

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné a vývojové biologie



Bc. Eliška Valášková

Vliv diabetes mellitus na reprodukční parametry a expresi
vybraných testikulárních genů na myším modelu

The effect of diabetes mellitus on reproductive parameters and
expression of selected testicular genes in diabetic mice

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitelka: doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc.
Praha, 2016

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 dne

Poděkování:

Chtěla bych moc poděkovat všem, kteří mi byli nápomocni při psaní mé diplomové práci.

Především děkuji doc. RNDr. Janě Pěkníkové, CSc. za cenné rady a připomínky při vypracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Evě Žatecké, Ph.D. za čas, který mi věnovala a poskytnutí odborných konzultací. V neposlední řadě celé Laboratoři reprodukční biologie, kde jsem měla možnost za odborného dohledu získat cenné zkušenosti a naučit se spoustu užitečných metod.

Abstrakt:

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO, 2014), 15% párů v reprodukčním věku trpí neplodností, z toho více než 60% případů je způsobeno mužskou neplodností. Tento stav může být zapříčiněn genetickým pozadím jedince, podmínkami životního prostředí nebo například různými chorobami, zahrnující i diabetes mellitus (DM). Cílem této studie bylo proto určit vliv DM na reprodukční parametry a expresi vybraných testikulárních genů na myším modelu (FVB myší kmen).

Ke studiu byl vybrán FVB inbrední myší kmen, u kterého byl DM (typ 1) uměle navozen látkou streptozotocin, která způsobuje destrukci buněk β slinivky břišní. Po 6 týdnech v diabetické prostředí byli dospělí samci usmrceni a podrobeni analýze.

Naše výsledky ukázaly, že diabetické prostředí mělo vliv na váhu těla a reprodukčních orgánů stejně tak jako na ledviny a játra. Dále byla pozorována snížená koncentrace a viabilita u diabetických spermií porovnávaných s kontrolními. Stejně tak zvýšené značení apoptotického markeru annexinu V bylo zaznamenáno u ovlivněné skupiny. Dále byly porovnávány změny u jaderných proteinů spermií – protaminů. U diabetických zvířat byl sledován vyšší počet spermií s nedostatečnou protaminací. Nicméně, poměr mezi protaminem 1 a protaminem 2 (P1/P2) nebyl pozměněn u diabetických samců porovnávaných s kontrolními. V případě testikulární tkáně byla pozorována zhoršená morfologie semenotvorných kanálků a zvýšený počet apoptotických buněk v testes u diabetických myší. Navíc byla změněna exprese některých testikulárních genů důležitých pro správnou funkci spermatocytů a spermatid.

Naše poznatky naznačují, že DM může mít vliv na kvalitu spermií. To by mohlo mít spojitost s poškozením semenotvorných kanálků a zvýšeným počtem apoptotických buněk v testes. Metabolická choroba také způsobila změnu exprese genů, které mají klíčovou roli během meiotické fáze spermatogeneze (*Sycp1* a *Sycp3*) a genů důležitých během spermiogeneze (*Tnp1*, *Tnp1*, *Prm1* a *Prm2*). Změněný profil genové exprese může také souviset se zhoršenou kvalitou spermií u diabetických zvířat.

Klíčová slova: diabetes mellitus (DM), streptozotocin, reprodukční parametry, samčí plodnost, spermie, genová exprese

Abstract:

According to the World Health Organization (WHO), 15% of couples in reproductive age suffer from infertility problems, and up to 60% of cases are caused by male factor. Causes of this condition could be genetic background, environmental factors and various diseases, including diabetes mellitus (DM). The aim of this study was to investigate the effects of DM on reproductive parameters and expression of selected testicular genes using mouse model (FVB inbred mouse strain).

DM (type 1) was artificially induced by chemical substance streptozotocin, which causes destruction of pancreatic β cells. These mice were exposed to diabetic condition for 6 weeks and then subjected to analysis.

Our results have shown that diabetic condition had an impact on body weight, weight of reproductive organs as well as kidneys and livers. We also observed decreased concentration and viability of diabetic sperm compared to control. Moreover, we noticed increased staining with apoptotic marker annexin V. Further, we evaluated changes of sperm nuclear proteins - protamines. In diabetic animals, we observed higher number of sperm with insufficient protamination. Nevertheless, protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), a marker of male fertility, was not altered in sperm of diabetic animals compared to control. Regarding the testicular tissue, we observed impaired morphology of seminiferous tubules and increased number of apoptotic cells in testes of diabetic animals. We also analysed expression of several important testicular genes where we showed changes in expression of genes responsible for proper function of spermatocytes and spermatids.

Our findings indicate that DM affects sperm quality in terms of alterations in the morphology of testicular tissue. The metabolic disorders also caused changes in the expression of genes important during meiotic phase of spermatogenesis (*Sycp1* and *Sycp3*) and genes important during spermiogenesis (*Tnp1*, *Tnp2*, *Prm1* and *Prm2*). Changes in gene expression could further contribute to impaired sperm quality of diabetic animals.

Key words : diabetes mellitus (DM), streptozotocin, reproductive parameters, male fertility, sperm, gene expression

Obsah:

Abstrakt:	- 4 -
Abstract:	- 5 -
Obsah:.....	- 6 -
Seznam zkratk:	- 8 -
1. Úvod:	- 10 -
1.1 Fyziologie reprodukce	- 10 -
1.1.1 Spermatogeneze	- 10 -
1.1.2 Spermioogeneze	- 13 -
1.1.3 Jaderné proteiny protaminy	- 14 -
1.1.4 Protaminy a mužská neplodnost.....	- 18 -
1.1.5 Epididymální maturace	- 19 -
1.1.6 Spermie.....	- 20 -
1.2 Genová a hormonální kontrola spermatogeneze	- 23 -
1.3 Diabetes mellitus	- 25 -
1.3.1 Diabetes mellitus I. typu.....	- 26 -
1.3.2 Diabetes mellitus II. typu	- 27 -
1.4 Modely studia diabetes mellitus	- 29 -
1.4.1 Streptozotocinem navozený diabetes mellitus	- 30 -
1.4.2 Diabetes mellitus a mužská neplodnost	- 30 -
1.5 Apoptóza	- 32 -
1.5.1 Apoptóza a souvislost s neplodností savců	- 34 -
2. Cíle práce.....	- 36 -
3. Metody:	- 37 -
3.1 Experimenty <i>in vivo</i>	- 37 -
3.2 AGD, váha těla a orgánů	- 38 -

3.3 Izolace a příprava spermií	- 38 -
3.4 Koncentrace spermií.....	- 39 -
3.5 Životnost spermií-viabilita	- 39 -
3.6 Hodnocení apoptotického stavu spermií	- 39 -
3.7 Morfologie spermií a separace hlavičky	- 40 -
3.8 Zastoupení protaminů v hlavičkách myších spermií.....	- 40 -
3.9 Příprava histologických preparátů.....	- 40 -
3.10 TUNEL analýza na histologických řezech testes	- 42 -
3.11 Extrakce jaderných proteinů protaminů	- 43 -
3.12 Rozdělení a analýza jaderných proteinů spermií.....	- 43 -
3.13 Izolace RNA.....	- 44 -
3.14 Stanovení koncentrace a kvality RNA	- 45 -
3.15 Reverzní transkripce (syntéza cDNA).....	- 46 -
3.16 Real Time quantitative PCR (RT-qPCR).....	- 46 -
3.17 Statistická analýza	- 49 -
4. Výsledky:	- 50 -
4.1 Výsledky <i>in vivo</i> studie provedené na FVB myších	- 50 -
4.2 Počet potomků, váha těla a orgánů.....	- 50 -
4.3 Parametry spermií	- 52 -
4.4 Histologická analýza	- 55 -
4.5 TUNEL analýza.....	- 57 -
4.6 Poměr jaderných proteinů protaminů P1/P2 ve spermií.....	- 58 -
4.7 Analýza genové exprese.....	- 60 -
5. Diskuze:.....	- 65 -
6. Závěr:	- 74 -
7. Literatura:	- 75 -

Seznam zkratek:

<i>Actb</i>	- gen pro protein aktin β
<i>Ar</i>	- gen pro androgenní receptor
ATP	- adenosintrifosfát
<i>Bcl-2</i>	- z anglického „B-cell leukemia/lymphoma“
<i>Ccna1</i>	- gen pro cyklin A1
cDNA	- komplementární deoxynukleová kyselina
DAPI	- 4', 6-diamino-2-fenylindolyl
DM	- diabetes mellitus
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
DPBS	- PBS s přídavkem glukózy
dUTP	- deoxyuridine trifosfát
DTT	- dithiotreitol
EDTA	- kyselina ethylendiamintetraoctová
Ezblue	- barvivo na barvení proteinů
<i>Fshr</i>	- gen pro folikul-stimulující hormonální receptor
<i>Gjal</i>	- z anglického „Gap junction alpha-1 protein“
GLUT	- glukózový přenašeč
<i>Grth</i>	- gen pro RNA helikázu regulovanou gonadotropinem
GuHCl	- guanidinium chloride
HCl	- kyselina chlorovodíková
H₂O₂	- peroxid vodíku
LiCl	- chlorid lithný
<i>Meig1</i>	- gen pro protein účastnící se procesu meióza/ spermatogeneze
mRNA	- mediátorová ribonukleová kyselina
mitDNA	- mitochondriální DNA
nDNA	- nukleární DNA
PMSF	- fenylmethylsulfonyl fluorid
<i>Ppia</i>	- peptidylprolyl isomerasa A
<i>Prm1</i>	- gen pro protein protamin 1
<i>Prm2</i>	- gen pro protein protamin 2
PBS	- fosfátový pufr (fyziologický roztok)
PCR	- polymerázová řetězová reakce

<i>p21</i>	- gen pro protein p21 aktivující se proteinem p53
<i>p53</i>	- gen pro protein p53
<i>P450scc</i>	- z anglického „Cholesterol side-chain cleavage enzyme“
RIN	- z anglického „RNA integrity number“
RNA	- ribonukleová kyselina
RT-PCR	- polymerázová řetězová reakce v reálném čase
<i>Sox8</i>	- gen pro protein z rodiny SRY („Sex-determining region Y“)
<i>Star</i>	- gen pro steroidogenní regulační protein
<i>Sycp1</i>	- gen pro synaptonemální komplex protein 1
<i>Sycp3</i>	- gen pro synaptonemální komplex protein 3
TAE	- Tris/EDTA/kyselina octová pufr
TCA	- kyselina trichloroctová
TE	- Tris/EDTA pufr
<i>Tnp1</i>	- gen pro transition protein 1
<i>Tnp2</i>	- gen pro transition protein 2
TUNEL assay	- z anglického „TdT-mediated dUTP nick-end labelling assay“
<i>Vegfa</i>	- gen pro protein pro vaskulární endoteliální růstový faktor A
<i>Wt1</i>	- z anglického „Wilms tumor protein“
WHO	- z anglického „World health organization“

1. Úvod:

1.1 Fyziologie reprodukce

Jedním z klíčových dějů existence živočichů je rozmnožování. Splýváním samčích a samičích pohlavních buněk-gamet vzniká diploidní zygota. Jejím rýhováním a postupnou migrací a diferenciací buněk vzniká budoucí embryo. Tento proces je velice specificky regulovaný a jakýkoliv faktor, který by měnil podmínky oplození a zamezoval by správnému vývoji embrya, by měl fatální následky pro vznik nového organismu.

Velice důležité pro vznik životaschopného embrya není pouze samotný akt oplození, ale i předcházející události, jako je vznik a vývoj gamet.

Samičí pohlavní buňky se tvoří ve vaječnicích – ováriích ze zárodečných buněk oogonií. Podstupují několik po sobě jdoucích buněčných dělení zahrnujících mitózu, při které vznikají oocyty I. řádu. Ty následně vstupují do meiózy (proces, kdy dochází k redukci počtu chromozomů na polovinu), kde v profázi prvního meiotického dělení setrvávají a čekají na aktivaci vajíčka pomocí pohlavních hormonů stimulujících vývoj folikulů. Touto hormonální aktivací je dokončeno první meiotické dělení a vznikají dvě buňky. Jedná se oocyt II. řádu a pólovou buňku. Konečnou fází vývoje zralého vajíčka je druhé meiotické dělení, iniciováno po ovulaci a dokončeno až po proniknutí spermie do vajíčka, kdy z oocyty II. řádu vzniká vajíčko a druhé pólové tělísko (Gilbert, 2000).

Samčí pohlavní buňky vznikají v testes ze zárodečných buněk spermatogonií, které prochází mitotickým a následně meiotickým redukčním dělením. V případě samčích pohlavních buněk si schopnost oplodnit vajíčko spermie získává v několika fázích svého vývoje. Spermie prochází 4-mi fázemi spermatogeneze, následně dochází k epididymální maturaci a v samičím reprodukčním traktu pak dochází ke kapacitaci a akrozomální reakci. Jednotlivé fáze vývoje spermie budou podrobněji vysvětleny v následujících kapitolách.

1.1.1 Spermatogeneze

Proces spermatogeneze je jedním z nejdůležitějších procesů v samčí reprodukci. Je klíčový pro produkci zralé funkční spermie a narušení správného průběhu spermatogeneze může vést až k samčí neplodnosti.

Samčí pohlavní buňka - spermie je konečný produkt redukčního dělení - spermatogeneze. Vývoj spermie probíhá postupně přes mitotickou, meiotickou a postmeiotickou fázi v semenotvorných kanálcích varlat - testes.

Primordiální zárodečné buňky se nachází v semenotvorných kanálcích a jsou obklopeny podpůrnými Sertoliho buňkami. Mezibuněčný prostor mezi jednotlivými semenotvornými kanálky je vyplněn Leydigovými a myoidními buňkami. Všechny tyto buňky se podílí na vytvoření podmínek nezbytných pro správný průběh spermatogeneze (Gilbert, 2000).

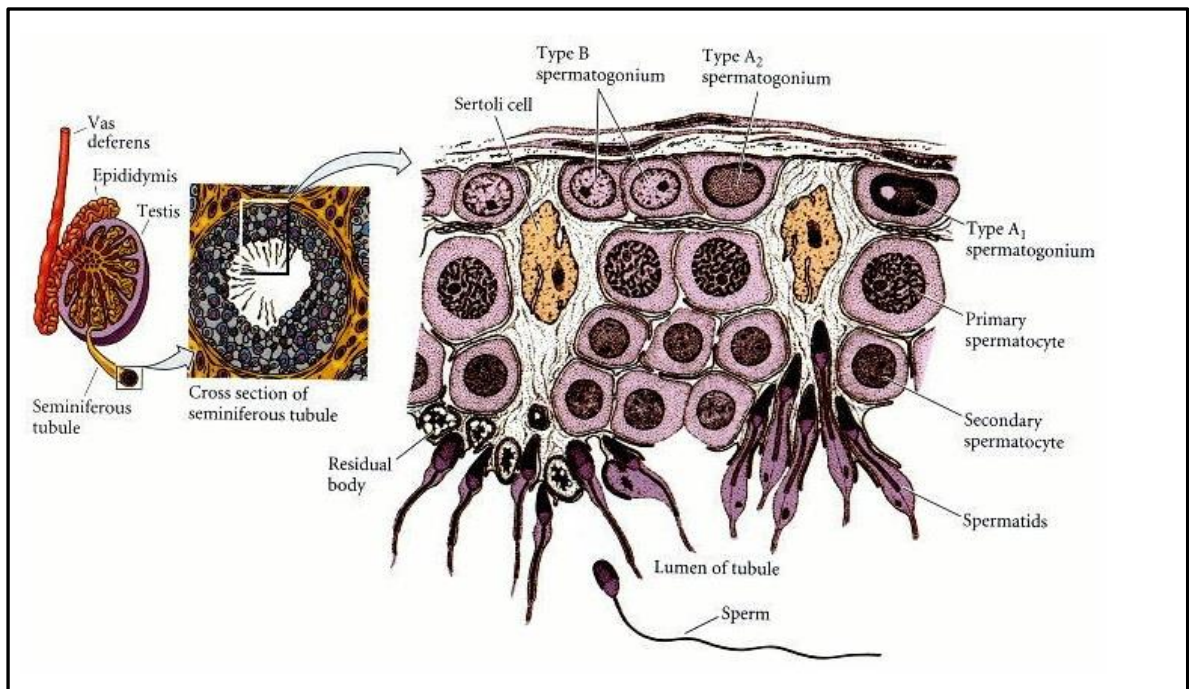
Počátečním krokem spermatogeneze je mitotické dělení primordiálních zárodečných buněk na spermatogonie typu A1. Jedná se o kmenové buňky, které dávají vzniknout jednak dalšímu typu spermatogonií - typu A2, ale také z nich vznikají další spermatogonie A1. Tím je zachován jejich nediferencovaný počáteční stav a mohou se tak neustále obnovovat. Spermatogonie typu A2 se diferencují na spermatogonie typu A3. Z tohoto typu spermatogonií vznikají spermatogonie typu A4. Je možné, že každý ze čtyř typů spermatogonií má vlastnosti kmenových buněk, neboli schopnost sebeobnovy. Spermatogonie typu A4 má 3 možnosti své další cesty: a) může dát vzniknout dalším spermatogoniím typu A4 (sebeobnova), b) může podstoupit proces buněčné smrti (apoptóza), c) nebo se může diferencovat do tzv. přechodných spermatogonií. Z tohoto typu buněk vznikají spermatogonie typu B. Tyto buňky jsou prekurzory spermatocytů I. řádu a jsou posledními buňkami podstupující mitotické dělení. Spermatocyty I. řádu neboli primární spermatocyty se dále dělí meioticky. Primární spermatocyty vstupují do prvního meiotického dělení a vzniká z nich pár sekundárních spermatocytů. Sekundární spermatocyty následně vstupují do druhého meiotického dělení a vznikají tak haploidní buňky nazývané spermatidy. Při meióze buňky prodělávají dvě sady dělení, finální dceřiné buňky obsahují pouze polovinu původního počtu chromozómů (Gilbert, 2000).

Nově vznikající buňky zůstávají během spermatogeneze spojeny mezibuněčnými cytoplazmatickými můstky, zajišťující synchronizaci vývoje a výměnu produktů genů mezi buňkami. Vzniklé kulaté spermatidy následně prodělávají sérii morfologických změn (spermioogeneze) při kterých získávají charakteristický tvar a dochází k vývoji specializovaných orgánů spermie (viz níže).

Postupně vyvíjející se spermie postupuje od periferní části semenotvorného kanálku až do středu kanálku (lumen). V lumen kanálku se již nachází funčně

a morfologicky vyvinutá spermie, která bude podstupovat další procesy, při kterých získá schopnost oplodnit vajíčko (Obr. 1).

U myši, celý vývojový proces od spermatogoniálních kmenových buněk po vznik testikulární zralé spermie trvá přibližně 35 dní (v závislosti na konkrétním kmenu). Mitotická fáze trvá ~11 dní, meióza trvá ~10 dní, a spermiogeneze probíhá dalších ~13.5 dne. U lidí, vývoj spermií trvá téměř dvakrát tak dlouho (Gilbert, 2000).



Obr. 1 – Schematické znázornění vývoje spermie v semenotvorných kanálcích (Gilbert, 2000)

Savčí spermatogeneze je vysoce koordinovaný proces, a v průběhu všech fází vývoje zárodečné buňky komunikují se Sertoliho buňkami prostřednictvím specializovaných buněčných spojení (Lui and Cheng, 2012). V dospělosti, Sertoliho buňky podporují tvorbu spermií skrze zásobení spemií důležitými látkami a živinami. Sertoliho buňky hrají také důležitou roli při tvorbě varlat, jak u vyvíjejícího se embrya, tak i po jeho narození (Sharpe et al., 2011). V pubertě mají Sertoliho buňky na starosti diferenciaci zárodečných buněk a také tvoří tzv. „blood–testis“ bariéru, která fyzicky odděluje cévy a vyvíjející se zárodečné buňky. Epitel semenotvorného kanálku je tak rozdělen na apikální a basální část (Lui a Cheng, 2012). Zrání Sertoliho buněk je řízeno hormony; zejména folikuly stimulujícího hormonu (FSH) a hormony štítné žlázy.

Hormony štítné žlázy inhibují proliferaci Sertoliho buněk a stimulují jejich funkční zrání, oproti tomu FSH má funkci jako pro-proliferační faktor těchto buněk (Sharpe et al., 2011). Počet Sertoliho buněk určuje počet zárodečných buněk, které mohou vzniknout v průběhu spermatogeneze.

Spermatogeneze a plodnost savců jsou závislé na přítomnosti nejen FSH a hormonů štítné žlázy, ale i hormonu testosteronu. Nepřítomnost testosteronu nebo nepřítomnost androgenního receptoru způsobuje přerušení procesu spermatogeneze a dochází tak k narušení správného vývoje spermie v testes. Produkce testosteronu je zajištěna Leydigovými buňkami. Testosteron může pomocí regulace genové exprese přímo vyvolat dělení zárodečných buněk v testes (klasická cesta) nebo aktivuje kinázy, které zprostředkují další procesy důležité za správný průběh spermatogeneze (Walker, 2011).

1.1.2 Spermioogeneze

Po vytvoření haploidních pohlavních buněk spermatid následuje proces spermioogeneze, ve kterém dochází k formování konečného tvaru spermie a z tzv. kulatých spermatid vznikají pohybu schopné spermie. V této fázi vývoje spermie dochází ke kondenzaci jádra, utváření bičíku a akrozomálních struktur a v neposlední řadě ztrátě velkého množství cytoplasmy. Během tohoto procesu spousta organel spermie, jako je například jádro, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie nebo centriola podstupují strukturální a funkční změny, které jsou důležité pro správnou funkci spermie (de Kretser et al., 1998).

Jedním z prvotních kroků spermioogeneze je utváření akrozomálního váčku z Golgiho aparátu. Akrosom je speciální struktura nacházející se v hlavičce spermie. Přestože se druhově velikost a tvar akrosomu liší, základní stavba je u savců stejná. Je tvořen vnitřní a vnější akrozomální membránou, které chrání obsah akrosomu, který obsahuje specifické lytické enzymy důležité pro fúzi spermie s vajíčkem (Yanagimachi, 1994).

Zdá se, že akrosom je funkčně podobný lysozomu. Tato specializovaná struktura obsahuje například proteázy (akrosin), glykosidázy (β -galaktosidáza, hyarulonidáza), fosfolipázy a další. Některé z nich mají funkci v interakci spermie s vajíčkem (např. akrosin a glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza spermii), (Peknicova et al., 2001, Margaryan et al., 2015).

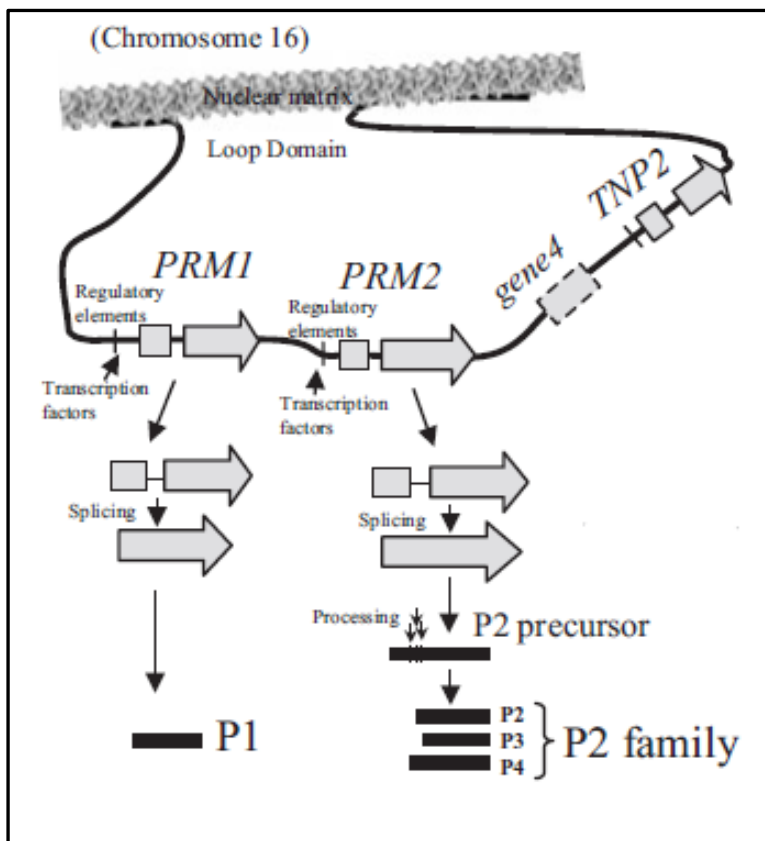
Dalším krokem je formování struktur bičíku spermie. Budoucí axonema vyrůstá z jedné centrioly směrem do lumen semenotvorného kanálků. V průběhu tvorby bičíku dochází k zarovnání mitochondrií podél prodlužujícího se bičíku v oblasti „midpiece“ spermie (Abou-Haila, 2000).

Poslední fází spermiogeneze je kondenzace jádra spermie za účelem stabilizace a ochrany paternálního genomu, který se musí dopravit k vajíčku neporušený. Tento krok zahrnuje rozvolnění nukleosomových struktur, nahrazení histonů transičními proteiny (TNPs) a ve finální fázi pak protaminy.

1.1.3 Jaderné proteiny protaminy

Protaminy jsou hlavní jaderné proteiny v hlavičce spermie. Jedná se o nízkomolekulární proteiny s vysokým obsahem kladně nabitých aminokyselin, zejména argininu (u lidských protaminů až 48%). Díky této vlastnosti jsou velmi silnými elektrostatickými silami vázány na záporně nabitou DNA. To umožňuje velkou kondenzaci samčí DNA a paternální genom je tak díky kompaktnosti ochráněn při putování spermie samičím reprodukčním traktem, a následně při oplození a splývání gamet (Oliva and Dixon, 1991; Oliva, 1995; Queralt et al., 1995; Lewis et al., 2003).

Protaminy a DNA ze spermie byly poprvé izolovány a objeveny před více jak stoletím Friedrichem Miescherem (Miescher, 1874; Dixon and Smith, 1968; Dahm, 2005).



Obr. 2 – Transkripce protaminových genů (Oliva, 2006)

U savců jsou známy dva druhy protaminů, které jsou exprimovány přibližně ve stejné míře. Jedná se o protamin 1 (P1) a rodina protaminu 2 (P2). Protamin 1 je přítomen u všech studovaných druhů obratlovců (Oliva and Dixon, 1991; Chauvière et al., 1992; Yoshii et al., 2005) a je kódován jednou kopií genu na 16 chromozomu. Rodina protaminů 2 se vyskytuje pouze u některých savců, a to u člověka a myši, zahrnuje protamin 2, protamin 3 a protamin 4 (Oliva and Dixon, 1991; Yoshii et al., 2005). Rodina P2 je také tvořena jednou kopií genu na chromozómu 16, ale po přepisu vzniká prekurzorový transkript, který je dalšími procesy upraven na funkční proteiny P2, P3 a P4 (Obr. 2). Je známo, že nejhojnějším zástupcem rodiny P2 je protamin 2. Díky tomuto faktu se vědecké studie zaměřují právě na protamin 2 (Oliva a Dixon, 1991).

