,3$  %), kontrolní skupina ( $10,9 \pm 4,3$  %) ( $P = 0,35$ ; Wilcoxon test), ale v F1 generaci byla hlavička u experimentální skupiny ( $16,6 \pm 7,4$  %) častěji oddělena od bičíku oproti skupině kontrolní ( $11,3 \pm 9,9$  %) ( $P < 0,01$ ; Wilcoxon test).

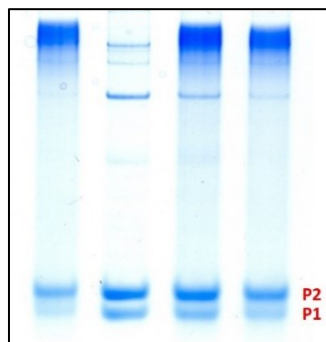
Dalším hodnoceným parametrem byl apoptotický stav spermie. Avšak mezi experimentální ( $57,1 \pm 10$  %) a kontrolní skupinou ( $53,2 \pm 6,7$  %) nebyly pozorovány významné změny ( $P = 0,31$ ; t-test), u F1 generace experimentální skupina ( $44,8 \pm 5,2$  %) měla méně apoptotických buněk oproti kontrolní skupině ( $54,9 \pm 5,5$  %) ( $P < 0,01$ ; t-test).

Při hodnocení stavu intraakrozomálních proteinů byly hodnoceny dva proteiny – GAPDHS a TERA (Obr.15). v případě GAPDHS akrozom spermie u experimentální skupiny P generace ( $59,8 \pm 3,5$  %) byl značen méně než ve skupině kontrolní ( $80,2 \pm 2,8$  %) ( $P < 0,001$ ; Wilcoxon test). v F1 generaci také došlo k signifikantně nižšímu značení akrozomálních proteinů u experimentální skupiny ( $71,1 \pm 5,2$  %) oproti skupině kontrolní ( $77,3 \pm 2,5$  %) ( $P < 0,01$ ; Wilcoxon test). u druhého intraakrozomálního proteinu TERA u experimentální skupiny ( $56,7 \pm 12$  %) v P generaci došlo ke snížení značení oproti skupině kontrolní ( $74,8 \pm 6$  %) ( $P < 0,001$ ; Wilcoxon test). v F1 generaci byl protein také signifikantně méně značen u experimentální skupiny ( $67,8 \pm 4,5$  %) oproti kontrolní skupině ( $73,1 \pm 4,5$  %) ( $P < 0,05$ ; t-test).

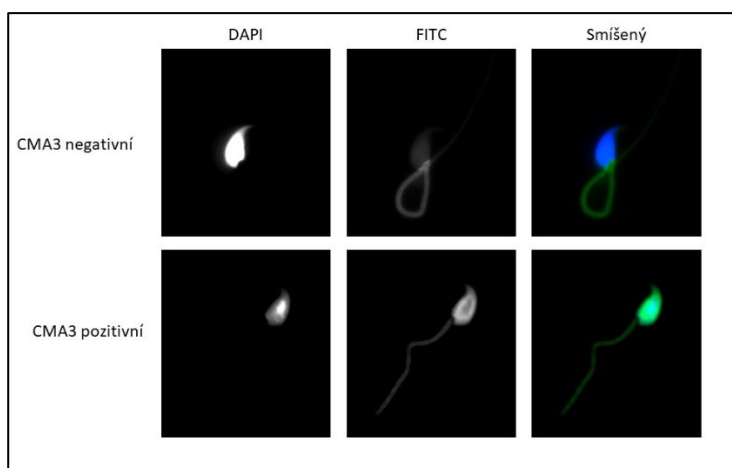


Obrázek 15: Spermie pozitivně a negativně značené protilátkou proti GAPDHS a TERA proteinu, snímání v kanálu DAPI, FITC a výsledný smíšený obraz

Dalším hodnoceným parametrem bylo zastoupení proteinů protaminů v jádře hlavičky spermie pomocí elektroforetické separace proteinů v polyakrylamidovém gelu (Obr.16). u experimentální skupiny v P generaci byl poměr protaminů ( $0,47 \pm 0,04$ ) a kontrolní skupiny byl ( $0,52 \pm 0,02$ ), poměr protaminů v experimentální skupině byl snížen o 10 % ( $P < 0,001$ ; Wilcoxon test). v F1 generaci již nebyly pozorovány změny v poměru protaminů (experimentální skupina ( $0,5 \pm 0,04$ ), kontrolní skupina ( $0,5 \pm 0,03$ )) ( $P = 0,75$ ; Wilcoxon test). Co se týče další metody – CMA3 barvení hodnotící kvalitu DNA (Obr.17), u P generace nebyl pozorován statistický rozdíl mezi experimentální ( $1,8 \pm 1$  %) a kontrolní skupinou ( $2,5 \pm 1,1$  %) ( $P = 0,16$ ; Wilcoxon test) ani u F1 generace nedošlo ke statisticky významným změnám mezi experimentální ( $1,7 \pm 1$  %) a kontrolní skupinou ( $2,4 \pm 1,4$  %) ( $P = 0,26$ ; Wilcoxon test).



Obrázek 16: Polyakrylamidový gel se separovanými proteiny P1 a P2 barvený pomocí EZblue, kontrolní skupina



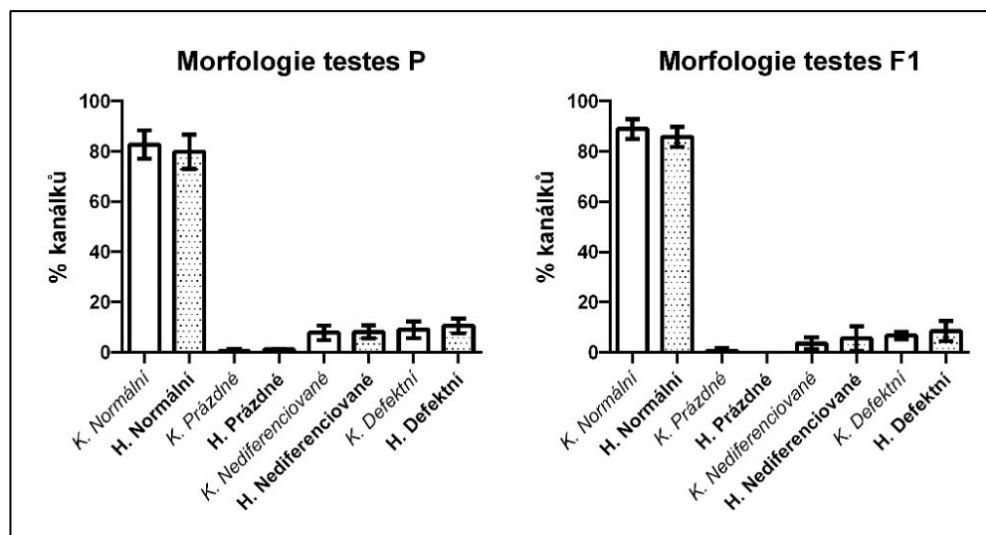
Obrázek 17: Spermie CMA3 negativní a pozitivní, snímání v kanálu DAPI, FITC a výsledný smíšený obraz

## 5.4 Histologická analýza testes

### 5.4.1 Morfologická analýza testes

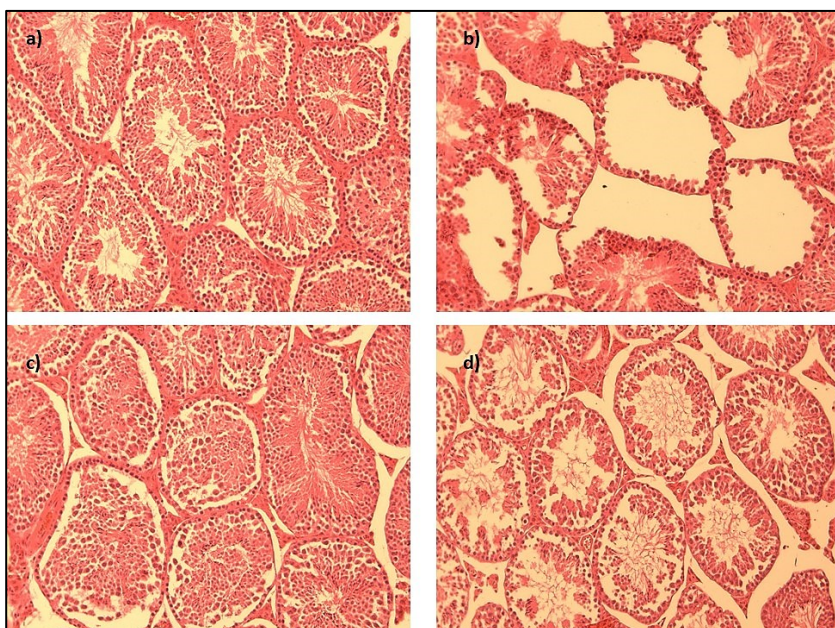
Morfologická analýza byla udělána na 6 $\mu$ m řezech testes obarvených hematoxylin-eosinonem. Hodnocen byl morfologický stav semenotvorného kanálku. Kanálky byly rozřazeny do skupin s normální morfologií, prázdnými, nediferenciovanými a defektními kanálky (Obr.18). Ve skupině s normální morfologií kanálku nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi experimentální (79,9  $\pm$  6,8 %) a kontrolní skupinou (82,7  $\pm$  5,6 %) paternální generace (P=0,36; t-test). v případě F1 generace kanálky s normální morfologií byly zastoupeny obdobně mezi experimentální (85,9  $\pm$  4 %) a kontrolní skupinou (89  $\pm$  3,9 %) (P=0,15; t-test). Ve skupině s prázdnými kanálky nebyly také zaznamenány signifikantní rozdíly mezi experimentálními (1,1  $\pm$  0,7 %) a kontrolními vzorky (0,5  $\pm$  0,8 %) u P generace (P=0,12; t-test). v experimentální skupině F1 generace nebyly pozorovány žádné prázdné kanálky. v kontrolní skupině bylo 0,7  $\pm$  1,1 % kanálků prázdných (P=0,09; t-test). Procentuální zastoupení nediferenciovaných kanálků bylo obdobné mezi experimentální (8,1  $\pm$  2,7 %) a kontrolní skupinou (7,8  $\pm$  2,9 %) P generace (P=0,8; t-test) i F1 generace (5,6  $\pm$  4,9 %; resp. 3,6  $\pm$  2,4 %) (P=0,3; t-test). v případě defektních kanálků také nebyly pozorovány signifikantní rozdíly u P (10,6  $\pm$  7,6 %; resp. 9  $\pm$  3,3 %) (P=0,57; t-test) ani u F1 generace (8,5  $\pm$  3,9 %; resp. 6,7  $\pm$  1,5 %) mezi kontrolní a experimentální skupinou (P=0,28; t-test).



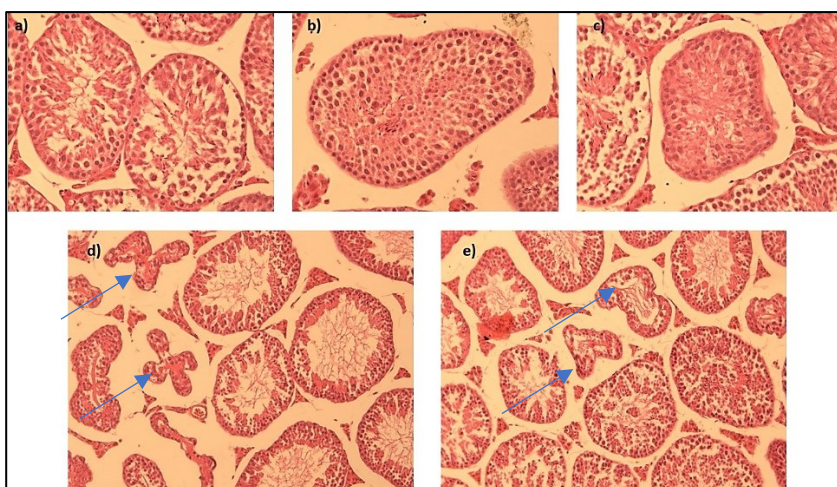


Obrázek 18: Grafické znázornění morfologického stavu semenotvorných kanálky u P a F1 generace. K=Kontrola, H.=HFD Mean $\pm$ SD. P generace morfologie testes kontrolní skupina N=10, experimentální skupina N=8, F1 generace kontrolní skupina N=9, experimentální skupina N=10; počítáno 100 kanáliků u každého jedince

U experimentální i kontrolní skupiny P generace bylo tedy více jak 79 % kanáliků z morfologického hlediska v pořádku. v F1 generaci bylo u obou skupin v pořádku více než 85 % kanáliků (Obr.19a). Byla pozorována prázdná lumen kanálku, kde chyběla některá buněčná stádia vedoucí ke vzniku spermie (Obr.19b), čímž došlo k narušení průběhu spermatogeneze a spermiogeneze. v nediferenciováných kanálcích byl pozorován stav, kdy celý vnitřek byl plný buněk (Obr.19c; 20b,c). u defektních kanáliků bylo narušeno standartní uspořádání buněk a buňky byly dezorganizovány (Obr.19d; 20a). Také byl pozorován stav, kdy kanálky byly atrofovány a smršňeny (Obr.20d,e - šipky).



