

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta  
Katedra Buněčné Biologie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science  
Department of Cell Biology**

Doktorský studijní program: Vývojová a Buněčná Biologie  
Ph.D. study program: Developmental and Cell Biology

Autoreferát disertační práce  
Summary of the Ph.D. Thesis



Effect of selected endocrine disruptors on the male mouse reproductive system *in vivo*

Vliv vybraných endokrinních disruptorů na reprodukční systém myších samců *in vivo*

**Eva Žatecká**

Školitel/Supervisor: Assoc. Prof. Jana Pěknicová, PhD.

Prague, 2015

## Table of contents

<b>Souhrn</b> .....	<b>4</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Úvod</b> .....	<b>6</b>
1.1 Spermatogeneze .....	6
1.2 Spermioogeneze .....	7
1.3. Endokrinní disruptory .....	8
1.3.1 Tetrabrombisphenol A .....	8
1.3.2 Zearalenone .....	8
1.4. Asistovaná reprodukce .....	9
<b>2. Cíle práce</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Metody</b> .....	<b>10</b>
<b>4. Výsledky a diskuze</b> .....	<b>13</b>
4.1. Vliv TBBPA na samčí reprodukční parametry se zaměřením na morfologii testikulární tkáně, kvalitu spermií a expresi vybraných testikulárních genů. ....	13
4.2 Vliv nízké dávky mykotoxinu zearalenonu na funkci samčích gonád, kvalitu spermií a expresi genů důležitých pro vývoj spermií. ....	15
4.3. Analýza genové exprese ve vzorcích z testikulárních biopsií pacientů, kteří podstoupili TESE. ....	16
<b>5. Závěr</b> .....	<b>17</b>
<b>6. Použitá literatura</b> .....	<b>18</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>21</b>
1.1. Spermatogenesis.....	21
1.2. Spermioogenesis.....	22
1.3. Endocrine disruptors .....	23
1.3.1 Tetrabromobisphenol A .....	23
1.3.2. Zearalenone .....	24
1.4. Assisted reproductive technology .....	24
<b>2. Aims of the work</b> .....	<b>25</b>
<b>3. Methods</b> .....	<b>25</b>
<b>4. Results and discussion</b> .....	<b>29</b>

4.1. The effect of TBBPA on male gonadal function with focus on testicular morphology, sperm quality and expression of selected genes.....	29
4.2. The effect of treatment with a low dose of mycotoxin zearalenone on the male gonadal pathology, sperm quality and expression of important testicular genes. ....	31
4.3. Expression of spermatogenesis-related genes in specimens from testicular biopsies of infertile men who underwent TESE for the ICSI procedure.....	33
<b>5. Conclusion .....</b>	<b>33</b>
<b>6. References.....</b>	<b>34</b>
<b>7. Selected publication .....</b>	<b>37</b>
<b>8. Curriculum Vitae .....</b>	<b>37</b>

## Souhrn

Každý den je do našeho prostředí uvolňováno ohromné množství tzv. polutantů životního prostředí, které mohou negativně ovlivnit naše zdraví. Některé z těchto sloučenin jsou hormonálně aktivní látky (tzv. endokrinní disruptory), které mohou interferovat s naším hormonálním systémem. Hormonální systém ovlivňuje správnou funkci mnoha fyziologických procesů a je jeden z nejdůležitějších regulačních systémů v organismu. I reprodukční systém je do značné míry regulován různými hormony a jejich správná funkce je zásadní pro tvorbu gamet, oplodnění a vývoj embrya. Proto znečištění životního prostředí je považováno za jednu z možných příčin zvýšené neplodnosti v lidské populaci. V našich studiích jsme se proto rozhodli studovat vliv dvou endokrinních disruptorů (tetrabrombisfenol A - TBBPA a zearalenon - ZEA) na samčí reprodukční systém myši *in vivo*.

Podle našich výsledků je TBBPA schopen indukovat apoptózu testikulárních buněk, stejně jako změny v expresi vybraných testikulárních genů a protaminaci spermií. Dále naše výsledky naznačují, že při kontinuální expozici TBBPA dochází k akumulaci jeho negativního vlivu v další generaci v závislosti na tom, zda rodiče byli nebo nebyli ovlivněni. Jedním z možných mechanismů trans-generačního přenosu by mohly být pozorované změny v protaminaci spermií.

Výsledky z naší další studie ukázaly, že ZEA má negativní vliv na kvalitu spermií, zejména na koncentraci a morfologii. Výsledky z analýzy genové exprese naznačují, že mezi nejvíce ovlivněné buňky patří spermatogonie a meiotické zárodečné buňky. Naše výsledky rovněž ukázaly, že nižší dávka ZEA má výraznější efekt na testované reprodukční parametry než dávka vysoká.

V naší poslední studii jsme analyzovali expresi vybraných genů ve vzorcích z testikulárních biopsií pacientů s azoospermií, kteří podstoupili TESE. Naše výsledky ukazují, že analýza genové exprese může být užitečnou diagnostickou metodou, která pomůže k výběru nejvhodnějšího postupu pro každého pacienta.

## Abstract

In our environment there are many compounds which can negatively influence humans and wildlife. Every day, a vast number of environmental pollutants are released into our environment and there is no way to avoid their exposure. Some of these compounds can even mimic endogenous hormones and interfere with our endocrine system (so called endocrine disruptors), which is the key regulatory system controlling almost all physiological processes in human and animal bodies. Also the reproductive system is largely regulated by various hormones, and their proper function is crucial for gamete formation, fertilization and embryo development. Environmental pollutants are therefore considered as one of the possible causes of increased infertility in human population. This prompted us to study the effect of two endocrine disruptors (tetrabromobisphenol A – TBBPA, and zearalenone – ZEA) on the male mouse reproductive system *in vivo*.

According to our results, TBBPA is able to induce apoptosis as well as changes in the expression of selected testicular genes and sperm protamination. Our results also suggest that permanent exposure to TBBPA slightly enhances its effect in the next generation, depending on whether the parents have been affected or not. We hypothesized that differential protamination of the sperm DNA may be one of the possible mechanisms of trans-generational transmission of the pathological phenotypes induced by environmental pollutants.

Results from our next study have shown that ZEA is able to negatively influence the sperm quality, mainly sperm concentration and morphology. Based on our results from gene expression analysis we assumed that the most affected cells are spermatogonia and meiotic germ cells. Our results have also shown that the lower dose of ZEA had a greater effect on exposed animals.

Finally, in the third part of the presented work we analyzed expression of selected genes in specimens from testicular biopsies of azoospermic patients who underwent TESE. Our results showed that gene expression analysis can be an additional and useful tool for assessing the most suitable procedure for each patient.

## 1. Úvod

Neplodnost v lidské populaci je v současnosti závažným problémem a proto se také stala jedním z důležitých směrů biologického a biomedicínského výzkumu. Podle světové zdravotnické organizace má až 15% párů v reprodukčním věku problémy v oblasti reprodukce a z 50% je příčina na straně muže<sup>1,2</sup>. Jedním z hlavních důvodů mužské neplodnosti je snížená kvalita spermatu<sup>3-5</sup>, která může mít mnoho příčin. Může být způsobena genetickými poruchami, nezdravým životním stylem či nadměrnou konzumací alkoholu a v neposlední řadě může negativně působit i špatná úroveň životního prostředí.

V našem životním prostředí se vyskytuje velké množství syntetických látek (tzv. polutanty životního prostředí), které se hojně využívají ve všech průmyslových odvětvích. Tyto látky jsou každý den uvolňovány do našeho prostředí, dostávají se do pitné vody, do potravin i do vzduchu a je tak téměř nemožné vyhnout se jejich působení. Proto je velmi důležité odhalit, které z těchto látek mají škodlivý vliv na zdraví zvířat a lidí a pokusit se eliminovat jejich užití.

### 1.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze probíhá v semenotvorných kanálcích testes, které jsou tvořeny několika buněčnými typy. Nalezneme zde různá vývojová stadia zárodečných buněk, které jsou obklopeny podpůrnými Sertoliho buňkami. Intersticiální prostor mezi jednotlivými semenotvornými kanálky je vyplněn Leydigovými a myoidními buňkami. Všechny tyto buněčné typy jsou nezbytné pro správný průběh spermatogeneze a tvorbu funkčních spermií.

Na začátku spermatogeneze dochází k mitotickému dělení specializovaných kmenových buněk – spermatogonií typu A. Tyto spermatogonie se jednak dělí, aby byl zachován jejich počet, nebo diferencují a vznikají tak spermatogonie typu B. Spermatogonie typu B se dále mitoticky dělí a dávají tak vzniknout primárním spermatocytům, které následně podstupují proces heterotypického dělení (meióza I) za vzniku sekundárních spermatocytů. Tyto podstupují proces homeotypického dělení (meióza II) a vytváří tak haploidní kruhové spermatidy<sup>6</sup>.