Kromě toho, že jsou protaminy silně bazické, a tím vzniká vysoce kondenzovaný komplex s genomickou paternální DNA, mají protaminy zainkorporovány ve své sekvenci cysteiny. Cysteinové zbytky protaminů tvoří disulfidické můstky, které silně stabilizují nukleoprotaminovou strukturu (Saowaros a Panyim, 1979).

Spermie s kompletním hydrodynamickým jádrem se mohou pohybovat rychleji a jsou schopny oplodnit vajíčko jako první. Vysoká kondenzace nukleoprotaminového komplexu je důležitá pro ochranu genetického materiálu. Nejen, že takto kompaktní spermie je chráněna před určitými nukleázami, ale je nepřístupná i pro mutageny. Vůči mutagenním faktorům, které by mohly způsobit různé defekty v paternálním genomu, bude takto „připravená“ spermie odolnější. Tato hypotéza je podpořena nedávnými studii v asistované reprodukci. Defekty v protaminaci byly pozorovány u spermií s poškozenou spermatozoální DNA. Tyto spermie byly schopny oplodnit vajíčko, ale bylo zabráněno správnému vývoji embrya (Nasr-Esfahani et al., 2005).

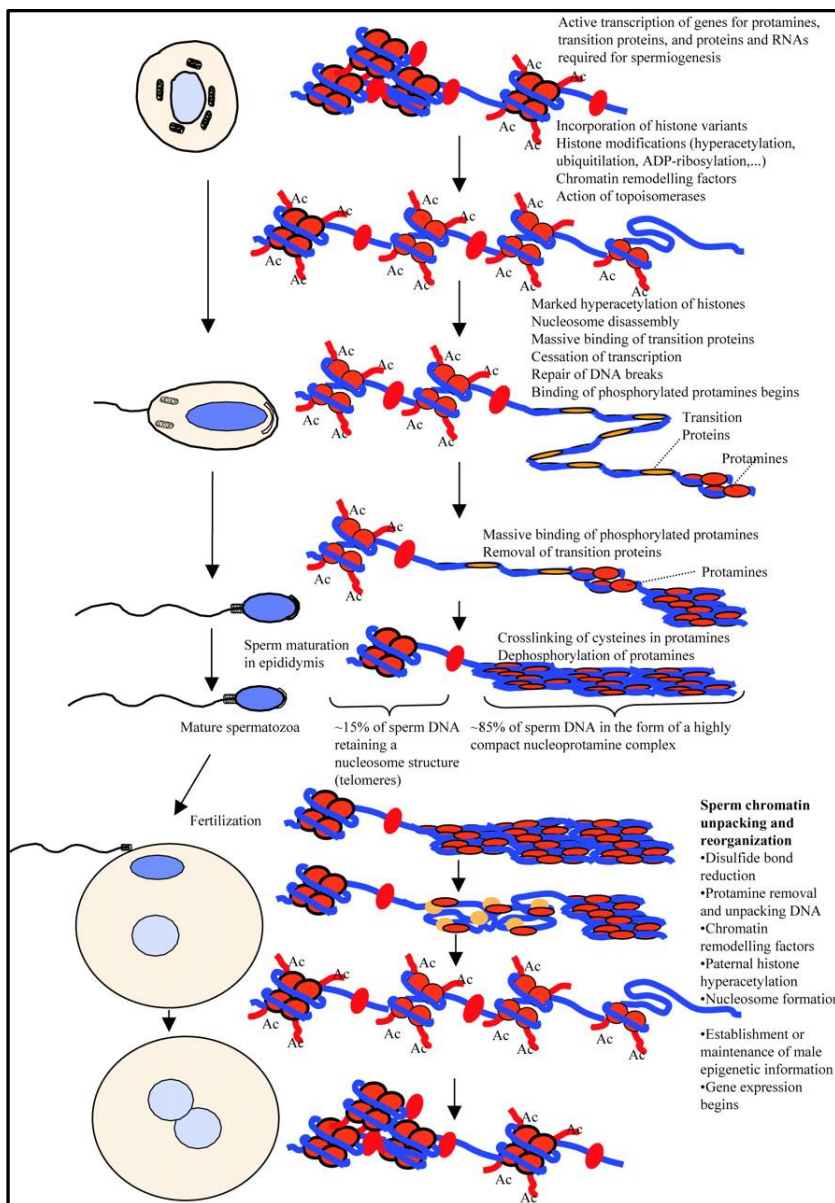
Dalším důležitým parametrem je pak poměr mezi jednotlivými protaminy P1/P2 ve spermiích. U lidí se zastoupení protaminů P1 a P2 pohybuje okolo 1:1. Napříč druhy se pak zastoupení protaminu 1 a protaminu 2 liší (Corzett et al., 2002). Detekce protaminů a poměr protaminů se využívá jako marker kvality spermií a to nejen u mužů, ale i v experimentálních podmínkách u myších samců (Zatecka et al., 2014). Kondenzovaný nukleoprotaminový komplex tvoří u lidské populace až 85% jaderné DNA spermie, zbytek DNA zůstává asociován s histony (Obr. 3), (Grootegoed et al., 2000; Rousseaux et al., 2005).

Proces nukleohistonové-nukleoprotaminové záměny je umožněn díky předcházejícím změnám na chromatinu (Tanaka et al., 2005). Jedním z prvních chromatinových změn je inkorporování histonových variant a jejich postranslační modifikace (hyperacetylace, ubiquitinace, ADP-ribosylace). Důležitou událostí ve fázi spermiogeneze před rozvolněním nukleosomů je právě hyperacetylace histonových zbytků. Ta způsobuje vznik záporného náboje na přesahujících koncích histonů, a tím umožňuje rozvolnění od negativně nabitě DNA a nahrazení histonů (Oliva et al., 1987). Tyto modifikace utváří pro spermii „histonový kód“, který určuje změnu histonů za protaminy (Govin et al., 2004). Význam acetylace histonů během spermiogeneze byl prokázán ve studii Sonnack et al. (2002), která prokázala souvislost mezi poklesem acetylace histonů a narušením záměny histonů za protaminy.

Tzv. kulaté spermatidy („round spermatid“) mají ještě chromatinovou strukturu stejnou jako somatické buňky, s DNA organizovanou do nukleosomů a většina genů je aktivně transkribována. Po iniciaci chromatinových změn jsou nukleosomy rozvolněny navázáním transičních proteinů (TNPs) na vlákno DNA. Kromě toho, transiční protein 1 (TNP1) se účastní oprav zlomů vláken DNA (Zhao et al., 2004). Transiční proteiny jsou následně nahrazeny protaminy. Je známo, že protaminy jsou

fosforylovány krátce po translaci a jejich fosforylace je nezbytná pro správné navázání na DNA. Jakmile jsou protaminy navázány na strukturu DNA jsou defosforylovány a vysoce kompaktní nukleoprotaminová struktura jádra spermie je vytvořena (Carrell et al., 2007), (Obr. 3). Jakmile je DNA spermie silně sbalena do této struktury, je celková transkripce genů v jádře umlčena.

V průběhu maturace spermií v epididymu, se mezi jednotlivými protaminy formují disulfidické můstky, které dále stabilizují nukleoprotaminový komplex. Při fertilizaci musí být vysoce kompaktní nukleoprotaminová struktura DNA rozrušena a znovu přeorganizovaná do nukleohistonové struktury, přístupnější pro transkripci důležitých genů ve fázi splývání gamet (Oliva et al., 2006).



Obr. 3 – Schématické znázornění nukleohiston–nukleoprotaminových změn (Oliva, 2006)

1.1.4 Protaminy a mužská neplodnost

Důležitá role jaderných proteinů protaminů spočívá ve sbalení DNA spermie, čímž vzniká vysoce kompaktní sktruktura jádra spermie (Oliva et al, 2006). Bylo prokázáno, že změny v expresi mRNA protaminu 1 a protaminu 2 nebo zvýšený poměr P1/P2 mají souvislost s neplodností u mužů (Ziyyat et al., 1999; de Yebra et al., 1993; Mengual et al., 2003).

Pro správnou funkci genů protaminů je důležitá transkripce a uložení transkriptů v spermatocytech a kulatých spermatidách pro pozdější translaci v prodlužujících spermatidách (Tanaka and Baba, 2005).

V jedné z prvních studií měřících expresi na úrovni mRNA v buňkách testikulární tkáně izolovaných pomocí průtokové cytometrie, byla zjištěna úplná absence exprese mRNA protaminu 2 v kulatých spermatidách u azoospermiků (mužů bez spermií v ejakulátu), (Ziyyat et al., 1999). Bylo také sledováno snížení hladiny mRNA protaminu 1 a mRNA protaminu 2 v kulatých spermatidách u neplodných pacientů (Steger et al., 2001). Jiná nezávislá skupina identifikovala změny v expresi protaminů z biopsie azoospermiků (Friel et al., 2002).

Až popis a optimalizování metody pro extrahování a analyzování protaminů pomocí gelové elektroforézy umožnilo jednodušší a rychlejší klinickou aplikaci (de Yebra and Oliva, 1993). Několik studií ukázalo, že poměr P1/P2 v lidských spermiích se u zdravých pacientů pohybuje kolem 1.0, u myši kolem 0.5 (Balhorn et al., 1999; Carrell and Liu, 2001; Corzet et al., 2002; Oliva, 2006).

První důkaz ve změnách množství protaminů v jádře spermie byl popsán ve studii, kde nedetekovaly protamin 2 u maturovaných spermiích neplodných pacientů (Silvestroni et al., 1976).

Jedna z prvních kompletních studií provedených na větším počtu studovaných pacientů, ukázala zvýšení poměru P1/P2 ve spermiích u šesti ze sedmi neplodných pacientů v porovnání s plodnými jedinci (n=17), (Balhorn et al., 1988). Dále pak bylo nalezeno stejné procentuální zastoupení protaminů ve spermiích fertilních mužů jako u neplodných pacientů s normální semennou plazmou, ale různé zastoupení u pacientů s abnormálními parametry plazmy (Bach et al., 1990). Další nezávislá vědecká skupina pozorovala nežádoucí kruhový tvar spermií. Tyto spermie obsahovaly méně protaminů a více histonů v jádře než jádro normálních spermií (Blanchard et al., 1990).

Mnoho studií se pak věnovalo separování protaminů a porovnávání poměru P1/P2 u pacientů s různými reprodukčními problémy. Například dvanáct ze třinácti pacientů bez detekovaného protaminu 2 mělo zhoršenou schopnost penetrace spermie, které byly doprovázeny zhoršenou motilitou a morfologií (Carrell and Liu, 2001). Zajímavá studie byla provedena Mengual et al. (2003), kde autoři porovnávali zastoupení jednotlivých protaminů u třech experimentálních skupin. Jednalo se o muže s oligozoospermií (n=12) (se sníženým počtem spermií v ejakulátu), kde se poměr pohyboval okolo 1.51 ± 0.48 , u pacientů s asthenozoospermií (n=13) (s redukovanou motilitou spermií) byl P1/P2 roven 1.23 ± 0.65 a u kontrolní fertlní skupiny mužů (n=10) s normálním spermioqramem se poměr držel okolo 1.01 ± 0.15 . Do spojitosti se dává i korelace mezi změnami poměru P1/P2 a integritou DNA. Zvýšená fragmentace DNA se vyskytovala u spermií se sníženým poměrem těchto dvou protaminů v porovnání se spermii s normálním/zvýšeným P1/P2 poměrem (Aoki et al., 2005).

Stejně tak procentuální zastoupení histonů a protaminů v genomové samči DNA je důležitým parametrem. Zvýšený podíl histonu H2B vůči protaminům se vyskytoval u neplodných jedinců (Zhang et al., 2006). Ve studii Castillo et al. (2011) zjistili, že snížení poměru celkového zastoupení protaminů / DNA, P1 / DNA, a P2 / DNA ve spermii koreluje s poškozením DNA u neplodných pacientů. Poměr protaminů byl použit k detekci kvality spermií také u myšího modelu (Zatecka et al., 2014).

Lze tedy říci, že protaminy hrají důležitou roli v konečných fázích spermatogeneze, a jsou tedy zodpovědné za správnou funkci spermie. Proto je potřeba prohlubovat poznatky o jejich struktuře, funkcích a v neposlední řadě účinků na plodnost savců.

1.1.5 Epididymální maturace

Vývoj spermie nekončí spermatogenezí a následnou spermiogenezí v semenotvorných kanálcích testes. Testikulární spermie jsou sice morfologicky zralé, ale musí ještě postoupit řadu regulovaných dějů, aby byly schopny oplodnit vajíčko.

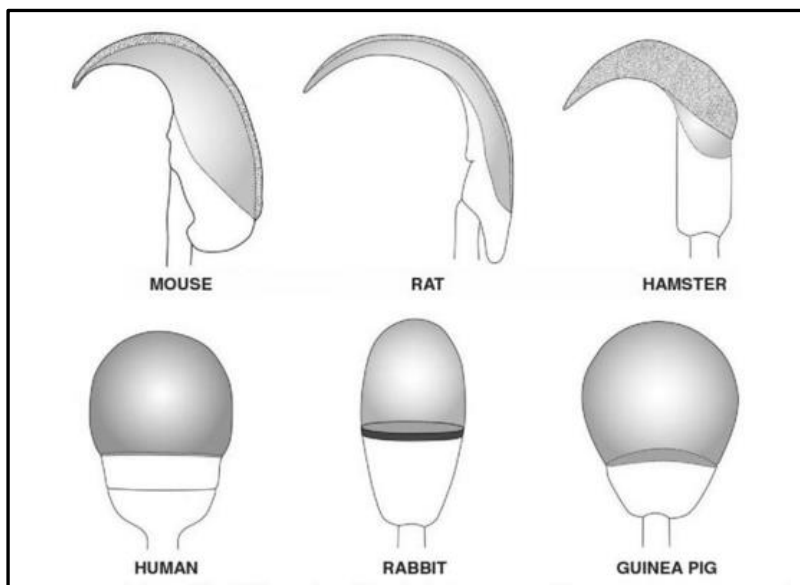
Jedním z prvních kroků po spermatogenezi je maturace spermie v nadvarleti, neboli epididymu. U některých druhů (kanec), se pohlavně zralé spermie objevují už v oblasti hlavy epididymu (caput), na rozdíl od jiných (myš), kde se vyskytují až v těle epididymu (corpus). Podle všeho, ne každá spermie získává svoji fertilizační schopnost ve stejných částech epididymu. Některá ji získá mnohem dříve (v proximálnějších

částech nadvarlete), některá až v koncové oblasti epididymu (cauda). Nicméně, jako hlavní pravidlo se zdá, že většina spermií dosáhne své schopnosti oplodnit vajíčko právě v cauda epididymis (Yanagimachi, 1994).

Jedním z klíčových dějů při epididymální maturaci jsou změny na plazmatické membráně spermie. Výsledkem těchto strukturálních změn je pohyblivost spermie, která se doposud v testes pohybovala omezenou rychlostí. Epididymální tekutina má velkou absorpční a sekreční aktivitu. Během průchodu spermií nadvarlaty jsou mnohé molekuly (proteiny, peptidy, lipidy) na plazmatické membráně spermií postranslačně modifikovány (př. glykosylovány), nebo odstraňovány a zároveň jsou v nadvarlatech syntetizovány molekuly nové. Například cholesterol je ve značné míře sekretován v epididymu a včleňován do plazmatické membrány spermií, čímž přispívá k její stabilizaci (Yanagimachi, 1994).

1.1.6 Spermie

Jedná se o vysoce specializované buňky, které mají zásadní úlohu v oplození vajíčka. Snaha spermie je doručit genetický materiál do vajíčka a nastartovat aktivaci vajíčka a vývoj nového jedince. Spermie se skládá z dvou hlavních komponent, hlavičky a bičíku spojených krčkem, tzv „connective piece“. V hlavičce je uchována paternální genetická informace a proteiny, které jsou nezbytné pro rozpoznání a navázání spermie na obaly vajíčka. Specializovaná akrozomální oblast obsahuje enzymy, které pomáhají spermii proniknout vaječnými obaly. Některé z těchto proteinů mají i vazebnou funkci a účastní se vazby spermie na vajíčko (Peknicova et al., 2001, Margaryan et al., 2015). Bičík slouží spermii jako pohybový aparát a pomáhá při průniku vaječnými obaly vajíčka (Yanagimachi, 1994; Gilbert, 2006). Tvar a velikost hlavičky se druhově liší. Pro hlodavce je typický srpkovitý tvar hlavičky, zatímco pro ostatní savčí druhy je typický kulatý (člověk) nebo oválný (kanec) tvar hlavičky (Obr. 4).



Obr. 4 – Jednotlivé typy hlaviček spermií savců (Eddy, 2002)

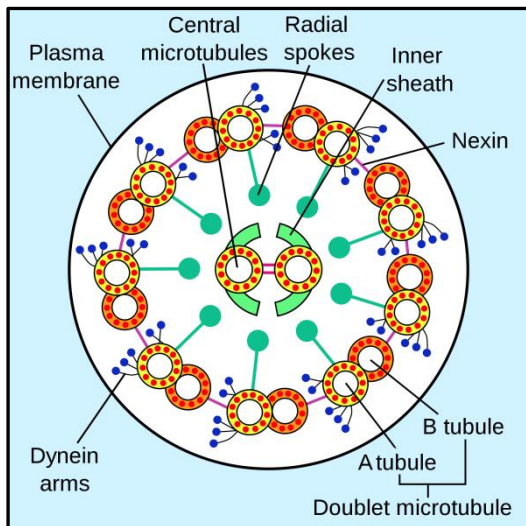
Jádro

Hlavička je složena z jádra, plazmatické membrány, akrozomu a malého množství cytoplasmy. Jádro spermie je specificky odlišné od ostatních buněk v těle organismu. Na rozdíl od somatických buněk je jádro haploidní, obsahuje poloviční sadu chromozomů. Díky silně bazickým nukleárním proteinům protaminům, které se silně vážou na negativně nabitou DNA, tvoří jádro spermie vysoce kompaktní, kondenzovaný chromatin. Protaminy mají ve své struktuře zabudované cysteiny a mohou tak vznikat disulfidické můstky, které stabilizují nukleoprotaminový komplex (Oliva, 2006).

Bičik

Bičik je důležitou organelou spermie. Je postupně rozdělen na jednotlivé regiony, část mitochondriální tzv. „midpiece“, hlavní část („principal piece“) a koncovou část („end piece“).

Celou délkou bičíku probíhá struktura, označována jako axonema, skládající se ze dvou centrálních mikrotubulů, které jsou obklopeny devíti dvojicemi mikrotubulů α a β (Obr. 5). Pohyb spermie je zajištěn díky dvěma dyneinovým raménkům vybíhajících z mikrotubulu α , směrem k následující dvojici mikrotubulů. Axonema je obalena vnějšími hustými vlákny neboli „outer dense fibers“. Další velice důležitá organela, která se u spermie nachází v střední části bičíku („midpiece“), je mitochondrie. Mitochondrie jsou nezbytné pro zajištění energie v podobě ATP, které je důležité pro pohyb bičíku (Alberts et al., 2002).

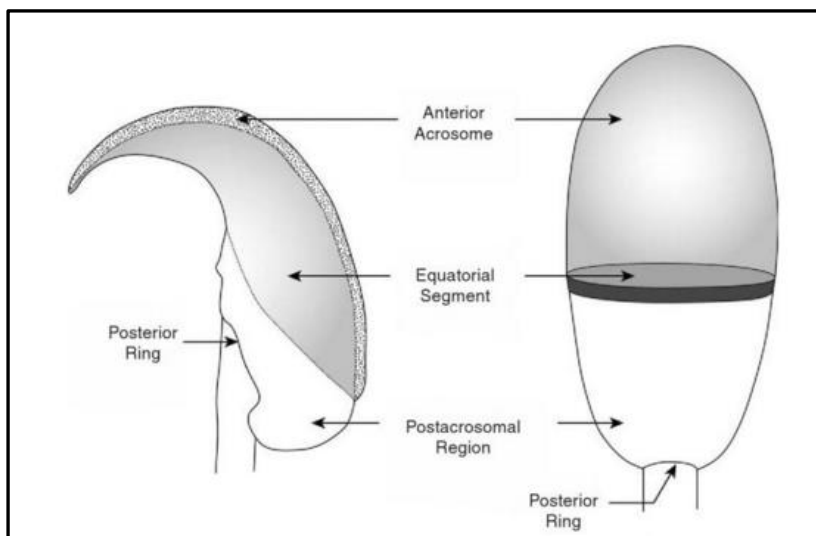


Obr. 5 – Schématické znázornění uspořádání mikrotubulů v bičíku (Lodish et al., 2000)

Plazmatická membrána spermie

Unikátní vlastnost spermíí je rozdělení plazmatické membrány na funkční domény. Tyto domény jsou charakteristické svou dynamickou strukturou a během života dochází k mohutným změnám v jejich organizaci. Membrána spermíí se rozděluje na akrozomální a postakrozomální oblast, které jsou dále členěny na jednotlivé segmenty (Obr. 6), (Eddy, 2002).

Hlavní složku plazmatické membrány spermíí tvoří fosfolipidy. Velice důležitou složkou membrány je také cholesterol, který ovlivňuje strukturální vlastnosti membrány (Yanagimachi, 1994).



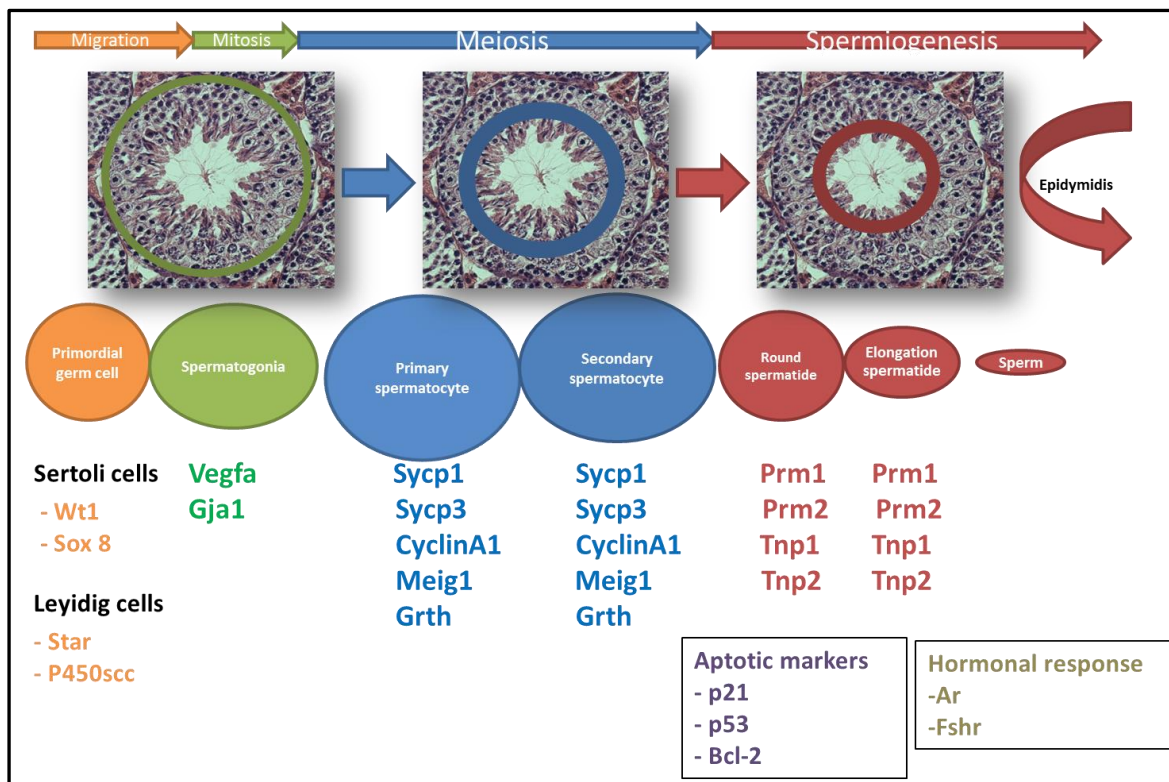
Obr. 6 – Plazmatická membrána myší a králičí spermie (Eddy, 2002)

1.2 Genová a hormonální kontrola spermatogeneze

Spermatogeneze vyžaduje přesnou regulaci různých buněčných událostí, které se uskutečňují v semenotvorných kanálcích složených ze Sertoliho buněk a vyvíjejících se zárodečných buněk, obklopených Leydigovými a myoidními buňkami. Tyto procesy vyžadují přesnou koordinaci, která se odehrává na několika úrovních (Eddy, 2002).

Vnitřní způsob kontroly je zajištěn evolučně konzervovaným genetickým programem, který určuje, kdy jsou specifické geny exprimovány. Vývoj spermií u savců probíhá ve třech fázích - mitotické, meiotické a postmeiotické. Během těchto třech fází jsou produkovány transkripty specifické pouze pro zárodečné buňky a jejich exprese je vývojově velmi přísně regulována různými mechanismy. Většinou je nalezneme pouze v dané vývojové fázi (Eddy, 2002). Jakékoliv narušení standardní genové exprese během testikulárního zrání spermií může narušit správný vývoj spermie, což může mít dopad na plodnost jedince. Transkripty mohou být produkovány různými způsoby: a) mohou být produkty genů zárodečných buněk homologní se somatickými geny; b) mohou být produkty unikátních genů; c) některé z nich mohou být produkty alternativního sestřihu (Eddy and O'Brien, 1998). Vývoj zárodečných buněk zahrnuje vysoce specifické děje, jako je meióza, genetická rekombinace, vznik akrozomu a bičíku, remodelace a kondenzace chromatinu. Všechny tyto procesy vyžadují speciální proteiny a dobré načasování - regulace genové exprese je tedy zásadní pro správnou spermatogenezi.