Obrázek 19: Histologické řezy testikulární tkáně barvené hematoxylinem-eosinem (zvětšeno 200x); a) Histologický preparát kanálku s normální morfologií a probíhající spermatogenezí; b) Prázdné kanálky bez lumen; c) Nediferenciované kanálky; d) Defektní kanálky



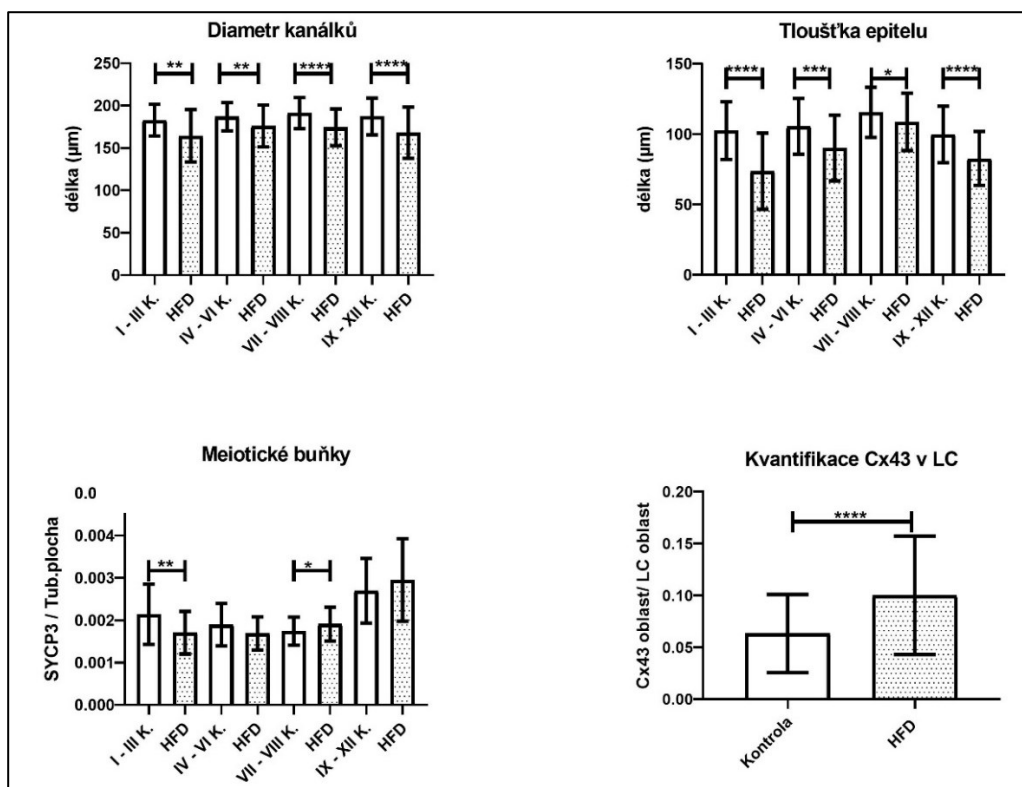
Obrázek 20: Vybrané ukázky defektů kanálků (a, b, c zvětšeno 400x; d, e zvětšeno 200x); a) Narušené uspořádání zárodečných buněk; b a c) Nediferenciované kanálky plné buněk; d a e) Atrofické degenerované kanálky (šipky)

#### 5.4.2 Morfometrická a imunohistochemická analýza testes

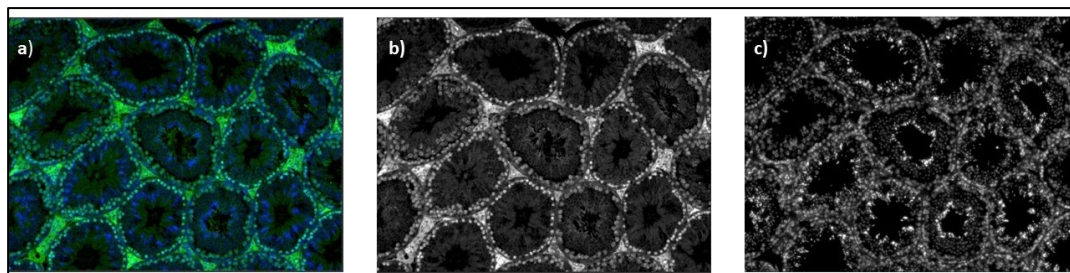
Výsledky morfometrické analýzy jsou zobrazeny na Obr.21. Hodnocena byla paternální generace, vzhledem k neprůkazným výsledkům morfologické analýzy u P a F1 generace. Všechny měřené hodnoty byly rozdělené do skupin (I-III, IV-VI, VII-VIII, IX-XII), z důvodu možného ovlivnění výsledků procesem spermiogeneze (Obr.22c).

U průměru kanálku bylo zjištěno, že u všech experimentálních skupin došlo k jeho snížení. Ve skupině I-III diametr kanálku u experimentální skupiny ( $164,4 \pm 31,1 \mu\text{m}$ ) poklesl o 11 % oproti kontrole ( $182,8 \pm 18,8 \mu\text{m}$ ) ( $P < 0,01$ ; Wilcoxon test). Ve skupině IV-VI průměr kanálku u experimentálních vzorků ( $176 \pm 24,5 \mu\text{m}$ ) poklesl o 6 % oproti kontrolám ( $186,9 \pm 16,7 \mu\text{m}$ ) ( $P < 0,01$ ; t-test). Ve skupině VII-VIII diametr kanálku u experimentální skupiny ( $174,3 \pm 21,8 \mu\text{m}$ ) poklesl o 9 % oproti kontrolám ( $191,1 \pm 18,3 \mu\text{m}$ ) ( $P < 0,0001$ ; t-test). Ve skupině IX-XI diametr kanálku u experimentální skupiny ( $168 \pm 20,2 \mu\text{m}$ ) poklesl o 11 % oproti kontrole ( $187,2 \pm 21,8 \mu\text{m}$ ) ( $P < 0,0001$ ; t-test).

Dalším parametrem morfometrické analýzy bylo měření tloušťky semenotvorného epitelu (=průměr kanálku – průměr lumen). Diabetické prostředí ovlivnilo všechna stádia spermiogeneze. Ve skupině I-III byla tloušťka semenotvorného epitelu u experimentální skupiny ( $73,8 \pm 27,1 \mu\text{m}$ ) snížena o 28 % oproti kontrolní skupině ( $102,5 \pm 20,5 \mu\text{m}$ ) ( $P < 0,0001$ ; Wilcoxon test). u stádií IV-VI v experimentální skupině ( $90,2 \pm 23,3 \mu\text{m}$ ) došlo ke snížení tloušťky epitelu o 15 % procent v porovnání s kontrolní skupinou ( $105,6 \pm 19,8 \mu\text{m}$ ) ( $P < 0,001$ ; Wilcoxon test). v případě VII-VIII stádia spermiogeneze byla tloušťka epitelu u experimentální skupiny ( $108,7 \pm 20,4 \mu\text{m}$ ) snížena o 5 % oproti kontrole ( $115,6 \pm 17,8 \mu\text{m}$ ) ( $P < 0,05$ ; t-test). v poslední skupině stádií IX-XII tloušťka epitelu byla snížena u experimentální skupiny o 17 % v porovnání s kontrolní skupinou ( $99,8 \pm 20,1 \mu\text{m}$ ) ( $P < 0,0001$ ; t-test).



Obrázek 21: Grafické znázornění diametru kanálků, tloušťky semenotvorného epitelu, poměru meiotických buněk na plochu kanálku a kvantifikace Cx43 v Leydigových buňkách. Mean  $\pm$  SD. Kontrolní skupina N=10, Experimentální skupina N=8. (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  a \*\*\*\* $P < 0,0001$ ). u každého jedince počítáno minimálně 30 kanálků.

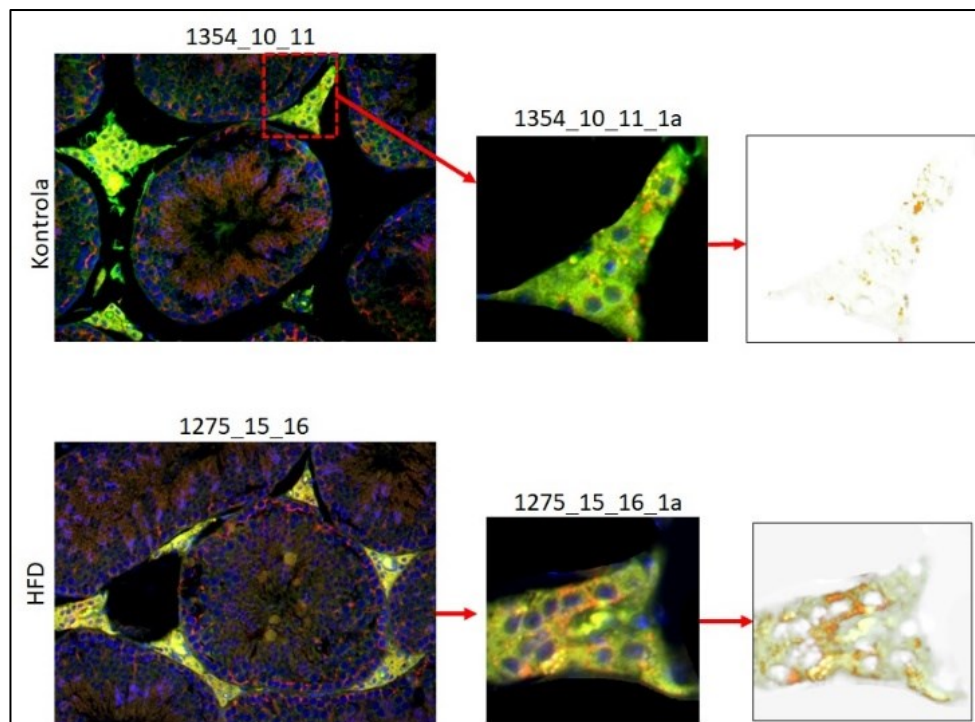


Obrázek 22: Mikroskopické preparáty řezů testes značené protilátkou proti SYCP3 a barvené s DAPI. Snímané fluorescenčním mikroskopem (Zvětšeno 200x). a) všechny 3 barevné kanály b) FITC – značené SYCP3 buňky c) DAPI – viditelné fáze spermiogeneze dle značených jader spermii

Následujícím zkoumaným parametrem byl počet meiotických buněk (spermatocytů ve fázi pachytene) na plochu semenotvorného kanálku (Obr.22b). v první skupině I-III došlo k signifikantnímu snížení počtu značených buněk na plochu kanálku u experimentální skupiny ( $0,0017 \pm 0,0005$ ) o 20,2 % oproti kontrolní skupině ( $0,0021 \pm 0,0007$ ) ( $P < 0,01$ ; t-test). Ve druhé skupině IV-VI nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi skupinou experimentální ( $0,0017 \pm 0,0004$ ) a kontrolní ( $0,0019 \pm 0,0005$ )

( $P=0,07$ ; Wilcoxon test). Ve třetí skupině VII-VIII došlo k nárůstu počtu pozitivně značených buněk pomocí SYCP3 na plochu kanálku o 7 % u experimentální skupiny ( $0,0019 \pm 0,0004$ ) oproti skupině kontrolní ( $0,0017 \pm 0,0003$ ) ( $P<0,05$ ; t-test). v poslední skupině IX-XII nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi skupinou experimentální ( $0,0029 \pm 0,001$ ) a kontrolní ( $0,0027 \pm 0,008$ ) ( $P=0,08$ ; Wilcoxon test).

Posledním studovaným parametrem v histologické analýze byla relativní kvantifikace exprese proteinu Cx43 v LB v intersticiálním prostoru (Obr. 20). Bylo zjištěno, že v experimentální skupině ( $0,1 \pm 0,06$ ) došlo ke zvýšené expresi proteinu o 41,6 % oproti skupině kontrolní ( $0,06 \pm 0,06$ ) ( $P<0,0001$ ; Wilcoxon test) (Obr.21).