Centrální roli v tomto procesu hrají Sertoliho buňky, které se podílejí na koordinaci jednotlivých kroků a bez kterých spermatogeneze neprobíhá. Sertoliho buňky jsou však velmi důležité i během embryonálního a postnatálního vývoje, kdy se podílejí na tvorbě varlat<sup>8</sup>. V pubertě dochází k ustanovení finálního počtu Sertoliho buněk, které následně ztrácejí proliferativní aktivitu a diferencují. Diferencované (maturované) Sertoliho buňky tvoří buněčné spoje jednak mezi sebou a formují tak tzv. hemato-testikulární bariéru a dále tvoří spoje se

zárodečnými buňkami, se kterými zůstávají propojeny během celého jejich vývoje <sup>7</sup>. V maturaci Sertoliho buněk hrají hlavní roli dva hormony. Je to folikuly stimulující hormon (FSH) a thyroideální hormon (TH). TH inhibuje proliferaci Sertoliho buněk a zároveň podporuje jejich maturaci, zatímco FSH funguje jako pro-proliferativní faktor <sup>8</sup>.

## 1.2 Spermioogeneze

Spermioogeneze je finální fáze spermatogeneze, při které dochází k diferenciaci kruhových spermatid na vysoce specializované bičíkaté buňky – spermie. Během tohoto procesu se mění funkce a struktura většiny organel, dochází ke kondenzaci jádra, tvorbě bičíku a akrosomu a spermie se zbavuje většiny cytoplazmy <sup>9</sup>.

Na počátku spermioogeneze dochází k přeměně Golgiho aparátu na akrozomální váček, který se nachází v přední části hlavičky a je naplněn lytickými enzymy (např. hyaluronidáza či akrozin). Akrozóm hraje důležitou roli během oplození, zejména při průchodu spermie vnějšími vaječnými obaly. Dále dochází k tvorbě bičíku, který roste z jedné z centriol směrem do lumen semenotvorného kanálku. Během tvorby bičíku dochází také k přemístění mitochondrií, které se u diferenciované spermie nacházejí v části bičíku zvané spojovací oddíl (midpiece) <sup>10</sup>.

Během poslední fáze spermioogeneze dochází ke kondenzaci jádra. Tento několika krokový proces zahrnuje rozvolnění nukleosomálních struktur a výměnu histonů za tranzitivní jaderné proteiny, které jsou následně vyměněny za protaminy. Protaminy vysoce kondenzují DNA, která se tak stává transkripčně inaktivní. Avšak ne všechny histony jsou vyměněny, určitá část DNA spermie zůstává vázána na histony (1-15% v závislosti živočišném druhu) <sup>11</sup>.

Mnoho studií prokázalo souvislost mezi mužskou neplodností a změnami v protaminaci spermií (množství protaminu 1 / protaminu 2) <sup>11-14</sup>. Bylo také prokázáno, že distribuce genů v oblastech, kde je DNA vázaná na protaminy nebo histony, není náhodná <sup>15, 16</sup>. Byla identifikována část DNA, která ve spermiích zůstává asociována s histony a ukázalo se, že tato DNA obsahuje geny důležité pro časný embryonální vývoj, miRNA a pro signální faktory důležité pro vývoj embrya <sup>17</sup>.

Stuide Cho et al. <sup>18</sup> hezky ukázala, že oba protaminy jsou nezbytné pro správnou funkci spermie a pro časný embryonální vývoj u myši. Bylo prokázáno, že snížené množství jak protaminu 1, tak protaminu 2 vede k poškození DNA ve spermiích a k neplodnosti.

### 1.3. Endokrinní disruptory

Endokrinní disruptory (EDs) jsou exogenní látky, které jsou strukturně podobné endogenním hormonům, a proto jsou schopny s nimi interferovat a narušit tak hormonální rovnováhu ovlivněného organismu<sup>19</sup>. Během posledních třiceti let jsou tyto látky systematicky zkoumány a je hodnocen jejich potenciální škodlivý vliv na organismus. Reprodukční systém může být narušen hlavně látkami s anti-androgenním nebo estrogením působením<sup>20</sup>.

#### 1.3.1 Tetrabrombisphenol A

Tetrabrombisphenol A (TBBPA) je vysoce lipofilní halogenová sloučenina, která se běžně používá jako zpomalovač hoření. Používá se především jako přísada do epoxidových pryskyřic a polykarbonátů a bylo prokázáno, že je schopna uvolnit se z různých elektronických zařízení<sup>22</sup>.

Bylo prokázáno, že TBBPA se silně váže na transthyretrin (TTR), který v organismu transportuje tyroxin (T4) a vitamin A<sup>29</sup>. Dále bylo prokázáno, že TBBPA je schopen inhibovat vazbu trijódthyroninu na thyroideální receptor a stimulovat proliferaci thyroideálně závislých GH3 buněk<sup>30,31</sup>. TBBPA se také váže na estrogení receptor *in vitro*<sup>32</sup> a stimuluje proliferaci estrogen-dependenčních buněk<sup>33, 31</sup>. Jen málo studií se zabývalo vlivem TBBPA na reprodukční systém *in vivo*. Experimenty provedené na kryších ukázaly, že TBBPA je schopen ovlivnit koncentraci tyroxinu a testosteronu v krvi ovlivněných samců. U zvířat vystavených účinkům TBBPA byla také pozorována zvýšená váha gonád<sup>34</sup>.

Všechny zmíněné studie ukazují, že TBBPA je všudypřítomná látka s potenciálními negativními účinky na zdraví lidí či zvířat. Proto jsou potřeba další studie, které by pomohly odhalit potenciální škodlivý účinek TBBPA na naše zdraví.

#### 1.3.2 Zearalenone

Zearalenone (ZEA) je mykotoxin produkovaný houbami z rodu *Fusarium*. Tyto houby jsou běžnými patogeny většiny zemědělských plodin, zejména pšenice, kukuřice, ječmene, rýže, ale také sena nebo siláží<sup>35</sup>. S ohledem na průměrnou koncentraci ZEA v potravinách byla vypočtena průměrná denní dávka pro dospělého člověka na 2.4 - 29 ng/kg tělesné hmotnosti/den (platí pro Severní Ameriku a Evropu). U batolat (12-36 měsíců starých) byla vypočtena průměrná denní dávka na 9.3 - 100 ng/kg tělesné hmotnosti/den<sup>36</sup>.

Bylo prokázáno, že ZEA se váže na estrogení receptor a je i schopen spustit estrogení odpověď<sup>35</sup>. U myší byl po působení ZEA pozorován zvýšený počet morfologicky



abnormálních spermií a snížený počet živých spermií. Jiná *in vivo* studie provedená na kryších ukázala, že jediná intraperitoneální dávka ZEA (5 mg/kg tělesné hmotnosti) je schopna indukovat apoptózu testikulárních zárodečných buněk<sup>40</sup>. *In vitro* studie, provedena na myších Leydigových buňkách, prokázala snížení produkce testosteronu v těchto buňkách po působení ZEA nebo  $\alpha$ -ZOL a lidského choriového gonadotropinu<sup>41</sup>.

Všechny tyto výsledky ukazují, že působení zearalenonu může narušit funkci endogenního hormonálního systému a negativně ovlivnit samčí reprodukční parametry *in vivo*. I když účinek ZEA byl poměrně intenzivně zkoumán, neexistují žádné studie zkoumající dlouhodobé působení ZEA v nízkých (fyziologicky relevantních) koncentracích.

#### **1.4. Asistovaná reprodukce**

Jak již bylo zmíněno, v lidské populaci je vysoké procento párů, které mají problémy s početím. Spousta z nich proto hledá lékařskou pomoc a je jim doporučeno využít služeb některého z center asistované reprodukce. V těchto centrech jsou používány různé techniky a je velmi důležité vybrat vhodnou techniku pro každého pacienta v závislosti na konkrétní příčině neplodnosti. Nejjednodušší a nejméně náročná metoda je intrauterinní inseminace. V případech závažnějších problémů je možné přistoupit na oplození *in vitro* (IVF), intracytoplazmatickou injekci spermie (ICSI), extrakci spermií z testikulární tkáně (TESE) nebo mikroskopickou aspiraci spermií z nadvarlete (MESA)<sup>42</sup>.

Asistovaná reprodukce je důležitou součástí naší společnosti a je vynakládáno velké úsilí vylepšit stávající IVF techniky, stejně jako diagnostické metody, které jsou klíčové pro výběr nejvhodnějších léčebných postupů.

## **2. Cíle práce**

- Ohodnotit vliv TBBPA na samčí reprodukční parametry se zaměřením na morfologii testikulární tkáně, kvalitu spermií a expresi vybraných testikulárních genů;
- Zjistit vliv nízké dávky mykotoxinu zearalenonu na funkci samčích gonád, kvalitu spermií a expresi genů důležitých pro vývoj spermií;
- Analyzovat expresi genů ve vzorcích z testikulárních biopsií pacientů, kteří podstoupili TESE a ohodnotit zda by analýza genové exprese mohla být další nástroj, který by dopomohl k přesnější diagnostice u neplodných pacientů.