V různých fázích vývoje spermie v semenotvorných kanálcích jsou aktivovány příslušné geny, které jsou zodpovědné za průběh daného stádia a mohou tak ovlivňovat proces spermatogeneze a v důsledku kvalitu spermií (Obr. 7). Tyto geny mohou být rozděleny do skupin podle toho kdy/kde jsou exprimovány - geny exprimující se v zárodečné buněčné linii (např. *Vegfa*, *Gja1*, *Sycp1*, *Sycp3*, *Ccna1*, *Meig1*, *Grth*, *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1*, *Tnp2*), geny aktivní v Sertoliho buňkách (např. *Wtl*, *Sox8*), geny exprimující se v Leydigových buňkách (např. *Star*, *P450scc*), geny účastníci se odpovědi na hormonální produkci (např. *Ar*, *Fshr*), geny mající roli v průběhu apoptózy (např. *p21*, *p53*, *Bcl-2*).



Obr. 7 - Schéma jednotlivých fází procesu spermatogeneze s příslušnými typy buněk a s příslušnými genovými markery

Další úroveň regulace je zajištěna pomocí endokrinního hormonálního systému. Hlavními hormony, které řídí vývoj samčích zárodečných buněk, jsou gonadotropiny - luteinizační hormon (LH) a folikuly stimulující hormon (FSH); a pohlavní hormony steroidogenní povahy (např., testosteron a 17β -estradiol), (Lui and Cheng, 2012). Hlavní stádia vývoje spermií, přežívání zárodečných buněk, meióza a spermioogeneze jsou u savců řízeny gonadotropními hormony (McLachlan et al., 2002). Hormonální regulace spermatogeneze je kontrolována prostřednictvím dráhy hypotalamus – hypofýza - testes. Hormon uvolňující se z hypotalamu - gonadotropin (GnRH) indukuje sekreci hormonů hypofýzy - LH a FSH.

Folikul-stimulující hormon se váže na FSH receptory (FSHRs), které jsou spojené s G-proteiny a nacházejí se na plazmatické membráně Sertoliho buněk (Simoni et al., 1997). FSH signalizace na Sertoliho buňkách aktivuje pět signálních drah, jako jsou: dráha tvorby vápníku, cAMP a proteinkinázová, MAP kinázová, fosfatidylinositol 3-kinázová dráha a dráha fosfolipázy A2 (Walker and Cheng 2005).

Nakonec tyto dráhy aktivují CRE-vázací protein (CREB), který se účastní regulace transkripce důležitých cílových genů.

LH aktivuje Leydigovy buňky, které tak pod tímto působením produkují důležitý hormon v mužské reprodukci - hormon testosteron (de Kretser et al. 1971, Wahlstrom et al., 1983). Testosteron uplatňuje své biologické účinky na cílové buňky přes androgenní receptory (ARs), které jsou lokalizovány na Sertoliho, Leydigových a peritubulárních myoidních buňkách (Silva et al., 2002). Testosteron má vliv na maturaci spermatocytů, reguluje vývoj kulatých a prodlužujících se spermatid. Důležitost působení testosteronu je také dokumentována kontinuální expresí androgenních receptorů v Sertoliho buňkách, kde konkrétní hladiny AR odpovídají jednotlivým stádiím v semenotvorných kanálcích (Bremner et al., 1994). Nedostatek testosteronu, popřípadě snížená exprese mRNA androgenních receptorů či gonadotropních hormonů může narušovat striktně regulovaný průběh vývoje spermie (McLachlan, 2002).

1.3 Diabetes mellitus

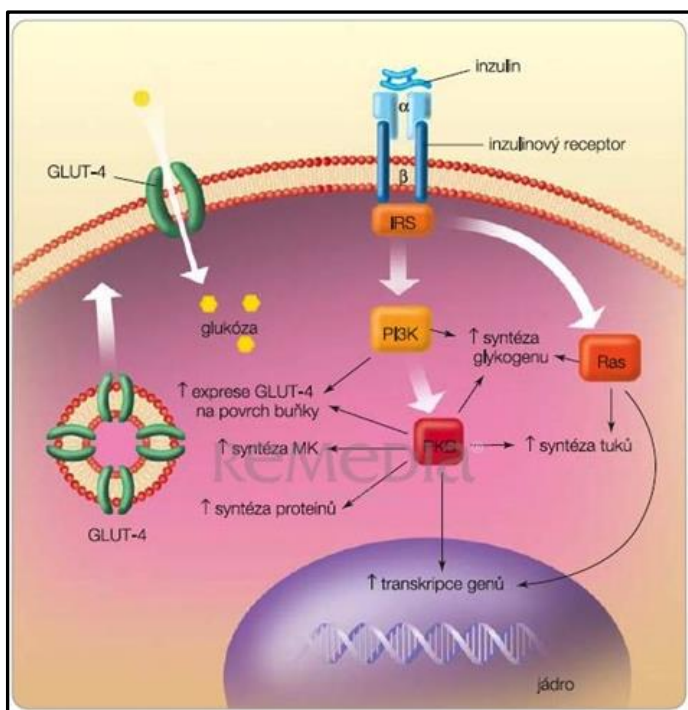
Diabetes mellitus (DM) je považován za jedno z hlavních metabolických onemocnění moderní doby a jeho nárůst rychle stoupá. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO), 347 milionu lidí trpí diabetes mellitus (WHO, 2014). Odhaduje se, že v roce 2030 bude diabetes v žebříčku sedmým onemocněním způsobujícím smrt jedince, hned za srdečním selháním, mozkovou mrtvicí, rakovinou nebo například imunitním selháním AIDS (Mathers a Loncar, 2006).

U zdravého organismu produkují Langerhansovy ostrůvky slinivky břišní hormon inzulín v závislosti na hladině glukózy v krvi. Navazání inzulínu na intramembránový inzulínový receptor aktivuje v cílových buňkách tyrozinkinázu, která zprostředkovává autofosforylaci β podjednotky inzulínového receptoru. Tento proces stimuluje fosforylaci proteinů IRS (insulin receptor substance 1-4). Následuje řada reakcí, které způsobí aktivaci transkripce genů, zvýšení syntézy glykogenu, proteinů a mastných kyselin. Aktivovaná je také exprese glukózových transportérů GLUT 4, které jsou tímto vystaveny na povrchu buněk (Obr. 8). Pomocí GLUT 4 přenašečů jsou molekuly glukózy transportovány do intracelulárního prostoru, kde jsou dále využity. Výsledkem je snížení hladiny cukru v krvi a v důsledku toho opětovné snížení produkce

pankreatického inzulínu, jedná se tedy o pozitivní zpětnou vazbu (Loney and Tavaré, 2009).

Z nedostatku glukózy v buňkách vyplývají akutní a chronické projevy diabetes, projevující se nejrůznějšími způsoby. *In vivo* dochází k diabetické nefropatii (poškození cév obalujících glomeruly ledvin), diabetické retinopatii (poškození cév vyživujících sítnici oka) nebo diabetické neuropatii (poškození funkce všech druhů nervů). Vlivem DM také dochází k defektům buněk testikulární tkáně z důvodu poškozením DNA. Stejně tak poškození Leydigových a Sertoliho buněk bylo prokázáno (Walker, 2011).

V neposlední řadě může mít diabetes mellitus vliv na reprodukční parametry samců (Mallidis et al., 2011; La Vignera et al., 2012; Mangoli et al., 2013).



Obr. 8 – Intracelulární mechanismy aktivace působení inzulínového receptoru (Bartoš et al., 2003)

1.3.1 Diabetes mellitus I. typu

Diabetes mellitus I. typu, neboli inzulín-dependetní diabetes mellitus je autoimunitní onemocnění postihující buňky Langerhansových ostrůvků slinivky břišní. Vlastní protilátky organismu napadnou β buňky, zničí je a ty pak dále nemohou produkovat inzulín. Jak je znázorněno na Obr. 9, z důvodu absence inzulínu nejsou

aktivovány inzulínové receptory, a proto nedochází k vystavení glukózových přenašečů GLUT 4 na membráně buněk. Glukóza tak není dopravena z krevního řečiště do buněk a její vysoká hladina se drží v krvi. Právě vysoká hladina (koncentrace) cukru v krvi - hyperglykemie může způsobovat nejrůznější nežádoucí projevy (Amaral et al., 2008).

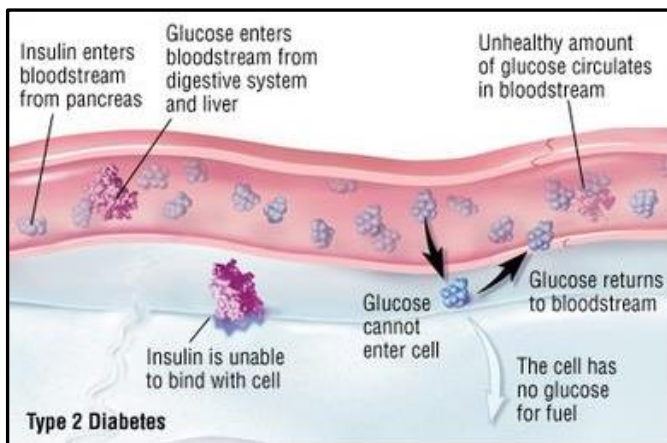
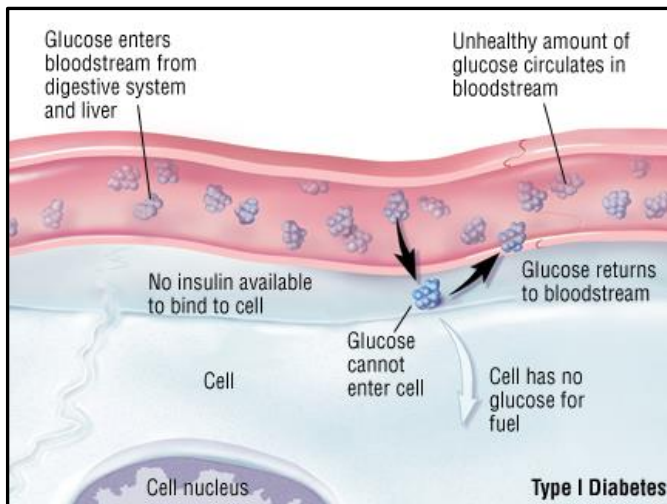
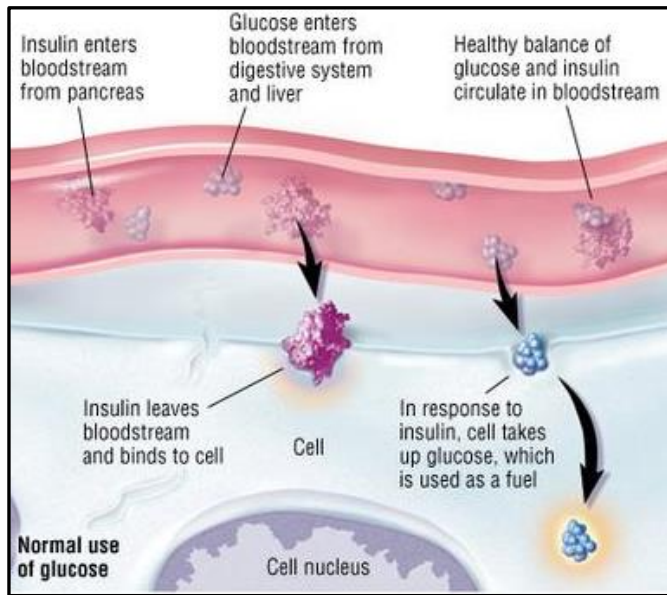
Hyperglykemie přispívá ke vzniku oxidativního stresu organismu. Hydroxylové skupiny glukózy se účastní přenosu elektronů, tím napomáhají k tvorbě radikálů, především reaktivní formy kyslíku (ROS). ROS jsou charakteristické tím, že přímo reagují s buňkami a mění jejich vlastnosti. Oxidativní stres buněk způsobuje poškození DNA, má vliv na programovanou buněčnou smrt nebo nekrózu. Obecně lze říci, že ROS celkově narušují homeostázi organismu (Giacco a Brownlee, 2011).

1.3.2 Diabetes mellitus II. typu

Dalším typem diabetes postihující lidskou populaci, je DM II. typu. Celosvětově zaujímá 90% případů ze všech typů diabetes (WHO, 2014). DM II. typu je onemocnění s genetickou predispozicí, které je polygenní a na jehož manifestaci se dále podílejí vlivy vnějšího prostředí (Froguel et al., 1993).

Dochází k normální produkci inzulínu pankreatickými buňkami, ale membránové inzulínové receptory okolních buněk jsou na inzulín rezistentní (Obr. 9), (DeFronzo, 1982). Projev této metabolické poruchy je stejný jako u DM I. typu, a to hyperglykémie.

Genetická vloha pro onemocnění diabetem II. typu je silnější komponentou než u diabetu I. typu a představuje 40-80% celkového rizika onemocnění (Froguel et al., 1993).



Obr. 9 – Mechanismus působení inzulínu a glukózy u zdravého jedince, jedince s DM I. typu a jedince s DM II. typu (American diabetes association, 2008)

1.4 Modely studia diabetes mellitus

Pro studování vlivu DM na organismus se využívá několik zvířecích modelů. V dřívějších letech byli využíváni psi s chybějící slinivkou břišní, jako doklad hlavní role tohoto orgánu v glukózové homeostázi. V současné době je většina experimentů prováděna na hlodavcích, hlavně potkanech a myších, i když některé studie jsou stále prováděny na větších zvířatech.

Pomocí různých metod umělého navození DM, včetně technik molekulární biologie, byl vytvořen velký počet nových zvířecích kmenů, které jsou považovány za vhodné modely pro studium DM typu I. a DM typu II. a souvisejících fenotypů (Rees and Alcolado, 2005).

Mechanismy navození a od toho se odvíjející savčí modely DM můžeme rozdělit do několika skupin (Obr. 10). První způsob umělého navození je chemická indukce DM. Vyznačuje se tím, že používané látky díky cytotoxickým účinkům specificky ničí β buňky slinivky břišní, což vede ke vzniku hyperglykémie. Nejčastěji využívanými látkami jsou streptozotocin a alloxan. Díky jejich podobné struktuře s molekulou glukózy se dostávají do buněk slinivky břišní přes glukózový přenašeč GLUT 2. Diabetes mellitus je obvykle vyvolán do 5-7 dnů po první injekci chemické látky s cílem zajistit stabilní hyperglykémii (King, 2012).

Dalším mechanismem je spontánní autoimunitní destrukce β buněk slinivky břišní. Nejběžněji využívané modely tohoto typu jsou tzv. „non-obese diabetic“ myši (NOD), tzv. potkani „biobreeding“ (BB) a LEW.1AR1/Ztm-iddm. Nicméně, nejvíce využívaným autoimunitním modelem v experimentálních pokusech jsou NOD myši (King, 2012).

Genetická manipulace je další vhodný způsob navození DM I. typu, v praxi je často využíván myší diabetický model Akita (C57BL/6-Ins2^{akita}/J). Jedná se o mutantní knock-out kmen, s mutací oblasti C96Y genu pro inzulin 2, která je zodpovědná za diabetický fenotyp u tohoto modelu (Wang et al., 1999). Missence (v tomto případě změna funkčního kodónu nahrazením cysteinu za tyrosin) mutace Ins2C96Y narušuje disulfidické můstky mezi α - a β -řetězci pro-inzulinu, což způsobuje drastickou konformační změnu finální molekuly inzulinu v endoplazmatickém retikulu. Chybné sbalení tohoto proteinu souvisí se ztrátou jeho funkce, což má za následek vznik diabetes u Akita myši. (Izumi et al., 2003).

Způsob navození DM	Model	Hlavní rysy
Chemická indukce	Vysoká dávka streptozotocinu (100-200 mg/kg)	Klasický model pro hyperglykémii
	Alloxan	
	Nízká dávka Streptozotocinu (20-40 mg/kg)	Model pro inzultidu (zánět Langerhansových ostrůvků)
Spontánní autoimunitní	NOD myši	Destrukce β buněk v závislosti na autoimunitní reakci
	BB potkani	
	LEW.1AR1/Zm-iddm potkani	
Genetická indukce	AKITA myši	Destrukce β buněk v závislosti na stresové prostředí endoplazmatického retikula

Obr. 10 - Využívané savčí modely pro studium diabetes mellitus (upraveno podle King, 2012)

1.4.1 Streptozotocinem navozený diabetes mellitus

Nejvyužívanější látkou pro umělé navození diabetes mellitus I. typu se považuje streptozotocin (STZ). Streptozotocin je antibiotikum produkované gram-pozitivní bakterií *Streptomyces achromogens* (Herr et al., 1976). Jedná se o alkylační činidlo indukující zlomy na DNA, chromosomální aberace a poškození DNA u savčích buněk *in vitro* (Bolzan and Bianchi, 2002). Streptozotocin se svojí chemickou strukturou velmi podobá glukóze, což souvisí s tím, že se do buněk se dostává prostřednictvím glukózového přenašeče GLUT 2, který pankreatické buňky obsahují v nadměře (Wang and Gleichmann, 1998; Schnedl et al., 1994). Díky svým toxickým účinkům na pankreatické β buňky je hojně využíván k navození diabetes mellitus (Vavra et al. 1959 podle Bolzan and Bianchi, 2002). Myši jsou hodnoceny jako diabetické, pokud se hladina cukru zvýší nad 13.9 mmol/L (Pavlinkova et al., 2009; Bohuslavova et al., 2010).

1.4.2 Diabetes mellitus a mužská neplodnost

Diabetes mellitus je charakterizován jako chronická hyperglykemie a je hlavní příčinou vážných mikro- a makro- vaskulárních onemocnění. Ovlivňuje proto téměř každý systém v těle. Je prokázáno, že zvýšený oxidativní stres se u diabetes mellitus projevuje nadprodukcí reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Snížená účinnost antioxidantních obranných mechanismů dále zhoršuje průběh tohoto onemocnění (Amaral et al., 2008).

Glukózová rovnováha organismu je klíčová pro správnou regulaci spermatogeneze *in vivo* a pro zachování fertilizační kapacity spermie (D'Cruz et al, 2012).

Jak už bylo zmíněno, existuje několik zvířecích modelů, u kterých je uměle navozeno DM. Jedná se výhodné modely pro studování této metabolické poruchy a jsou hojně využívány, mimo jiné, pro studium vlivu diabetes mellitus na reprodukční parametry.

Významným kritériem podílejícím se na plodnosti savců je nejen koncentrace spermií v ejakulátu, ale i jejich pohyblivost. Narušení těchto parametrů může vést k snížené fertilitě. Právě snížená motilita a koncentrace spermií byla pozorována u diabetických myší (Kim and Moley, 2008). U STZ-indukovaných diabetických myší a potkanů bylo po léčbě inzulinem pozorováno zlepšení těchto dvou parametrů. To poukazuje na fakt, že adekvátní léčba experimentálního zvířete zmírňuje následky endokrinních poruch způsobených DM I. typu (La Vignera et al., 2013).

U myší, kterým bylo navozeno diabetes pomocí účinné látky streptozotocinu, byl také nalezen snížený počet spermií jak v testes, tak v epididymis (Soudamani et al., 2005; Scarano et al., 2006). Podobnou studii provedla skupina Mangoli et al. (2013), která se zabývala studiem vlivu diabetes mellitus na viabilitu, počet, morfologii, motilitu a kvalitu chromatinu spermií u myší. Výsledky této studie ukazují, že streptozotocinem indukovaný diabetes mellitus může ovlivnit fertilitu myší prostřednictvím narušení těchto parametrů a poškozením integrity DNA spermií (Mangoli et al., 2013).

Testes jsou hlavním samčím pohlavním orgánem, kde se nejen tvoří pohlavní buňky, ale je to i důležitá endokrinní žláza produkující pohlavní hormony. Jakékoliv narušení tohoto orgánu by mohlo vést ke snížené plodnosti. To potvrdila studie, která se zabývala histopatologií testikulární tkáně u diabetických potkanů. Během této studie bylo pozorováno snížení počtu zárodečných buněk spermatogonií v testes těchto zvířat a snížení průměru semenotvorných kanálků (Jelodar et al., 2009). Vliv diabetes mellitus na reprodukční parametry savců je spojován s poškozením testikulárních metabolických a signálních drah, což v důsledku negativně působí na vývoj a funkci spermií.

I myší model Akita je využíván ke studiu vlivu diabetes mellitus na reprodukční parametry. U tohoto modelu dochází k redukci velikosti testes a jejich abnormální morfologii. Akita myši mají také zhoršené parametry spermií, a to motilitu a morfologii. Dále dochází ke snížení počtu spermií v epididymis a spermie získané z caudy epididymis postrádají akrosom a mají odtržené hlavičky od zbytku spermie (Schoeller et al., 2012).

Klinické studie se taktéž zameřovaly na parametry spermií, obzvláště na morfologii, koncentraci a motilitu. Barták et al., (1975) pozorovali snížení koncentrace a motility spermií u diabetických pacientů v porovnání s plodnými jedinci. Navíc byl pozorován zvýšený počet morfologicky defektních spermií u jedinců s prokázaným DM I. typu (Padrón et al., 1984; Delfino et al., 2007).

DM I. typu je také asociován s poruchami hormonální produkce. Několik autorů sledovalo sníženou koncentraci testosteronu u pacientů s DM I. typu (Millidis et al., 2011; Ballester et al., 2004). Je zřejmé, že endokrinní dysfunkce nastává v důsledku poškození hlavních hormon-produkujících buněk v testes, Leydigových a Sertoliho buněk. To může mít v důsledku vliv na správný průběh spermatogeneze, která je řízena testosteronem, hormonem produkujícího právě Leydigovými buňkami (Walker, 2011).

DM, jak už bylo zmíněno, je spojen se zvýšeným oxidativním stresem, který poškozuje jadernou a mitochondriální DNA spermie. V důsledku tohoto poškození může docházet k indukci apoptózy, což bylo potvrzeno ve studii O'Neill et al. (2010), kde u pacientů s DM I. typu byl pozorován zvýšený počet apoptotických spermií v porovnání se zdravými dárči.

1.5 Apoptóza

Apoptóza, programovaná buněčná smrt, hraje klíčovou roli během normálního vývoje jedince a při udržování homeostáze organismu. Apoptóza je charakterizována jako kaskáda dějů, zahrnujících kondenzaci a fragmentaci chromatinu, snížení transmembránového mitochondriálního potenciálu (Luo et al., 1998), uvolnění cytochromu c z mitochondrií (Bossy-Wetzel et al., 1998) a v neposlední řadě snížení celkového objemu buňky (Arends and Wyllie, 1991). Apoptóza může být buď vývojově regulována, nebo indukována v důsledku buněčného stresu či zranění.

Apoptóza má důležitý význam i v ontogenezi. Uplatňuje se například u vývoje jednotlivých prstů končetin nebo se účastní zániku buněk ocasu pulců při přeměně na dospělou žábu. Apoptóza hraje také důležitou roli při vývoji srdce nebo periferních nervů, kdy programovanou buněčnou smrt podstoupí ty nervy, které nejsou spojeny s cílovou buňkou (Brill et al., 1999).

Je známo několik důležitých genů účastníků se regulace apoptózy. Jedním z nich je tumor supresorový gen *p53*. Výsledný protein tohoto genu je zahrnutý v procesech

jako je DNA reparace, apoptóza nebo dokáže zastavit buněčný cyklus. Jakmile je poškozena jederná DNA, protein p53 je schopen takovému místu rozeznat a následně spustit transkripci genu *p21*. Protein p21 má schopnost zastavit dělení buňky, a je zodpovědný za to, že buňka s poškozenou DNA zůstává v G1 fázi buněčného cyklu, kde čeká na opravu DNA. Poškození DNA je jedna z příčin, která vede k aktivaci programované buněčné smrti.

Protein p53 aktivuje dva různé způsoby průběhu apoptózy. Jedním z nich je kaskáda dějů přes komplex Fas receptoru a Fas ligandu. Výsledkem této apoptotické dráhy je aktivace exekuční kaspázy-3, kaspázy-6 a kaspázy-7, které jsou hlavními zprostředkovateli apoptotického děje (štěpí například cytoskeletární proteiny, proteiny řídící opravu DNA). V případě apoptotického signálu, který vzniká v důsledku odpovědi na stres buňky (teplota, infekce, nedostatek živin), se aktivuje druhá apoptotická dráha. Účastní se jí, jak proapoptotické proteiny (např. Bax, Bad, Bak), tak antiapoptotické proteiny (např. Bcl-2, Mcl-1, A1) z rodiny Bcl-2 lokalizované na mitochondriální membráně. Poměr proapoptotických a antiapoptotických proteinů v buňce je klíčový pro osud buňky, neboť určují, zdali buňka přežije nebo podstoupí programovanou buněčnou smrt (Brill et al., 1999).

Proapoptické proteiny řídí uvolnění cytochromu c z mitochondrií a vytvoření komplexu apoptozómu, který aktivuje iniciační kaspázu-9 a následně exekuční kaspáz-3, která vykonává vlastní proces apoptózy. Proteiny Bcl-2, Mcl-1, A1 naopak zabraňují vylévání cytochromu c z mitochondrií, a tím udržují klidový mitochondriální membránový potenciál (Brill et al., 1999).

U dospělých savců, včetně lidí, hraje apoptóza důležitou roli i během spermatogeneze, nejčastěji u spermatogonií (Allan et al., 1992). U zdravého jedince dochází v raných stádiích spermatogeneze k zániku těchto buněk. Tento způsob odstraňování nepotřebných zárodečných buněk a jejich výsledný počet je závislý na počtu Sertoliho buněk, které je vyživují a zásobují důležitými látkami. I Sertoliho buňky podstupují apoptózu, která *in vivo* slouží k formování semenotvorných kanálků. Bylo prokázáno, že spontánní i vyvolaná smrt zárodečných buněk v průběhu spermatogeneze, zejména při zániku spermatogonií se děje téměř výhradně apoptózou (Sinha Hikim and Swerdloff, 1999).

V savčím organismu také probíhá děj zvaný nekróza. Jedná se o pasivní proces, který nevyžaduje žádnou energii a není nijak regulován. Jedná se o zánik buněk, při kterém nabobtnají, praskne plazmatická membrána a dochází k vylití

cytoplazmatického obsah do extracelulárního prostoru. Tato lyze buňky je schopna způsobit i zánětlivou reakci, která může být pro organismus škodlivá.

Jedna z metod hojně využívaných k detekci apoptotických buněk je metoda zvaná TUNEL assay – TdT-mediated dUTP nick-end labelling. Pomocí enzymu terminální deoxynukleotidyl-transferasa dochází k navázání fluorescenčně značeného dUTP na 3'OH konce naštěpené DNA. Takto lze detekovat poškozené buňky, které mají fragmentovanou jadernou DNA díky nastartování programované buněčné smrti.