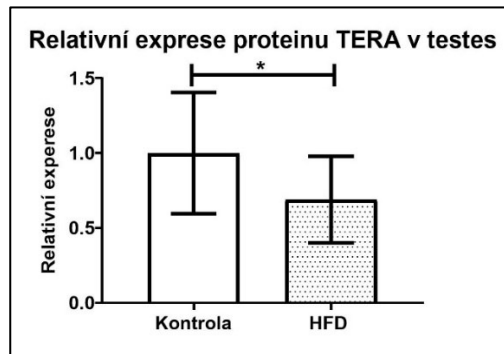
Obrázek 23: Mikroskopické preparáty řezů testes kontrolní a HFD skupiny značené protilátkou proti Cx43 a barvené DAPI s následnou kvantifikací v Image J. (Zvětšeno 200x; výřezy kanálků a mezibuněčných prostor)

## 5.5 Analýza exprese proteinů

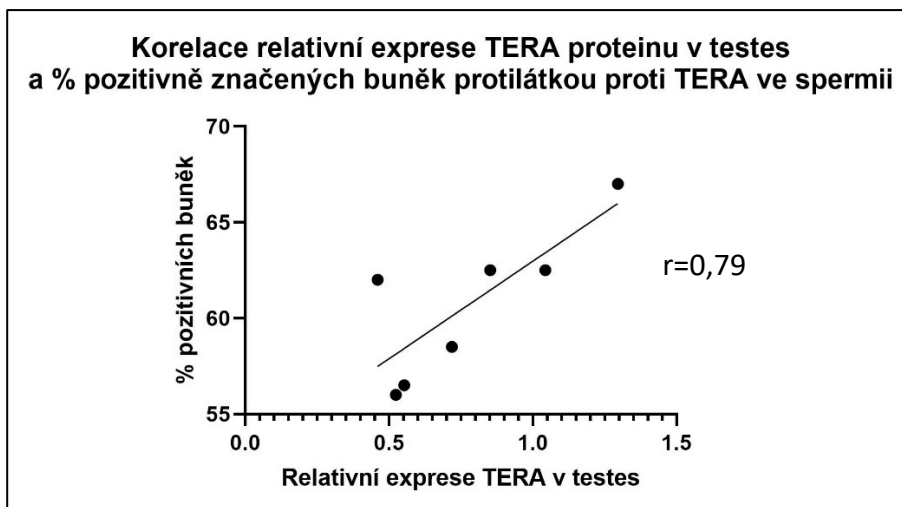
Analýza relativní exprese proteinu v testikulární tkáni byla provedena pomocí metody Western Blot s následnou imunodetekcí a kvantifikací proteinu. Analyzován byl protein o velikosti 97 kDa TERA (VCP) na vzorcích paternální generace (Obr.24). Relativní exprese proteinu u experimentální skupiny ( $0,73 \pm 0,29$ ) byla snížena o 27 % oproti skupině kontrolní ( $1 \pm 0,4$ ) ( $P<0,05$ ; t-test) (Obr.25). Data získaná z této analýzy korelovala s výsledky hodnocení procentuálního zastoupení pozitivně značených spermií protilátkou proti TERA proteinu (Obr.26) ( $r=0,79$ ) ( $P<0,05$ ).



Obrázek 24: Detekce TERA proteinu, Proteiny byly separovány na 12% gelu za použití SDS-PAGE a následně byla provedena imunodetekce s protilátkou proti proteinu TERA a  $\alpha$ Tubulinu



Obrázek 25: Grafické znázornění relativního množství proteinu TERA v testikulární tkáni v P generaci. Kontrolní skupina N=10, Experimentální skupina N=8. (\* $P < 0,05$ )



Obrázek 26: Korelace dat získaných z analýzy exprese TERA v testikulární tkáni a % pozitivně značených spermií protilátkou proti intraakrozomálnímu TERA proteinu

## 6. Diskuze

V posledních letech dochází k rozvoji tzv. civilizačních chorob, mezi které patří cukrovka a neplodnost. Narůstá počet pacientů s diabetes mellitus, přičemž se odhaduje, že za současného stavu 451 miliónů nemocných po celém světě by mohl nárůst za dalších zhruba dvacet pět let dosáhnout 693 miliónů (Cho a spol., 2018). Dalším problémem, který postihuje lidskou populaci, je neustále se zvyšující neplodnost. Pokles plodnosti se stává velkým problémem v mnoha vyspělých zemích. Narůstá počet neplodných párů (Mascarenhas a spol., 2012) a mužská neplodnost přispívá k neplodnosti z více jak 50 % případů (Agarwal a spol., 2015). Mužská neplodnost je způsobena řadou faktorů, jako je genetické pozadí, životní prostředí a různá onemocnění, například diabetes mellitus (Condorelli a spol., 2018). Navíc dochází k odkládání rodičovství do pozdějšího věku, což je spojeno se zvýšeným výskytem neplodnosti (Colasante a spol., 2018) a metabolických onemocnění, jako je diabetes mellitus 2. typu (WHO, 2016). Výzkum problematiky diabetes mellitus a jeho vlivu na reprodukci doposud ukázal, že vlivem DM dochází ke změnám v organismu, které negativně ovlivňují spermatogenezi, kvalitu a funkci spermií, erekcí a ejakulaci (Aguirre-Arias a spol., 2017; Condorelli a spol., 2018; Korani & Sonbol, 2018). Avšak mechanismus zodpovědný za poruchu mužské plodnosti ani přesný výsledný efekt není doposud příliš znám. z tohoto důvodu je důležité se touto problematikou zabývat.

Cílem této práce bylo zjistit vliv indukovaného DM2 na vybrané reprodukční parametry u myší inbrední linie C57BL/6J v porovnání s kontrolní skupinou a možný vliv paternálního diabetu na reprodukční parametry první filialní generace. Naše práce využívá inovativní přístupy v hodnocení vlivu DM2 na reprodukci myší. Doposud nebyl studován vliv DM2 na stav proteinů spermie – intraakrozomální proteiny, jaderné proteiny protaminy ani stav mezibuněčné komunikace v intersticiálním prostoru testes.

Diabetes mellitus 2. typu byl u experimentálních zvířat kmene C57BL/6J navozen dle protokolu ve studiích autorů Wang a spol. (2014) a Zhang a spol. (2014). Myší inbrední linie byla chována v předem daných neměnných podmínkách při dvanáctihodinovém světelném režimu, přístupem k vodě a potravě *ad libitum*. u myší tedy nemohlo dojít k ovlivnění navozeného diabetu dalšími rizikovými faktory, jež by mohly negativně ovlivnit experiment, jako je tomu u lidí.

Po devíti týdnech na vysokotučné dietě (HFD) byla samcům injikována jedna dávka streptozotocinu, čímž došlo částečně ke specifické destrukci  $\beta$  buněk pankreatu, které produkují inzulín. u myší tak byl posunut zdravotní stav z glukózové intolerance do plně rozvinutého onemocnění DM2. v tomto stavu byli experimentální samci ponecháni další čtyři týdny (stále HFD) a poté byli připuštěni s neovlivněnými samičkami. Narozené potomstvo (F1 generace) na standardní stravě bylo testováno ve věku deseti týdnů. Veškerá

experimentální zvířata byla porovnávána s kontrolami, které byly stejně staré jako experimentální jedinci.

Ačkoliv je streptozotocin primárně rozpoznáván a transportován GLUT2 do  $\beta$  buněk pankreatu, Wei a spol., (2014) testovali, zda vlivem STZ nedochází k ovlivnění parametrů spermií, i když působí na organismus jen krátkou dobu vzhledem k jeho poločas rozpadu (5-15 minut). Testováním histonu  $\gamma$ H2AX, který je citlivý na poškození DNA, autoři zjistili, že nízká dávka streptozotocinu nepoškozuje DNA spermií. k poškození DNA nedošlo ani v dalších dnech (po 1 dni, 1 týdnu ani po 4 týdnech) od injikování STZ. Testováním metylačního vzoru navíc zjistili, že vlivem STZ nedochází k epigenetickým změnám v DNA spermií. Díky těmto výsledkům můžeme říci, že námi získané výsledky testovaných parametrů spermií vznikly působením DM2, a ne vlivem alkylačního činidla STZ.

V experimentech *in vivo* byla myším pravidelně měřena hladina glukózy v krvi. Průměrná hladina glukózy v séru *ad libitum* byla již po šesti týdnech na HFD 15,7 mmol/l, za diabetické jedince jsou považováni jedinci s hladinou glukózy v krvi vyšší než 13,9 mmol/l (Bohuslavova a spol., 2013; Pavlinkova a spol., 2017). Po jedné aplikaci nízké dávky STZ byla průměrná hladina glukózy u experimentálních samců před připuštěním 26,1 mmol/l, kdežto u kontrolních samců byla hladina glukózy 10,4 mmol/l. Tudíž došlo k nárůstu hladiny glukózy v krvi u experimentálních jedinců o 150 % oproti jedincům kontrolním. Podobně vysoký nárůst hladiny glukózy v krvi u experimentálních jedinců pozorovali i Zhang a spol., (2014), podle jejichž protokolu byl DM2 u našich myší navozen. v případě F1 generace byly pozorovány signifikantní rozdíly v hladině glukózy v krvi, kdy došlo k nárůstu hladiny u experimentálních jedinců o 25 %, avšak průměrná hladina glukózy 12,5 mmol/l nepřekročila kritickou diabetickou hranici 13,9 mmol/l. Glukózový toleranční test nepotvrdil narušenou glukózovou toleranci. Naše výsledky jsou ve shodě s výsledky jiných autorů (Fullston a spol., 2013; Wei a spol., 2014). Je ale možné, že by časem došlo k zhoršení glukózové tolerance jako tomu bylo ve studii autorů Ng a spol. (2010), kteří pozorovali, že u potomků samců krmených HFD došlo k zhoršené sekreci inzulínu a narušení glukózové tolerance, která se časem zhoršovala oproti kontrolám. Tedy i naše experimentální generace by mohla být náchylnější k rozvoji metabolického onemocnění DM2, vzhledem k zvýšené hladině glukózy v krvi v 10. týdnu věku.

V experimentální části naší studie byl zkoumán vliv DM2 na váhu těla, vybraných orgánů, anogenitální vzdálenost, fertilizační schopnost samců a kvalitu spermií. Dále byla hodnocena morfologie testikulární tkáně, morfometrie testikulárních kanálků a také byla provedena imunohistochemická analýza testikulárních řezů. Mimo jiné byla provedena analýza vybraného testikulárního proteinu souvisejícího s kvalitou spermií.



Vlivem DM2 došlo k nárůstu váhy těla o 16 % u experimentální skupiny paternální generace oproti kontrolám, pravděpodobně kvůli akumulaci tukové hmoty. Zvýšenou váhu těla u hyperglykemických-obézních myši pozorovali Hellman a spoluautoři (1963) a Fan a spol. (2015). Také autoři Srinivasan a spol. (2005) potvrdili signifikantní nárůst váhy u jedinců krměných HFD. Přičemž potvrdili, že tento model replikuje přirozenou historii a metabolické vlastnosti lidského typu DM2. Naopak ve studiích, kde byl navozován diabetes jen pomocí STZ bez HFD, u experimentálních jedinců došlo k signifikantnímu poklesu váhy oproti kontrolám (Long a spol., 2018; Shrilatha & Muralidhara, 2007).

U F1 generace jsme zjistili signifikantní pokles váhy těla, a to již od prvního vážení v 5. týdnu věku (nezveřejněná data). Podobné výsledky byly pozorovány i u porodní váhy novorozenců, jejichž otcové trpí DM2, oproti maternálnímu diabetu, kdy novorozenci mají zvýšenou porodní hmotnost (Tyrrell a spol., 2013). Vliv paternálního DM2 nebyl příliš studován a mechanismus ovlivnění porodní váhy potomků není znám. Tyrrell a spol. (2013) jako jedni z prvních v rozsáhlé studii poskytují důkaz, že porodní hmotnost je ovlivněna DM2 otce. Nejpravděpodobnějším vysvětlením tohoto efektu je genetická variace přecházející z otce na potomka, která ovlivňuje jak nižší porodní hmotnost, tak zvýšené riziko rozvoje diabetu 2. typu.

Vlivem DM2 dochází ke snížení hladiny pohlavních hormonů (Condorelli a spol., 2018; Dhindsa a spol., 2004; Fan a spol., 2015; Pontes a spol., 2011; Soliman a spol., 2018). u anogenitální vzdálenost je známo, že je u samců 2x delší než u samic a při nízké hladině androgenů dochází k jejímu zkrácení (Zhou a spol., 2016). z tohoto důvodu jsme v naší studii tento parametr měřili, avšak nebyly pozorovány změny mezi experimentální a kontrolní skupinou u P ani F1 generace. Je tedy možné, že z důvodu akumulace tuku v těle i oblasti genitálií nedošlo k zmenšení AGD, nebo pokles hladiny androgenů u DM2 jedinců není tak významný, aby signifikantně ovlivnil AGD.

Normální váha testes je spojována se správným průběhem spermatogeneze (Markey a spol., 1995). Ale snížená váha testes je často pozorována u DM2 jedinců v P generaci (Hellman a spol., 1963; Kianifard a spol., 2012; Pontes a spol., 2011), z důvodu snížené hladiny pohlavních hormonů ovlivňujících testikulární tkáň (Condorelli a spol., 2018). Avšak autoři Aguirre-Arias a spol. (2017) ani my jsme v naší studii nepozorovali změnu v relativní váze testes u P generace. Ale u experimentálních jedinců naší F1 generace došlo k signifikantnímu snížení váhy testes oproti kontrolní skupin. Výsledný efekt mohl být způsoben diabetickým prostředím u samců, jež ovlivnilo epigenetickou informaci zárodečných buněk, stejně jako je tomu u efektu snížení váhy těla F1 generace. Výsledný pokles váhy testes mohl být způsoben zmenšeným testikulárním objemem u potomstva, aniž by tento efekt narušil morfologickou strukturu testes.