### **3. Metody**

#### **Imunofluorescenční detekce**

K fixaci připravených roztěrů byl použit aceton, následně byla skla opláchnuta PBS a inkubována přes noc při 4°C s monoklonálními protilátkami proti intra-akrozomálním proteinům (Hs-8 a Hs-14), které byly naředěny na koncentraci 20 µg/ml. Po inkubaci byla skla omyta PBS a inkubována 1h při 37°C s fluorescenčně značenou sekundární protilátkou (Sigma) naředěnou 1:128 v PBS. Následně byla skla omyta PBS a destilovanou vodou a zamontována do Vectashield mounting medium s DAPI (Vector Laboratories). K detekci poškozených spermií byl použit kit Annexin V-FITC (Sigma). Při jeho aplikaci bylo postupováno podle instrukcí výrobce. Vzorky byly zkoumány Nikon Eclipse E400 fluorescenčním mikroskopem a fotografovány kamerou CCD-1300 VDS (Vosskühler GmbH) za pomoci zobrazovacího softwaru NIS-Elements (Laboratory Imaging Ltd.).

#### **Histologická analýza**

Pravé testes bylo fixováno v 4% paraformaldehydu a následně zalito do parafínu. Byly připraveny 2-3 µm řezy, které byly nabarveny hematoxylinem a eozinem. Vzorky byly hodnoceny pod světelným mikroskopem. U každého vzorku bylo analyzováno 100 semenotvorných kanálků a byla měřena tloušťka epitelu a průměr semenotvorného kanálku. Počet apoptotických buněk v testes byl určen pomocí kitu „deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling – TUNEL” (Promega), který byl použit dle pokynů výrobce. U všech vzorků byl počítán počet TUNEL pozitivních buněk v dvaceti semenotvorných kanálkách a obdržené výsledky byly statisticky zpracovány.

#### **Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)**

Z testes byla vyizolována celková RNA s pomocí kitu Tri-Reagent (Sigma). K levému testes bylo přidáno 1 ml Tri-reagentu a dále se pokračovalo dle pokynů výrobce. U vyizolované RNA byla zkontrolována kvalita a čistota a následně byla skladována při -70 °C. K syntéze cDNA bylo použito 5 µg RNA, ke které byl přidán 1 µl DNase I (Invitrogen), 1 µl DNase I reakčního pufru (Fermentas) a H<sub>2</sub>O (konečný objem 10 µl). Tato směs byla inkubována 30 min při 37 °C v Touchgene Gradient Thermal Cycler (Techne). Následně byl přidán 1 µl EDTA (Fermentas) a směs byla dále inkubována 10 min při 65 °C. Následně bylo ke vzorkům přidáno 30 µl reakční směsi obsahující 8 µl reakčního pufru pro M-MuLV reverzní transcriptázu (Fermentas), 5 µl 10 mM 4dNTP (Fermentas), 0.3 µl RiboLock inhibitor (Fermentas), 1 µl oligo (dT) + náhodné primery (Promega) a 15.2 µl H<sub>2</sub>O. Následně byly vzorky inkubovány 60 min při 42 °C a 10

min při 70 °C. Vzniklá cDNA byla použita na qPCR reakci, která probíhala ve stripech či 96-ti jamkových destičkách (BioRad). Na každou reakci byly použity 2 µl 5x naředěné cDNA, 10 µl SYBR Green Master Mix (Fermentas), 0.5 µl primeru a 7 µl H<sub>2</sub>O. Všechny reakce byly prováděny v dvojicích v PCR cykléru (Eppendorf). Z naměřených C<sub>q</sub> hodnot, které byly normalizovány podle referenčního genu (Ppia nebo Actb), bylo spočítáno relativní množství dané mRNA v každém vzorku metodou 2<sup>-ΔΔC<sub>q</sub></sup>. Hodnoty kontrolních vzorků byly vyjádřeny jako 100% a hodnoty experimentálních vzorků k nim byly vztaženy.

### **qPCR na přístroji BioMark**

Analýza genové exprese byla provedena za použití přístroje BioMark (Fluidigm), který umožňuje provedení velkého množství qPCR reakcí během jediného testu. Před samotnou PCR reakcí vzorky musely být pre-amplifikovány. Na pre-amplifikační reakci bylo použito 2 µl cDNA a 1.2 µl směsi primerů (208nM), kdy výsledná koncentrace každého primeru byla 25 nM, dále bylo přidáno 5 µl směsi iQSupermix (BioRad) a 1.8 µl H<sub>2</sub>O. Vzniklá směs byla inkubována 10 minut při 95 °C a následně 4 minuty při 59 °C. Pre-amplifikovaná cDNA byla naředěna 20× a použita na qPCR reakci, která probíhala v GE Dynamic pole 48x48 v HD systému BioMark (Fluidigm). Na PCR reakci bylo použito 1 µl zředěné pre-amplifikované cDNA, 0.25 µl 20× DNA Binding Dye Sample Loading činidla (Fluidigm), 2.5 µl SsoFastEvaGreen Supermix (Bio-Rad), 0.1 µl ROX (Invitrogen), 1.15 µl RNase/DNase free H<sub>2</sub>O, 2.5 µl 10 µM primerů (forward a reverse) a 2.5 µl DAAssay Loading činidla (Fluidigm). Reakce probíhala za následujících podmínek – 98 °C po dobu 40-ti sekund; 40 cyklů 95 °C po dobu 10-ti sekund; a 60 °C po dobu 40-ti sekund. Jako referenční gen byl vybrán β-aktin (Actb). Tento gen byl vybrán z několika kandidátů prostřednictvím programu Normfinder (Genex Enterprise, Mul-tiD Analyses). Obdržená data byla analyzována programem BioMark Real-Time PCR analysis Software 3.1.3. (Fluidigm). Údaje byly normalizovány relativními C<sub>q</sub> z reakcí pro referenční gen. Relativní změna genové exprese byla vypočtena metodou 2<sup>-ΔΔC<sub>q</sub></sup> pro každý replikát a pak vyjádřena jako aritmetický průměr příslušných replikátů. Hodnoty kontrolních vzorků byly vyjádřeny jako 100% a hodnoty experimentálních vzorků k nim byly vztaženy.

### **Extrakce jaderných proteinů ze spermií**

Pro extrakci jaderných proteinů bylo použito 5 x 10<sup>6</sup> spermií izolovaných z koncové části nadvarlete. Ke spermiím byla přidána směs obsahující 0,5% Triton X-100, 20mM Tris, 2 mM MgCl<sub>2</sub> a následovala centrifugace při 8940 g, 5 min, 4 °C. Po centrifugaci byly vzorky

zpracovány způsobem, který popsal de Yebra et al. <sup>43</sup> s tím rozdílem, že místo jód acetátu byl použit 0.8% vinyl pyridin. Po té byl každý vzorek resuspendován v 10 µl vzorkového pufru, obsahujícího 5.5 M močovinu, 20% β-merkptoethanol a 5% kyselinu octovou. DNA, která zůstala v peletě po extrakci jaderných proteinů, byla extrahována a kvantifikována, jak již bylo popsáno dříve <sup>44</sup>.

### **Separace a analýza jaderných proteinů ze spermií**

Bazické jaderné proteiny byly analyzovány za použití kyselého polyakrylamidového gelu obsahujícího 2.5 M močovinu, 12.5 M thiomčovinu, 0.9 M kyselinu octovou, 15% akrylamid, 0.1% bis-akrylamid a 0.12% peroxid vodíku. Z každého vzorku byly na gel nanoseny 2 µl vyzolovaných jaderných proteinů a následná separace proteinů probíhala v 0.9 M kyselině octové po dobu 90 min při 110 V. Společně s analyzovanými vzorky byly na gel nanoseny také standardy lidských protaminů (0,435; 0,87; 1,74; 2,61 µg). Následně byly gely barveny činidlem EzBlue (Sigma) dle instrukcí výrobce a obarvené gely byly oskenovány. Denzitometrická analýza bandů odpovídajícím P1 a P2 byla provedena pomocí programu Quantity One software (Bio-Rad Laboratories). Z nanesených protaminových standardů byla vypočítána regresní křivka, která byla použita k absolutní kvantifikaci množství protaminů (P1 + P2) v jednotlivých vzorcích. Z naměřených hodnot byly vypočítány poměry P1/P2, P1 + P2/DNA, P1/DNA a P2/DNA.

### **Extrakce spermií z testikulární tkáně (TESE) a ICSI**

Malé kousky testikulární tkáně byly umístěny do Petriho misky s proplachovacím roztokem (Medicult) a extrakce spermií z tkáně byla provedena, stejným způsobem, jak již bylo popsáno dříve <sup>45</sup>. Před odebráním spermií byl odebrán malý kousek tkáně, který byl poté podroben histologické analýze. Následně byly vzorky rozděleny do tří skupin: hypospermatogeneze (HS), maturační arest (MA) a „Sertoli cell only“ syndrom (SCO). ICSI bylo provedeno dle Silbert et al. <sup>47</sup>. Spermie byly inkubovány v kapkách promývacího média (Medicult) s 30 % lidským sérem po dobu 120 min a následně injikovány do vajíčka. Úspěšnost oplození byla hodnocena po 18 hodinách podle přítomnosti dvou pronukleí a druhého polárního tělíska.

## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1. Vliv TBBPA na samčí reprodukční parametry se zaměřením na morfologii testikulární tkáně, kvalitu spermií a expresi vybraných testikulárních genů.

V těchto studiích jsme analyzovali vliv bromovaného zpomalovače hoření tetrabrombisphenolu A (TBBPA) na reprodukční parametry myších samců *in vivo*. TBBPA se hojně vyskytuje v našem prostředí. Hlavním zdrojem kontaminace jsou továrny, kde se TBBPA používá. Bylo také prokázáno, že se může uvolňovat z různých elektronických spotřebičů a kontaminovat tak naše domovy či kanceláře.

Abychom ohodnotili vliv TBBPA na reprodukci myších samců, provedli jsme dvougenerační *in vivo* studii, kdy jsme zvířata kontinuálně ovlivňovali tetrabrombisphenolem A, který byl rozpuštěn v pitné vodě v koncentraci 200 µg/l (cca 35 µg/kg tělesné hmotnosti). V první generaci byly dvě skupiny – kontrolní skupina **C** a exponovaná skupina **T**. Ve skupině **T** byla zvířata exponována od těhotenství až do dospělosti, zatímco skupina **C** nebyla vůbec ovlivněna. Ve věku 70 dnů byla zvířata z F1 generace křížena, aby vytvořila F2 generaci. Křížení probíhalo následujícím způsobem – samci a samice ze skupiny **C** vytvořili skupinu **CC** (kontrolní skupina druhé generace); oba rodiče ze skupiny **T** vytvořili skupinu **TT**; samice ze skupiny **C** a samci ze skupiny **T** vytvořili skupinu **CT**; samice ze skupiny **T** a samci ze skupiny **C** vytvořili skupinu **TC**. Zvířata z F2 generace byla exponována pouze ve skupinách **TC** a **TT** (skupiny **CC** a **CT** nebyly exponovány).

Ve věku 70 dnů byla zvířata z obou generací usmrcena a podrobena analýze. Nejdříve byly hodnoceny obecné reprodukční parametry. Počet potomků, váha těla a anogenitální vzdálenost působením TBBPA ovlivněny nebyly. Váha reprodukčních orgánů byla nejvíce ovlivněna u zvířat ze skupiny **TT**, kde byla detekována snížená hmotnost testes a zvýšená hmotnost prostaty a semenných vaků. Analýza parametrů spermií (morfologie, životnost a stav akrozómu) neukázala žádné signifikantní změny po působení TBBPA.

Dále byla provedena histologická analýza testikulární tkáně. U experimentálních skupin nebyly pozorovány žádné patologické změny v morfologii semenotvorných kanálků. Až morfometrická analýza ukázala, že u zvířat ze skupiny **T** (F1 generace) a **TC**; **TT** (F2 generace) byla snížena tloušťka epitelu semenotvorných kanálků. U těch samých skupin byl také pozorován zvýšený počet apoptotických buněk v testes.

Dále byla provedena analýza exprese genů, které hrají důležitou roli během spermatogeneze. Gen pro pro-akrozin (Acr) byl vybrán jako zástupce akrozóm-specifických genů. Gen pro androgenní receptor byl vybrán jako zástupce androgen-responzivních genů, dále bylo testováno několik genů kódujících tzv. proteiny tepelného šoku (Hsps) - Hsp70-2, Hsc70t, Hsp60, a APG-1. Geny kódující proteiny Bax a Bcl-2 byly vybrány jako zástupci apoptotických genů a gen kódující Sox9 protein byl vybrán jako marker Sertoliho buněk. Nejvíce ovlivněné skupiny byly ty, které byly vystaveny účinkům TBBPA, to znamená skupina T (F1 generace) a skupiny TC; TT (F2 generace). U zvířat z těchto skupin byla detekována snížená exprese genů pro Hsp70-2, Hsp60, Bcl-2 (anti-apoptotický protein) a Sox9 a zvýšená exprese genů pro Hsp70-t a Bax (pro-apoptotický protein). U zvířat ze skupiny TT a TC (F2 generace) byla ještě detekována snížená exprese genu pro Ar. Zajímavé je, že byly pozorovány změny v genové expresi i u zvířat ze skupiny CT (F2 generace), která nebyla vystavena účinkům TBBPA. Zde byla detekována snížená exprese genů kódujících Hsp70-2 a Hsp60.

Naše výsledky ukazují, že TBBPA je schopen indukovat apoptózu testikulárních buněk, což je pravděpodobně příčina snížené tloušťky epitelu semenotvorných kanálků. Analyzované parametry spermií nebyly ovlivněny působením TBBPA, avšak qPCR analýza ukázala změny v expresi vybraných testikulárních genů. Tyto geny byly vybrány proto, že hrají důležitou roli ve vývoji spermií a proto změny v jejich expresi by mohly vést k narušení tohoto procesu. Naše výsledky také naznačují, že při trvalém působení TBBPA dochází mírnému navýšení jeho účinku v F2 generaci v závislosti na tom, zda rodiče byli nebo nebyli ovlivněni.

V naší další studii jsme blíže zkoumali vliv TBBPA na kvalitu spermií. Zaměřili jsme se na analýzu jaderných proteinů spermie – protaminů a na analýzu integrity DNA. V této studii byla zvířata vystavena TBBPA ve stejné koncentraci a stejným způsobem jako tomu bylo v předchozí studii. Výsledky z analýzy protaminů ukázaly snížený poměr protaminu 1 a protaminu 2 a zvýšený poměr celkového množství protaminu a DNA u zvířat vystavených účinkům TBBPA. Integrita DNA byla hodnocena pomocí metody TUNEL. U zvířat exponovaných TBBPA byl detekován vyšší počet TUNEL pozitivních spermií v porovnání s kontrolními zvířaty. Tyto výsledky ukazují, že u exponovaných zvířat je DNA spermií více poškozena. Mnohé studie poukazují na vztah mužské neplodnosti se změnami v protaminaci spermií a/nebo s fragmentací DNA<sup>16, 27, 29, 33</sup>. Další studie naznačují, že protaminy by mohly být součástí epigenomu spermie<sup>39, 41</sup> a proto změny v protaminaci spermií by mohly představovat možný mechanismus trans-generačního přenosu patologického fenotypu způsobeného působením polutantů životního prostředí.

#### 4.2 Vliv nízké dávky mykotoxinu zearalenonu na funkci samčích gonád, kvalitu spermií a expresi genů důležitých pro vývoj spermií.

Zearalenone (ZEA) je mykotoxin s estrogení aktivitou produkovaný houbami z rodu *Fusarium*. Tyto houby jsou běžnými patogeny většiny zemědělských plodin. V této studii jsme analyzovali vliv dvou různých koncentrací ZEA (0.15 µg/l a 150 µg/l) na reprodukční parametry a expresi testikulárních genů u myši *in vivo*. V této studii byly dvě experimentální skupiny (jedna vystavená ZEA v koncentraci 0.15 µg/l a druhá v koncentraci 150 µg/l) a jedna kontrolní skupina. Nižší podávaná dávka odpovídá průměrné denní dávce pro dospělého člověka (cca 25 ng/kg tělesné hmotnosti) <sup>36</sup>. ZEA byl zvířatům podáván od prvního dne těhotenství matek a narozená mláďata byla následně kontinuálně exponována až do věku 70 dnů, kdy byla usmrcena a podrobena analýze.

U experimentálních zvířat nebyly pozorovány žádné změny v tělesné hmotnosti nebo hmotnosti reprodukčních orgánů v porovnání s kontrolní skupinou. Nicméně, byla pozorována snížená kvalita spermií a to především u zvířat vystavených nízké koncentraci ZEA. V této skupině byla detekována snížená koncentrace spermií, zvýšené množství morfologicky abnormálních spermií a zvýšená vazba apoptotického markeru annexinu V. Dále byl metodou qPCR ohodnocen expresní profil 28 testikulárních genů. Testované geny mohou být rozděleny do pěti skupin v závislosti na jejich funkci – geny exprimované v zárodečných buňkách (*Vegfa*, *Sycp3*, *Sycp1*, *Ccna1*, *Meig1*, *Grth*, *Prm1*, *Tnp1*, *Tnp2*), geny exprimované v Sertoliho buňkách (*Sox9*, *Wt1*, *Eps8*, *Icap1*, *Mas1*), geny hrající roli v hormonální odpovědi (*Ar*, *Fkbp5*, *Tff1*, *Igfbp5*, *Ctsd*, *Fshr*), geny hrající roli v apoptotickém procesu (*p21*, *Bcl*, *p53*) a geny související s epigenetickými procesy (*Ccnd1*, *Crem*, *Kdm4a*, *Spata2*, *Dnmt1*). Obecně bylo pozorováno více změn v expresi vybraných genů u zvířat vystavených nízké dávce ZEA. V této skupině, byla zjištěna snížená exprese genu *Vegfa*, který je specificky exprimován ve spermatogoniích. Dále byla detekována snížená exprese genů specifických pro spermatocyty – *Sycp3*, *Ccna1* a *Grth*. Ve skupině vystavené vyšší dávce ZEA nebyly pozorovány žádné signifikantní změny v expresi těchto genů. V případě genů exprimovaných v Sertoliho buňkách byla zaznamenána signifikantně snížená exprese genu *Sox9* u obou skupin a také snížená exprese genu *Wt1* u zvířat vystavených vysoké dávce ZEA. Dále byly testovány geny související s epigenetickými procesy, zde byla pozorována snížená exprese genů pro *Ccnd1* a *Dnmt1* u zvířat vystavených nízké dávce ZEA a snížená exprese genů pro *Ccnd1*, *Kdm4a* a *Spata2* u zvířat vystavených vysoké dávce ZEA.