Pro apoptický proces jsou také charakteristické postupné změny plazmatické membrány. V raných fázích apoptózy se přemisťuje fosfatidylserin (PS), což je negativně nabitý fosfolipid. V normální buňce se vyskytuje na vnitřní straně plazmatické membrány. Poškozená buňka či buňka podstupující programovanou buněčnou smrt způsobí jeho translokaci na vnější stranu plazmatické membrány (Martin et al., 1995; Vermes et al., 1995). Toho se využívá při další metodě sloužící k detekci apoptotických buněk, a to je značení PS pomocí proteinu annexin V. Vazba fosfatidylserin-annexin V je tak markerem rané apoptózy.

1.5.1 Apoptóza a souvislost s neplodností savců

Je prokázáno, že zvýšená apoptóza je asociována s mužskou neplodností (Sakkas et al., 2003; Oehninger et al., 2003). Ve vzorcích získaných testikulární biopsií neplodných mužů s rozdílným stupněm neplodnosti bylo detekováno vysoké množství apoptotických buněk (Lin et al., 1997). Jiná studie potvrdila zvýšený výskyt apoptotických spermií u pacientů, kteří mají problémy s plodností (Taylor et al., 2004). Mimoto, u neplodných pacientů byla u spermií detekována vyšší aktivita kaspázy-3 v porovnání s plodnými dárce (Grunewald et al., 2005). Apoptóza je považována za mechanismus, který ponechá spermie s nepoškozenou DNA. Nicméně může docházet k jevu, kdy spermie s poškozenou jadernou DNA, které nejsou apoptózou eliminovány, mohou oplodnit vajíčko. To může mít fatální následky pro vyvíjející se embryo (Henkel et al., 2004; Sun et al., 1997).

Populace zárodečných buněk je stanovena rovnováhou mezi buněčnou smrtí (apoptózou) a dělením buněk, což je ovlivněno různými biochemickými faktory. Před pubertou jedince, odhadem 70% všech spermatogonií v testes podstupuje programovanou buněčnou smrt, která je nutná pro udržení poměru mezi zárodečnými a Sertoliho buňkami (Rodriguez et al., 1997). Nové poznatky naznačují, že hormony,

přednostně FSH a testosteron, působí jako faktory pro přežití buněk přes regulaci apoptotických genů a proteinů (Chausiaux et al, 2008).

Některé studie pozorovaly vztah mezi parametry spermií a počtem apoptotických spermií v ejakulátu. Tyto studie se shodují, že existuje signifikantně negativní korelace mezi počtem apoptotických buněk s životností a motilitou spermií v ejakulátu (Marchetti et al., 2002). Cílem další studie bylo zjistit, míru fragmentace DNA u pacientů s DM I. typu a DM II. typu. Výsledky ukazují zvýšenou koncentraci spermií s narušeným transmembránovým mitochondriálním potenciálem, aktivovanou kaspázou-3, nežádoucí produkcí reaktivních forem kyslíku a v neposlední řadě zvýšenou fragmentací DNA spermií u diabetických pacientů v porovnání se zdravými jedinci. Tento efekt se výrazněji projevoval u mužů trpících diabetes II. typu (Roessner et al., 2012).

2. Cíle práce:

Cílem této práce bylo určit vliv diabetického prostředí na kvalitu spermií, reprodukční orgány a změny v expresi vybraných genů, které hrají významnou roli během savčí spermatogeneze. Tento efekt byl studován na FVB inbredním myším kmeni. U experimentální skupiny zvířat byl uměle navozen DM, jako kontrola byla použita skupina zdravých (wild type) myší.

Specifické cíle:

1. Váha těla, reprodukčních orgánů, anogenitální vzdálenost (AGD)
2. Hodnocení kvality spermií
3. Analýza histopatologie samčích gonád
4. Studium jaderných proteinů protaminů
5. Expres vybraných genů v testikulární tkáni

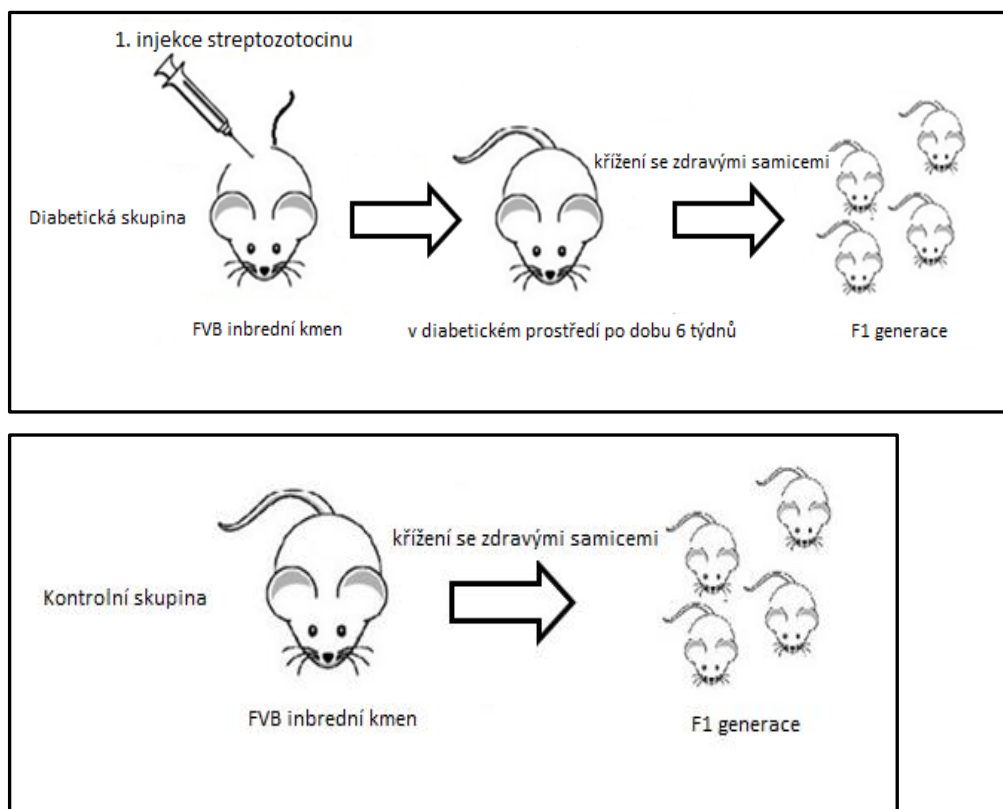
3. Metody:

3.1 Experimenty *in vivo*

Dvougenerační *in vivo* studie probíhala na inbredním myším kmenu FVB (kmen 207, Charles River), který byl díky vhodným vlastnostem vybrán na navození DM. Tato line je známa početnými vrhy (10-12 mláďat ve vrhu). Obě myší skupiny (experimentální a kontrolní) byly chovány v chovném a experimentálním zařízení Ústavu molekulární genetiky, AV ČR, v. v. i., Praha. Jejich chov probíhal za standardních experimentálních podmínek (12 hodinový světelný režim, konstantní teplota bez výkyvů, omezení vnějších stresových faktorů na minimum). Všechna zvířata zahrnutá do studie byla krmena granulemi bez obsahu sóji, a to z důvodu předcházení příjmu fytoestrogenů z krmiva (LASvendi, Soest). Přístup k pitné vodě měla *ad libitum*.

Navození DM proběhlo pomocí látky streptozotocin-u (STZ), která díky svým vysokým cytotoxickým účinkům způsobuje destrukci β buněk slinivky břišní, do kterých se dostává přes membránový GLUT 2 přenašeč. Streptozotocin byl injikován intraperitoneálně, a to v dávce 100 $\mu\text{g/g}$ živé hmotnosti zvířete. Předtím byl rozpuštěn v 10 nM citrátovém pufru o pH 4.5 (v 10 ml destilované vody bylo rozpuštěno 0.021 g kyseliny citronové). Na 100 μl citrátového pufru tak připadlo 1 mg streptozotocinu. Ve věku pohlavní zralosti (6 týdnů) byla samcům injikována 1. dávka STZ. Po každé aplikaci byla změřena hladina glukózy v krvi (v mmol/L). Po týdnu byla provedena 2. injekce streptozotocinem a opakované měření glukózy v krvi. Myši s hladinou cukru v krvi vyšší než 13.9 mmol/L byly považovány za diabetické a zahrnuty do této studie (Obr. 11). Experimentální skupina myší byla vystavena diabetickému prostředí po dobu 6 týdnů. V 13. týdnu věku byli myši samci s DM kříženi se zdravými (wild type) samicemi a jejich narozená mláďata nebyla dále ovlivňována (F1 generace). V 14. týdnu věku byli samci z parentální generace usmrceni a podrobeni analýzám. V předložené studii byli hodnoceni pouze samci z parentální generace.

Experimentální skupina myší byla porovnávána se skupinou adekvátních kontrolních zdravých myší. Počet testovaných zvířat byl v diabetické skupině 13 a v kontrolní skupině 15. Experiment byl proveden se souhlasem etické komise a v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992.



Obr. 11 – Diagram navození DM a křížení FVB myši v *in vivo* studii

3.2 AGD, váha těla a orgánů

Byla měřena anogenitální vzdálenost (AGD), vážena hmotnost zvířat a jednotlivých reprodukčních orgánů – testes, epididymis, prostata, semenné vaky a dalších důležitých orgánů, jako ledviny a játra. Vypreparované reprodukční orgány byly očištěny, zváženy na analytických vahách a konkrétní hodnoty byly zpracovány statistickou analýzou. K získání spermií byly zpracovány cauda epididymis (ocas) z obou epididymis. Pravé testes bylo uchováno na extrakci celkové RNA, DNA a proteinů a levé bylo využito pro histologickou analýzu.

3.3 Izolace a příprava spermií

U experimentálních i kontrolních skupin myši byly k získání spermií použity cauda epididymis z levého a pravého epididymis. Cauda epididymis byly vloženy do 1 ml PBS vyhřátého na 37°C v mikrozkuhavce. Pomocí nůžek byly jednotlivé části tkáně nastříhány pro snazší vyplavení spermií do roztoku. Dále probíhala inkubace v 5% CO₂ inkubátoru při stálé teplotě 37 °C po dobu 10-15 minut s občasným protřepáním. Po vyplavení spermií do media byla buněčná suspenze zfiltrována přes

síto o velikosti 30 μm (Partec) do čisté zkumavky a objem byl doplněn do 1 ml PBS. Tato suspenze byla použita pro následnou analýzu.

3.4 Koncentrace spermií

K určení koncentrace spermií bylo odebráno 10 μl buněčné suspenze, která byla 10x naředěna pro stanovení koncentrace v Bürkerově hematocytometrické komůrce dle doporučení výrobce. Do této komůrky bylo nanášeno 10 μl naředěné suspenze spermií a pomocí světelného mikroskopu (Nikon E400 Eclipse) byly buňky počítány při 400 - násobném zvětšení.

3.5 Životnost spermií-viabilita

K určení životnosti spermií bylo odebráno 10 μl buněčné suspenze. Ta byla smíchána se 190 μl HEPES vazebného pufru a 1 μl SYBR14 z kitu Live/Dead sperm viability. Směs byla inkubována při 37°C po dobu 10 minut a následně bylo přidáno 100 μl DPBS (Gibco). Viabilita spermií byla měřena průtokovým cytometrem LSRII (Becton Dickinson), hodnoceno bylo minimálně 15 000 událostí.

3.6 Hodnocení apoptotického stavu spermií

K hodnocení apoptotického stavu spermií byl použit kit APO-AF (Annexin V - FITC Apoptosis Detection kit, Sigma-Aldrich). Pro analýzu byl použit upravený protokol výrobce, a to: 100 μl 1x koncentrovaného vazebného pufru, 1 μl roztoku annexinu V a 1 μl buněčné suspenze odebrané z pelety po centrifugaci vzorku při 300 g po dobu 5 minut. Připravený vzorek byl po dobu 15 minut inkubován v temnu při pokojové teplotě. Po důsledném resuspendování bylo odebráno 2 x 10 μl a nakapáno na podložní sklo. Tento preparát byl v temnu usušen při 37 °C. Po zaschnutí kapek byl preparát opláchnut destilovanou vodou, rychle osušen a na sklíčko bylo nanášeno montovací médium obsahující DAPI pro barvení jaderné DNA (Vectashield with Dapi, Vector Laboratories) s následným překrytím krycím sklíčkem.

Tímto způsobem připravené mikroskopické preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E400 a objektivu Plan Apo VC 60x s imerzním olejem. Každý snímek byl nasnímán kamerou CCD VDS1300 (Vosskühler) a softwaru NIS – Elements AR (Laboratory Imaging). Hodnoceno bylo vždy minimálně 200 buněk.

3.7 Morfologie spermií a separace hlavičky

Pro hodnocení morfologického stavu myších spermií bylo 10 μ l buněčné suspenze nakapáno na podložní sklo, zafixováno při teplotě 37°C v termostatu a barveno podle protokolu výrobce pomocí Spermac Stain systému (Ferti Pro). Využit byl fázový kontrast při 600 – násobném zvětšení. Hodnoceno bylo minimálně 200 buněk jak pro stanovení morfologie spermií (hlaviček), tak pro stanovení počtu oddělených hlaviček od bičíků.

3.8 Zastoupení protaminů v hlavičkách myších spermií

Pro testování množství protaminů v hlavičkách spermií bylo využito 10 μ l buněčné suspenze nakapané na podložní sklo. Po zaschnutí na vzduchu byl preparát fixován v roztoku methanol: kyselina octová (3:1) po dobu 10 minut při 4°C. Po fixaci bylo sklíčko 5 minut oplachováno McIllvainovým pufrům (pH 7.0). Po dobu 20 minut při 37°C byly spermiie obarveny pomocí roztoku chromomycinu A3 (CMA3, Sigma - Aldrich). Preparáty se následně promývaly 2x po dobu 5 minut v McIllvainově pufru a 1x v deionizované vodě. Po rychlém osušení bylo na preparáty naneseno montovací médium obsahující DAPI pro barvení jaderné DNA (Vectashield with DAPI, Vector Laboratories). Preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu (Nikon Eclipse E-400) s objektivem Plan Apo VC 60x s imerzním olejem. Chromomycin A3 barví struktury nukleoproteinů- histonů v jádře spermiie. Byly počítány pozitivně značené buňky chromomycinem A3 značící nepřítomnost protaminů v hlavičce spermiie. Bylo hodnoceno minimálně 200 buněk.

3.9 Příprava histologických preparátů

Na přípravu histologických preparátů bylo použito levé testes samců z kontrolních a experimentálních skupin. Testes bylo fixováno v 10% formalínu po dobu 48 hodin a následně promyto v PBS po dobu 4 hodin. Stejný čas byla tkáň promývána nejprve v 25% ethanolu, poté v 50% ethanolu a na závěr v 70% ethanolu. Takto připravené testes bylo vloženo do kazet (Tissue tek, Sakura) a následně do odvodňovacího procesoru IKEM like, Formol/Ethanol START RMS. Odvodňování probíhalo v jednotlivých krocích podle Tab. 1. Vzorek byl poté zalit parafínem

(Histovax). Takto připravená tkáň byla řezána mikrotomem na řezy o tloušťce 6-8 μm , které byly následně umístěny na podložní sklíčko a nechaly se na něj přilnout.

Aby mohla být provedena histologická analýza, musely řezy být nejprve zbaveny parafínu. To bylo provedeno pomocí roztoku diasolv (3x10 minut). Poté byly vzorky rehydratovány v sestupné koncentrační řadě ethanolu (100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50% ethanol, každý po dobu 5 minut) a nakonec v destilované vodě po dobu 10 minut.

Po rehydrataci byly vzorky barveny pomocí roztoku Mayerův Haematoxilin (Dia - Path) po dobu 40 sekund pro obarvení buněčných jader. Následovalo opláchnutí vzorků ve vodě a poté v kyselém alkoholu (96% ethanol + HCl) pro odbarvení okolní tkáně. Následně byly vzorky barveny po dobu 5 sekund 0.5% Eosinem Goy (Dia-Path). Nejprve byly vzorky opláchnuty destilovanou vodou, poté odvodněny ve vzestupné řadě ethanolu (70%, 80%, 90%, 96%) a nakonec v 100% ethanolu po dobu 5 minut. Následně byly vzorky projasněny pomocí xylénu (2x 3 minuty). Poté byly vzorky ihned zality do montovacího média. Histopatologický stav testikulární tkáně byl hodnocen pod světelným mikroskopem (Olympus, zvětšení 200x). Bylo hodnoceno celkem 100 semenotvorných kanálek na vzorek. Bylo počítáno procentuální zastoupení normálních a patologických kanálek. Pro každou experimentální a kontrolní skupinu bylo hodnoceno 8 vzorků. Pro vyhodnocení byly pořízeny snímky histologických preparátů světelným mikroskopem Olympus s kamerou Olympus IX81 při 200x zvětšení.

Chemikálie	Čas	Teplota (°C)	Tlak/Vakuum
4% Formalín	15 min	Okolní	
70% Ethanol	1 h	37	P/V
100% Ethanol	1 h	37	P/V
100% Ethanol	1 h	37	P/V
100% Ethanol	1 h	37	P/V
50% Ethanol/50% Isopropanol	1 h	37	P/V
50% Ethanol/50% Isopropanol	1 h	37	P/V
Xylene	1 h	37	P/V
Xylene	1 h	37	P/V
Xylene	1 h	37	P/V
Histovax	1 h 30 min	62	P/V
Histovax	2 h	62	P/V
Histovax	2 h	62	P/V

Tab. 1- Jednotlivé kroky odvodňovacího procesoru

3.10 TUNEL analýza na histologických řezech testes

TUNEL je metoda, která umožňuje detekovat apoptotické buňky tak, že značí fragmentovanou DNA. Ke značení DNA dochází inkorporováním fluoresceinem značených nukleotidů na 3'-OH konec DNA. TUNEL metoda byla provedena na histologických řezech testes pomocí kitu DeadEnd Fluorometric TUNEL system (Promega Co), obsahující: ekvilibrační pufr, SCC pufr, TdT enzym a nukleotidový mix. Histologické řezy byly odparafinovány (viz výše) a promyty v PBS 5 minut při pokojové teplotě. Následně byli fixováni v 10% formalínu 15 minut v lednici. Poté byly 3x promyty PBS po dobu 5 minut.

V každém experimentu byl jeden vzorek použit jako pozitivní kontrola. Tento vzorek byl inkubován v 100 μ l DNAsa pufru (Fermentas) a následně inkubován po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Preparát byl dále inkubován v 100 μ l DNAsa pufru obsahující 0.5 μ l enzymu DNAsa I. Následně byl vzorek 4x důkladně opláchnut destilovanou vodou a poté ekvilibrován spolu s experimentálními vzorky 10 minut v 100 μ l ekvilibračního pufru.

Experimentální řezy i řezy představující pozitivní kontrolu byly inkubovány v 50 μ l směsi, která obsahovala: 45 μ l ekvilibračního pufru, 5 μ l nukleotidového mixu a 1 μ l TdT enzym (terminální deoxynukleotidyl transferáza). Negativní kontrola byla ošetřena stejným způsobem jako experimentální vzorky s tím rozdílem, že místo TdT enzymu byl přidán 1 μ l destilované vody. Vzorky byly inkubovány ve vlhké komůrce v termostatu při 37°C po dobu 60 minut. Po této inkubaci byla reakce zastavena pomocí 2x koncentrovaného SCC pufru (15 minut při pokojové teplotě).

Vzorky byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E400 s použitím objektivu 10x Plan Apo VC. Každý snímek byl nasnímán kamerou CCD VDS1300 (Vosskühler) a softwaru NIS – Elements AR (Laboratory Imaging). V každém řezu byly počítány TUNEL pozitivní buňky na počet semenotvorných kanálků. Hodnoceno bylo 10 nezávislých ploch řezu testes. Pro každou experimentální a kontrolní skupinu bylo hodnoceno 8 vzorků a při každém experimentu byla provedena pozitivní a negativní kontrola.

3.11 Extrakce jaderných proteinů protaminů

K extrakci protaminů byla použita peleta obsahující 4×10^6 spermií. Buňky byly resuspendovány v 56 μ l permeabilizačního pufru (20 mM Tris-HCl (pH 8), 2 mM $MgCl_2$, 0.5 % Triton Tx-100). Směs byla centrifugována při 9000 g, po dobu 5 minut při 4°C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla následně resuspendována v 56 μ l roztoku 1 mM PMSF (inhibice proteáz). Směs byla stočena při 9000 g, po dobu 5 minut při 4°C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla důkladně resuspendována v 15 μ l extrakčního roztoku (1 mM PMSF, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl). Poté bylo přidáno 15 μ l denaturačního roztoku (575 mM DTT, 6 M GuHCl) a směs byla resuspendována. Následně bylo přidáno 15 μ l roztoku 0.8% vinylypyridinu (inhibice cystein-disulfidických můstků) a směs byla inkubována po dobu 30 minut v 37°C, ve tmě s opakovaným promícháním v 5 minutových intervalech. Pro vysrážení DNA bylo ke směsi přidáno 250 μ l 100% ethanolu o teplotě -20°C a tato směs byla inkubována po dobu 2 hodin při teplotě -20°C a poté byla stočena při 13000 g po dobu 15 minut při 4°C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v 143 μ l 0.5 M HCl. Směs byla inkubována po dobu 5 minut v 37°C, promíchána a opět inkubována po dobu 2 minut při 37°C. Směs byla centrifugována při 17600 g po dobu 10 minut při 4°C. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky a peleta obsahující DNA byla uschována při teplotě -20°C k dalšímu možnému použití. K supernatantu bylo přidáno 36 μ l TCA a směs byla inkubována po dobu 10 minut při 4°C a každé 2 minuty byla směs protřepána. Následně byla směs stočena při 17600 g po dobu 10 minut při 4°C. Supernatant byl odstraněn a k peletě bylo přidáno 143 μ l 1% b-mercaptoethanolu v acetonu. Vzorky byly sušeny ve vakuovém koncentrátoru (Eppendorf) 10 minut při 4°C. Usušený vzorek byl resuspendován ve 12 μ l vzorkového pufru (5.5 M urea, 20% b-mercaptoethanol a 5% kyselina octová) a použit pro elektroforetickou separaci proteinů. Všechny výše uvedené chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich.

3.12 Rozdělení a analýza jaderných proteinů spermií

Bazické jaderné proteiny byly analyzovány pomocí kyselého-urea polyakrylamidového gelu obsahujícího 2.5 M ureu, 12.5 mM thioureu, 0.9 M kyselinu octovou, 15% akrylamidu, 0.1% bis-akrylamidu a 0.12% H_2O_2 . Po polymerizaci gelu byla sestavena elektroforetická sada, gely byly ekvilibrovány v elektrodovém pufru

(0.9 M kyselina octová) po dobu 5 minut. Z každého vzorku bylo použito 2.5 μ l na jamku a do volných pozic bylo nanášeno 5 μ l vzorkového pufru obsahujícího 10 % methyl green pro barevnou vizualizaci průběhu elektroforézy. Separace vzorků probíhala s obrácenou polaritou po dobu 90 minut při konstantním napětí 110 V. Separované vzorky byly obarveny pomocí EZblue barvicího roztoku a následně byl pro každý vzorek hodnocen poměr denzit jednotlivých bandů odpovídajících P1 a P2 (Image-J software). Všechny výše uvedené chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich mimo kyseliny octové (Lachner).

3.13 Izolace RNA

Pro izolaci RNA z pravého testes byl použit kit – Tri Reagent (Sigma-Aldrich). Tkáň, ke které byl přidán 1 ml Tri Reagentu byla nejprve homogenizována v homogenizátoru (Precellys 24, Bertin Technologies). Po tomto kroku následovala pětiminutová inkubace v pokojové teplotě. Po přidání 0.1 ml bromchloropropanu byla provedena inkubace s tímto reagens po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Vzniklá směs byla centrifugována 15 minut při 12 000 g a 4°C. Tento krok umožnil rozdělení vzorku do tří barevně odlišitelných fází – spodní červená odpovídá proteinům, ve střední frakci je soustředěna DNA a horní vodná fáze představuje požadovanou RNA.

Ve sterilním boxu (PCR box, BioTech) byla horní fáze přenesena do čisté sterilní zkumavky, bylo k ní přidáno 0.5 ml rozpouštědla isopropanolu, směs byla promíchána a centrifugována při 12 000 g, 10 minut a 4°C. Na boku a dnu zkumavky byl po stočení utvořen RNA precipitát. Supernatant byl odstraněn a peleta byla promyta v 1 ml 75% ethanolu. Resuspendovaná suspenze byla centrifugována v 7 500 g po dobu 5 minut při 4°C. Vzniklý supernatant byl odstraněn a peleta byla sušena na vzduchu v boxu 10 minut. Po této době byla peleta rozpuštěna v 40 μ l „RNA/DNA free water“. Izolace RNA byla provedena individuálně pro každého jedince ve skupině.

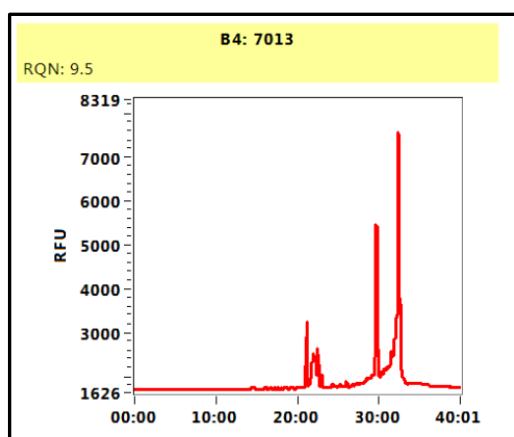
Bylo provedeno přečištění vzorků od DNA a dalších kontaminací. Na 10 μ l vyizolované RNA bylo použito 4 μ l 10x koncentrovaného reakčního pufru pro enzym DNAsa I (Fermentas), 4 μ l enzymu DNAsa I (Fermentas), 22 μ l „RNA/DNA free water“ (Fermentas). Výsledné směsi byly inkubovány 37°C 30 minut. Následně bylo přidáno 40 μ l precipitačního činidla 8M LiCl a směs byla inkubována přes noc v -20°C. V dalším kroku se vzorky centrifugovaly při 20 814 g, 30 minut při 4°C. Supernatant byl odstraněn a peleta s RNA byla promyta v 1 ml 80% ethanolu. Směs byla opět

centrifugována při 20 814 g, 30 minut při 4°C. Ethanolový supernatant byl odstraněn a zbytky se nechaly odpařit na vzduchu po dobu 10 minut. Peleta byla následně resuspendována v 20 µl 1x koncentrovaného TE a byla uložena do -70°C.