Další důležité orgány pro schopnost reprodukce jsou prostata a semenné vaky. Jejich sekrety spolu se spermii jsou smíchány v močové trubici a tím dochází ke vzniku spermatu. Sekret prostaty je důležitý pro správnou funkci spermií, a tudíž přispívá k plodnosti jedince. Její sekret tvoří 37–44 % celého objemu ejakulátu a semenné vaky přispívají z 55–61 % (Ndovi a spol., 2007). v případě naší studie jsme pozorovali pokles váhy prostaty v P generaci, což může způsobovat menší množství ejakulátu u diabetických jedinců (Ali a spol., 1993). Ve váze semenných vaků rozdíl ve váze pozorován nebyl. v dalších studiích bylo pozorováno, že byla ovlivněna váha obou orgánů (Pontes a spol., 2011; Popoola, Ashefor, Akanni, & Adaramoye, 2017; Soliman a spol., 2018).

Játra jsou velmi důležitým orgánem v regulaci metabolismu glukózy (včetně glykogeneze, glykogenolýzy, glykolýzy a glukoneogeneze) a lipidů (lipogeneze a lipolýzy). v důsledku vysokotučné diety dochází k akumulaci tuku v játrech, což má za následek nárůst jejich hmotnosti, vzniku inzulínové rezistence, dochází k zhoršené funkčnosti a jejich poškození, které může vést k onemocnění tzv. nealkoholické tukové jaterní chorobě, která je často pozorována u pacientů s DM2 (Bugianesi a spol., 2005; Pozzo a spol., 2016).

V našem případě také došlo k signifikantnímu nárůstu váhy jater u experimentálních jedinců v P generaci. Vlivem DM2 navozeného u otce došlo k signifikantnímu nárůstu váhy jater i u F1 generace. Fullston a spol. (2013) na myším kmenu C57BL/6, který byl krměn HFD stravou pozorovali, že u F1 experimentálních samců také byla zvýšená hmotnost jater. Bylo zjištěno, že vlivem HFD a DM2 je ovlivněna exprese a metylační vzor nejen v tkáni pankreatu (Wei a spol., 2014), ale i v tkáni jater (Keleher a spol., 2018). Je tedy možné, že vlivem HFD a následného rozvoje metabolického onemocnění DM2 byla ovlivněna exprese a metylační vzor genů v játrech účastnících se metabolismu, což mělo za následek zvýšenou váhu jater i u potomstva.

Analýza kvality spermatu je důležitá pro hodnocení reprodukční schopnosti jedince. Hodnotí se koncentrace spermií, motilita, morfologie a další parametry pro které jsou přesně dané normy (WHO, 2010). u pacientů s DM2 je pozorována snížená koncentrace spermií oproti zdravým jedincům (Singh a spol., 2014; Condorelli a spol., 2018). i v naší studii jsme hodnotili koncentraci spermií získaných z epididymu myši. Pozorovali jsme jistý trend poklesu koncentrace spermií u experimentálních jedinců o 25 % oproti jedincům v kontrolní P generaci a v F1 generaci o 11%. Je tedy možné, že i v naší studii vlivem DM2 došlo ke snížení koncentrace spermií, avšak s ohledem na množství testovaných zvířat výsledek není signifikantní. Je možné tedy možné, že i v naší studii byla vlivem oxidačního stresu ovlivněna koncentrace spermií, což je v souladu se studii ostatních autorů (Bahmanzadeh a spol., 2016; Shrilatha & Muralidhara, 2007).

Dalším hodnoceným parametrem naší práce byl morfologický stav spermií. Vlivem diabetického prostředí může být narušený průběh spermiogeneze vedoucí k více než 10násobnému zhoršení morfologie hlavičky spermie (Long a spol., 2018; Shrilatha a Muralidhara, 2007). u našeho experimentu byl výskyt abnormální morfologie hlavičky spermie vyšší než v případě kontrol jak v P generaci, tak i v F1 generaci. Hodnocena také byla separace hlavičky. v P generaci nebyly pozorovány signifikantní změny mezi kontrolní a experimentální skupinou, ale v F1 generaci došlo k separaci častěji u experimentální skupiny, a to o více než 5 %. Spolu se zhoršenou morfologií spermií to může značit narušený průběh spermiogeneze (Chemes a spol., 1999). Zvýšené procento separovaných hlaviček spermií u jedinců F1 generace možné narušení ukotvení hlavičky k bičíku a také ovlivnění proteinů účastnících se tohoto spojení (Shang a spol., 2017; Yuan a spol., 2015).

Spermie jedinců s DM2 vykazovaly ve studii autorů Aguirre-Arias a spol. (2017) signifikantně zvýšený podíl apoptotických buněk hodnocených pomocí Annexin v kitu. Avšak v našem případě výsledek není průkazný vzhledem k tomu, že i kontrolní jedinci měli vysoké procento značených buněk pomocí Annexin v kitu. Zvýšený počet apoptotických buněk i v případě kontrol vznikl pravděpodobně chybou v testování, tudíž výsledky z tohoto testu nebyly dále hodnoceny.

Dalším hodnoceným parametrem byla detekce intraakrozomálních proteinů, které určují stav akrozomu a účastní se vazby spermie/vajíčko. Nepřítomnost těchto proteinů může značit, že u spermie došlo k předčasné akrozomální reakci vzhledem k narušené integritě membrány (Lancellotti a spol., 2010; Visconti a spol., 1999) nebo špatném průběhu spermatogeneze, kdy proteiny ve spermii úplně chybí (Feiden a spol., 2008; Cayli a spol., 2011).

V předchozí práci naší laboratoře jsme zjistili a prokázali, že detekce akrozomálních proteinů je důležitým diagnostickým markerem kvality spermií (Peknicova a spol., 2005; 2002; Peknicova & Moos, 1990; 2007; Tepla a spol., 2006). Později byla prokázána vazebná schopnost intraakrozomálního proteinu glycerinaldehyd fosfát dehydrogenázy specifické pro spermie (GAPDHS) pro vazbu spermie na vajíčko (Margaryan a spol., 2015). Další důležitý akrozomální protein, který je zodpovědný za motilitu spermií a má úlohu i v metabolismu spermií je akrozomální endoplasmatická retikulární ATPasa (TERA). Pokles značených intraakrozomálních proteinů byl zjištěn u pacientů s patologickým spermioqramem, kdy u těchto jedinců dochází ke snížené fertilizační schopnosti (Capkova a spol., 2016; Tepla a spol., 2006). v naší studii u DM2 jedinců byl pozorován signifikantní pokles značení jak GAPDHS proteinu u experimentální skupiny P generace i F1 generace oproti kontrolám, tak u TERA proteinu u experimentální skupiny P generace i F1 generace oproti kontrolám. Výsledky naznačují, že u obou proteinů došlo

k podobnému narušení syntézy a následné detekci intraakrozomálních proteinů vlivem DM2 u P generace i u F1 generace.

Pro podrobnější testování relativní exprese proteinu v testes byl vybrán protein TERA. Tento protein je exprimován v průběhu postnatálního vývoje v testes a epididymis. U dospělých jedinců je exprese proteinu přítomna prakticky ve všech fázích vývoje zárodečných buněk (Cayli a spol., 2011). Zjistili jsme, že došlo k signifikantnímu snížení exprimovaného proteinu o 27 % oproti kontrolní skupině. Tento výsledek koreluje s nižším procentem imunofluorescenčně značeného TERA proteinu v akrozomu spermie. To naznačuje, že protein byl narušen již v průběhu spermatogeneze vlivem diabetického prostředí a z tohoto důvodu bylo i snížené procento značených akrozomů pomocí imunofluorescenčního barvení.

Během spermiogeneze v jádře spermie dochází k nahrazení většiny histonů za protaminy. Změny v poměru zastoupených protaminů jsou pozorovány u neplodných jedinců, a to jak v případě myši, tak i lidí (Balhorn a spol., 1988; Cho a spol., 2003).

Bylo zjištěno, že působením okolního prostředí především endokrinních disruptorů, jako tetrabromobisfenol A, dochází nejen ke snížené produkci testosteronu u samců, ale také k signifikantnímu snížení poměru protaminů P1/P2 v jádře spermie (Zatecka a spol., 2014).

Podobně jako u histonů existuje histonový kód, je možné, že i u protaminů existuje „protaminový kód“ s ohledem na různé postranlační modifikace (Bao & Bedford, 2016). Je tedy možné, že kromě změny v zastoupení protaminů v jádře spermie jsou také ovlivněny protaminy postranlačními modifikacemi, což může ovlivnit genetickou informaci potomstva. Avšak „protaminový kód“ a jeho regulace nejsou zatím příliš prozkoumány.

Doposud byl studován jen vliv DM1 na poměr protaminů v jádře spermie, kde nebyla pozorována signifikantní změna v poměru protaminů P1/P2 (Pavlinkova a spol., 2017), avšak nebyl studován vliv DM2 na poměr protaminů P1/P2. v naší studii u diabetických jedinců v paternální generaci došlo k signifikantnímu snížení výsledného poměru P1/P2 ( $P < 0.001$ ) oproti kontrolám. Ovlivněný poměr protaminů může být způsoben sníženou hladinou testosteronu a FSH (Manjeet Kaur a spol., 2011), přičemž snížená hladina těchto hormonů je běžný jev u jedinců s DM2 (Condorelli a spol., 2018; Soliman a spol., 2018). Poměr P1/P2 může být ovlivněn vlivem oxidačního stresu, kterému jsou gonády při DM2 vystaveny (Aguirre-Arias a spol., 2017). u F1 již nebyl pozorován rozdíl mezi experimentální a kontrolní skupinou, je tedy možné, že DNA kódující protaminy nebyla ovlivněna.

Další metodou, pomocí které jsme hodnotili stav chromatinu spermie, byla standardní cytochemická technika – barvení pomocí chromomycinu A3, která značí deficienci

protaminů a přítomnost nukleohistonů (Lolis a spol., 1996). Bahmanzadeh a spol (2016) ve své studii pozorovali signifikantně vyšší procento značených spermií pomocí CMA3 oproti kontrolám. v našem případě nebyl pozorován rozdíl ve značení mezi experimentální a kontrolní skupinou u P ani F1 generace podobně jako v jiných studiích, kde však studovali vliv DM1 (Mangoli a spol., 2013; Talebi a spol., 2014). Naše výsledky naznačují, že nedošlo k signifikantní ztrátě protaminů či zvýšené přítomnosti nukleohistonů u DM2 jedinců, ale bylo ovlivněno relativní zastoupení protaminů v jádře dle výsledků P1/P2 poměru, které se neproказuje CMA3 barvením.

Jak již bylo zmíněno, morfologie testes ovlivňuje správný průběh spermatogeneze a výslednou kvalitu spermií (Markey a spol., 1995). Při správné spermatogenezi se spermie vyvíjejí do středu kanálku přes několik buněčných stádií (Huckins, 1978). Avšak vlivem DM2 a jím způsobené metabolické nerovnováhy je u buněk aktivována apoptotická buněčná smrt, čímž může dojít k dezorganizaci buněčného uskupení v testes (Kushwaha a Jena, 2013; Verma a spol., 2018).

V naší studii byla provedena morfologická analýza na 6  $\mu\text{m}$  řezech barvených hematoxylin-eosinem. Struktura kanálků byla rozdělena do 4 skupin dle normální morfologie, kanálků, které byly prázdné, nediferenciované a defektní. v jednotlivých skupinách nebyl signifikantní rozdíl mezi experimentálními a kontrolními zvířaty. u obou skupin byly pozorovány kanálky, které byly prázdné, respektive u nich byla spermatogeneze zastavena v určitém vývojovém stupni a dále neprobíhala. Také byly pozorovány kanálky, u nichž nedošlo k diferenciaci buněk a kanálek byl jimi celý vyplněn. u defektních kanálků došlo k dezorganizaci, degeneraci a atrofii zárodečných buněk v kanálku. Výsledný efekt u experimentálních jedinců mohl být způsobený tím, že buňky testes doposud zvládaly kompenzovat nepříznivé diabetické prostředí.

Vzhledem k výsledkům morfologické analýzy, kde nebyly patrné velké rozdíly ve výsledcích mezi experimentální a kontrolní skupinou jsme se rozhodli v morfometrické a imunohistochemické analýze testovat jen paternální generaci. s ohledem na vývojová stádia spermií byly kanálky roztrženy u kontrolní i experimentální skupiny do skupin dle vývojového stádia kanálku, kvůli přesnějším výsledkům, jelikož by přítomnost spermií v kanálku mohla minimálně ovlivnit tloušťku semenotvorného epitelu. První skupina obsahovala stádia I-III, kdy byly zmnoženy spermatidy, ale ještě nebyly přítomny spermie. Druhá skupina obsahovala stádia IV-VI, kdy byly přítomny spermie, ale ne po celém obvodu lumen kanálku na rozdíl od třetí skupiny, která obsahovala stádia VII-VIII. Čtvrtá skupina obsahovala stádia IX-XII, v této skupině nebyly pozorovány spermie, také byl pozorován menší počet spermatid oproti první skupině, vzhledem k tomu, že spermie již opustily lumen kanálku.