Naše výsledky ukazují, že ZEA má negativní vliv na kvalitu spermií a to zejména na koncentraci a morfologii. Na základě výsledků z qPCR analýzy můžeme usuzovat, že mezi nejvíce ovlivněné buňky patří spermatogonie a meiotické zárodečné buňky. Obecně se dá říci, že v této studii byl pozorován větší vliv u zvířat vystavených nízké dávce ZEA. Tento jev, kdy nižší dávka dané látky má určitý vliv, zatímco vysoká dávka má žádný nebo jiný efekt, se v endokrinologii vyskytuje běžně. Existuje několik vysvětlení tohoto zajímavého úkazu. Hormonálně aktivní látky (endokrinní disruptory) jsou schopné vázat se na příslušné receptory a následně vyvolat hormonální odpověď, která se může lišit v závislosti na koncentraci ligandu<sup>51</sup>. Také bylo prokázáno, že když je ligand v koncentracích vyšších než jeho fyziologická hodnota, může se vázat na receptory pro jiný hormon a vyvolat příslušnou odpověď<sup>52</sup>. Je tedy zřejmé, že v závislosti na koncentraci ligandu mohou být vyvolány různé fyziologické odpovědi. Zjevně, různé odpovědi mohou tedy být obdrženy v závislosti na koncentraci hormonu.

#### **4.3. Analýza genové exprese ve vzorcích z testikulárních biopsií pacientů, kteří podstoupili TESE.**

V naší populaci existuje mnoho párů, které mají problémy v oblasti reprodukce. Mnozí z nich hledají lékařskou pomoc a použití služeb některé z center asistované reprodukce. Jednou z příčin mužské neplodnosti je absence spermií v ejakulátu - azoospermie. Pacienti s azoospermií mají možnost stát se otcem dítěte a to pomocí testikulární extrakce spermií (TESE) následovanou ICSI<sup>53</sup>. V současné době je jediným spolehlivým a běžně používaným prediktorem úspěšné TESE histologická analýza testikulární tkáně. V této studii byla nalyzována genová exprese ve vzorcích z testikulárních biopsiích pacientů s azoospermií, kteří podstoupili TESE.

Geny testované v této studii byly - GAPDH (exprimován v somatických buňkách testes a ve spermatogoniích); MND1 / GAJ a SPATA22 (exprimovány v germinálních buňkách před meiotickým dělením); GAPDHS a ACR (exprimovány v haploidních spermatidách). Celkem bylo analyzováno 34 vzorků, z nichž 9 bylo diagnostikováno jako „Sertoliho cell only“ syndrom (SCO); 12 jako maturační arest na úrovni spermatocytů (MA); 12 jako hypospermatogeneze (HS) a jeden jako obstrukční azoospermie. Ve třech vzorcích ze skupiny HS a v šesti vzorcích ze skupiny MA nebyla detekována žádná nebo velmi nízká exprese studovaných genů. V jednom vzorku ze skupiny HS a ve dvou vzorcích ze skupiny MA byla detekována exprese MND1 a SPATA22, ale nebyla detekována exprese genů ACR či



GAPDHS. Ve skupině SCO byla ve dvou vzorcích detekována snížená exprese testovaných genů a u zbývajících sedmi vzorků byla detekována pouze reziduální exprese genů GAPDHS, ACR a SPATA22.

Tato studie ukázala, že analýza genové exprese může potvrdit histologicky diagnostikovaný SCO. V případě MA a HS by analýza genové exprese mohla pomoci určit, ve které fázi došlo k přerušení spermatogeneze, a tím dopomoci k výběru nejvhodnějšího postupu pro každého pacienta.

## 5. Závěr

Předložená studie je zaměřená na studium vlivu dvou endokrinních disruptorů (TBBPA a ZEA) na různé reprodukční parametry u myši *in vivo*. Podle našich výsledků jsou tyto látky schopné ovlivnit spermatogenezi a následně tak kvalitu spermií. V případě TBBPA byl dokonce zaznamenán mírný transgenerační účinek, který byl již dříve pozorován v souvislosti s jinými endokrinními disruptory<sup>54</sup>. V případě ZEA byl pozorován vliv hlavně na kvalitu spermií a expresi testikulárních genů. Také bylo pozorováno, že nižší koncentrace ZEA ovlivnila experimentální zvířata více, než koncentrace vysoká. V mnoha toxikologických studiích se používají vysoké koncentrace testovaných látek za předpokladu, že pokud tyto vysoké koncentrace nemají negativní vliv, platí totéž i pro nízké koncentrace. Avšak, naše a další studie ukázaly, že to není pravda, a to zejména v případě látek s hormonální aktivitou.

Při našich experimentech jsme sice nepozorovali signifikantní vliv na plodnost exponovaných zvířat, nicméně je důležité si uvědomit, že lidé a zvířata jsou vystavena tisícům různých organických nebo syntetických látek, které mohou ovlivnit zdraví a/nebo plodnost. S rostoucím počtem neplodných párů a rychle klesající kvalitou spermatu hlášenou z Evropských a Amerických zemích, je velmi důležité odhalit látky, které mohou negativně ovlivnit naše reprodukční zdraví a eliminovat jejich použití.

Rostoucí počet neplodných párů je spojen s vyšší poptávkou po asistované reprodukci. V současné době je k dispozici mnoho technik a je důležité zvolit nejvhodnější přístup pro každého pacienta. Pro tento účel je důležité vyvinout senzitivní diagnostické techniky. V naší studii jsme ukázali, že analýza genové exprese by mohla být jednou z dalších technik, která by dopomohla k přesnější diagnostice a k výběru vhodného postupu.

## 6. Použitá literatura

1. Hirsh, A. Male subfertility. *BMJ* **327**, 669-672 (2003).
2. Poongothai, J., Gopenath, T.S. & Manonayaki, S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J* **50**, 336-347 (2009).
3. Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. & Skakkebaek, N.E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* **305**, 609-613 (1992).
4. Swan, S.H., Elkin, E.P. & Fenster, L. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect* **105**, 1228-1232 (1997).
5. Swan, S.H., Elkin, E.P. & Fenster, L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect* **108**, 961-966 (2000).
6. Dym, M. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11287-11289 (1994).
7. 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).
8. Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C. & Fisher, J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* **125**, 769-784 (2003).
9. de Kretser, D.M., Loveland, K.L., Meinhardt, A., Simorangkir, D. & Wreford, N. Spermatogenesis. *Hum Reprod* **13 Suppl 1**, 1-8 (1998).
10. Abou-Haila, A. & Tulsiani, D.R. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* **379**, 173-182 (2000).
11. Carrell, D.T. & Liu, L. 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. *J Androl* **22**, 604-610 (2001).
12. Mengual, L., Balleca, J.L., Ascaso, C. & Oliva, R. Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. *J Androl* **24**, 438-447 (2003).
13. Oliva, R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* **12**, 417-435 (2006).
14. Jodar, M. & Oliva, R. Protamine alterations in human spermatozoa. *Adv Exp Med Biol* **791**, 83-102 (2014).
15. Li, Y., Lalancette, C., Miller, D. & Krawetz, S.A. Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. *Asian J Androl* **10**, 535-541 (2008).
16. van der Heijden, G.W. *et al.* Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol* **8**, 34 (2008).
17. Hammoud, S.S. *et al.* Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* **460**, 473-478 (2009).
18. Cho, C. *et al.* Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* **28**, 82-86 (2001).
19. Damstra, T., Page, S.W., Herrman, J.L. & Meredith, T. Persistent organic pollutants: potential health effects? *J Epidemiol Community Health* **56**, 824-825 (2002).
20. Crisp, T.M. *et al.* Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environ Health Perspect* **106 Suppl 1**, 11-56 (1998).
21. Alaei, M., Arias, P., Sjodin, A. & Bergman, A. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environ Int* **29**, 683-689 (2003).
22. Birnbaum, L.S. & Staskal, D.F. Brominated flame retardants: cause for concern? *Environ Health Perspect* **112**, 9-17 (2004).