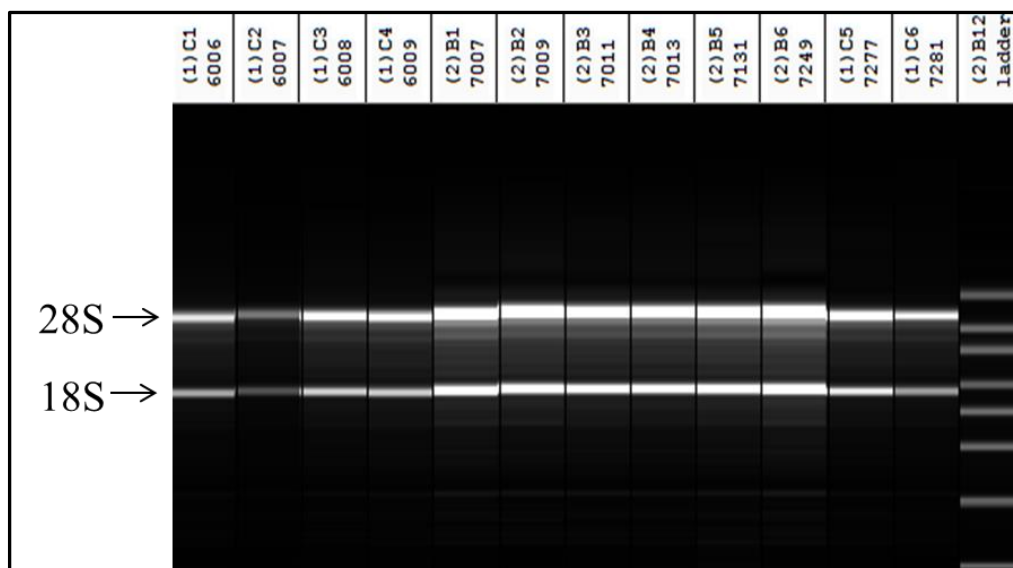
3.14 Stanovení koncentrace a kvality RNA

Celková koncentrace a čistota jednotlivých vzorků RNA byla kontrolována na spektrofotometru (Helios α , Thermo Elektron Corporation). Koncentrace RNA, popřípadě i DNA byla měřena při 260 nm (A_{260}). Další důležitou veličinou je hodnota koncentrace proteinů, měřených při 280 nm (A_{280}), což je využito při stanovování čistoty vzorku. Pokud se poměr mezi A_{260}/A_{280} pohybuje mezi 1.8 až 2.0 jedná se o vysoce kvalitní vzorek RNA (DNA). Vzorky s poměrem pohybující se nad hodnotu 1.8 byly použity k dalším analýzám. Koncentrace daného vzorku byla stanovena pomocí absorbance při 260 nm.

Pro zjištění, zda nedošlo k degradaci RNA, která by zkreslovala výsledky qPCR, bylo využito kitu DNF-471 (Advanced Analytical). Kontrolní a experimentální vzorky vyizolované RNA byly 20x naředěny TE pufrem a byly podrobeny analýze na přístroji Fragment Analyzer (Advanced Analytical). Ten využívá k změření intaktnosti RNA poměr mezi malou a velkou podjednotkou - 18S/28S rRNA (RNA integrity number - RIN nebo RQN). Tento poměr se u nedegradovaného vzorku RNA, pohybuje v rozmezí od 7-10 (Obr. 12). Všechny vzorky použité v dalších pokusech měly hodnotu RQN vyšší než 9.0 (Obr. 13).



Obr. 12 - Graf znázorňující poměr podjednotek 18S/28S rRNA určující intaktnost daného vzorku, hodnota RQN=9.5



Obr. 13 – Elektroforetický gel určující stupeň degradace RNA jednotlivých vzorků. Všechny použité vzorky měly hodnoty RQN > 9.0

3.15 Reverzní transkripce (syntéza cDNA)

Pro syntézu cDNA byly použity 2 μg vyizolované RNA. K té byl přidán 1 μl oligo(dT) + náhodných primerů (Promega) a vše bylo doplněno „RNA/DNA free water“ (Fermentas) do 12.5 μl . Takto připravená směs byla inkubována 5 minut v 65°C. V dalším kroku byly přidány 4 μl 5x koncentrovaného reakčního pufru pro M-MuLV reverzní transkriptázu (Fermentas), 0.5 μl Inhibitoru RiboLock (Fermentas), 0.5 μl RNA Spiku (TATAA Biocenter), 2 μl 10 nM dNTP (Fermentas) a 1 μl M-MuLV reverzní transkriptázy (Fermentas). Výsledná směs byla inkubována při 42°C 60 minut a následně 70°C 10 minut v termocykleru (Techne Touchgene Gradient PCR Thermal Cycler, Labrecyclers). Po ukončení reakce byly jednotlivé vzorky zchlazeny na teplotu 4°C a uloženy do -20°C.

Mimoto byla připravena tzv. RT⁻ kontrola pro odhalení případné kontaminace genomickou DNA, která by se mohla nespecificky amplifikovat a tím falešně zkreslovat výsledky. RT⁻ kontrola byla připravena obdobně jako experimentální vzorky s tím rozdílem, že místo 1 μl M-MuLV reverzní transkriptázy bylo přidáno 1 μl „RNA/DNA free water“.

3.16 Real Time quantitative PCR (RT-qPCR)

Na RT-qPCR byla použita 10x ředěná cDNA vzniklá pomocí metody reverzní transkripce a příslušné primery naředěné na koncentraci 10 μmol . Použité primery jsou

uvedeny v Tab. 2. RT-qPCR reakce byla provedena v 384 jamkových destičkách (384 - PCR well plates, BioRad) v sterilním boxu (PCR box, BioTech). Na jednu reakci bylo použito: 2 μ l 10x ředěné cDNA, 5 μ l SYBR Green Master Mix (Fermentas), 2 μ l „RNA/DNA free water“, 1 μ l primeru. Všechny tyto reakce byly provedeny v dubletech v termocykleru (CFX 384 – qPCR cycler, BioRad). Průběh reakce je uveden v Tab. 3.

Pro kontrolu správného nasednutí primerů, a zdali primery netvoří tzv. „primery - dimery“ byla vytvořena tzv. NTC (non-template control). NTC byla připravena obdobně jako experimentální vzorky s tím rozdílem, že nebyla přidána cDNA, ale na místo toho „RNA/DNA free water“.

Z naměřených Ct hodnot byla vypočítána relativní exprese mRNA v daném vzorku podle vzorce $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Jozefczuk a Adjaye, 2011), kdy kontrola byla stanovena na 100%. Experimentální vzorky byly vztaženy ke kontrolním. Pro normalizaci naměřených hodnot byly použity hodnoty naměřené pro referenční geny Actb-aktin β a Ppia - peptidylprolil isomerasa A, které byly zprůměrované. Tyto tzv. provozní geny („housekeeping geny“), byly vybrány z pěti kandidátních genů. Analýzy se zúčastnily geny: actin β , peptidylprolil isomerasa A, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferasa, tubulin β a ribosomální komplex pro podjednotku 18S rRNA. Nejvhodnější referenční geny byly vybrány pomocí programu NormFinder (GenEx), který používá matematické algoritmy pro stanovení nejvhodnějšího (stabilního) referenčního genu pro analýzu (Graf 1).

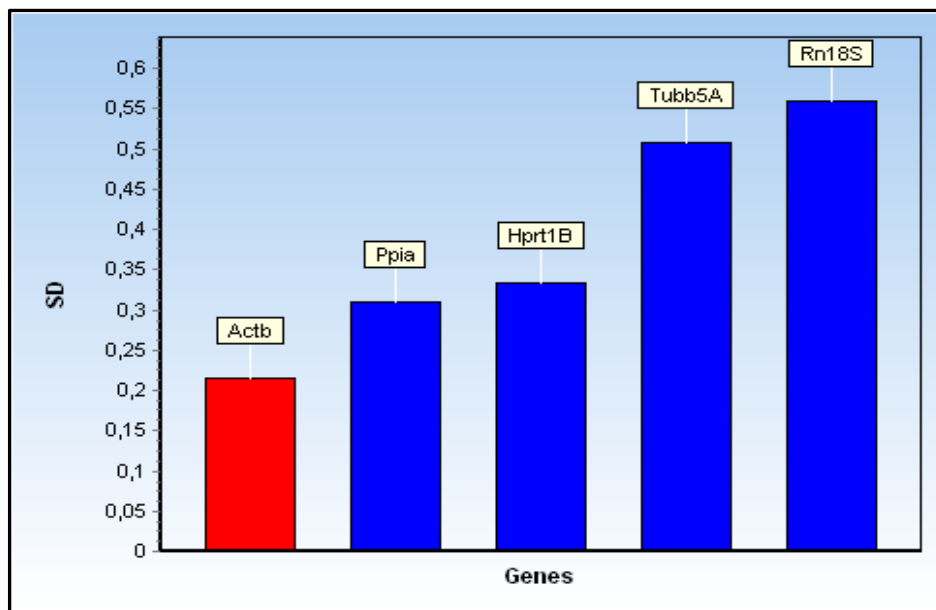
Gen	Nukleotidová sekvence	Velikost produktu PCR (bp)
<i>Actb</i>	5' -CGGTTCCGATGCCCTGAGGCTCTT- 3' 5' -CGTCACACTTCATGATGGAATTGA- 3'	100
<i>Ar</i>	5' -GGACCATGTTTTACCCATCG- 3' 5' -TCGTTTCTGCTGGCACATAG- 3'	171
<i>Bcl2</i>	5' -CAGGGAGATGTCACCCCTGGTGG- 3' 5' -AGGCATCCCAGCCTCCGTTATCC- 3'	104
<i>Ccnal</i>	5' -TTGCAGCTTGTCGGGACAGCA-3' 5' -ACAAACTCATCCACGTCGGGCG- 3'	80
<i>Fshr</i>	5' -GGAGCCTCTGGGCCAGTCGT- 3' 5' -GCGGTATGTTGACCTGGCCCTC- 3'	108
<i>Gjal</i>	5' -TTTGGCGTGCCGGCTTCACTTT-3' 5' -CTCCGGCCGTGGAGTAGGCTT-3'	113

<i>Grth</i>	5' -TACTTTGGGGAGGCGACGCC-3' 5' -AGGTTCTTCCTGGGGTGGACGA-3'	85
<i>Meig1</i>	5' -TCTGCACTGAGTCTGGTCGTCGA- 3' 5' -TCCTCTGACCATTCTTGGCACGA- 3'	144
<i>PPIA</i>	5' -AGCTCTGAGCACTGGAGAGA- 3' 5' -GCCAGGACCTGTATGCTTTA- 3'	158
<i>Prm1</i>	5' -ACAGGTTGGCTGGCTCGACC-3' 5' -CGGCAGCATCGGTATCTGGCC-3'	90
<i>Prm2</i>	5' -CCAGGGGCCTGGACAAGACC-3' 5' -TCTGTGGTGGTGGTGGCCCC- 3'	112
<i>p21</i>	5' -CCGCCGCGGTGTCAGAGTCTA- 3' 5' -CTGTGCGGAACAGGTCGGAC- 3'	120
<i>p53</i>	5' -ATGGCTTCCACCTGGGCTTCCTG- 3' 5' -CCACAACCTGCACAGGGCACGT- 3'	119
<i>p450scc</i>	5' -AGGTGTAGCTCAGGACTTCA- 3' 5' -AGGAGGCTATAAAGGACACC- 3'	370
<i>Sox8</i>	5' -AAGACCCTAGGCAAGCTGTGGCG-3' 5' -GCCAGTCTTCACACTCTTCCTTCGC-3'	147
<i>Star</i>	5' -CATCCAGCAGGGAGAGGTGGCT- 3' 5' -CACCTTGCCCACATCTGGCACC- 3'	133
<i>Sycp1</i>	5' -GCCCATGCTCGAACAG GTTGC- 3' 5' -ACAGTCTGCTCATTGGCTCTGAA- 3'	98
<i>Sycp3</i>	5' -GGACAGCGACAGCTCACCGG- 3' 5' -GGTGGCTTCCCAGATTTCCCAGA- 3'	90
<i>Tnp1</i>	5' -CCGAGCTCCTCACAAG GGCGT- 3' 5' -CAGGGCAGAGCTCATTGCCGC- 3'	140
<i>Tnp2</i>	5' -CCTGCAAGACCCAGCCACCG- 3' 5' -GTTTCCGCCTCCTGACGGCC- 3'	94
<i>Vegfa</i>	5' -TGCTCTTTGGGTGCACTGGAC- 3' 5' -GACGGCAGTAGCTTCGCTGGT- 3'	147
<i>Wt1</i>	5' -GGCGCTTTGAGGGGTCCGAC- 3' 5' -AAAGTGGGCGGAGCACCGAC- 3'	205

Tab. 2 – Sekvence použitých primerů

Krok	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	10 min	1
Denaturace	95	15 s	35
Hybridizace (nasednutí primerů)	60	30 s	35
Prodlužování	75	30 s	35

Tab. 3 – jednotlivé kroky RT-PCR



Graf 1 – Výběr referenčního genu v programu NormFinder

3.17 Statistická analýza

Statistická analýza experimentálních dat byla provedena pomocí programu Graphpad Prism 5.0 (GraphPad, Software) a STATISTICA 7.0 (Statsoft).

Váhy jednotlivých orgánů a anogenitální vzdálenost byly srovnávány metodou analýzy kovariance (ANCOVA), jako kovariát byla použita váha těla. Jednotlivé parametry spermií, metoda TUNEL a stejně tak data z analýzy genové exprese byly porovnávány mezi experimentální a kontrolní skupinou nepárovým Mann–Whitney U - testem. Pro zjištění korelace mezi jednotlivými sety dat byl vypočítán Pearsonův korelační koeficient (r). Hodnota P menší než 0.05 byla označena za statisticky signifikantní ($*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ a $***p \leq 0.001$, $****p < 0.0001$).

4. Výsledky:

4.1 Výsledky *in vivo* studie provedené na FVB myších

Výsledky této *in vivo* studie se zabývají studiem vlivu DM na reprodukční parametry a expresi testikulárních genů u samců myší z inbredního kmene FVB. Experimentální skupina s uměle navozeným DM byla porovnáвана s kontrolní skupinou myších samců.

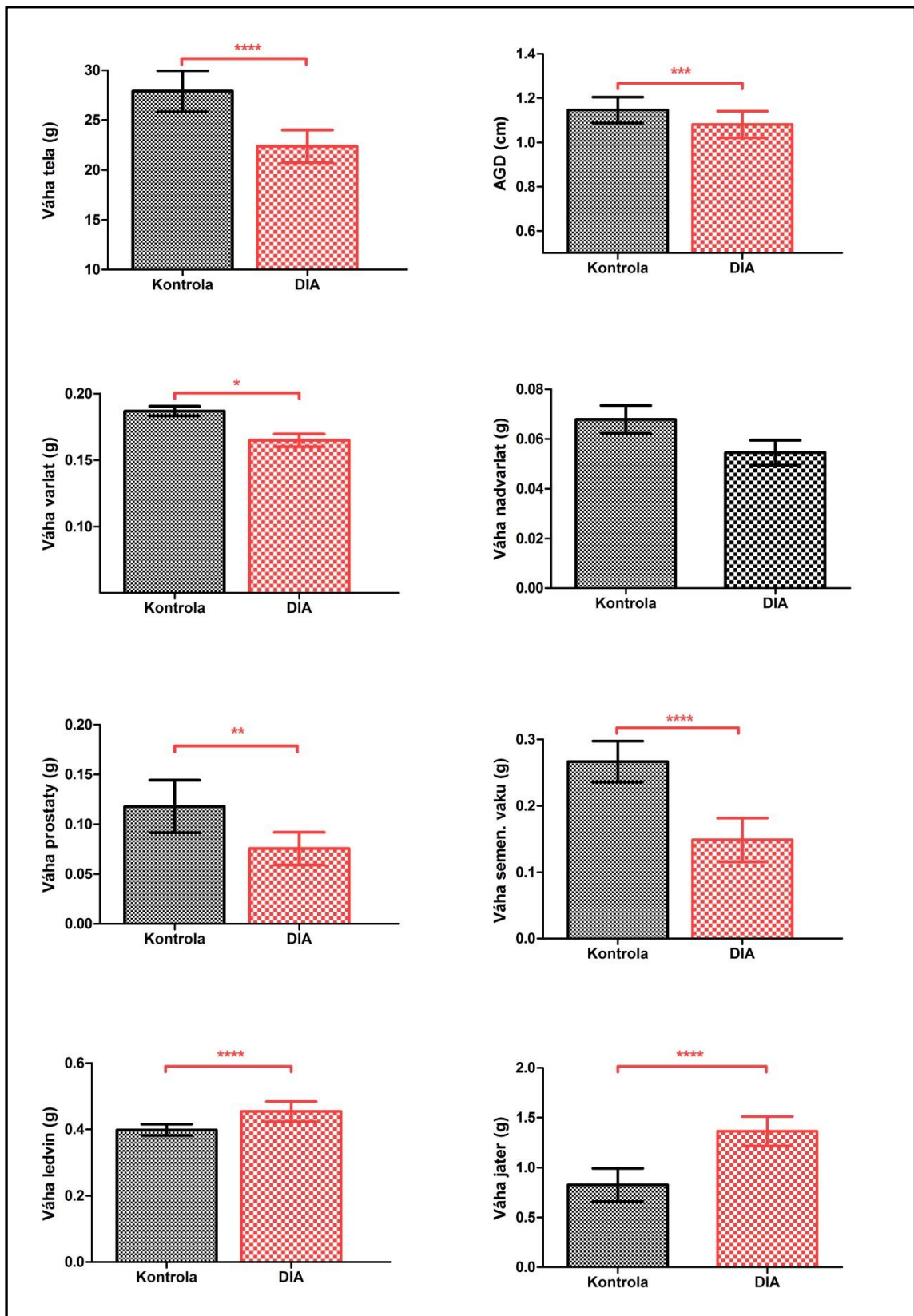
4.2 Počet potomků, váha těla a orgánů

Diabetické prostředí nemělo žádný vliv na počet potomků ve vrhu v parentální generaci. Stejně tak poměr samců a samic se nelišil mezi experimentální a kontrolní skupinou.

Byla měřena anogenitální vzdálenost (AGD). Dále byla vážena hmotnost těla zvířat, jednotlivých reprodukčních orgánů, jater a ledvin. Srovnávání byli diabetičtí samci (DIA) z parentální (P) generace s kontrolní skupinou myší (Kontrola).

Diabetické prostředí mělo vliv na anogenitální vzdálenost, hmotnost těla samců a váhu některých orgánů. Bylo pozorováno signifikantní zmenšení ($p \leq 0.001$) anogenitální vzdálenosti u diabetických samců o 15%. Hmotnost těla diabetických myší byla také statisticky změněna ($p < 0.0001$), a to snížena o 20% v porovnání s kontrolní skupinou. Byly zaznamenány signifikantní změny váhy testes ($p \leq 0.05$) a semenných vaků ($p < 0.0001$) u diabetické skupiny. U testes došlo k snížení o 9%, u semenných vaků bylo pozorováno snížení o 31%. Byly pozorovány minimální rozdíly v hmotnosti nadvarlat (epididimu) mezi dvěma testovanými skupinami. Dále byly pozorovány statisticky významné změny ve vahách prostaty ($p \leq 0.01$), které se projevovaly snížením váhy o 19% u experimentálních zvířat. Hmotnost jedněch z hlavních metabolických a endokrinních orgánů jater a ledvin, byla také významně změněna. V porovnání s kontrolní skupinou bylo sledováno signifikantní zvýšení ($p < 0.0001$) hmotnosti jater o 18% u diabetických samců. Stejně tak tomu bylo u ledvin, u kterých se zvýšení hmotnosti o 30% projevilo také jako statisticky významné ($p < 0.0001$).

Výsledky anogenitální vzdálenosti a váhy jednotlivých orgánů diabetické a kontrolní skupiny myší jsou zobrazeny v Obr. 14.



Obr. 14 – Grafické znázornění anogenitální vzdálenosti, váhy těla a orgánů. Mean±SD. Kontrolní skupina N=15, Diabetická skupina N=13. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ a **** $p \leq 0.001$, ***** $p < 0.0001$)

4.3 Parametry spermií

Mikroskopickými technikami byla hodnocena koncentrace, životnost, morfologie a separace hlavičky spermií, protaminace jádra spermie a apoptotický stav (Obr. 16).

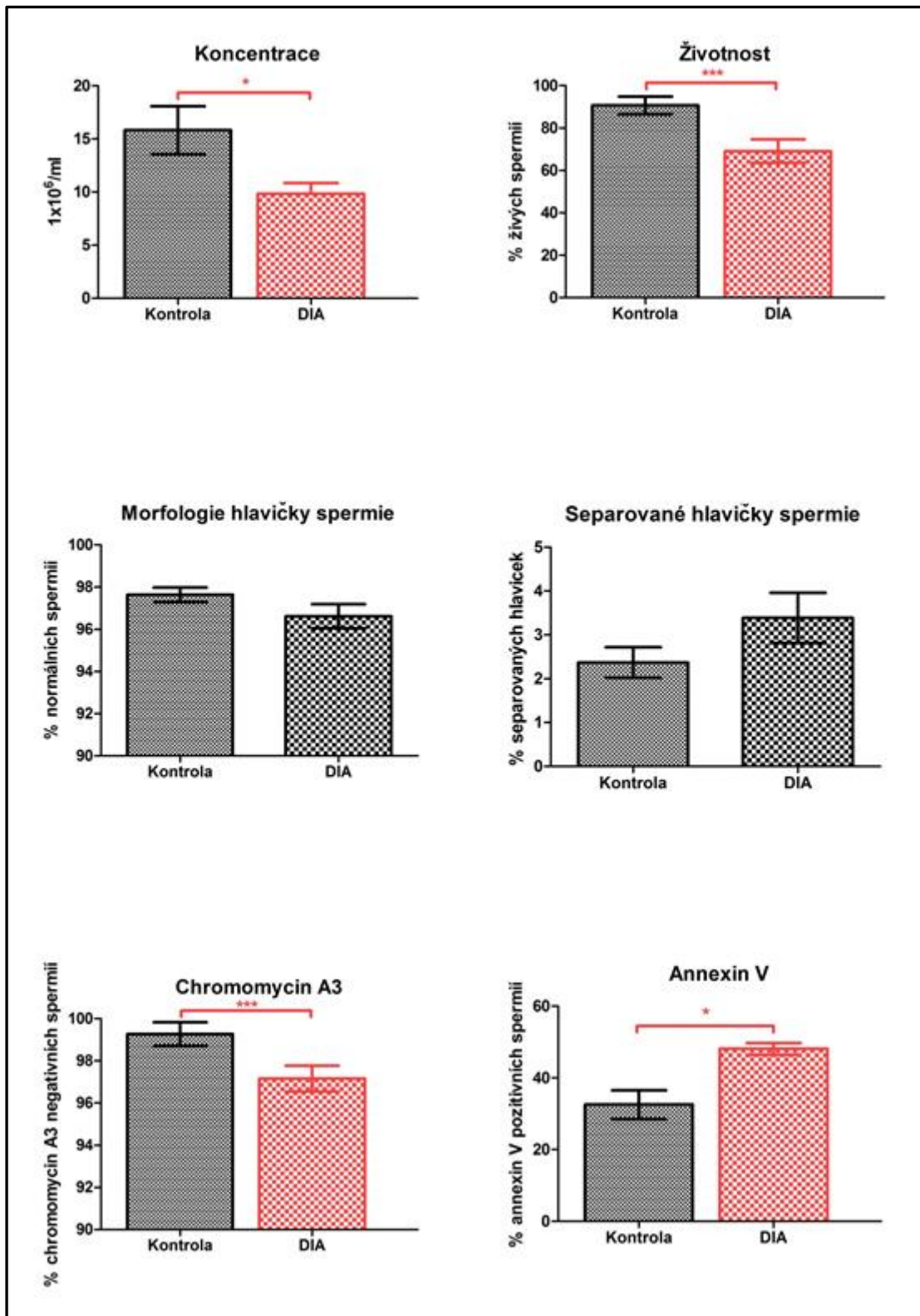
Byly pozorovány signifikantní změny ($p \leq 0.05$) v koncentraci spermií u diabetické skupiny myší srovnávané s kontrolní. U experimentálních zvířat byla zjištěna snížená koncentrace spermií, a to zhruba o 40%. Rovněž životnost spermií (viabilita) byla signifikantně snížena ($p \leq 0.001$) u diabetické skupiny v porovnání s kontrolní skupinou (o více jak 20%).

Morfologie spermie, rozumí se množství spermií s normálním a abnormálním tvarem hlaviček, nebyla statisticky pozměněna mezi testovanými skupinami. Ani separace hlaviček spermií nebyla signifikantně změněna u diabetických zvířat v porovnání s kontrolou.

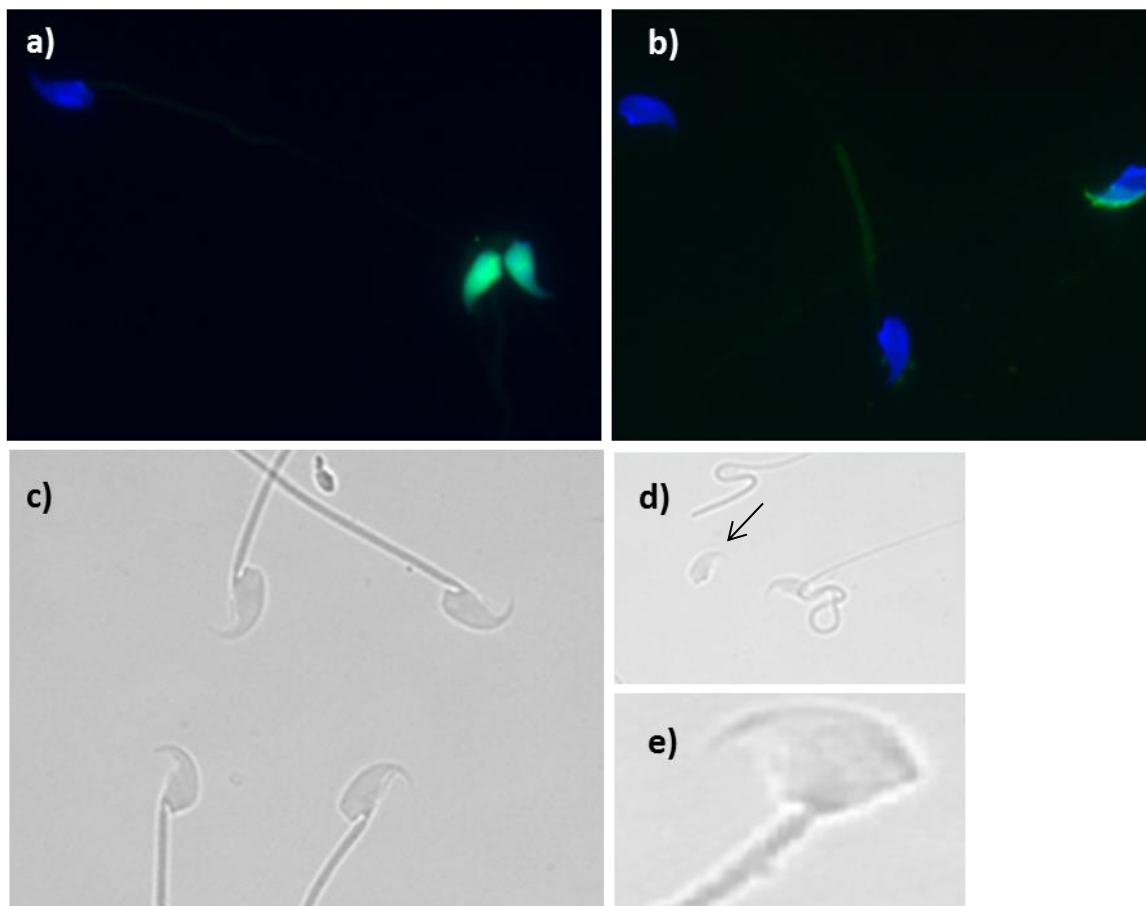
Dalším markerem fertility je zastoupení jaderných proteinů protaminů v hlavičce spermie. Procentuální zastoupení pozitivních buněk s obsahem protaminů v jádře bylo hodnoceno u spermií u obou skupin zvířat. Asi 2% snížení počtu buněk s pozitivním značením na zastoupení protaminů bylo detekováno u diabetické skupiny, což se projevilo jako statisticky signifikantní v porovnání se skupinou kontrolní ($p \leq 0.001$).