Vlivem DM2 byly průměr kanálku i tloušťka epitelu ve všech 4 skupinách signifikantně sníženy oproti kontrolním jedincům. Podobné výsledky publikovali i autoři Aguirre-Arias (2017), kdy v jejich studii došlo k signifikantnímu snížení průměru kanálku a tloušťce epitelu u DM2 jedinců. Naopak Ahangarpour a spol. (2016) nepozorovali na DM2 myších navozených pomocí streptozotocinu rozdíly v průměru kanálku a tloušťce semenotvorného epitelu signifikantní rozdíly mezi diabetickou a kontrolní skupinou. k sníženému průměru kanálku i tloušťky lumen pravděpodobně dochází kvůli apoptotické smrti buněk a atrofii semenotvorných kanálků, což navrhovali i další autoři ve svých studiích (Khaneshi a spol., 2013; Sisman a spol., 2014). Také snížený průměr kanálku může být zapříčiněn sníženým počtem buněčných vrstev v semenotvorném kanálku (Kianifard a spol., 2012).

Dalším zkoumaným parametrem byla progresse meiózy a lokalizační vzor meiotického markeru SYCP3, axiálního prvku synaptonemálního komplexu v spermatocytech (Yuan a spol., 2000). Ve studii autorů Bondarenko a spol. (2012) pozorovali ovlivněný průběh spermatogeneze, kdy byl snížený počet spermatogoniálních kmenových buněk.

Dle imunohistochemické analýzy jsme detekovali sníženou expresi SYCP3 proteinu na plochu semenotvorného kanálku ve skupině I-III u DM2 jedinců oproti kontrolám. Naopak ve skupině VII-VIII byl poměr SYCP3 proteinu na plochu kanálku u diabetických jedinců zvýšen. Pravděpodobně došlo k určité kompenzaci diabetického prostředí v testes, čímž byla ovlivněna spermatogeneze.

Varanda a Decarvalho (1994) zjistili, že mezibuněčná komunikace v intersticiálním prostoru mezi LB, které produkují testosteron, je zprostředkována především pomocí „gap junction“, které jsou tvořeny proteiny konexinu 43. Vzhledem k tomu, že u DM2 jedinců dochází k poklesu hladiny androgenních hormonů, studovali jsme, jaký efekt bude mít DM2 na mezibuněčnou komunikaci, což nebylo doposud studováno.

Batias a spol. (1999) pozorovali, že u jedinců s narušenou spermiogenezí dochází ke snížené expresi Cx43 v testes. Avšak v naší studii u experimentálních jedinců s DM2 byl pozorován signifikantnímu nárůstu exprese proteinu Cx43 oproti kontrolám. Podobný efekt pozorovali i Kotula-Balak a spolupracovníci (2007) u jedinců s patologickými vzorky varlat. Detekovali velmi silnou expresi Cx43 mezi sousedícími LB. i ve studii Chojnacka a spol. (2016) pozorovali, že působením antiandrogenního přípravku je zvýšená exprese Cx43 mezi LB u experimentálních jedinců oproti kontrolám, což je podle těchto autorů výsledkem nerovnováhy intratestikulárních steroidů. v našich experimentech zvýšenou expresi Cx43 vysvětlujeme tak, že kvůli snížené hladině pohlavních hormonů, LB buňky zvýší produkci proteinů Cx43 účastníci se mezibuněčné komunikace, aby

zvýšenou komunikací udrželi metabolickou aktivitu LB. i dle Kotula-Balak a spol. (2007) je pravděpodobné, že zvýšená mezibuněčná komunikace může hrát roli při udržování metabolické aktivity LB.

V naší studii bylo zjištěno, že metabolické onemocnění diabetes mellitus 2. typu má negativní vliv na některé myši reprodukční parametry, a to nejen u paternální generace, ale i generace následující. v předchozích publikacích ostatních autorů bylo zjištěno, že vlivem onemocnění diabetes mellitus 2. typu je snížena hladina pohlavních hormonů, narušena morfologie testes a dalších pohlavních orgánů, zvýšena apoptotická smrt buněk, zhoršena kvalita spermatu, kdy je snížena koncentrace spermií jejich motilita a životnost. My jsme navíc zjistili, že vlivem DM2 jsou ovlivněny nejen tyto parametry, ale také dochází k narušení vnitřních struktur spermie jako jsou intraakrozoální proteiny účastníci se vazby spermie/vajíčko. Dále jsou ovlivněny proteiny protaminy, které váží DNA nesoucí genetickou informaci pro vznik potomstva. Vlivem DM2 je ovlivněna exprese proteinů zodpovědných za mezibuněčnou komunikaci, zejména komunikaci Leydigových buněk produkujících samčí pohlavní hormon testosteron. Navíc i u potomků diabetických otců (F1 generace) byly ovlivněny některé reprodukční parametry (váha testes a epididymu, morfologie spermií, stav intraakrozoálních proteinů), což mělo za následek sníženou fertilizační schopnost těchto jedinců a to o 26 % oproti kontrolám. Vlivem DM2 u otcovské linie patrně došlo k epigenetickým modifikacím zárodečných buněk, jež mohou ovlivnit plodnost následující generace, což bylo zjištěno v naší studii.

Na rozdíl od naší studie, kde reprodukční parametry myši byly ovlivněny jen onemocněním diabetes mellitus 2. typu, u lidí je plodnost ovlivňována kombinací různých faktorů, mimo onemocnění diabetes mellitus 2. typu například konzumací alkoholu, životním stylem, kouřením, stresem a životním prostředím. o všech těchto faktorech je známo, že mají vliv na plodnost lidí a jejich kombinace může vést k subfertilitě až úplné infertilitě. Je tedy důležité, aby budoucí otcové mysleli nejen na svoje zdraví a plodnost, ale i na zdraví a plodnost svých potomků.

## 7. Závěr

V naší práci byl studován vliv metabolického onemocnění diabetes mellitus 2. typu (DM2) na reprodukci myšího inbredního kmene C57BL/6J. Experimentálním myším byl uměle navozen DM2 kombinací vysokotučné diety a diabetogenní chemikálie streptozotocinu. Ve studii byl studován vliv DM2 u paternální generace v porovnání s kontrolní skupinou a možný vliv paternálního DM2 na první filiální generaci. Pro zjištění vlivu DM2 na fyzický stav experimentálních jedinců, byly měřeny jednotlivé parametry: hladina glukózy v krvi, váha těla a jednotlivých orgánů a délka anogenitální vzdálenosti. u experimentálních jedinců paternální generace došlo k statisticky významnému zvýšení hladiny glukózy v krvi, zvýšení váhy těla a některých orgánů těla. u potomků diabetických otců byla snížena fertilizační schopnost v porovnání s kontrolní skupinou.

Reprodukční schopnost experimentálních a kontrolních myší byla hodnocena pomocí kvality spermií, která je daná koncentrací, morfologií hlavičky spermie a stavem akrozomálních proteinů. u experimentální skupiny byly pozorovány statisticky významné výsledky poškození morfologie hlavičky a snížené detekce intraakrozomálních proteinů u obou generací. z testikulární tkáně byla analyzována exprese intraakrozomálních proteinů spermií a již v testes došlo ke snížené expresi daných proteinů, přičemž výsledky obou testů spolu korelovaly.

Dále byl hodnocen stav jádra spermie pomocí metod barvení spermie chromomycinem A3 a elektroforetické separace jaderných protaminů. u diabetických myší byl pozorován statisticky významný pokles v poměru P1/P2 ve spermiích oproti kontrolním zvířatům.

Dalším hodnoceným parametrem byl histologický stav testes, hlavního reprodukčního orgánu pro vznik spermií. Přestože diabetické prostředí neovlivnilo morfologii testes, naše výsledky ukazují, že u diabetických jedinců byl signifikantně snížen průměr semenotvorného kanálku a tloušťka epitelu se zárodečnými buňkami. Také byl ovlivněn průběh spermatogeneze, kdy byl změněn poměr počtu meiotických buněk na plochu kanálku. Pro správný vývoj spermií je důležitá mezibuněčná komunikace a hormonální signalizace. Naše výsledky imunohistochemické analýzy ukazují, že vlivem diabetického prostředí byla zvýšená exprese proteinů účastnících se mezibuněčné komunikace.

Výsledky naší práce naznačují, že námi uměle navozený diabetes mellitus 2. typu ovlivnil některé reprodukční parametry, a to nejen u diabetických otců, ale i u jejich mužských potomků. To může mít negativní dopad na plodnost jedince nejen v otcovské generaci, ale i v generaci následující.



Vzhledem k tomu, že celý experiment probíhal za standartních chovných podmínek a F1 generace byla již na klasické dietě, pozorované účinky epigenetické dědičnosti jsou pravděpodobně způsobeny navozeným diabetem u otců.

## 8. Literatura

1. ADA, American diabetes association (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37, S81-S90. doi:10.2337/dc14-S081
2. Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). a unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13, 9. doi:10.1186/s12958-015-0032-1
3. Aguirre-Arias, M. V., Velarde, V., & Moreno, R. D. (2017). Effects of ascorbic acid on spermatogenesis and sperm parameters in diabetic rats. *Cell and Tissue Research*, 370(2), 305-317. doi:10.1007/s00441-017-2660-6
4. Ahangarpour, A., Oroojan, A. A., Heidari, H., Ghaedi, E., & Taherkhani, R. (2015). Effects of Hydro-alcoholic Extract from *Arctium lappa* L. (Burdock) Root on Gonadotropins, Testosterone, and Sperm Count and Viability in Male Mice with Nicotinamide/Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 22(2), 25-32.
5. Ahangarpour, A., Oroojan, A. A., Khorsandi, L., Arzani, G., & Afshari, G. (2016). Effects of Betulinic Acid on the Male Reproductive System of a Streptozotocin-Nicotinamide-Induced Diabetic Mouse Model. *World Journal of Mens Health*, 34(3), 209-216. doi:10.5534/wjmh.2016.34.3.209
6. Al-Kuraishy, H. M., & Al-Gareeb, A. I. (2016). Erectile Dysfunction and Low Sex Drive in Men with Type 2 DM: The Potential Role of Diabetic Pharmacotherapy. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(12), FC21-FC26. doi:10.7860/jcdr/2016/19971.8996
7. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Raff, M., & Roberts, K. (2002). *Molecular Biology of the Cell, 4th Edition*: Garland Science.
8. Ali, O. (2013). Genetics of type 2 diabetes. *World Journal of Diabetes*, 4(4), 114–123. doi:10.4239/wjd.v4.i4.114
9. Ali, S. T., Shaikh, R. N., Siddiqi, N. A., & Siddiqi, P. Q. R. (1993). Semen analysis in insulin-dependent/non-insulin-dependent diabetic men with/without neuropathy. *Archives of Andrology*, 30(1), 47-54. doi:10.3109/01485019308988368
10. Amor, H., Zeyad, A., Ben Ali, H., & Hammadeh, M. (2017). Protamines ratio (P1/P2) in spermatozoa as biomarker for male infertility. *Fertility and Sterility*, 108(3), E142-E142. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.07.427
11. Anderson, L. M., Riffle, L., Wilson, R., Travlos, G. S., Lubomirski, M. S., & Alvord, W. G. (2006). Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice. *Nutrition*, 22(3), 327-331. doi:10.1016/j.nut.2005.09.006
12. Association, A. D. (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37, S81-S90. doi:10.2337/dc14-S081
13. Baccetti, B., la Marca, A., Piomboni, P., Capitani, S., Bruni, E., Petraglia, F., & De Leo, V. (2002). Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Human Reproduction*, 17(10), 2673-2677. doi:10.1093/humrep/17.10.2673
14. Bahmanzadeh, M., Vahidinia, A., Mehdinejadi, S., Shokri, S., & Alizadeh, Z. (2016). Dietary supplementation with astaxanthin may ameliorate sperm parameters and DNA integrity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Exp Reprod Med*, 43(2), 90-96. doi:10.5653/cerm.2016.43.2.90
15. Balhorn, R., Brewer, L., & Corzett, M. (2000). DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: Analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Molecular Reproduction and Development*, 56(2), 230-234. doi:10.1002/(sici)1098-2795(200006)56:2+<230::aid-mrd3>3.3.co;2-m
16. Balhorn, R., Reed, S., & Tanphaichitr, N. (1988). Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia*, 44(1), 52-55. doi:10.1007/bf01960243
17. Bao, J. Q., & Bedford, M. T. (2016). Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction*, 151(5), R55-R70. doi:10.1530/rep-15-0562
18. Batias, C., Defamie, N., Lablack, A., Thepot, D., Fenichel, P., Segretain, D., & Pointis, G. (1999). Modified expression of testicular gap-junction connexin 43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. *Cell and Tissue Research*, 298(1), 113-121. doi:10.1007/s004419900076
19. Bench, G., Corzett, M. H., Kramer, C. E., Grant, P. G., & Balhorn, R. (2000). Zinc is sufficiently abundant within mammalian sperm nuclei to bind stoichiometrically with