23. Kierkegaard, A., Sellstrom, U. & McLachlan, M.S. Environmental analysis of higher brominated diphenyl ethers and decabromodiphenyl ethane. *J Chromatogr A* **1216**, 364-375 (2009).
24. Watanabe, I., Kashimoto, T. & Tatsukawa, R. Identification of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in the river sediment and the mussel collected in Osaka. *Bull Environ Contam Toxicol* **31**, 48-52 (1983).
25. Fernandez, M.P., Ikonomou, M.G. & Buchanan, I. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Sci Total Environ* **373**, 250-269 (2007).
26. Sjodin, A. *et al.* Flame retardants in indoor air at an electronics recycling plant and at other work environments. *Environ Sci Technol* **35**, 448-454 (2001).
27. Takigami, H., Suzuki, G., Hirai, Y. & Sakai, S. Transfer of brominated flame retardants from components into dust inside television cabinets. *Chemosphere* **73**, 161-169 (2008).
28. Takigami, H., Suzuki, G., Hirai, Y. & Sakai, S. Brominated flame retardants and other polyhalogenated compounds in indoor air and dust from two houses in Japan. *Chemosphere* **76**, 270-277 (2009).
29. Meerts, I.A. *et al.* Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicol Sci* **56**, 95-104 (2000).
30. Fini, J.B. *et al.* An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ Sci Technol* **41**, 5908-5914 (2007).
31. Kitamura, S., Jinno, N., Ohta, S., Kuroki, H. & Fujimoto, N. Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 554-559 (2002).
32. Korner, W. *et al.* Validation and application of a rapid in vitro assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals. *Chemosphere* **37**, 2395-2407 (1998).
33. Samuelsen, M. *et al.* Estrogen-like properties of brominated analogs of bisphenol A in the MCF-7 human breast cancer cell line. *Cell Biol Toxicol* **17**, 139-151 (2001).
34. Van der Ven, L.T. *et al.* Endocrine effects of tetrabromobisphenol-A (TBBPA) in Wistar rats as tested in a one-generation reproduction study and a subacute toxicity study. *Toxicology* **245**, 76-89 (2008).
35. Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M. & Watanabe, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol* **7**, 253-306 (1987).
36. Zinedine, A., Soriano, J.M., Molto, J.C. & Manes, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol* **45**, 1-18 (2007).
37. Ruhr, L.P., Osweiler, G.D. & Foley, C.W. Effect of the estrogenic mycotoxin zearalenone on reproductive potential in the boar. *Am J Vet Res* **44**, 483-485 (1983).
38. Alm, H., Greising, T., Brussow, K.P., Torner, H. & Tiemann, U. The influence of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenol on in vitro maturation of pig oocytes and in vitro culture of pig zygotes. *Toxicol In Vitro* **16**, 643-648 (2002).
39. Yang, J.Y., Wang, G.X., Liu, J.L., Fan, J.J. & Cui, S. Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice. *Reprod Toxicol* **24**, 381-387 (2007).
40. Kim, I.H., Son, H.Y., Cho, S.W., Ha, C.S. & Kang, B.H. Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. *Toxicol Lett* **138**, 185-192 (2003).
41. Yang, J.Y., Zhang, Y.F., Wang, Y.Q. & Cui, S. Toxic effects of zearalenone and alpha-zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. *Toxicology in Vitro* **21**, 558-565 (2007).
42. Wosnitzer, M.S. & Goldstein, M. Obstructive azoospermia. *Urol Clin North Am* **41**, 83-95 (2014).
43. de Yebra, L. & Oliva, R. Rapid analysis of mammalian sperm nuclear proteins. *Anal Biochem* **209**, 201-203 (1993).

44. Simon, L., Castillo, J., Oliva, R. & Lewis, S.E. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online* **23**, 724-734 (2011).
45. Tepla, O. *et al.* Evaluation of reproductive potential after intracytoplasmic sperm injection of varied human semen tested by antiacrosomal antibodies. *Fertil Steril* **86**, 113-120 (2006).
46. Holstein, A.F., Schulze, W. & Davidoff, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* **1**, 107 (2003).
47. Silber, S.J. *et al.* High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* **10**, 148-152 (1995).
48. Carrell, D.T., Emery, B.R. & Hammoud, S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update* **13**, 313-327 (2007).
49. Aoki, V.W., Liu, L. & Carrell, D.T. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod* **20**, 1298-1306 (2005).
50. Brykczynska, U. *et al.* Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 679-687 (2010).
51. Welshons, W.V. *et al.* Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect* **111**, 994-1006 (2003).
52. Fox, T.O. Androgen- and estrogen-binding macromolecules in developing mouse brain: biochemical and genetic evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 4303-4307 (1975).
53. Mansour, R. Intracytoplasmic sperm injection: a state of the art technique. *Hum Reprod Update* **4**, 43-56 (1998).
54. Anway, M.D. & Skinner, M.K. Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the prostate transcriptome and adult onset disease. *Prostate* **68**, 517-529 (2008).

## **1. Introduction**

In recent years, infertility became a common problem in human population and therefore an important topic for scientific and medical research. According to the World Health Organization, 15 % of couples in reproductive age suffer from infertility problems, and up to 50 % of cases are caused by the male <sup>1,2</sup>. One of the most common causes of male infertility is severely decreased sperm quality. Several studies have shown that sperm quality, in particular sperm concentration, has decreased globally over the past 60 years <sup>3-5</sup>.

Many different pollutants and endocrine disruptors appear in our environment. They are released from factories or various products and can get into the water, food or air and influence our health. Therefore, it is necessary to reveal which of these pollutants are dangerous to our health to eliminate their usage.

### **1.1. Spermatogenesis**

Spermatogenesis takes place in seminiferous tubules, which are long and convoluted structures inside the testis. Seminiferous tubules consist of various types of germ cells that are surrounded by supporting Sertoli cells. The interstitial space between particular seminiferous tubules consists of Leydig and myoid cells. All these cell types help create the environment necessary for proper spermatogenesis.

The process of spermatogenesis begins with a series of mitotic divisions of primordial germ cells, which give rise to spermatogonia (types A1 - A4). Type A spermatogonia still retain the ability of stem cells, which means that they are able to divide and provide a constant supply of type A spermatogonia or to differentiate into type B spermatogonia. Type B spermatogonia are already determined for sperm differentiation and they lack the properties of stem cells. These cells divide mitotically and give rise to primary spermatocytes. Primary spermatocytes then enter the first meiotic division and form secondary spermatocytes, which subsequently complete the second meiotic division and produce haploid round spermatids <sup>6</sup>.

Mammalian spermatogenesis is a highly coordinated process and throughout all the stages, the developing germ cells are attached to the Sertoli cells via specialized cell junctions <sup>7</sup>. In adulthood, Sertoli cells support spermatogenesis, but it is not the only function they have. Sertoli cells also play an important role during testis formation in fetal and early postnatal life <sup>8</sup>. At puberty the role of Sertoli cells switches to supporting germ-cell differentiation and they also form the blood-testis barrier. The blood-testis barrier is created by adjacent Sertoli cells

near the basal lamina and divides the seminiferous epithelium into the basal and apical compartments <sup>7</sup>. The maturation of Sertoli cells is controlled by hormones; in particular follicle-stimulating hormone (FSH) and thyroid hormone (TH). TH inhibits Sertoli cell proliferation and stimulates their functional maturation, while FSH functions as a pro-proliferative factor <sup>8</sup>.

## **1.2. Spermiogenesis**

Spermiogenesis, sometimes also called spermateliosis, is the final stage of spermatogenesis when the transformation of round spermatids into differentiated spermatozoa occurs. It is a metamorphosis process, which involves condensation of the nuclei, formation of flagellar and acrosomal structures, and loss of a significant amount of cytoplasm. During this process many organelles such as the nucleus, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, mitochondria, and centriole undergo structural and functional changes that are necessary for proper function of spermatozoa <sup>9</sup>.

In early stage of spermiogenesis, the Golgi apparatus is transformed into the acrosome vesicle, which is placed over the anterior half of the sperm head. Acrosome is quite similar to a cellular lysosome; it is a sack-like structure composed of inner and outer acrosomal membrane and contains various digestive enzymes (e.g. hyaluronidase or acrosin). Acrosome plays an important role during fertilization, in particular during the passage of sperm through oocytes' external covers and sperm-oocyte binding. Another step is formation of the flagella structures, when the future axoneme grows out of one centriole and the flagellum is extended into the lumen of seminiferous tubules. During the flagellum formation, mitochondria align along the elongating flagella and are placed in the flagellar midpiece, where they form a ring around the axoneme <sup>10</sup>.

During the last stage of spermiogenesis, condensation of the sperm nucleus takes place. This step-wise process includes disassembly of the nucleosome structure, replacement of histones by transition proteins (TNPs) and finally by protamines. Once the sperm DNA is tightly packed with protamines, the overall transcription is terminated and the sperm nucleus remains transcriptionally silenced. However, not all histones are replaced by protamines. In sperm, certain amount of DNA remains associated with histones (1-15% depending on species) <sup>11</sup>.