Apoptotický stav spermií byl hodnocen pomocí annexinu V. U diabetických myší bylo zaznamenáno zvýšení počtu pozitivně značených spermií (o 16%) v porovnání s kontrolními zvířaty, které se statisticky potvrdilo ($p \leq 0.05$).

Všechny výsledky hodnocení jednotlivých parametrů spermií jsou shrnuty v Obr. 15.



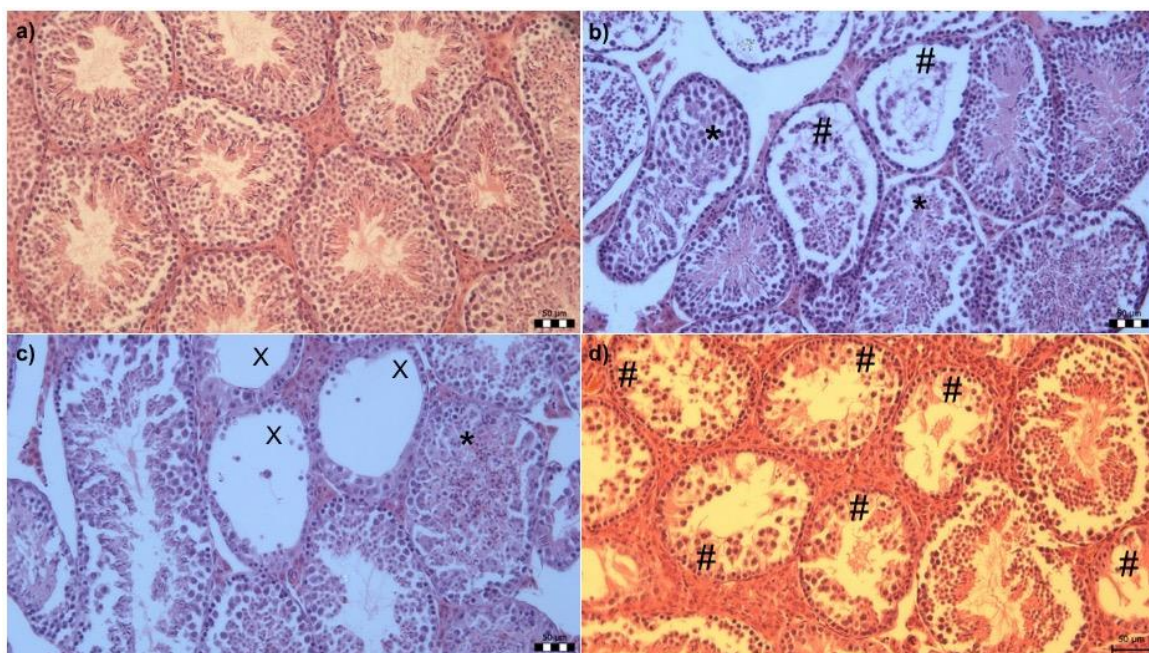
Obr. 15 – Grafické znázornění hodnocených parametrů spermii: koncentrace, životnost, morfologie hlavičky, separace hlavičky spermie, chromomycin A3 negativní spermie na zastoupení protaminů, annexin V pozitivní spermie. Mean±SD. Kontrolní skupina N=15, Diabetická skupina N=13. (* $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$)



Obr. 16 – Mikroskopické preparáty spermíí snímané fluorescenčním mikroskopem (a,b) a pod fázovým kontrastem (c-e) (zvětšeno 600x); a) Barvení chromomycinem A3; b) Barvení annexinem V; c) Spermie s normální morfologií; d) Separovaná hlavička spermie (šipka znázorňuje separovanou hlavičku spermie); e) Spermie s abnormální morfologií

4.4 Histologická analýza

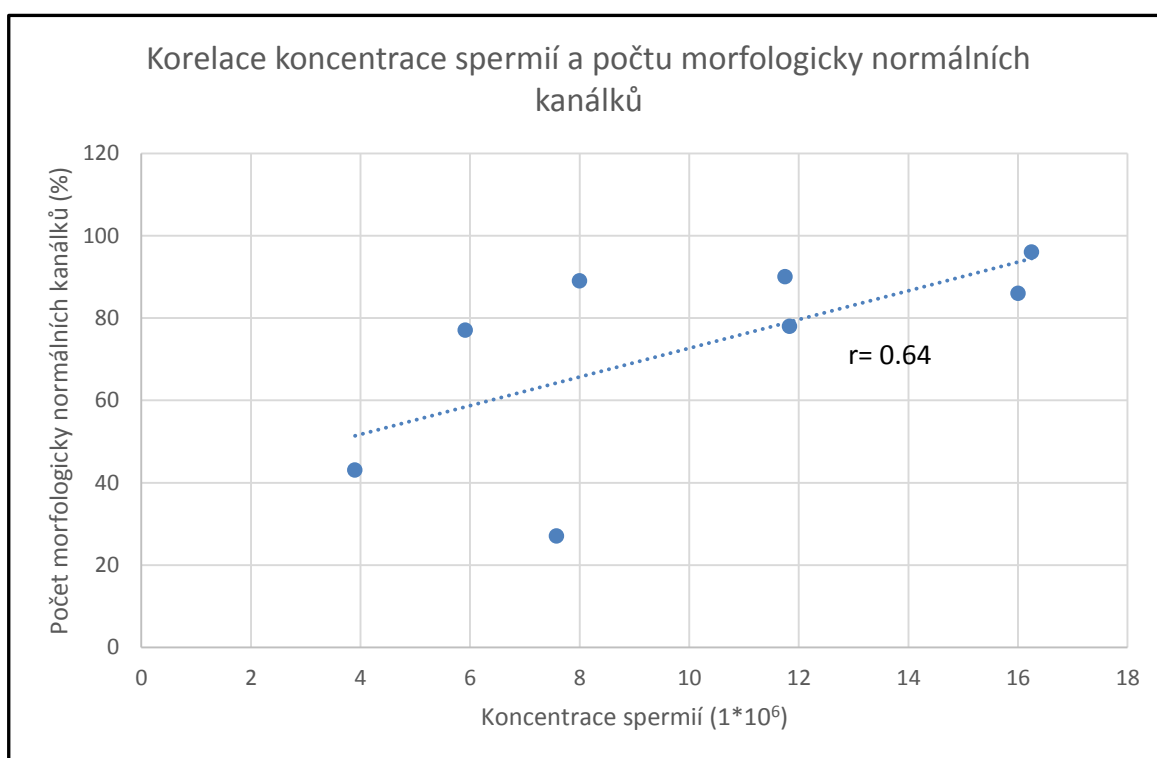
Histologická analýza byla provedena na řezech testes. Pod světelným mikroskopem byla hodnocena morfologie semenotvorných kanálků a průběh spermatogeneze. U diabetické skupiny byly zaznamenány viditelné defekty a patologické změny v morfologii semenotvorných kanálků. Počet morfologicky defektních kanálků u jednotlivých zvířat je uveden v Tab. 4. Patologie vyskytující se převážně u myši z DIA skupiny byly - prázdné kanálky; kanálky s neorganizovanými buněčnými typy bez lumen a defektní kanálky bez standardního rozdělení buněk na spermatogonie, spermatocyty a spermatidy. Rovněž průběh spermatogeneze byl u některých diabetických myši narušen (Obr. 17). Data získaná z morfologické analýzy a hodnocení koncentrace spermií ukázala u diabetických myši pozitivní korelaci mezi těmito dvěma parametry (Graf 2).



Obr. 17 - Histologické řezy testikulární tkáň barvené hematoxylinem-eosinem snímané pod světelným mikroskopem (zvětšeno 200x); a) Histologický preparát normálního kanálku s příslušnými buněčnými typy a probíhající spermatogenezi; b-d) Histologické preparáty kanálků s různými patologiemi; (*) Nediferenciované kanálky bez lumen; (#) Defektní kanálky; (X) Prázdné kanálky

	Vzorek	Normální kanálky (%)	Nediferencované (bez lumen) kanálky (%)	Prázdné kanálky (%)	Defektní kanálky (%)
Kontrola	7132	86	5	0	9
	7134	86	6	0	8
	7248	90	3	0	7
	7277	92	2	0	6
	7279	94	2	0	4
	7281	68	10	0	22
	7322	93	3	0	4
	7426	93	2	0	5
DIA	7428	88	3	0	9
	7007	86	9	0	5
	7009	43	21	16	20
	7011	78	13	0	9
	7013	89	4	0	7
	7014	77	3	0	20
	7131	96	2	0	2
	7249	90	2	0	8
7283	27	1	2	70	

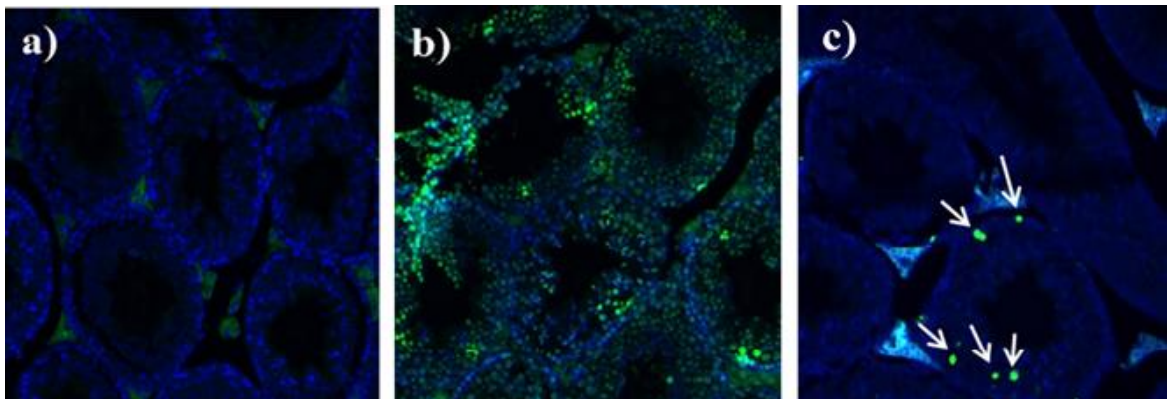
Tab. 4 - Srovnání morfologie semenotvorných kanálků testes u kontrolní a diabetické skupiny



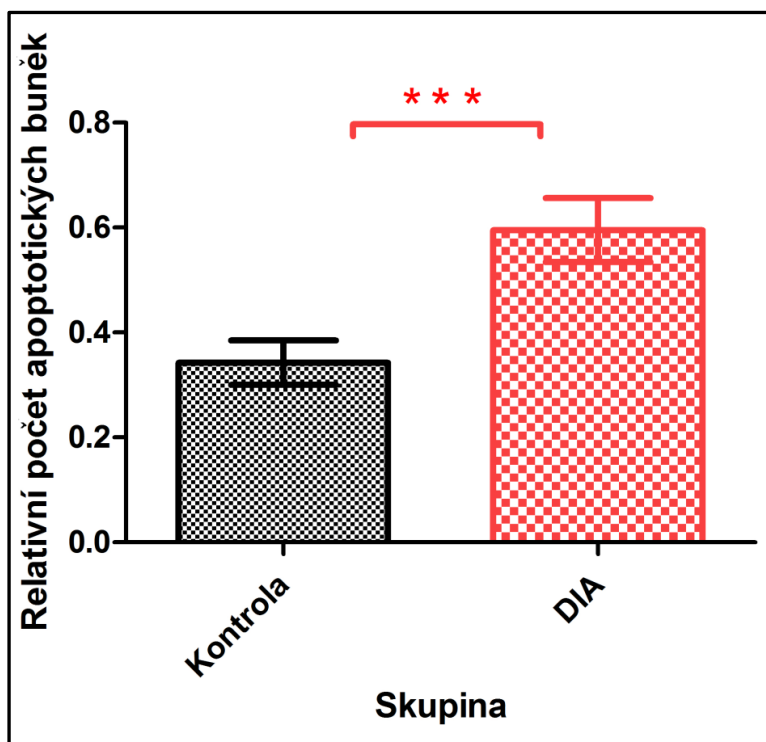
Graf 2 - Korelace dat získaných z morfologické analýzy a hodnocení koncentrace spermií u diabetických myší. Data ukazují pozitivní korelaci mezi dvěma sledovanými parametry ($r=0.64$)

4.5 TUNEL analýza

Tato metoda je využívána k zjištění počtu buněk s narušenou (fragmentovanou) DNA, což je typické pro buňky procházející apoptózou. Analýza byla provedena na histologických řezech testikulární tkáně (Obr. 18). Graf znázorňuje počet apoptotických buněk na jeden semenotvorný kanálek (Obr. 19). Bylo pozorováno signifikantní zvýšení počtu apoptotických buněk u diabetické skupiny myší ($p \leq 0.001$) porovnávané s testikulární tkání kontrolních myších samců u parentální generace (0.3425 ± 0.088 vs 0.595 ± 0.116).



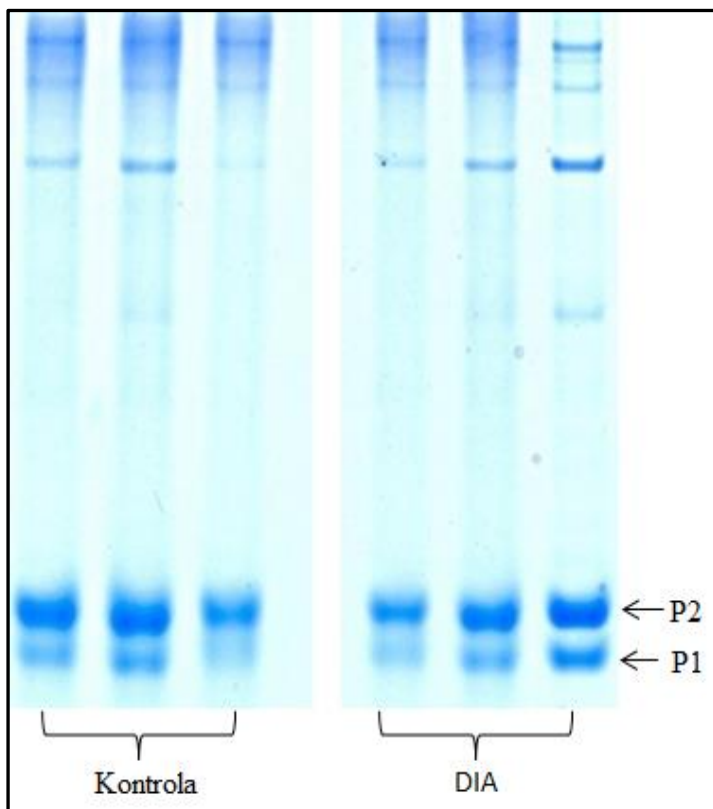
Obr. 18 – Mikroskopické preparáty snímané fluorescenčním mikroskopem - TUNEL analýza (zvětšeno 100x); a) Negativní kontrola- bez enzymu Terminální deoxynukleotidyl transferázy (TdT); b) Pozitivní kontrola- přidána DNAsa I; c) Experimentální vzorek. Modrá barva značí DNA v jádře buněk pomocí DAPI, zelená barva značí apoptotické buňky pomocí FITC



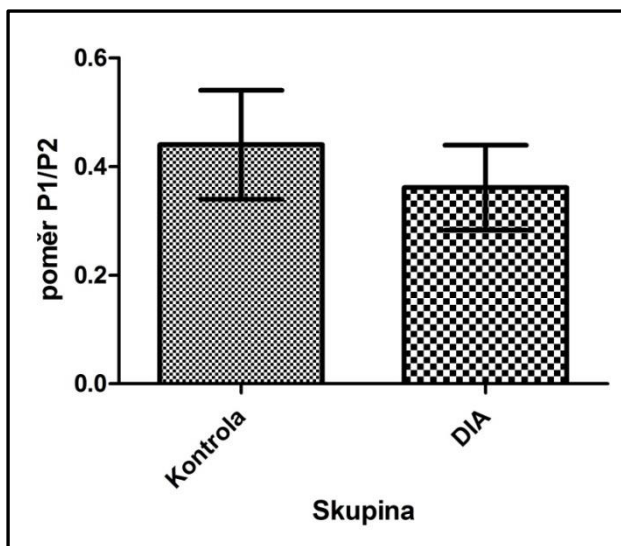
Obr. 19 – Grafické znázornění relativního počtu apoptotických buněk v testes. Mean±SD. N=8. (***) $p \leq 0.001$)

4.6 Poměr jaderných proteinů protaminů P1/P2 ve spermii

Pomocí změření optické denzity bandů odpovídajících separovaným protaminům (P1 a P2) na polyakrylamidovém gelu byl vypočítán poměr jaderných protaminů P1/P2 pro každý vzorek ve skupině (Obr. 20). U diabetické skupiny byl poměr P1/P2 0.361 ± 0.078 , zatímco u kontrolní skupiny byl poměr P1/P2 0.440 ± 0.100 (Obr. 21). Nicméně, toto snížení protaminového poměru u diabetické skupiny se neprojevilo jako statisticky významné ($p=0.174$).



Obr. 20 - Polyakrylamidový gel se separovanými proteiny P1 a P2 barvený pomocí EZblue



Obr. 21 – Grafické znázornění poměrového zastoupení P1/P2 ve spermích. Mean±SD. Kontrolní skupina N=7, Diabetická skupina N=9

4.7 Analýza genové exprese

Analýza genové exprese byla provedena metodou kvantitativní Real Time PCR (qPCR) s primery pro geny exprimované se v zárodečné buněčné linii, geny aktivní v Sertolihových buňkách, geny exprimované se v Leydigových buňkách, geny účastníci se odpovědi na hormonální produkci a geny mající roli v průběhu apoptózy.

Jako reprezentující geny exprimované v zárodečné buněčné linii byly vybrány geny *Vegfa* (Vascular endothelial growth factor A), *Gjal* (Gap Junction Protein 1), *Sycp1* (Synaptonemal complex protein 1), *Sycp3* (Synaptonemal complex protein 3), *Ccna1* (Cyclin A1), *Meig1* (Meiosis/ Spermatogenesis associated protein 1), *Grth* (Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase), *Prm1* (Protamine 1), *Prm2* (Protamine 2), *Tnp1* (Transition protein 1), *Tnp2* (Transition protein 2). Jako zástupce genů aktivních v Sertolihových buňkách byly použity geny *Wt1* (Wilms tumor protein 1) a *Sox8* (Sex Determining Region Y -Box 8) a v Leydigových buňkách gen *Star* (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) a *P450scc* (Cholesterol side-chain cleavage enzyme). Jako zástupce genů odpovědi na hormonální produkci byl vybrán gen *Ar* (Androgen receptor) a gen *Fshr* (Follicle stimulating hormone receptor). A jako zástupci proteinů mající roli v procesu apoptózy byly vybrány geny *Bcl-2* (B-cell leukemia/lymphoma), *p21* (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A) a gen *p53* pro transkripční faktor p53 (Tumor Protein P53).

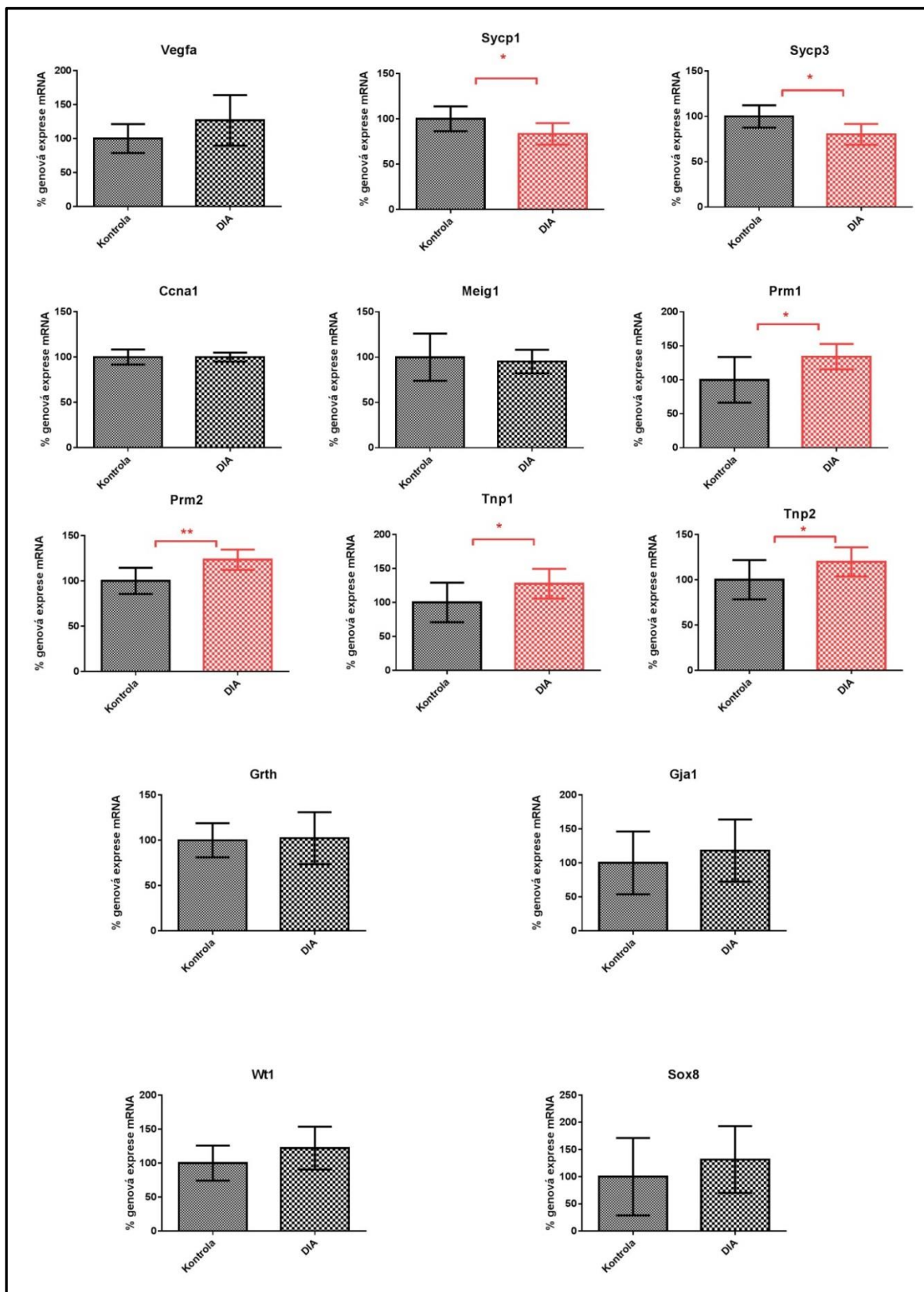
Relativní exprese genu *Sycp1* byla statisticky snížena ($p \leq 0.05$) u diabetické skupiny myši v porovnání s kontrolními, a to zhruba o 20%. Stejný efekt byl pozorován u exprese genu *Sycp3*, kdy diabetická skupina vykazovala statisticky významné 20% snížení oproti kontrole ($p \leq 0.05$). Zvýšená exprese genů *Vegfa*, *Wt1* a *Sox8* u diabetické skupiny nebyla statisticky významná ve srovnání s kontrolní skupinou. Vliv diabetického prostředí na expresi genu *Ccna1* nebyl detekován (Obr. 22).

Nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi diabetickou a kontrolní skupinou u exprese genu *Grth*. Stejně tak ani u exprese genů *Gjal* a *Meig1* nebyly zaznamenány statisticky signifikantní změny mezi testovanými skupinami (Obr. 22).