- protamine 2. *Molecular Reproduction and Development*, 56(4), 512-519. doi:10.1002/1098-2795(200008)56:4<512::aid-mrd9>3.0.co;2-m
20. Bench, G. S., Friz, A. M., Corzett, M. H., Morse, D. H., & Balhorn, R. (1996). DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry*, 23(4), 263-271. doi:10.1002/(sici)1097-0320(19960401)23:4<263::aid-cyto1>3.3.co;2-9
  21. Bener, A., Al-Ansari, A. A., Zirie, M., & Al-Hamaq, A. (2009). Is male fertility associated with type 2 diabetes mellitus? *International Urology and Nephrology*, 41(4), 777-784. doi:10.1007/s11255-009-9565-6
  22. Boden, G. (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*, 46(1), 3-10. doi:10.2337/diabetes.46.1.3
  23. Boden, G., Chen, X. H., Ruiz, J., White, J. V., & Rossetti, L. (1994). Mechanism of fatty acid-induced inhibition of glucose-uptake. *Journal of Clinical Investigation*, 93(6), 2438-2446. doi:10.1172/jci117252
  24. Bohuslavova, R., Skvorova, L., Sedmera, D., Semenza, G. L., & Pavlinkova, G. (2013). Increased susceptibility of HIF-1 alpha heterozygous-null mice to cardiovascular malformations associated with maternal diabetes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 60, 129-141. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.04.015
  25. Bondarenko, L. B., Shayakhmetova, G. M., Matvienko, A. V., & Kovalenko, V. M. (2012). Diabetes-mediated changes in rat type I collagen and spermatogenesis indices. *19*(3), 245. doi:10.2478/v10255-012-0030-4
  26. Bower, P. A., Yelick, P. C., & Hecht, N. B. (1987). Both P1 and P2 protamine genes are expressed in mouse, hamster, and rat. *Biology of Reproduction*, 37(2), 479-488. doi:10.1095/biolreprod37.2.479
  27. Brunner, A. M., Nanni, P., & Mansuy, I. M. (2014). Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. *Epigenetics & Chromatin*, 7, 12. doi:10.1186/1756-8935-7-2
  28. Bugianesi, E., McCullough, A. J., & Marchesini, G. (2005). Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*, 42(5), 987-1000. doi:10.1002/hep.20920
  29. Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2003). beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52(1), 102-110. doi:10.2337/diabetes.52.1.102
  30. Capkova, J., Geussova, G., & Peknicova, J. (2000). Monoclonal antibody to human sperm acrosomal protein. *Folia Biologica*, 46(1), 55-57.
  31. Capkova, J., Kubatova, A., Ded, L., Tepla, O., & Peknicova, J. (2016). Evaluation of the expression of sperm proteins in normozoospermic and asthenozoospermic men using monoclonal antibodies. *Asian Journal of Andrology*, 18(1), 108-113. doi:10.4103/1008-682x.151400
  32. Capkova, J., Margaryan, H., Kubatova, A., Novak, P., & Peknicova, J. (2015). Target antigens for Hs-14 monoclonal antibody and their various expression in normozoospermic and asthenozoospermic men. *Basic and Clinical Andrology*, 25, 12. doi:10.1186/s12610-015-0025-0
  33. Carone, B. R., Fauquier, L., Habib, N., Shea, J. M., Hart, C. E., Li, R. W., Rando, O. J. (2010). Paternally Induced Transgenerational Environmental Reprogramming of Metabolic Gene Expression in Mammals. *Cell*, 143(7), 1084-1096. doi:10.1016/j.cell.2010.12.008
  34. Carrell, D. T., Emery, B. R., & Hammoud, S. (2007). Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Human Reproduction Update*, 13(3), 313-327. doi:10.1093/humupd/dm1057
  35. Cayli, S., Ocakli, S., Erdemir, F., Tas, U., Aslan, H., Yener, T., & Karaca, Z. (2011). Developmental expression of p97/VCP (Valosin-containing protein) and Jab1/CSN5 in the rat testis and epididymis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 13. doi:10.1186/1477-7827-9-117
  36. Chemes, H. (1986). The phagocytic function of Sertoli cells - a morphological, biochemical, and endocrinologic study of lysosomes and acid-phosphatase in the rat testis. *Endocrinology*, 119(4), 1673-1681.
  37. Chemes, H. E., Puigdomenech, E. T., Carizza, C., Olmedo, S. B., Zanchetti, F., & Hermes, R. (1999). Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment: a human syndrome of genetic origin. *Human Reproduction*, 14(7), 1811-1818. doi:10.1093/humrep/14.7.1811

38. Chiarini-Garcia, H., Raymer, A. M., & Russell, L. D. (2003). Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction*, *126*(5), 669-680. doi:10.1530/reprod/126.5.669
39. Cho, C., Jung-Ha, H., Willis, W. D., Goulding, E. H., Stein, P., Xu, Z., Eddy, E. M. (2003). Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biology of Reproduction*, *69*(1), 211-217. doi:10.1095/biolreprod.102.015115
40. Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., Fernandes, J. D. D., Ohlrogge, A. W., & Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *138*, 271-281. doi:10.1016/j.diabres.2018.02.023
41. Chojnacka, K., Hejmej, A., Zarzycka, M., Tworzydło, W., Bilinski, S., Pardyak, L., Bilinska, B. (2016). Flutamide induces alterations in the cell-cell junction ultrastructure and reduces the expression of Cx43 at the blood-testis barrier with no disturbance in the rat seminiferous tubule morphology. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *14*, 13. doi:10.1186/s12958-016-0144-2
42. Colasante, A., Minasi, M. G., Scarselli, F., Casciani, V., Zazzaro, V., Ruberti, A., Greco, E. (2018). The aging male: Relationship between male age, sperm quality and sperm DNA damage in an unselected population of 3124 men attending the fertility centre for the first time. *Archivio Italiano Di Urologia E Andrologia*, *90*(4), 254-259. doi:10.4081/aiua.2018.4.254
43. Condorelli, R. A., La Vignera, S., Mongioi, L. M., Alamo, A., & Calogero, A. E. (2018). Diabetes Mellitus and Infertility: Different Pathophysiological Effects in Type 1 and Type 2 on Sperm Function. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 9. doi:10.3389/fendo.2018.00268
44. Corzett, M., Mazrimas, J., & Balhorn, R. (2002). Protamine 1 : Protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Molecular Reproduction and Development*, *61*(4), 519-527. doi:10.1002/mrd.10105
45. Couper, J., & Donaghue, K. C. (2009). Phases of diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes*, *10*, 13-16. doi:10.1111/j.1399-5448.2009.00574.x
46. Dai, R. M., & Li, C. C. H. (2001). Valosin-containing protein is a multiubiquitin chain targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nature Cell Biology*, *3*(8), 740-744. doi:10.1038/35087056
47. Dandona, P., Thushu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J., Armstrong, D., & Nicotera, T. (1996). Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet*, *347*(8999), 444-445. doi:10.1016/s0140-6736(96)90013-6
48. DeRouchey, J., Hoover, B., & Rau, D. C. (2013). A Comparison of DNA Compaction by Arginine and Lysine Peptides: a Physical Basis for Arginine Rich Protamines. *Biochemistry*, *52*(17), 3000-3009. doi:10.1021/bi4001408
49. Deshmukh, A. S. (2016). Insulin-stimulated glucose uptake in healthy and insulin-resistant skeletal muscle. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, *26*(1), 13-24. doi:10.1515/hmbci-2015-0041
50. Deyebra, L., & Oliva, R. (1993). Rapid Analysis of Mammalian Sperm Nuclear Proteins. *Analytical Biochemistry*, *209*(1), 201-203. doi:10.1006/abio.1993.1104
51. Dhindsa, S., Prabhakar, S., Sethi, M., Bandyopadhyay, A., Chaudhuri, A., & Dandona, P. (2004). Frequent occurrence of hypogonadotropic hypogonadism in type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *89*(11), 5462-5468. doi:10.1210/jc.2004-0804
52. Domenjoud, L., Kremling, H., Burfeind, P., Maier, W. M., & Engel, W. (1991). On the expression of protamine genes in the testis of man and other mammals. *Andrologia*, *23*(5), 333-337.
53. Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M. E., Dufour, S., Cline, G. W., Shulman, G. I. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Journal of Clinical Investigation*, *103*(2), 253-259. doi:10.1172/jci5001
54. Dula, S. B., Jecmenica, M., Wu, R. P., Jahanshahi, P., Verrilli, G. M., Carter, J. D., Nunemaker, C. S. (2010). Evidence that low-grade systemic inflammation can induce islet dysfunction as measured by impaired calcium handling. *Cell Calcium*, *48*(2-3), 133-142. doi:10.1016/j.ceca.2010.07.007
55. Eddy, E. M., & O'Brien, D. A. (1994). The Spermatozoon. In *The Physiology of Reproduction*.

56. Fan, Y., Liu, Y., Xue, K., Gu, G. B., Fan, W. M., Xu, Y. L., & Ding, Z. D. (2015). Diet-Induced Obesity in Male C57BL/6 Mice Decreases Fertility as a Consequence of Disrupted Blood-Testis Barrier. *Plos One*, *10*(4). doi:10.1371/journal.pone.0120775
57. Fedder, J., Kaspersen, M. D., Brandslund, I., & Hojgaard, A. (2013). Retrograde ejaculation and sexual dysfunction in men with diabetes mellitus: a prospective, controlled study. *Andrology*, *1*(4), 602-606. doi:10.1111/j.2047-2927.2013.00083.x
58. Feiden, S., Wolfrum, U., Wegener, G., & Kamp, G. (2008). Expression and compartmentalisation of the glycolytic enzymes GAPDH and pyruvate kinase in boar spermatogenesis. *Reproduction Fertility and Development*, *20*(6), 713-723. doi:10.1071/rd08004
59. Ficarro, S., Chertihin, O., Westbrook, V. A., White, F., Jayes, F., Kalab, P., Visconti, P. E. (2003). Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm - Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(13), 11579-11589. doi:10.1074/jbc.M202325200
60. Francis, S., Yelumalai, S., Jones, C., & Coward, K. (2014). Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment. *Human Fertility*, *17*(2), 80-89. doi:10.3109/14647273.2014.915347
61. Fullston, T., Teague, E., Palmer, N. O., DeBlasio, M. J., Mitchell, M., Corbett, M., Lane, M. (2013). Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F-2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *Faseb Journal*, *27*(10), 4226-4243. doi:10.1096/fj.12-224048
62. Gallou-Kabani, C., Vige, A., Gross, M. S., Rabes, J. P., Boileau, C., Larue-Achagiotis, C., Junien, C. (2007). C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity*, *15*(8), 1996-2005. doi:10.1038/oby.2007.238
63. Garvey, W. T., Maianu, L., Zhu, J. H., Brechtel-Hook, G., Wallace, P., & Baron, A. D. (1998). Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, *101*(11), 2377-2386. doi:10.1172/jci1557
64. Giampietri, C., Petrungaro, S., Coluccia, P., D'Alessio, A., Starace, D., Riccioli, A., De Cesaris, P. (2005). Germ cell apoptosis control during spermatogenesis. *Contraception*, *72*(4), 298-302. doi:10.1016/j.contraception.2005.04.011
65. Greifenhagen, U., Frolov, A., Bluher, M., & Hoffmann, R. (2016). Plasma Proteins Modified by Advanced Glycation End Products (AGEs) Reveal Site-specific Susceptibilities to Glycemic Control in Patients with Type 2 Diabetes. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(18), 9610-9616. doi:10.1074/jbc.M115.702860
66. Guan, J. (2009). *Mammalian sperm flagella and cilia*. Stockholm: Karolinska Intitutet.
67. Gutierrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., & Olivares-Reyes, J. A. (2017). Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: An Update. *Gac Med Mex*, *153*(2), 214-228.
68. Hellman, B., Jacobsson, L., & Täljedal, I.-B. (1963). Endocrine activity of the testis in obese -hyperglycaemic mice. *44*(1), 20. doi:10.1530/acta.0.0440020
69. Huckins, C. (1971). Spermatogonial stem cell population in adult rats - Evidence for a long-cycling population. *Cell and Tissue Kinetics*, *4*(4), 335-&. doi:10.1111/j.1365-2184.1971.tb01544.x
70. Huckins, C. (1978). The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anatomical Record*, *190*(4), 905-926. doi:10.1002/ar.1091900410
71. Hud, N. V., Milanovich, F. P., & Balhorn, R. (1994). Evidence of novel secondary structure in DNA-bound protamine is revealed by Raman spectroscopy. *Biochemistry*, *33*(24), 7528-7535. doi:10.1021/bi00190a005
72. Hunter, D., Anand-Ivell, R., Danner, S., & Ivell, R. (2012). Models of in vitro spermatogenesis. *Spermatogenesis*, *2*(1), 32-43. doi:10.4161/spmg.19383
73. Ito, M., Kondo, Y., Nakatani, A., Hayashi, K., & Naruse, A. (2001). Characterization of low dose streptozotocin-induced progressive diabetes in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *9*(3), 71-78. doi:10.1016/s1382-6689(00)00064-8
74. Jackson Laboratory, T. (2019). C57/BL6J. Retrieved from <https://www.jax.org/strain/000664>
75. Jan, S. Z., Hamer, G., Repping, S., de Rooij, D. G., van Pelt, A. M. M., & Vormer, T. L. (2012). Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, *1822*(12), 1838-1850. doi:10.1016/j.bbadis.2012.02.008