Many studies have shown a link between alterations of protamine content or protamine ratio and male infertility <sup>11-14</sup>. There is also growing evidence that the distribution of genes in the regions associated with protamines or histones in the sperm is not random <sup>15, 16</sup>. It was shown

that sperm DNA which remains associated with histones contain loci important for early development including imprinted gene clusters, miRNA clusters, and the promoters of developmental transcription and signalling factors <sup>17</sup>.

The study of Cho et al. <sup>18</sup> nicely demonstrated the importance of protamines for proper sperm function and embryo development in mice. Authors have shown that both protamines are essential and that a decrease in the amount of either protamine impairs nuclear formation and leads to altered spermatogenesis and male infertility.

### **1.3. Endocrine disruptors**

Endocrine disruptors (EDs) are exogenous substances that are structurally similar to endogenous hormones and are able to interfere with them. This results in disruption of the function of endocrine system, and consequently causes various health problems for the particular organism or its progeny <sup>19</sup>. In the last thirty years, these substances are under systematic investigation to reveal their potential harmful effect on mammalian organism. The reproductive system may primarily affect substances with anti- androgenic or estrogenic effect <sup>20</sup>.

#### **1.3.1 Tetrabromobisphenol A**

Tetrabromobisphenol A (TBBPA) is a highly lipophilic halogen compound, which is commonly used as a flame retardant <sup>21</sup>. It is primarily used as a reactive flame retardant in epoxy resins and polycarbonates and it has been shown to be able to release from various electronic devices <sup>22</sup>. Indeed, TBBPA was detected in the environment in various areas <sup>23-28</sup>.

TBBPA can strongly bind to transthyretin (TTR). The function of TTR is to transport thyroxine (T4) and vitamin A. An *in vitro* experiments showed that TBBPA has even higher affinity to TTR than T4 itself <sup>29</sup>. Furthermore, it was demonstrated that TBBPA inhibits binding of triiodothyronine (T3) to the thyroid receptor (TR) and stimulates proliferation of GH3 cells (TH-dependent pituitary cells) <sup>30, 31</sup>. TBBPA is also able to bind to the estrogen receptor *in vitro* <sup>32</sup> and is able to induce proliferation of estrogen-dependent MCF-7 <sup>33</sup> and Mit/E2 cells <sup>31</sup>. A few studies have investigated the effect of TBBPA on the reproductive system *in vivo*. Experiments performed on Wistar rats <sup>34</sup> showed reduction of thyroxin circulation, increased weight of gonads and increased plasma levels of testosterone in F1 males after TBBPA treatment.

All these studies indicate that TBBPA is a ubiquitous environmental pollutant with potential negative effect on human or wildlife health. Therefore, additional *in vivo* studies are needed to further study this compound and assess its potential deleterious effect.

### **1.3.2. Zearalenone**

Zearalenone (ZEA) is a mycotoxin produced by fungi of the genus *Fusarium*. These fungi are common pathogens of most agricultural crops mainly wheat, corn, barley, oats, rice, but also hay or silage<sup>35</sup>. Considering the average concentration of ZEA in food and its consumption, the average daily dose was calculated to 2.4 - 29 ng/kg bw/day for an adult in Europe and North America. For toddlers (12–36 months old), the highest average daily intakes was calculated to 9.3 - 100 ng ZEA/kg bw/day<sup>36</sup>.

The main effect of zearalenone results from its estrogenic activity. It has been shown that binding of ZEA or its derivatives to estrogen receptor trigger estrogen stimulation<sup>35</sup>. Thus ZEA is able to disrupt the hormonal balance in various animals *in vivo*<sup>37,38</sup>. In mice, ZEA induced significant increase of abnormal spermatozoa and significant decrease of live spermatozoa. Testicular and cauda epididymal sperm counts were also reduced, as well as serum testosterone<sup>39</sup>. An *in vivo* study in rats showed that a single intraperitoneal dose of ZEA (5 mg/kg bw) induces testicular germ cell apoptosis in a time- dependent and stage-specific manner<sup>40</sup>. An *in vitro* study, made on mouse Leydig cells, has demonstrated decrease of testosterone production in Leydig cells co-treated with ZEA or  $\alpha$ -ZOL and human chorionic gonadotropin.<sup>41</sup>

All these results indicate that exposure to ZEA can cause disruption of endogenous hormonal system as well as impair male reproductive parameters *in vivo*. Although, the effect of ZEA was quite extensively investigated, there are no studies examining the long- term exposure to low (physiologically relevant) concentration of ZEA.

### **1.4. Assisted reproductive technology**

As mentioned previously, in human population there are many couples experiencing some form of infertility problems. Many of them search for medical assistance and are recommended to use services of some of the centers of assisted reproduction. In these centers, various assisted reproductive techniques are used. It is very important to choose a suitable technique depending on the cause of infertility. The most simple and least demanding for the couple is intrauterine insemination. In the case of more severe pathology, it is possible to proceed from insemination



to conventional *in vitro* fertilization (IVF), intracytoplasmic sperm injection (ICSI), testicular sperm extraction (TESE), or microscopic epididymal sperm aspiration (MESA) <sup>42</sup>.

Assisted reproduction is an important part of our society and there is great effort to further improve the IVF techniques as well as diagnostic methods which are crucial for choosing the most suitable treatment.

## **2. Aims of the work**

- To evaluate how TBBPA affects the male gonadal function with focus on testicular morphology, sperm quality and expression of selected genes;
- To assess the effect of treatment with a low dose of mycotoxine zearalenone on the male gonadal function, sperm quality and expression of genes playing important roles during spermatogenesis, genes expressed in Sertoli cells, and genes playing a role in apoptosis and hormonal response;
- To investigate the expression of spermatogenesis-related genes in specimens from testicular biopsies of infertile men who underwent TESE for the ICSI procedure to provide an additional approach to increase the prediction of positive TESE outcome.

## **3. Methods**

### **Indirect immunofluorescence**

Epididymal spermatozoa loaded on glass slides were fixed for 10 min with acetone. After rinsing with PBS, the slides were incubated overnight at 4 °C with monoclonal antibodies against intra-acrosomal proteins (Hs-8 and Hs-14) prepared in our laboratory (diluted to an immunoglobulin concentration of 20 µg/ml). After washing with PBS, the smears were incubated with anti-mouse IgM fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate (Sigma), diluted 1:128 in PBS and incubated for 60 min at 37 °C, washed with PBS and distilled water and mounted in Vectashield H-1200 DAPI (Vector Laboratories). The Annexin V-FITC apoptosis detection kit (Sigma) was applied for detection of the sperm damage according to laboratory instructions. Samples were examined with a Nikon Eclipse E400 fluorescent microscope and photographed with a CCD 1300-VDS camera (Vosskühler GmbH,) with the aid of the NIS-ELEMENTS Ar imaging software (Laboratory Imaging Ltd.).

### **Histological analysis and tissue morphometry**

The right testis was fixed in 4% formaldehyde in PBS. The paraffin-embedded 2-3  $\mu\text{m}$  thick tissue sections were prepared and stained by haematoxylin–eosin staining. Tissue specimens were evaluated under a light microscope. In all specimens, 100 seminiferous tubules were analyzed by computer assisted morphometry. The thickness of the germinal epithelium and diameter of the seminiferous tubules were measured. The number of apoptotic cells in tissue sections of the control and experimental animals was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL), using an in situ detection kit (Promega) according to the manufacturer's instruction. In all specimens the number of TUNEL positive cells in 20 cross-sectioned seminiferous tubules was counted. Differences between the number of TUNEL-positive cells in the control and experimental samples were statistically analyzed.

### **Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)**

Total RNA was extracted from the testicular tissue using a Tri-Reagent kit (Sigma). To the left testes 1 ml of Tri Reagent was added, and the samples were then processed according to manufacturer's instructions. Isolated RNA was stored at  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The RNA quality and purity was measured spectrophotometrically in NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). The synthesis of cDNA was done using 5  $\mu\text{g}$  of purified RNA with addition of 1  $\mu\text{l}$  DNase I (Invitrogen), 1  $\mu\text{l}$  DNase I reaction buffer (Fermentas) and  $\text{H}_2\text{O}$  to reach a volume of 10  $\mu\text{l}$ . This mixture was incubated for 30 min at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a Touchgene Gradient Thermal Cycler (Techne). After incubation, 1  $\mu\text{l}$  EDTA (Fermentas) was added and the mixture was further incubated at  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 10 min. 30  $\mu\text{l}$  of the reaction mixture (8  $\mu\text{l}$  of reaction buffer for M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas), 5  $\mu\text{l}$  10 mM 4dNTP (Fermentas), 0.3  $\mu\text{l}$  RiboLock inhibitor (Fermentas), 1  $\mu\text{l}$  oligo (dT) + random primers (Promega) and 15.2  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ ) was then added to the samples. The mixture was incubated for 60 min at  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  followed by 10 min at  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  and in the end was maintained at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . RT-qPCR reaction was carried out in PCR strips or 96-well plates (BioRad) and all work was performed in a sterile PCR box (Biosan). For each reaction 2  $\mu\text{l}$  5 $\times$  diluted cDNA, 10  $\mu\text{l}$  SYBR Green Master Mix (Fermentas), 0.5  $\mu\text{l}$  primer and 7  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  was used. All reactions were performed in duplets in a PCR cycler (Eppendorf). The relative amount of mRNA in each sample was calculated from the measured Cq values normalized to reference gene (Ppia or Actb).