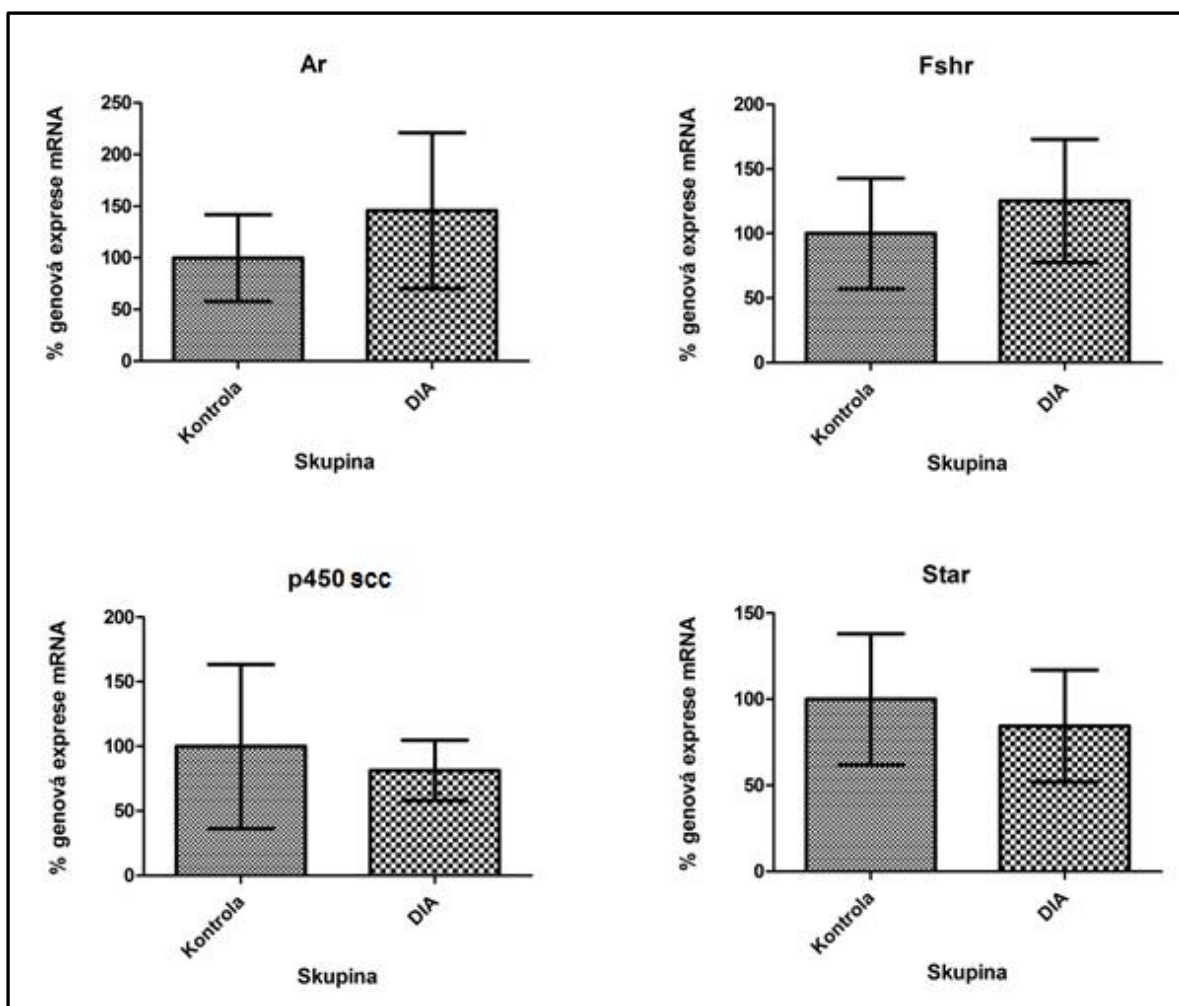
Vliv diabetického prostředí se projevoval u exprese genů *Prm 1*, *Prm 2*, *Tnp1*, *Tnp 2*. U diabetických myši byl pozorován signifikantní nárůst exprese genu *Prm1* ($p \leq 0.05$), o více než 35% a genu *Prm2* o 23% ($p \leq 0.01$). Obdobné signifikantně zvýšené hladiny exprese byly pozorovány u genů *Tnp1* a *Tnp2* (oba geny $p \leq 0.05$) (Obr. 22).

U genů účastnících se odpovědi na hormonální produkci nebyly zaznamenány žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami. Zvýšená relativní exprese genu *Ar* ($p = 0.210$) a genu *Fshr* ($p = 0.210$) u diabetické skupiny nebyla statisticky významná. U dalších testovaných genů *P450scc* a *Star* byly zaznamenány minimální rozdíly na úrovni míry exprese mRNA mezi oběma testovanými skupinami (Obr. 23).

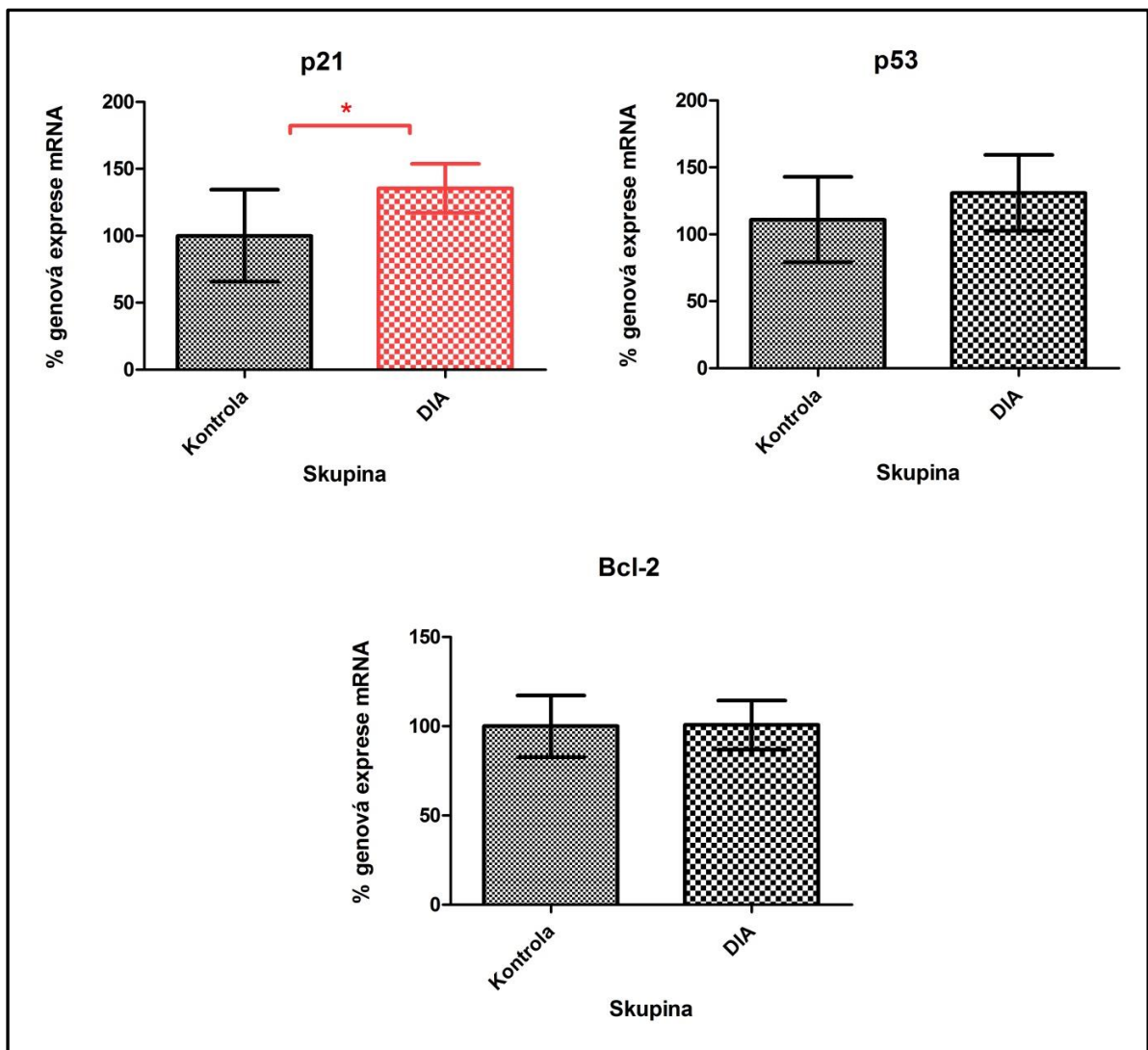
U diabetické skupiny myši bylo zaznamenáno signifikantní navýšení exprese genu *p21* ($p \leq 0.05$), o 35% v porovnání s kontrolní skupinou. Tento trend byl zaznamenán také u genu *p53*, nicméně se neprojevil jako statisticky významný. V expresi genu *Bcl-2* byly pozorovány minimální rozdíly mezi oběma testovanými skupinami (Obr. 24).



Obr. 22 – Grafické znázornění relativní exprese genů exprimující se v buňkách zárodečné linie (*Vegfa*, *Sycp1*, *Sycp3*, *Ccna1*, *Meig1*, *Grth*, *Gja1*) a v Sertoliho buňkách (*Wt1*, *Sox8*). Mean±SD. Kontrolní skupina N=9, Diabetická skupina N=7. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$)



Obr. 23 – Grafické znázornění relativní exprese genů účastnící se odpovědi na hormonální produkci. Mean±SD. Kontrolní skupina N=9, Diabetická skupina N=7



Obr. 24 – Grafické znázornění relativní exprese genů mající roli během apoptózy. Mean±SD. Kontrolní skupina N=9, Diabetická skupina N=7. (*p ≤ 0.05)

5. Diskuze:

Podle světové zdravotnické organizace – World health organization (WHO), 347 milionů lidí po celém světě trpí metabolickým onemocněním diabetes mellitus (DM) a jeho výskyt dále stoupá. Předpokládá se, že do roku 2030 bude diabetes sedmou nejčastější chorobou způsobující úmrtí (WHO, 2014). Dalším problémem naší populace je neustále se zvyšující neplodnost. Jedná se o 15% párů, které mají problémy s otěhotněním. Z velké části (60%) je neplodnost párů přisuzována mužskému faktoru (WHO, 2014). Studium těchto dvou rizikových faktorů se zdá být velice přínosné z hlediska prohloubení poznatků o vlivu diabetes mellitus na mužskou reprodukci.

Cílem předložené práce bylo zhodnotit vliv metabolické poruchy diabetes mellitus na reprodukční parametry a expresi vybraných testikulárních genů u myši s uměle navozeným diabetes.

Experimentálním zvířatům (FVB myši kmen) byla v dávce 100 $\mu\text{g/g}$ živé hmotnosti zvířete intraperitoneálně injikována chemická látka streptozotocin (STZ), která specificky ničí β buňky slinivky břišní a způsobuje tak DM I. typu. Myši s hladinou cukru v krvi vyšší než 13.9 mmol/L byly považovány za diabetické a v diabetickém prostředí setrvaly po dobu 6 týdnů. Následně, ve věku 14 týdnů, byli samci usmrceni a podrobeni analýze vlivu DM na reprodukční zdatnost a s ní spojené parametry. Diabetická skupina byla porovnávána s kontrolní zdravou skupinou myši. V této studii byla analyzována pouze parentální generace.

Streptozotocinem indukovaný diabetický model je široce využíván ke studii vlivu diabetes mellitus. Half-life, neboli poločas rozpadu STZ je velmi krátký (~5-15 min), což znamená, že nemůže fungovat delší čas *in vivo*. Western blot analýza také ukázala, že exprese citlivého markeru poškození DNA - γH2AX byla beze změny po 1 dni, 1 týdnů, i po 4 týdnech od injikování STZ bez navození diabetes. To znamená, že nízká dávka (100 $\mu\text{g/g}$) STZ nezpůsobuje poškození DNA ve spermiích. Dále bylo zjišťováno, zda nízká dávka STZ způsobuje epigenetické změny DNA spermií. Bylo náhodně vybráno 10 methylovaných regionů rozdělených na různých chromozomech, které jsou nejvíce ovlivněny paternálním prediabetes. Analýza ukázala, že žádný z těchto regionů ve spermiích nebyl ovlivněn u STZ-zvířat (Wei et al., 2013). Na základě těchto výsledků můžeme říci, že námi testované parametry nejsou ovlivněny prostřednictvím STZ, ale v důsledku působení diabetes mellitus.

Předložená studie je zaměřena na testování kvality spermií, počtu potomků, váhy těla a orgánů, anogenitální vzdálenosti (AGD). Dále se studie zabývá, histopatologií testikulární tkáně, apoptotickým stavem buněk testes a v neposlední řadě analýzou exprese genů zodpovědných za správný průběh spermatogeneze skrze působení v zárodečných, Sertoliho a Leydigových buňkách, účastnících se apoptotických procesů a odpovědi na hormonální produkci.

Před usmrcením zvířat, byli samci z obou skupin kříženi s wild type samicemi a byl sledován počet a poměr pohlaví mláďat. V naší studii nebyl zjištěn vliv DM na poměr pohlaví potomků u diabetických myší a stejně tak počet potomků nebyl statisticky pozměněn.

Mezi prvními znaky odlišujícími se mezi skupinami myší byla váha těla diabetických myší, která se projevovala signifikantním snížením o 20% v porovnání se zdravými kontrolami (Obr. 14). To může být způsobeno narušenou glukózovou homeostází, která se projevuje při diabetes mellitus (Amral et al., 2008). Glukóza, která se bez produkce inzulínu není schopna dostat do cílové buňky, nemůže být dále využita jako zásobní energetická látka a organismus díky tomu strádá.

Dalším pozměněným parametrem byla anogenitální vzdálenost a hmotnost jednotlivých orgánů. V naší studii bylo zjištěno, že anogenitální vzdálenost, sekundární pohlavní znak savců, byl u diabetických myší snížen o 15% (Obr. 14). Navozený DM v naší práci způsoboval podvyživenost dospělých samců, což by mohlo zapříčinit posun, neboli zmenšení anogenitální vzdálenosti. Dále tento parametr u mužů souvisí se správnou hormonální funkcí testes, zejména androgenního hormonu - testosteronu (Avidime et al., 2011). Je potvrzeno, že diabetes mellitus ovlivňuje hladinu sérového testosteronu (Mallidis et al., 2011; Ballester et al., 2004). Proto i námi sledované snížení AGD u diabetických myší by mohlo být způsobeno sníženým množstvím testosteronu. Diabetes mellitus, metabolická porucha projevující se hyperglykemií a zvýšeným oxidativním stresem, má negativní vliv na funkci a morfolonii mnoha tkání (Yamamoto et al., 2001). U DM, díky nedostatku glukózy v buňkách a vysokému krevnímu tlaku, dochází k nefropatii - progresivnímu poškození ledvin, které způsobuje morfologické změny ledvinových glomerulů (Yamamoto et al., 2001). To koresponduje s faktem, že v naší studii mělo diabetické 6 týdenní prostředí u myší vliv na další měřený orgán, ledviny. U této skupiny myší došlo k zvýšení hmotnosti ledvin o 30% (Obr. 14).

Naproti tomu játra fungují jako úložiště glukózy a napomáhají udržet stálou hladinu glukózy v krvi. Játra v závislosti na potřebách orgánů buď zpracovávají anebo ukládají energii ve formě glukózy, což je řízeno hormony inzulinem a glukagonem (Freinderberg et al., 1985). Právě defekty v inzulinové dráze u diabetes mellitus by mohly vést ke změnám hmotnosti jater, jak bylo ukázáno v naší studii. U diabetických samců jsme pozorovali 11% zvýšení hmotnosti metabolického orgánu - jater (Obr. 14).

Stejně tak jako v naší studii byly i ve studii Seethalakshmi et al. (1987) pozorované signifikantní změny u reprodukčních orgánů jako je prostata, semenné vaky a testes porovnání mezi diabetickou a kontrolní skupinou (Obr. 14).

Prostata a semenné vaky jsou reprodukční orgány důležité pro sekreci specifických látek ovlivňujících fertilizační schopnost spermií (Mann, 1974). Množství ejakulátu úzce souvisí s množstvím sekretu semenných vaků a prostaty. U mužů tvoří sekret semenných vaků největší část objemu ejakulátu (50–80%), o něco méně pak prostata (15-30%). Ve studii Agbaje et al. (2007) mělo diabetické prostředí negativní dopad na množství ejakulátu, kdy menší množství bylo nalezeno u diabetických pacientů porovnávaných se zdravými dárci. V naší studii, u diabetické skupiny došlo ke snížení váhy semenných vaků (o 31%) a prostaty (o 19%), což by mohlo mít negativní dopad na množství ejakulátu, který je tvořen sekrety z těchto orgánů. Dále, by mohlo diabetické prostředí ovlivnit změny v hmotnosti prostaty a semenných vaků v důsledku snížení hladiny sérového testosteronu, jehož snížení bylo sledováno u pacientů s DM I. typu (Mallidis et al., 2011).

Je zřejmé, že správný vývoj testes je zásadní pro zajištění reprodukčního potenciálu jedince. Hmotnost testes má přímou souvislost s mužskou plodností, skrze proces spermatogeneze. Rychlost produkce spermií a kvalita spermií do značné míry souvisí s celkovou délkou a průměrem semenotvorných kanálků, který zpětně ovlivňuje váhu testes (Suto, 2008). V důsledku zhoršené morfologie testikulární tkáně může docházet ke snížení celkové hmotnosti testes. Právě snížená hmotnost testes byla sledována v naší studii, kdy u diabetických myší došlo ke snížení hmotnosti o 9 % v porovnání s kontrolními samci (Obr. 14).

Jak už bylo zmíněno, funkci testikulární tkáně obstarávají buňky, kterými je tvořena. Spermatogeneze vyžaduje přesnou regulaci různých buněčných událostí, které se uskutečňují v semenotvorných kanálcích složených ze Sertoliho buněk a vyvíjejících se zárodečných buněk, obklopených Leydigovými a myoidními buňkami.

Přes specializované buňky, jako jsou spermatogonie, spermatocyty a spermatidy se zárodečné buňky vyvíjí ve zralou spermii (Gilbert, 2000). Naše histologická analýza na řezech testes barvených hematoxylinem-eosinem potvrdila u poloviny diabetických myší zhoršenou morfologii testikulární tkáně (Tab. 4). Negativní dopad diabetes mellitus měl nejrůznější projevy na morfologii semenotvorných kanálků. U některých myší došlo k minimálnímu narušení, zatímco u jiných byly sledovány různé patologie jako prázdné semenotvorné kanálky bez probíhající spermatogeneze, nediferenciované kanálky bez lumen nebo například defektní kanálky s aberantní spermatogenezí (Obr. 17). Tento negativní projev je v souladu s publikací, která u diabetických potkanů posuzovala morfologii testikulární tkáně. V této studii autoři pozorovali snížení průměru semenotvorných kanálků a zároveň zvýšený počet prázdných kanálků (Cai et al., 2000). Z výsledků morfologické analýzy vyplývá, že některé myši se s negativním působením DM vypořádaly lépe než jiné. Tento jev byl pozorován i u pacientů s DM (La Vignera et al., 2013). U myší, které měly zvýšený počet defektních semenotvorných kanálků, jsme také pozorovali sníženou koncentraci spermií (Graf 2). Zdá se tedy, že diabetické prostředí je schopno negativně ovlivnit morfologii semenotvorných kanálků, což má za následek sníženou produkci spermií.

V rámci dalšího posouzení patologických změn testes, byla využita metoda TUNEL na stanovení počtu apoptotických buněk. Naše studie detekovala statistické zvýšení počtu apoptotických buněk ($p \leq 0.001$) u diabetické skupiny srovnávané s kontrolní (Obr. 19). Stejný efekt byl popsán v publikaci, která analyzovala množství apoptotických buněk u STZ-navozených diabetických potkanů (Cai et al., 2000). Zhoršená morfologie a zvýšený počet buněk podstupujících programovanou buněčnou smrt v testes by mohl způsobovat zhoršení kvality spermií, která byla pozorována u diabetických myší. Tato teorie je podpořena publikací, kdy ve vzorcích získaných testikulární biopsií neplodných mužů bylo detekováno vysoké množství apoptotických buněk (Lin et al., 1997).

Kvalita spermií může být hodnocena několika parametry. Je prokázáno, že koncentrace spermií ovlivňuje reprodukční potenciál jedince. Snížení koncentrace spermií je spojována se sníženou plodností i u diabetických pacientů (Kim and Moley, 2008). Jedním z námi testovaných parametrů byla právě koncentrace epididymálních spermií. Vyhodnocení ukázalo statisticky sníženou koncentraci spermií ($p \leq 0.05$) u ovlivněných myší, a to o 40%, což může výrazně ovlivnit reprodukční schopnost myší (Obr. 15). Největší negativní dopad diabetického prostředí

na koncentraci spermií byl pozorován u myši, u kterých byla sledována zhoršená morfologie semenotvorných kanálků (Graf 2). Jako další parametr určující kvalitu spermií byla hodnocena viabilita, neboli procentuální zastoupení živých spermií. U diabeticky ovlivněných myši došlo ke snížení počtu živých buněk (o více jak 20%) (Obr. 15). Dále bylo zaznamenáno snížené procento spermií s morfologicky normálními hlavičkami u diabetických zvířat. Stejně tak bylo pozorováno zvýšené množství separovaných hlaviček spermií díky diabetickému prostředí. Nicméně, ani u jednoho parametru, se změny mezi diabetickou a kontrolní skupinou neprojevily jako statisticky významné (Obr. 15).

Jako další důležitý reprodukční parametr byl analyzován apoptotický stav spermií. Jedná se o detekci spermií podstupujících programovanou buněčnou smrt. Jako marker byl použit protein annexin V vázající se na fosfatidylserin, který se u apoptotických buněk vyskytuje vně cytoplazmatické membrány. U diabetických zvířat byl sledován zvýšený počet epididymálních spermií ($p \leq 0.05$) se značeným markerem pro rannou apoptózu o zhruba 16% (Obr. 15). Náš výsledek je v souladu s publikací O'Neill et al. (2010), kde u pacientů s DM I. typu byl pozorován zvýšený počet apoptotických spermií v porovnání se zdravými dárči.

Pro posouzení kvality spermií byl analyzován další důležitý reprodukční parametr, a to zastoupení jaderných proteinů protaminů. Tato studie je unikátní v tom, že jako jedna z prvních propojuje metabolickou chorobu diabetes mellitus a její vliv na protaminaci spermií. V předchozích studiích bylo zjištěno, že změny v poměru protaminu 1 a protaminu 2 (P1/P2) byly nalezeny u jedinců s problémy s plodností (Balhorn et al., 1988). Právě z tohoto důvodu bylo analyzováno, zda má DM vliv na plodnost savců prostřednictvím zastoupení protaminů ve spermiích. Pomocí značení chromomycinem A3, který se váže na nukleoproteiny – histony, byl detekován počet spermií se snížením počtem protaminů v jádře. V naší studii byl u diabetických samců v porovnání s kontrolními sledován statisticky snížený počet protaminového zastoupení u spermií ($p \leq 0.001$) (Obr. 15). Touto metodou není možné určit, zda snížené množství protaminů ve spermiích je zapříčiněno poklesem protaminu 1, protaminu 2 anebo obou protaminů. Toto může pomoci odhalit metoda hodnotící poměr P1/P2, kdy podle změn v poměru obou protaminů se dá usuzovat, čím je detekovaný pokles protaminů ve spermiích zapříčiněn. Množství P1/P2, po izolování jaderných proteinů a separaci na polyakrylamidovém gelu, bylo denzitometricky měřeno. Nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny v poměru P1/P2 mezi diabetickou a kontrolní skupinou

zvířat (Obr. 21). Z tohoto závěru lze usuzovat, že oba protaminy byly sníženy ve stejné míře a proto nedošlo k ovlivnění jejich poměrového zastoupení.

Pro správnou funkci protaminů je důležitá transkripce a uložení transkriptů ve spermatocytech a kulatých spermatidách pro pozdější translaci v prodlužujících spermatidách (Tanaka a Baba, 2005). Je dobré vzít v úvahu, že původ změn na proteinové úrovni může mít souvislost i se změnami na úrovni mRNA protaminu 1 a protaminu 2. Z tohoto důvodu jsme analyzovali expresi genů *Prm1*, *Prm2*, zdali jsou nějakým způsobem ovlivněny. Se správnou funkcí protaminů úzce souvisí proteiny Tnp1 a Tnp2, které napomáhají vazbě protaminů na vlákno DNA. Důležitost těchto proteinů je prokázána studií, kde myši s mutacemi v genech pro transiční proteiny (*Tnp1*^{-/-}, *Tnp2*^{+/-}) měly nižší úspěšnost oplodnění než wild-type myši (Suganuma et al., 2005). V naší studii všechny čtyři zmíněné geny vykazovaly statisticky významné změny mezi diabetickou a kontrolní skupinou ($p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$) (Obr. 22). Překvapivě se jednalo o zvýšení exprese protaminů a transičních proteinů. Hladina proteinů by spíše naznačovala sníženou expresi mRNA, nicméně úroveň mRNA nemusí odpovídat proteinové úrovni. Jednou z možných hypotéz vysvětlujících zvýšenou expresi *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* a *Tnp2* je, že došlo k narušení jednoho či více z mnoha mezikroků výměny histonů za protaminy. Ať už se jedná o uložení transkriptů, translaci proteinů či pozdější posttranslační modifikace protaminů. Jakýkoliv krok narušující inkorporaci protaminů na vlákno DNA by mohl způsobit případný pokles hladiny těchto proteinů ve spermiích. Tento efekt by mohl vyvolat kompenzační mechanismus, který by se projevil zmíněnou zvýšenou expresi mRNA, kterou jsme pozorovali u diabetických spermíí.

Rovněž exprese genů, které hrají významnou roli při procesech spermatogeneze, čili utváření spermie schopné oplodnění, byla námi testována. Další analyzované geny byly rozděleny do skupin podle funkce v testikulární tkáni a byl studován vliv diabetes mellitus na změny v mRNA expresi mezi ovlivněnou a kontrolní skupinou.

V první skupině byly zastoupeny geny, které jsou aktivní ve spermatogoniích, spermatocytech a spermatidách. Důležitou roli v sebeobnově a diferenciaci spermatogoniálních buněk má gen *Vegfa*. Jedná se o gen kódující protein důležitý pro angiogenezi, který stimuluje endoteliální buňky k proliferaci a diferenciaci (Caires et al., 2012). Právě gen *Vegfa* byl vybrán jako zástupce genů, které se podílí na správné funkci spermatogonií a byla testována jeho exprese. Žádné významné rozdíly nebyly pozorovány mezi diabetickou a kontrolní skupinou myši (Obr. 22).