76. Jha, K. N., Tripurani, S. K., & Johnson, G. R. (2017). TSSK6 is required for gamma H2AX formation and the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Journal of Cell Science*, 130(10), 1835-1844. doi:10.1242/jcs.202721
77. Johnson, P. A., Yelick, P. C., Liem, H., & Hecht, N. B. (1988). Differential distribution of the P1 and P2 protamine gene sequences in eutherian and marsupial mammals and a monotreme. *Gamete Research*, 19(2), 169-175. doi:10.1002/mrd.1120190207
78. Kaneto, H., Fujii, J., Myint, T., Miyazawa, N., Islam, K. N., Kawasaki, Y., Taniguchi, N. (1996). Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochemical Journal*, 320, 855-863. doi:10.1042/bj3200855
79. Kaneto, H., Katakami, N., Matsuhisa, M., & Matsuoka, T. (2010). Role of Reactive Oxygen Species in the Progression of Type 2 Diabetes and Atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, 11. doi:10.1155/2010/453892
80. Kasmauski, K. (2018). Type 2 diabetes: the urgent need to protect young people. *Lancet*, 392(10162), 2325-2325. doi:10.1016/s2213-8587(18)30303-6
81. Kawahito, S., Kitahata, H., & Oshita, S. (2009). Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World Journal of Gastroenterology*, 15(33), 4137-4142. doi:10.3748/wjg.15.4137
82. Keleher, M. R., Zaidi, R., Hicks, L., Shah, S., Xing, X. Y., Li, D. F., Cheverud, J. M. (2018). a high-fat diet alters genome-wide DNA methylation and gene expression in SM/J mice. *Bmc Genomics*, 19. doi:10.1186/s12864-018-5327-0
83. Khaneshi, F., Nasrolahi, O., Azizi, S., & Nejati, V. (2013). Sesame effects on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Avicenna J Phytomed*, 3(4), 347-355.
84. Kianifard, D., Sadrkhanlou, R. A., & Hasanzadeh, S. (2012). The ultrastructural Changes of the Sertoli and Leydig Cells Following Streptozotocin Induced Diabetes. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(1), 623-635.
85. King, A., & Bowe, J. (2016). Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. *Biochemical Pharmacology*, 99, 1-10. doi:10.1016/j.bcp.2015.08.108
86. Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, S. M., Moore, M. C., Renner, S., Woods, S. C., Tschop, M. H. (2018). Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(3), 140-162. doi:10.1038/nrendo.2017.161
87. Korani, M. A., & Sonbol, A. (2018). Study of risk factors for erectile dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus: Correlation to serum testosterone level. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 319-321. doi:10.1016/j.ajme.2018.01.002
88. Kotula-Balak, M., Hejmej, A., Sadowska, J., & Bilinska, B. (2007). Connexin 43 expression in human and mouse testes with impaired spermatogenesis. *European Journal of Histochemistry*, 51(4), 261-268.
89. Kushwaha, S., & Jena, G. B. (2013). Telmisartan ameliorates germ cell toxicity in the STZ-induced diabetic rat: Studies on possible molecular mechanisms. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 755(1), 11-23. doi:10.1016/j.mrgentox.2013.04.013
90. Lancellotti, T. E. S., Boarelli, P. V., Monclus, M. A., Cabrillana, M. E., Clementi, M. A., Espinola, L. S., Fornes, M. W. (2010). Hypercholesterolemia Impaired Sperm Functionality in Rabbits. *Plos One*, 5(10), 8. doi:10.1371/journal.pone.0013457
91. Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216-226. doi:10.1007/s00125-007-0886-7
92. Li, D., Sekhon, P., Barr, K. J., Marquez-Rosado, L., Lampe, P. D., & Kidder, G. M. (2013). Connexins and steroidogenesis in mouse Leydig cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91(2), 157-164. doi:10.1139/cjpp-2012-0385
93. Liu, L. Q., Zhang, Y. B., Chang, X. L., Li, R., Wu, C. H., Tang, L. M., & Zhou, Z. J. (2018). Fluorochloridone perturbs blood-testis barrier/Sertoli cell barrier function through Arp3-mediated F-actin disruption. *Toxicology Letters*, 295, 277-287. doi:10.1016/j.toxlet.2018.07.001
94. Lolis, D., Georgiou, I., Syrrou, M., Zikopoulos, K., Konstantelli, M., & Messinis, I. (1996). Chromomycin A(3)-staining as an indicator of protamine deficiency and fertilisation. *International Journal of Andrology*, 19(1), 23-27. doi:10.1111/j.1365-2605.1996.tb00429.x
95. Long, L. L., Qiu, H., Cai, B., Chen, N. N., Lu, X. F., Zheng, S. H., Li, Y. B. (2018). Hyperglycemia induced testicular damage in type 2 diabetes mellitus rats exhibiting

- microcirculation impairments associated with vascular endothelial growth factor decreased via PI3K/Akt pathway. *Oncotarget*, 9(4), 5321-5336. doi:10.18632/oncotarget.23915
96. Long, L. L., Wang, J. N., Lu, X. F., Xu, Y. X., Zheng, S. H., Luo, C. Q., & Li, Y. B. (2015). Protective Effects of Scutellarin on Type II Diabetes Mellitus-Induced Testicular Damages Related to Reactive Oxygen Species/Bcl-2/Bax and Reactive Oxygen Species/Microcirculation/Staving Pathway in Diabetic Rat. *Journal of Diabetes Research*, 11. doi:10.1155/2015/252530
  97. Lu, S., Cui, Y., Li, X., Zhang, H., Hu, J., Liu, J., & Chen, Z. J. (2014). Sperm retrieval in anejaculatory diabetic men who failed in drug treatment and penile vibratory stimulation during blood sugar under control. *Andrologia*, 46(4), 370-373. doi:10.1111/and.12087
  98. Luo, J., Quan, J., Tsai, J., Hobensack, C. K., Sullivan, C., Hector, R., & Reaven, G. M. (1998). Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 47(6), 663-668. doi:10.1016/s0026-0495(98)90027-0
  99. Maahs, D. M., West, N. A., Lawrence, J. M., & Mayer-Davis, E. J. (2010). Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 39(3), 481-+. doi:10.1016/j.ecl.2010.05.011
  100. Majzoub, A., Arafa, M., Al-Said, S., Dabbous, Z., Aboulsoud, S., Khalafalla, K., & Elbardisi, H. (2016). Premature ejaculation in type II diabetes mellitus patients: association with glycemic control. *Translational Andrology and Urology*, 5(2), 248-254. doi:10.21037/tau.2016.03.11
  101. Mangoli, E., Talebi, A. R., Anvari, M., & Pouretezari, M. (2013). Effects of experimentally-induced diabetes on sperm parameters and chromatin quality in mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 11(1), 53-60.
  102. Manjeet Kaur, G.-S., Choudhuri, J., & D'Souza, S. (2011). Sperm Chromatin Protamination: An Endocrine Perspective. *Protein & Peptide Letters*, 18(8), 786 - 801. doi:10.2174/092986611795714005
  103. Margaryan, H., Dorosh, A., Capkova, J., Manaskova-Postlerova, P., Philimonenko, A., Hozak, P., & Peknicova, J. (2015). Characterization and possible function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-spermatogenic protein GAPDHS in mammalian sperm. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13, 9. doi:10.1186/s12958-015-0008-1
  104. Markey, C. M., Jequier, A. M., Meyer, G. T., & Martin, G. B. (1995). Relationship between testicular morphology and sperm production following ischemie in the ram. *Reproduction Fertility and Development*, 7(1), 119-128. doi:10.1071/rd9950119
  105. MartinezMenarguez, J. A., Geuze, H. J., & Ballesta, J. (1996). Evidence for a nonlysosomal origin of the acrosome. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 44(4), 313-320. doi:10.1177/44.4.8601690
  106. Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A. (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: a Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *Plos Medicine*, 9(12), 12. doi:10.1371/journal.pmed.1001356
  107. Matson, C. K., Murphy, M. W., Griswold, M. D., Yoshida, S., Bardwell, V. J., & Zarkower, D. (2010). The Mammalian Doublesex Homolog DMRT1 Is a Transcriptional Gatekeeper that Controls the Mitosis versus Meiosis Decision in Male Germ Cells. *Developmental Cell*, 19(4), 612-624. doi:10.1016/j.devcel.2010.09.010
  108. Mayer-Davis, E. J., Lawrence, J. M., Dabelea, D., Divers, J., Isom, S., Dolan, L., Study, S. D. Y. (2017). Incidence Trends of Type 1 and Type 2 Diabetes among Youths, 2002-2012. *New England Journal of Medicine*, 376(15), 1419-1429. doi:10.1056/NEJMoa1610187
  109. McLaughlin, K. A., Richardson, C. C., Ravishankar, A., Brigatti, C., Liberati, D., Lampasona, V., Christie, M. R. (2016). Identification of Tetraspanin-7 as a Target of Autoantibodies in Type 1 Diabetes. *Diabetes*, 65(6), 1690-1698. doi:10.2337/db15-1058
  110. McPherson, S., & Longo, F. J. (1993). Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *European Journal of Histochemistry*, 37(2), 109-128.
  111. Meistrich, M. L., Mohapatra, B., Shirley, C. R., & Zhao, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*, 111(8), 483-488. doi:10.1007/s00412-002-0227-z
  112. Naughton, C. K., Jain, S., Strickland, A. M., Gupta, A., & Milbrandt, J. (2006). Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biology of Reproduction*, 74(2), 314-321. doi:10.1095/biolreprod.105.047365

113. Ndovi, T. T., Parsons, T., Choi, L., Caffo, B., Rohde, C., & Hendrix, C. W. (2007). a new method to estimate quantitatively seminal vesicle and prostate gland contributions to ejaculate. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 63(4), 404-420. doi:10.1111/j.1365-2125.2006.02791.x
114. Neill, J. D. (2006). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (3 ed. Vol. 1): Academic Press.
115. Ng, S. F., Lin, R. C. Y., Laybutt, D. R., Barres, R., Owens, J. A., & Morris, M. J. (2010). Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature*, 467(7318), 963-U103. doi:10.1038/nature09491
116. Nogueira, V., & Hay, N. (2013). Molecular Pathways: Reactive Oxygen Species Homeostasis in Cancer Cells and Implications for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 19(16), 4309-4314. doi:10.1158/1078-0432.ccr-12-1424
117. Oakberg, E. F. (1956). a description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *American Journal of Anatomy*, 99(3), 391-&. doi:10.1002/aja.1000990303
118. Oakberg, E. F. (1971). Spermatogonial stem-cell renewal in mouse. *Anatomical Record*, 169(3), 515-&. doi:10.1002/ar.1091690305
119. Oliva, R., & Dixon, G. H. (1991). Vertebrate Protamine Genes and the Histone-to-Protamine Replacement Reaction. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 40, 25 - 94. doi:https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60839-9
120. Pavlinkova, G., Margaryan, H., Zatecka, E., Valaskova, E., Elzeinova, F., Kubatova, A., Peknicova, J. (2017). Transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes-induced male subfertility. *Scientific Reports*, 7, 14. doi:10.1038/s41598-017-05286-0
121. Peknicova, J., Capkova, J., Geussova, G., Ivanova, M., & Mollova, M. (2001). Monoclonal antibodies to intra-acrosomal proteins inhibit gamete binding in vitro. *Theriogenology*, 56(2), 211-223. doi:10.1016/s0093-691x(01)00557-x
122. Peknicova, J., Chladek, D., & Hozak, P. (2005). Monoclonal antibodies against sperm intra-acrosomal antigens as markers for male infertility diagnostics and estimation of spermatogenesis. *American Journal of Reproductive Immunology*, 53(1), 42-49. doi:10.1111/j.1600-0897.2004.00245.x
123. Peknicova, J., Kyselova, V., Buckiova, D., & Boubelik, M. (2002). Effect of an endocrine disruptor on mammalian fertility. Application of monoclonal antibodies against sperm proteins as markers for testing sperm damage. *American Journal of Reproductive Immunology*, 47(5), 311-318. doi:10.1034/j.1600-0897.2002.01112.x
124. Peknicova, J., & Moos, J. (1990). Monoclonal antibodies against boar acrosomal antigens labeling undamaged acrosomes of spermatozoa in immunofluorescence test. *Andrologia*, 22(5), 427-435.
125. Peknicova, J., Pexidrova, M., Kubatova, A., Koubek, P., Tepla, O., Sulimenko, T., & Draber, P. (2007). Expression of beta-tubulin epitope in human sperm with pathological spermiogram. *Fertility and Sterility*, 88, 1120-1128. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.12.070
126. Pontes, D. A., Fernandes, G. S. A., Piffer, R. C., Gerardin, D. C. C., Pereira, O. C. M., & Kempinas, W. G. (2011). Ejaculatory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats: the role of testosterone. *Pharmacological Reports*, 63(1), 130-138. doi:10.1016/s1734-1140(11)70407-8
127. Popoola, B., Ashefor, O., Akanni, O., & Adaramoye, O. (2017). Biochemical, Hormonal and Histological Changes in Prostate of Wistar Rats Following Long Term Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 32, 75-84.
128. Pozzo, L., Vornoli, A., Coppola, I., Della Croce, C. M., Giorgetti, L., Gervasi, P. G., & Longo, V. (2016). Effect of HFD/STZ on expression of genes involved in lipid, cholesterol and glucose metabolism in rats. *Life Sciences*, 166, 149-156. doi:10.1016/j.lfs.2016.09.022
129. Rakieten, N., Rakieten, M. L., & Nadkarni, M. V. (1963). Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemotherapy Reports*(29), 91-98.
130. Ramaswamy, S., & Weinbauer, G. F. (2014). Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis*, 4(2), e996025. doi:10.1080/21565562.2014.996025
131. Rato, L., Alves, M. G., Cavaco, J. E., & Oliveira, P. F. (2014). High-energy diets: a threat for male fertility? *Obesity Reviews*, 15(12), 996-1007. doi:10.1111/obr.12226
132. Reeves, R. H., Gearhart, J. D., Hecht, N. B., Yelick, P., Johnson, P., & Obrien, S. J. (1989). Mapping of PRM1 to human chromosome 16 and tight linkage of Prm-1 and Prm-2 on