Synaptonemální komplex je důležitá struktura uplatňující se v meióze při rekombinaci chromozomů, neboť zipovým způsobem spojuje homologní chromozomy. Geny *Sycp1* a *Sycp3* kódují proteiny, které se podílejí na sestavení tohoto komplexu (Kouznetsova et al., 2011). Analýza relativní genové exprese genů *Sycp1* a *Sycp3* ukázala statisticky významné snížení u diabetické skupiny myši porovnávané s kontrolními zvířaty ($p \leq 0.05$) (Obr. 22). Snížené množství proteinu Sycp1 a proteinu Sycp3 by mohlo zapříčinit nesprávné sestavení synaptonemálního komplexu a způsobit tak poruchy v rané meióze. Nesprávný průběh meiotického dělení by mohlo zapříčinit nesprávné rozdělení DNA v buňkách, což by vedlo k apoptóze nebo ke vzniku defektních spermií. Takovéto narušení funkce buněk v testes by mohlo mít negativní vliv na průběh spermatogeneze i na kvalitu spermií. Podobný, i když ne statisticky významný trend vykazovala snížená exprese genu *Meig1*, který se taktéž účastní regulace meiózy (Obr. 22). Analýza exprese genu kodující protein cyklin A1, který se spolu s cyklin-dependentními kinázami účastní regulace buněčného cyklu, neukázala žádné změny mezi dvěma testovanými skupinami (Obr. 22). Mutace v genu pro cyklin A1 (*Ccna1*^{-/-}) u myši způsobovala defekty v spermatocytech a následnou apoptózu těchto buněk, která zapříčinila sterilitu myši, tak jak to bylo popsáno (Liu et al., 1998). Minimální rozdíly mezi diabetickou a kontrolní skupinou byly sledovány u genu *Grth* a *Gjal*. *Grth* je gonadotropiny regulovaná testikulární RNA helikáza, jejíž gen je exprimován ve spermatocytech, spermatidách a Leydigových buňkách (Fukushima et al., 2011). Oproti tomu protein *Gjal* byl nalezen v semenotvorných kanálcích, kde hraje důležitou roli ve spermatogenezi a vývoji testes, kdy jako součást těsných buněčných spojů pomáhá tvořit tzv. „blood–testis“ bariéru (Li et al., 2016). Další skupinou testovaných genů jsou geny aktivní v Sertoliho buňkách. Gen kódující transkripční faktor *Sox8* se podílí na vzniku testes během embryonálního vývoje savců. U dospělců je *Sox8* exprimován specificky v Sertoliho buňkách (O'Bryan et al., 2008). Dalším genem exprimovaným v Sertoliho buňkách je gen *Wtl*. Funkce tohoto genu je klíčová pro správný vývoj gonád. Jakékoliv narušení genu *Wtl* způsobuje během embryonálního vývoje nedostatečné vytvoření gonád (Park and Jameson, 2005). Analýza relativní exprese genů *Sox8* a *Wtl* mezi experimentální a kontrolní skupinou neukázala žádné statistické rozdíly (Obr. 22). Současně s nezměněnou relativní expresí genu *Gjal*, který se taktéž exprimuje v Sertoliho buňkách, můžeme usuzovat, že DM nemá negativní vliv na funkci Sertoliho buněk.

Další analyzovanou skupinou genů, byly geny účastníci se odpovědi na hormonální produkci. Byl vybrán gen pro androgenní hormon, důležité geny exprimující se v Leydigových buňkách (*Star*, *P450scc*) a gen pro receptor folikul-stimulujícího hormonu *Fshr*. Androgenní receptor je přítomný v jádře buněk, kde váže testosteron a zprostředkovává jeho působení přes regulaci exprese cílových genů. Mutace v genu *Ar* pro androgenní receptor, která způsobí jeho necitlivost k androgenům, vede k poruchám spermatogeneze a plodnosti (Verhoeven et al., 2010). Receptor pro folikul-stimulační hormon (*Fshr*) váže FSH, který společně s luteinizačním hormonem a testosteronem stimuluje průběh spermatogeneze a správný vývoj testes (Verhoeven et al., 2010).

Úzkou souvislost mají mezi sebou proteiny steroidogenní povahy *Star* a enzym *P450scc*, oba mají klíčovou roli ve vývoji testes prostřednictvím regulace testosteronu. Exprese genu *Star* je transkripčně kontrolována v gonádách gonadotropními hormony (FSH, LH), (Hasegawa et al., 2000).

Přestože v některých vědeckých studiích je prokázáno, že diabetes mellitus je asociován s poruchami hormonální produkce a byla sledována snížená koncentrace testosteronu u pacientů s DM I. typu (Millidis et al., 2011; Ballester et al., 2004), u žádného námi testovaného genu (*Fshr*, *Ar*, *Star*, *P450scc*) jsme nesledovali změněnou expresi v rámci vlivu diabetického prostředí. Naše výsledky naznačují, že exprese testovaných genů, které jsou důležité pro správnou funkci androgenního hormonu – testosteronu, není narušena. Nicméně, v naší studii jsme zaznamenali sníženou váhu testes, což může poukazovat na celkové snížení počtu testikulárních buněk, včetně Leydigových buněk. Takže snížená produkce testosteronu by mohla být způsobena celkově nižším počtem Leydigových buněk s normální produkcí testosteronu.

Dalšími testovanými geny byly *p53* a *p21*. Protein *p53* je evolučně velmi konzervovaný tumor supresorový protein, který reguluje buněčný cyklus, opravy DNA i apoptózu a zároveň je i transkripčním faktorem genu pro protein *p21*. Výsledky zvýšené apoptózy testes u diabetických myší korelují se statisticky zvýšenou expresí genu pro protein *p21* ($p \leq 0.05$) (Obr. 24), který se účastní apoptotického procesu. Protein *p21* je zodpovědný za to, že buňka s poškozenou DNA zůstává v G1 fázi buněčného cyklu, kde čeká na opravu DNA (Brill et al., 1999).

Stejně zvýšený trend byl sledován u genu pro tumor supresorový protein *p53* (Obr. 24). Tento výsledek je v souladu s publikací Jelodar et al. (2009), kde autoři detekovali zvýšené procento apoptotických buněk v testes diabetických myší. Nám

se tento jev podařil potvrdit nejen na hladině mRNA, ale stejně tak na buněčné úrovni v rámci testování apoptotického stavu testikulárních buněk.

I přes všechny tyto výše zmíněné negativní vlivy diabetes mellitus, nedošlo u diabetických myši k zhoršení plodnosti, neboť nebyl nijak ovlivněn počet ani poměr pohlaví potomků. Díky tomu, že experimentální myši byly chovány v ideálních podmínkách (12 hodinový světelný režim, konstantní teplota bez výkyvů, omezení vnějších stresových faktorů na minimum), nebyl vliv DM kombinován s dalšími rizikovými faktory, které by mohly přispět k negativnímu působení DM. U lidí diabetes mellitus působí společně s dalšími rizikovými faktory jako je například kouření, obezita, stres, a proto dopad na kvalitu spermií a plodnost bývá celkově silnější. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO, 2010), koncentrace spermií normospermika se pohybuje nad hodnotou $15 \times 10^6/\text{ml}$. Proto u lidí snížení koncentrace o 40% a zvýšený počet nefunkčních spermií, jako tomu bylo v naší studii, by mohl zapříčinit subfertilitu až neplodnost.

6. Závěr:

Tato práce se zabývala studiem vlivu metabolické choroby diabetes mellitus (DM) na samčí reprodukci s využitím myšního modelu. Experimentální myši, kterým byl uměle navozen DM, byly porovnávány se skupinou zdravých (wild-type) myší. Jednotlivé parametry jako váha těla, váha orgánů a anogenitální vzdálenost byly testovány za účelem zjištění dopadu DM na organismus experimentálních myší. Reprodukční potenciál dospělých samců byl studován prostřednictvím kvality spermií, která byla analyzována pomocí parametrů jako koncentrace, životnost a apoptotický stav spermií. Bylo zjištěno, že u ovlivněné skupiny myší došlo k statisticky významnému snížení koncentrace a životnosti spermií. Dále bylo u diabetických myší detekováno zvýšené procento apoptotických spermií. Dalším záměrem předložené práce bylo zhodnotit stav hlavních jaderných proteinů spermie protaminů, které se využívají jako marker mužské plodnosti. U diabetických spermií byl pozorován pokles v zastoupení těchto důležitých proteinů. Poměr P1/P2 ve spermiích však nebyl statisticky změněn vůči kontrole.

Hlavním reprodukčním orgánem pro vznik a vývoj spermií je testes. U poloviny diabetických myší bylo sledováno markantní narušení průběhu spermatogeneze, které se projevovalo výskytem prázdných kanálků či kanálků s různými morfologickými defekty. Jako metoda pro hodnocení průběhu spermatogeneze byla zvolena analýza exprese důležitých testikulárních genů. Metabolická choroba způsobila změnu exprese genů, které mají klíčovou roli během meiotické fáze spermatogeneze (*Sycp1* a *Sycp3*) a genů důležitých během spermiogeneze (*Tnp1*, *Tnp1*, *Prm1* a *Prm2*). Dále byla zaznamenána zvýšená exprese genů důležitých během apoptotického procesu (*p21* a *p53*), což potvrdilo výsledky z TUNEL analýzy. Změněný profil genové exprese může také souviset se zhoršenou kvalitou spermií u diabetických zvířat.

Naše výsledky naznačují, že DM ovlivnil morfologii a apoptotický stav testikulární tkáně, která je zodpovědná za správný průběh vývoje samčích pohlavních buněk. Současně, metabolická choroba způsobila změnu exprese genů, které hrají klíčovou roli během vývoje spermie. To může mít negativní dopad na probíhající spermatogenezi v testes a v důsledku na kvalitu spermií, která byla u diabetických myší značně snížena. Výsledky z této studie tedy poukazují na to, že diabetes mellitus negativně ovlivňuje parametry spermií a reprodukčních orgánů, což může mít dopad na plodnost jedince.

7. Literatura:

Abou-Haila, A. & Tulsiani, D. R. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* 379, 173-182 (2000).

Abou-haila, A. & Tulsiani, D. R. P. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 485, 72-81 (2009).

Agbaje, I. M *et al.* Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Human Reproduction* 22, 1871-1877 (2007).

Alberts B. *et al.* Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science (2002).

Allan, D. J. *et al.* Spermatogonial apoptosis has 3 morphologically recognizable phases and shows no circadian-rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Proliferation* 25, 241-250 (1992).

Amaral, S. *et al.* Diabetes and the Impairment of Reproductive Function: Possible Role of Mitochondria and Reactive Oxygen Species. *Current Diabetes Reviews* 4, 46-54 (2008).

Aoki, V. W. *et al.* Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Human Reproduction* 20, 1298-1306 (2005).

Arends, M. J. & Wyllie, A. H. Apoptosis - mechanisms and roles in pathology. *International Review of Experimental Pathology* 32, 223-254 (1991).

Bach, O. *et al.* Electrophoretic patterns of spermatozoal nucleoproteins (np) in fertile men and infertility patients and comparison with np of somatic-cells. *Andrologia* 22, 217-224 (1990).

Baldi, E. *et al.* Signal transduction pathways in human spermatozoa. *Journal of Reproductive Immunology* 53, 121-131 (2002).

Balhorn R. *et al.* Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human *Experientia* 44, 52-55 (1988).

Ballester, J. *et al.* Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms. *Journal of Andrology* 25, 706-719 (2004).

Bartak, V. *et al.* Juvenile diabetes and human sperm quality. *International Journal of Fertility* 20, 30-32 (1975).

Bartoš, V. & Pelikánová, T. Diabetes mellitus-minimum pro praxi.

Blanchard, Y. *et al.* Anomalous distribution of nuclear basic-proteins in round-headed human spermatozoa. *Andrologia* 22, 549-555 (1990).

Bohuslavova, R. *et al.* Gene expression profiling of sex differences in HIF1-dependent adaptive cardiac responses to chronic hypoxia. *Journal of Applied Physiology* 109, 1195-1202, doi:10.1152/jappphysiol.00366.2010 (2010).

Bolzan, A. D. & Bianchi, M. S. Genotoxicity of Streptozotocin. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 512, 121-134 (2002).

Bossy-Wetzel, E. *et al.* Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo Journal* 17, 37-49 (1998).

Bremner, W. J. *et al.* Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 135, 1227-1234 (1994).

Brill, A. *et al.* The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *J Assist Reprod Genet.* 16, 512-9 (1999).

Cai, L. *et al.* Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. *Urol Res.* 28, 342-347 (2000).

Caires, K. C. *et al.* VEGFA Family Isoforms Regulate Spermatogonial Stem Cell Homeostasis in Vivo. *Endocrinology* 153, 887-900 (2012).

Carrell, D. T. & Liu, L. H. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *Journal of Andrology* 22, 604-610 (2001).

Carrell, D. T. *et al.* Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update* 13, 313-327 (2007).

Castillo, J. *et al.* Protamine/DNA Ratios and DNA Damage in Native and Density Gradient Centrifuged Sperm From Infertile Patients. *Journal of Andrology* 32, 324-332 (2011).

Chausiaux, O. E. *et al.* Hypogonadal mouse, a model to study the effects of the endogenous lack of gonadotropins on apoptosis. *Biology of Reproduction* 78, 77-90 (2008).

Chauviere, M. *et al.* Molecular characterization of 6 intermediate proteins in the processing of mouse protamine-p2 precursor. *European Journal of Biochemistry* 204, 759-765 (1992).

- Corzett, M. *et al.* Protamine 1 : Protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Molecular Reproduction and Development* 61, 519-527 (2002).
- D'Cruz, S. C. *et al.* Bisphenol A impairs insulin signaling and glucose homeostasis and decreases steroidogenesis in rat testis: An in vivo and in silico study. *Food and Chemical Toxicology* 50, 1124-1133 (2012).
- Dahm, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology* 278, 274-288 (2005).
- de Kretser, D. M. *et al.* Studies on the in vitro testicular binding of iodinated luteinizing hormone in rats. *Endocrinology* 88, 332-337 (1971).
- de Kretser, D. M. *et al.* Spermatogenesis. *Hum Reprod* 13 Suppl 1, 1-8 (1998).
- Defronzo, R. A. *et al.* Hepatic and peripheral insulin resistance - a common feature of type-2 (non-insulin-dependent) and type-1 (insulin-dependent) diabetes-mellitus. *Diabetologia* 23, 313-319 (1982).
- De Lamirande, E. *et al.* Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction* 3, 175-194 (1997).
- De Yebra, L. & Oliva, R. Rapid analysis of mammalian sperm nuclear proteins. *Analytical Biochemistry* 209, 201-203 (1993).
- Ding, G. L. *et al.* The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian Journal of Andrology* 17, 948-953 (2015).
- Dixon, G. H. & Smith, M. Nucleic acids and protamine in salmon testes. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 8, 9-34 (1968).
- Eddy, E. M. Male germ cell gene expression. *Recent Progress in Hormone Research, Vol 57* 57, 103-128 (2002).
- Evenson, D. P. *et al.* Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology* 23, 25-43 (2002).
- Fukushima, M. *et al.* Gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25), a negative regulator of luteinizing/chorionic gonadotropin hormone-induced steroidogenesis in Leydig cells: central role of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem.* 286, 29932-40 (2011).
- Freidenberg, G. R. *et al.* Insulin receptor kinase activity in rat liver. Regulation by fasting and high carbohydrate feeding. *The Journal of Biological Chemistry* 260, 12444-12453 (1985).

- Friel, A. *et al.* A preliminary report on the implication of RT-PCR detection of DAZ, RBMY1, USP9Y and Protamine-2 mRNA in testicular biopsy samples from azoospermic men. *International Journal of Andrology* 25, 59-64 (2002).
- Froguel P. *et al.* Genetic-determinants of type-2 diabetes-mellitus - lessons learned from family studies. *Diabetes & Metabolism* 19, 1-10 (1993)..
- Giacco, F. & Brownlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 107, 1058–1070 (2010).
- Gilbert, S., F. V knize: *Developmental biology*, 6TH edition. Sinauer Associates (2000).
- Govin, J *et al.* The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* 271, 3459-3469 (2004).
- Grootegoed, J. A. *et al.* Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 14, 331-343 (2000).
- Grunewald, S. *et al.* Sperm caspases become more activated in infertility patients than in healthy donors during cryopreservation. *Archives of Andrology* 51, 449-460 (2005).
- Grunewald, S. *et al.* Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertility and Sterility* 92, 572-577 (2009).
- Hasegawa, T. *et al.* Developmental Roles of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) as Revealed by StAR Knockout Mice. *Molecular Endocrinology* 14 (2000).
- Henkel, R. *et al.* Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertility and Sterility* 81 (2004).
- Herr, R. R. *et al.* Structure of streptozotocin. *Journal of the American Chemical Society* 89, 4808-& (1967).
- Hoogendijk, C. F. *et al.* A novel approach for the selection of human sperm using annexin V-binding and flow cytometry. *Fertility and Sterility* 91, 1285-1292 (2009).
- Izumi, T. *et al.* Dominant negative pathogenesis by mutant proinsulin in the Akita diabetic mouse. *Diabetes* 52, 409–416 (2003).
- Jelodar, G. *et al.* Endocrine profile and testicular histomorphometry in adult rat offspring of diabetic mothers. *Journal of Physiological Sciences* 59, 377-382 (2009).
- Jozefczuk, J. & Adjaye, J. Quantitative real-time PCR-based analysis of gene

expression. *Methods Enzymol.* 500, 99-109 (2011).

Kim, S. T. & Moley, K. H. Paternal effect on embryo quality in diabetic mice is related to poor sperm quality and associated with decreased glucose transporter expression. *Reproduction* 136, 313-322 (2008).

King, JF. A. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol.* Jun; 166, 877-894 (2012).

Kouznetsova, A. Meiosis in Mice without a Synaptonemal Complex. *PLoS One* 6, e28255 (2011).

Krotkiewski, M. *et al.* The effects of physical-training on insulin-secretion and effectiveness and on glucose-metabolism in obesity and type-2 (non-insulin-dependent) diabetes-mellitus. *Diabetologia* 28, 881-890 (1985).

La Vignera, S. *et al.* Diabetes Mellitus and Sperm Parameters. *Journal of Andrology* 33, 145-153 (2012).

Leney, S. E. & Tavaré, J. M. The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: signalling, trafficking and potential drug targets. *Journal of Endocrinology* 203, 1-2 (2009)

Lescoat, D. *et al.* Electrophoretic characteristics of nuclear proteins from human-spermatozoa. *Archives of Andrology* 20, 35-40 (1988).

Lewis, J. D. *et al.* A walk though vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* 111, 473-482 (2003).

Li, N. *et al.* Connexin 43 reboots meiosis and reseals blood-testis barrier following toxicant-mediated aspermatogenesis and barrier disruption. *Faseb J.* 30, 1436-52 (2016).

Lin, W. W. *et al.* In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertility and Sterility* 68, 1065-1069 (1997).

Lodish H. *et al.* *Molecular Cell Biology.* 4th edition. New York: W. H. Freeman (2000).

Lui, W.Y. & Cheng, C.Y. Transcriptional regulation of cell adhesion at the blood-testis barrier and spermatogenesis in the testis. *Adv Exp Med Biol* 763, 281-294 (2012).

Luo, X. *et al.* Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490 (1998).

Mallidis, C. *et al.* The influence of diabetes mellitus on male reproductive

function. A poorly investigated aspect of male infertility. *Urology* 50, 33-37 (2011).

Mangoli, E. *et al.* Effects of experimentally-induced diabetes on sperm parameters and chromatin quality in mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 11, 53-60 (2013).

Mann, T. Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *J. Reprod. Fert* 37, 179-188 (1974).

Marchetti, C. *et al.* Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Human Reproduction* 17, 1257-1265 (2002).

Margaryan, H. *et al.* Characterization and possible function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-spermatogenic protein GAPDHS in mammalian sperm. *Reproductive Biology and Endocrinology* 13 (2015).

Martin, S. J. *et al.* Early redistribution of plasma-membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus - inhibition by overexpression of bcl-2 and abl. *Journal of Experimental Medicine* 182, 1545-1556 (1995).

Mathers C. D. & Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from *PLoS Med*, 2002-2030 (2006).

McLachlan, R. I. *et al.* Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Progress in Hormone Research. Reproductive hormones human health* 57, 149-179 (2002).

Meistrich, M. L. *et al.* Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111, 483-488 (2003).

Mengual, L. *et al.* Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from Percoll fractions between patients and controls. *Journal of Andrology* 24, 438-447 (2003).

Miescher F. Das Protamin – Eine neue organische Basis aus den Samen – des Rheinlachs. *Ber Dtsch Chem Ges* 7,376 (1874).

Mulholland, J. *et al.* Male diabetes mellitus and assisted reproduction treatment outcome. *Reproductive Biomedicine Online* 22, 215-219 (2011).

Nasr-Esfahani M. H. *et al.* Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online* 11,198–205 (2005).

O'Bryan, M. K. *et al.* Sox8 is a critical regulator of adult Sertoli cell function and male fertility. *Developmental Biology* 316, 359–370 (2008).

- O'Neill, J. *et al.* Differences in mouse models of diabetes mellitus in studies of male reproduction. *International Journal of Andrology* 33, 709-716 (2010).
- Oehninger, S. *et al.* Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reproductive biomedicine online* 7, 469-476 (2003).
- Okabe, M. The cell biology of mammalian fertilization. *Development* 140, 4471-4479 (2013).
- Oliva, R. Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update* 12, 417-435 (2006).
- Oliva, R. *et al.* Factors affecting nucleosome disassembly by protamines in vitro. Histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins. *J Biol Chem* 262, 17016-17025 (1987).
- Oliva, R. & Dixon, G. H. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 40, 25-94 (1991).
- Oliva, R. Sequence, evolution and transcriptional regulation of Avian-mammalian P1 type protamines. *Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle* 166, 537-548 (1995).
- Park, S. Y. & Jameson, J. L. Minireview: Transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology* 146 (2005).
- Pavlinkova, G. *et al.* Role of HIF1 Pathways in Diabetic Embryopathy. *Birth Defects Research Part a-Clinical and Molecular Teratology* 85, 413-413 (2009).
- Pavlinkova, G. *et al.* Maternal diabetes alters transcriptional programs in the developing embryo. *Bmc Genomics* 10 (2009).
- Peknicova, J. *et al.* Monoclonal antibodies to intra-acrosomal proteins inhibit gamete binding in vitro. *Theriogenology* 56, 211-223 (2001).
- Queralt, R. *et al.* Evolution of protamine p1 genes in mammals. *Journal of Molecular Evolution* 40, 601-607 (1995).
- Rees, D. A. & Alcolado, J. C. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 22, 359-370 (2005).
- Rodriguez, I. *et al.* An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo Journal* 16, 2262-2270 (1997).
- Roessner, C. *et al.* Sperm apoptosis signalling in diabetic men. *Reproductive Biomedicine Online* 25, 292-299 (2012).

- Rousseaux, S. *et al.* Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* 345, 139-153 (2005).
- Said, T. M. *et al.* Which test of sperm quality is clinically useful in the subsequent evaluation of normozoospermic infertile men? *Fertility and Sterility* 78, S225-S225 (2002).
- Sakkas, D. *et al.* Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reproductive biomedicine online* 7, 428-432 (2003).
- Saowaros, W. & Panyim, S. Formation of disulfide bonds in human protamines during sperm maturation. *Experientia* 35, 191-192 (1979).
- Scarano, W. R. *et al.* Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *International Journal of Andrology* 29, 482-488 (2006).
- Sharpe, R. M. *et al.* Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125, 769-784 (2003).
- Schnedl, W. J. *et al.* Stz transport and cytotoxicity - specific enhancement in glut2-expressing cells. *Diabetes* 43, 1326-1333 (1994).
- Schoeller, E. L. *et al.* Insulin Rescues Impaired Spermatogenesis via the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Akita Diabetic Mice and Restores Male Fertility. *Diabetes* 61, 1869-1878 (2012).
- Seethalakshmi, L. *et al.* The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrine-male reproductive tract axis of the adult rat. *J Urol.* 138, 190-4 (1987).
- Silva, F. *et al.* Rapid signal transduction in Sertoli cells. *European Journal of Endocrinology* 147, 425-433 (2002).
- Silvestroni, L. *et al.* Histones instead of protamines in terminal germ-cells of infertile, oligospermic men. *Fertility and Sterility* 27, 1428-1437 (1976).
- Simoni, M. *et al.* The follicle-stimulating hormone receptor: Biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrine Reviews* 18, 739-773 (1997).
- Sinha Hikim, A. P. & Swerdloff, R. S. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Reviews of reproduction* 4, 38-47 (1999).
- Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M. & Steger, K. Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* 34, 384-390 (2002).

- Soudamani, S. *et al.* Experimental diabetes has adverse effects on the differentiation of ventral prostate during sexual maturation of rats. *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology* 287A, 1281-1289 (2005).
- Steger, K. Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat Embryol (Berl)* 203,323–334 (2001).
- Suganuma, R. *et al.* Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. *Hum. Reprod.* 20, 3101-3108 (2005).
- Sun, J. G, *et al.* Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: Correlation with fertilization in vitro. *Biology of Reproduction* 56, 602-607 (1997).
- Suto, J. Genetic dissection of testis weight in a mouse strain having an extremely large testis: major testis weight determinants are autosomal rather than Y-linked on the basis of comprehensive analyses in Y-chromosome consomic strains. *Phys Biol. Science* 84, 393–406 (2008)
- Tanaka, H. & Baba, T. Gene expression in spermiogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62, 344-354 (2005).
- Tanaka, H. *et al.* HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Molecular and Cellular Biology* 25, 7107-7119 (2005).
- Taylor, S. L. *et al.* Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Molecular Human Reproduction* 10, 825-834 (2004).
- Vanheerde, W. L. *et a.*. The complexity of the phospholipid-binding protein annexin-v. *Thrombosis and Haemostasis* 73, 172-179 (1995).
- Verhoeven, G. *et al.* Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 365 (2010).
- Vermes, I *et al.* C. A novel assay for apoptosis - flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein-labeled annexin-v. *Journal of Immunological Methods* 184, 39-51 (1995).
- Wahlstrom, T *et al.* M. Localization of luteinizing-hormone, follicle-stimulating-hormone, prolactin, and their receptors in human and rat testis using immunohistochemistry and radioreceptor assay. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 57, 825-830 (1983).
- Walker, W. H. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis* 1, 116-120 (2011).

- Walker, W. H. & Cheng, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 130, 15-28 (2005).
- Wang, Z. Y. & Gleichmann, H. GLUT2 in pancreatic islets - Crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 47, 50-56 (1998).
- Wang, J. *et al.* A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic b-cell dysfunction in the Mody mouse. *J Clin Invest* 103, 27–37 (1999).
- Vavra, J. J. *et al.* Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiot Annu* 7, 230-235 (1959).
- Wei, Y. *et al.* Paternally induced transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 1873-8 (2014).
- Weiss, R. B. Streptozotocin: a review of its pharmacology, efficacy and toxicity. *Cancer Treat Rep* 66, 427–38 1982
- World Health Organization. Global Health Estimates: Deaths by Cause, Age, Sex and Country, 2000-2012. Geneva, WHO (2014).
- World Health Organization. Laboratory manual for the Examination and processing of human semen, Fifth edition (2010).
- Yamamoto, Y. *et al.* Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. *J Clin Invest.* 108, 261-8 (2001).
- Yanagimachi R. “The Physiology of Reproduction”, *Mammalian Fertilization*, Second edition (1994).
- Yoshii, T. *et al.* Fine resolution of human sperm nucleoproteins by two-dimensional electrophoresis. *Molecular Human Reproduction* 11, 677-681 (2005).
- Zatecka, E. *et al.* The effect of tetrabromobisphenol A on protamine content and DNA integrity in mouse spermatozoa. *Andrology* 2, 910-917 (2014).
- Zhang, X. Y. *et al.* Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: Evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. *Journal of Andrology* 27, 414-420 (2006).
- Zhao, M. *et al.* Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* 38, 200-213 (2004).
- Ziyyat, A. *et al.* Flow cytometry isolation and reverse transcriptase polymerase chain reaction characterization of human round spermatids in infertile patients. *Human Reproduction* 14, 379-387 (1999).