- mouse chromosome 16. *Journal of Heredity*, 80(6), 442-446.  
doi:10.1093/oxfordjournals.jhered.a110895
133. Ricci, G., Catizone, A., Esposito, R., Pisanti, F. A., Vietri, M. T., & Galdieri, M. (2009). Diabetic rat testes: morphological and functional alterations. *Andrologia*, 41(6), 361-368.  
doi:10.1111/j.1439-0272.2009.00937.x
  134. Risley, M. S., Tan, I. P., Roy, C., & Saez, J. C. (1992). Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *Journal of Cell Science*, 103, 81-96.
  135. Roden, M., Price, T. B., Perseghin, G., Petersen, K. F., Rothman, D. L., Cline, G. W., & Shulman, G. I. (1996). Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 97(12), 2859-2865. doi:10.1172/jci118742
  136. Rossi, G. L., & Bestetti, G. (1981). Morphological changes in the hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis of male rats after twelve months of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 21(5), 476-481. doi:10.1007/bf00257789
  137. Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P. S., & Clegg, E. D. (1993). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. *International Journal of Andrology*, 16(1), 83-83.  
doi:10.1111/j.1365-2605.1993.tb01156.x
  138. Sautiere, P., Martinage, A., Belaiche, D., Arkhis, A., & Chevallier, P. (1988). Comparison of the amino acid sequences of human protamines HP2 and HP3 and of intermediate basic nuclear proteins HPS1 and HPS2. Structural evidence that HPS1 and HPS2 are pro-protamines. *Journal of Biological Chemistry*, 263(23), 11059-11062.
  139. Scherer, P. E. (2006). Adipose tissue - From lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*, 55(6), 1537-1545. doi:10.2337/db06-0263
  140. Schneider, S., Balbach, M., Jikeli, J. F., Fietz, D., Nettersheim, D., Jostes, S., Schorle, H. (2016). Re-visiting the Protamine-2 locus: deletion, but not haploinsufficiency, renders male mice infertile. *Scientific Reports*, 6, 13. doi:10.1038/srep36764
  141. Shang, Y., Zhu, F., Wang, L., Ouyang, Y. C., Dong, M. Z., Liu, C., Li, W. (2017). Essential role for SUN5 in anchoring sperm head to the tail. *Elife*, 6. doi:10.7554/eLife.28199
  142. Shrilatha, B., & Muralidhar. (2007a). Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the Streptozotocin-diabetic rat. *International Journal of Andrology*, 30(6), 508-518.  
doi:10.1111/j.1365-2605.2007.00748.x
  143. Shrilatha, B., & Muralidhar. (2007b). Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: Its progression and genotoxic consequences. *Reproductive Toxicology*, 23(4), 578-587. doi:10.1016/j.reprotox.2007.02.001
  144. Singh, J., Oneill, C., & Handelsman, D. J. (1995). Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology*, 136(12), 5311-5321.  
doi:10.1210/en.136.12.5311
  145. Singh, K. A., Shalini, T., Ajay, C., Ramji, S., & Narsingh, V. (2014). Type 2 diabetes mellitus affects male fertility potential. *Indian journal of physiology and pharmacology*, 58, 403-406.
  146. Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2014). Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 18(1), 1-14.  
doi:10.4196/kjpp.2014.18.1.1
  147. Sisman, A. R., Kiray, M., Camsari, U. M., Evren, M., Ates, M., Baykara, B., Uysal, N. (2014). Potential Novel Biomarkers for Diabetic Testicular Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Nerve Growth Factor Beta and Vascular Endothelial Growth Factor. *Disease Markers*, 7. doi:10.1155/2014/108106
  148. Skovso, S. (2014). Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of Diabetes Investigation*, 5(4), 349-358. doi:10.1111/jdi.12235
  149. Soliman, G. A., Saeedan, A. S., Abdel-Rahman, R. F., Ogaly, H. A., Abd-Elsalam, R. M., & Abdel-Kader, M. S. (2018). Olive leaves extract attenuates type II diabetes mellitus-induced testicular damage in rats: Molecular and biochemical study. *Saudi Pharmaceutical Journal*.  
doi:https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.11.015
  150. Srinivasan, K., Viswanad, B., Asrat, L., Kaul, C. L., & Ramarao, P. (2005). Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological Research*, 52(4), 313-320.  
doi:10.1016/j.phrs.2005.05.004
  151. Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A., & Feinglos, M. N. (1988). Diet-induced type-II diabetes in 57BL/6J MICE. *Diabetes*, 37(9), 1163-1167.  
doi:10.2337/diabetes.37.9.1163

152. Talebi, A. R., Mangoli, E., Nahangi, H., Anvari, M., Pouretezari, M., & Halvaei, I. (2014). Vitamin C attenuates detrimental effects of diabetes mellitus on sperm parameters, chromatin quality and rate of apoptosis in mice. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, *181*, 32-36. doi:10.1016/j.ejogrb.2014.07.007
153. Tepla, O., Peknicova, J., Koci, K., Mika, J., Mrazek, M., & Elzeinova, F. (2006). Evaluation of reproductive potential after intracytoplasmic sperm injection of varied human semen tested by antiacrosomal antibodies. *Fertility and Sterility*, *86*(1), 113-120. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.12.019
154. Thomas, N. J., Jones, S. E., Weedon, M. N., Shields, B. M., Oram, R. A., & Hattersley, A. T. (2018). Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank. *Lancet Diabetes & Endocrinology*, *6*(2), 122-129. doi:10.1016/s2213-8587(17)30362-5
155. Tyrrell, J. S., Yaghootkar, H., Freathy, R. M., Hattersley, A. T., & Frayling, T. M. (2013). Parental diabetes and birthweight in 236 030 individuals in the UK Biobank Study. *International Journal of Epidemiology*, *42*(6), 1714-1723. doi:10.1093/ije/dyt220
156. Varanda, W. A., & Decarvalho, A. C. C. (1994). Intercellular communication between mouse Leydig cells. *American Journal of Physiology*, *267*(2), C563-C569.
157. Verma, R., Samanta, R., & Krishna, A. (2018). Comparative Effects of Estrogen and Phytoestrogen, Genistein on Testicular Activities of Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetic Mice. *Reproductive Sciences*, *0*(0), 1933719118815576. doi:10.1177/1933719118815576
158. Vilfan, I. D., Conwell, C. C., & Hud, N. V. (2004). Formation of native-like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(19), 20088-20095. doi:10.1074/jbc.M312777200
159. Visconti, P. E., Ning, X. P., Fornes, M. W., Alvarez, J. G., Stein, P., Connors, S. A., & Kopf, G. S. (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: Cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Developmental Biology*, *214*(2), 429-443. doi:10.1006/dbio.1999.9428
160. Vozarova, B., Weyer, C., Lindsay, R. S., Pratley, R. E., Bogardus, C., & Tataranni, P. A. (2002). High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes*, *51*(2), 455-461. doi:10.2337/diabetes.51.2.455
161. Wang, J. L., Obici, S., Morgan, K., Barzilai, N., Feng, Z. H., & Rossetti, L. (2001). Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes*, *50*(12), 2786-2791. doi:10.2337/diabetes.50.12.2786
162. Wang, Y. G., Zhang, Z. G., Guo, W. Y., Sun, W. X., Miao, X., Wu, H., Cai, L. (2014). Sulforaphane reduction of testicular apoptotic cell death in diabetic mice is associated with the upregulation of Nrf2 expression and function. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *307*(1), E14-E23. doi:10.1152/ajpendo.00702.2013
163. Wang, Z. Y., & Gleichmann, H. (1998). GLUT2 in pancreatic islets - Crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes*, *47*(1), 50-56. doi:10.2337/diabetes.47.1.50
164. Wei, Y. C., Yang, C. R., Wei, Y. P., Zhao, Z. A., Hou, Y., Schatten, H., & Sun, Q. Y. (2014). Paternally induced transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(5), 1873-1878. doi:10.1073/pnas.1321195111
165. WHO, World health organisation (2010). *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*: World Health Organization.
166. WHO, World health organisation (2011). Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *93*(3), 299-309. doi:10.1016/j.diabres.2011.03.012
167. WHO, World health organisation (2016). *Global report on diabetes*. Retrieved from [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257\\_eng.pdf;jsessionid=0AA015586AD1CDA60ED388D542710519?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257_eng.pdf;jsessionid=0AA015586AD1CDA60ED388D542710519?sequence=1)
168. Willemsen, G., Ward, K. J., Bell, C. G., Christensen, K., Bowden, J., Dalgard, C., Spector, T. (2015). The Concordance and Heritability of Type 2 Diabetes in 34,166 Twin Pairs From International Twin Registers: The Discordant Twin (DISCOTWIN) Consortium. *Twin Research and Human Genetics*, *18*(6), 762-771. doi:10.1017/thg.2015.83
169. Yang, Q. E., Kim, D., Kaucher, A., Oatley, M. J., & Oatley, J. M. (2013). CXCL12-CXCR4 signaling is required for the maintenance of mouse spermatogonial stem cells. *Journal of Cell Science*, *126*(4), 1009-1020. doi:10.1242/jcs.119826

170. Ye, J. P. (2008). Regulation of PPAR gamma function by TNF-alpha. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(3), 405-408. doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.068
171. Yeh, S. Y., Tsai, M. Y., Xu, Q. Q., Mu, X. M., Lardy, H., Huang, K. E., Chang, C. S. (2002). Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: An in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13498-13503. doi:10.1073/pnas.212474399
172. Yuan, L., Liu, J. G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B., & Hoog, C. (2000). The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Molecular Cell*, 5(1), 73-83. doi:10.1016/s1097-2765(00)80404-9
173. Yuan, S. Q., Stratton, C. J., Bao, J. Q., Zheng, H. L., Bhetwal, B. P., Yanagimachi, R., & Yan, W. (2015). Spata6 is required for normal assembly of the sperm connecting piece and tight head-tail junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(5), E430-E439. doi:10.1073/pnas.1424648112
174. Zatecka, E., Castillo, J., Elzeinova, F., Kubatova, A., Ded, L., Peknicova, J., & Oliva, R. (2014). The effect of tetrabromobisphenol a on protamine content and DNA integrity in mouse spermatozoa. *Andrology*, 2(6), 910-917. doi:10.1111/j.2047-2927.2014.00257.x
175. Zha, W. L., Bai, Y. T., Xu, L., Liu, Y. N., Yang, Z., Gao, H., & Li, J. (2018). Curcumin Attenuates Testicular Injury in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Biomed Research International*, 10. doi:10.1155/2018/7468019
176. Zhang, Z. G., Wang, S. D., Zhou, S. S., Yan, X. Q., Wang, Y. G., Mellen, N., Cai, L. (2014). Sulforaphane prevents the development of cardiomyopathy in type 2 diabetic mice probably by reversing oxidative stress-induced inhibition of LKB1/AMPK pathway. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 77, 42-52. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.09.022
177. Zhou, N. Y., Sun, L., Yang, H., Chen, Q., Wang, X. G., Tan, L., Cao, J. (2016). Anogenital distance is associated with serum reproductive hormones, but not with semen quality in young men. *Human Reproduction*, 31(5), 958-967. doi:10.1093/humrep/dew052