### **RT-qPCR performed using BioMark analysis**

Gene expression analysis was performed in BioMark (Fluidigm). Before performing BioMark analysis the samples were pre-amplified. The pre-amplification reaction was done as follows: 2  $\mu$ l of cDNA (10 ng RNA/  $\mu$ l) was mixed with 1.2  $\mu$ l of 208 nM primer mix (all primers were mixed together, final concentration of each primer 25 nM), 5  $\mu$ l of iQSupermix (BioRad) and 1.8  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O. The mixture was first incubated for 10 min at 95 °C, then followed 18 cycles of 15 s at 95 °C, and finally 4 min at 59 °C. Pre-amplified cDNA was diluted 20 $\times$ . The real-time PCR reactions were carried out in GE Dynamic array 48.48 in a BioMark HD System (Fluidigm). Five  $\mu$ l of Fluidigm sample premix consisted of 1  $\mu$ l of 20 $\times$  diluted pre-amplified cDNA, 0.25  $\mu$ l of 20 $\times$  DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm), 2.5  $\mu$ l of Sso Fast Eva Green Supermix (Bio-Rad), 0.1  $\mu$ l of 4 $\times$  diluted ROX (Invitrogen) and 1.15  $\mu$ l of RNase/DNase-free water. Each 5  $\mu$ l assay premix consisted of 2.5  $\mu$ l of 10  $\mu$ M primers (forward and reversed at a final concentration of 500 nM) and 2.5  $\mu$ l of DA Assay Loading Reagent (Fluidigm). Conditions for qPCR were: 98 °C for 40 s, 40 cycles of 95 °C for 10 s, and 60 °C for 40 s. The actin (Actb) reference gene was selected from several reference gene candidates by Normfinder (GenEx). The data were collected using BioMark 3.1.2 Data Collection software and analyzed by BioMark Real-Time PCR Analysis Software 3.1.3. (Fluidigm).

### **Extraction of sperm nuclear proteins**

For protamine extraction,  $5 * 10^6$  of mouse epididymal sperm cells were used. Sperm cells were resuspended in 200- $\mu$ L PBS, centrifuged at 8940 g for 5 min at 4 °C and the pellet was resuspended in 100  $\mu$ L of 0.5% Triton X-100, 20 mM Tris, 2 mM MgCl<sub>2</sub> solution and centrifuged at 8940 g for 5 min at 4 °C. After centrifugation the samples were treated as described previously <sup>43</sup>, except that instead of using iodoacetate treatment we performed a treatment with 0.8% vinylpyridine (Sigma) for 30 min at 37 °C to further inhibit formation of cysteine disulphide bonds. Finally, each sample was resuspended in 10  $\mu$ L of sample buffer containing 5.5 M urea, 20%  $\beta$ - mercaptoethanol and 5% acetic acid. The DNA remaining in the pellet after the extraction of the nuclear proteins with 0.5 M HCl was extracted and quantified after 0.5 N perchloric acid hydrolysis (90 °C, 20 min) and absorbance determination at 260 nm, measured using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Products), as described previously <sup>44</sup>.

### **Separation and analysis of sperm nuclear proteins**

Basic nuclear proteins were analysed using acid–urea polyacrylamide gel containing 2.5 M urea, 12.5 mM thiourea, 0.9 M acetic acid, 15% acrylamide, 0.1% bis-acrylamide and 0.12% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. After polymerization, 2 µL of each sample was loaded and the gel was electrophoresed in 0.9 M acetic acid buffer for 90 min at 110 V. Different known quantities of a human protamine standard from a pool of human normozoospermic sperm samples (0.435, 0.87, 1.74 and 2.61 µg) were added in each acid–urea electrophoretic gel. The gels were stained with EzBlue staining reagent (Sigma) following the manufacturer's instructions. The stained gels were scanned and the intensity of the bands corresponding to P1 and P2 was quantified with Quantity One software (Bio-Rad Laboratories). The data obtained from Quantity One software were used for calculating the P1/P2 ratio. A standard curve was obtained from the different concentrations of human protamine standard to calculate the total amount of protamines (P1 + P2) in each sample, and the P1/P2, P1 + P2/DNA, P1/DNA and P2/DNA ratios were calculated.

### **TESE procedure, sperm extraction and ICSI**

Testicular sperm extraction (TESE) was performed as previously described<sup>45</sup>. Briefly, small pieces of testicular tissue were placed in a Petri dish in Flushing medium (Medicult) and cupped up using two sterile needles. The fragmented tissue was assessed for the presence of motile spermatozoa under the phase contrast microscope. The suspension of cells was cultivated for 24–48 hours before injection or freezing procedure. Prior to the sperm retrieval procedure, a small piece of testicular tissue was taken for histological examination. TESE samples were divided into three groups: hypospermatogenesis (HS), maturation arrest (MA), and Sertoli cells only syndrome (SCO), with a histopathology score counting according to Holstein et al.<sup>46</sup>. ICSI procedures were carried out according to Silber et al.<sup>47</sup>. The sperm cells were incubated in droplets of 5 µl of Flushing medium (Medicult) with 30% of human serum for 2 hours followed by injection into the oocyte. The fertilization rate was assessed approximately 18h after the injection by the presence of two pronuclei and second polar body and was quantified as a percentage of fertilized mature oocytes. Clinical pregnancy was confirmed by observing the gestational sac or detecting foetal heart beats.

## 4. Results and discussion

### 4.1. The effect of TBBPA on male gonadal function with focus on testicular morphology, sperm quality and expression of selected genes.

In these studies, we analyzed the effect of brominated flame retardant tetrabromobisphenol A (TBBPA) on reproductive parameters of male mice *in vivo*. This environmental pollutant has been shown to be ubiquitous in the environment. The main source of contaminations are factories where TBBPA is produced, and it has also been shown that it is released from various electronic products and thus contaminating our homes or offices<sup>21, 28</sup>.

We conducted two-generational *in vivo* study where animals were continuously exposed to TBBPA. TBBPA was dissolved in drinking water in concentration 200 µg/l, which roughly corresponds to 35 µg/kg bw. In the F1 generation there were two sub-groups – **C** (control group) and **T** (group exposed to TBBPA). In group **T**, the pups were exposed to TBBPA during gestation, lactation, pre-pubertal and pubertal period, and up to the adulthood. In group **C**, the pups were not exposed to TBBPA at all. Animals of F1 generation were bred at the age of 70 days to form F2 generation. The breeding was performed as follows – females and males from group **C** formed group **CC** (control group of F2 generation); both parents from group **T** formed group **TT** (interbreeding), female from group **C** and male from group **T** formed group **CT** (outcrossing), and female from group **T** and male from group **C** formed group **TC** (reverse outcrossing). Pups of F2 generation were exposed to TBBPA only in groups **TC** and **TT** (groups **CC** and **CT** were not exposed).

At the age of 70 days, animals of both generations were sacrificed and subjected to analysis. First, we evaluated the general reproductive parameters. We did not observe any effect of TBBPA on the number or sex ratio of the progeny, body weight and anogenital distance in both generations. Regarding the weight of reproductive organs, the most affected group was the group **TT** of F2 generation, where we noticed significantly reduced testicular weight and increased weight of the prostate and seminal vesicles. Evaluation of sperm parameters (sperm morphology, viability and acrosome status) did not reveal any negative changes after exposure to TBBPA in both generations.

We also performed histological analysis using testis paraffin sections stained by hematoxylin (nucleus) and eosin (cytoplasm). In experimental groups we did not observe any visible pathological changes in morphology of seminiferous tubules. Likewise, the process of

spermatogenesis was not interrupted. However, epithelial thickness was significantly lower in groups T (F1 generation) and TC; TT (F2 generation). To identify the number of apoptotic cells in the testes we performed the TUNEL analysis of testis paraffin sections. We observed increased numbers of apoptotic cells in the testes in group T of the F1 generation (almost double compared to the control) and in groups TC and TT of the F2 generation (about 25 % more apoptotic cells compared to the control).

To evaluate the effect of TBBPA on events taking place in testicular tissue more closely, we analyzed the expression profile of several testicular genes. The gene for proacrosin (Acr) was tested as an acrosome-specific gene. The gene for androgen receptor (Ar) was tested as an androgen-responsive gene. Several genes for heat shock proteins (Hsps) – Hsp70-2, Hsc70t, Hsp60, and APG-1 – were analyzed to determine the overall stress effect of TBBPA on testicular cells. Genes for Bax and Bcl-2 proteins were selected for their relation to apoptosis, and finally the Sox9 gene was chosen as a marker for Sertoli cells. The most affected groups were those that were exposed to TBBPA – groups T (F1 generation) and TC; TT (F2 generation), where we detected decreased expression of genes for Hsp70-2, Hsp60, Bcl- 2 (anti-apoptotic protein) and Sox9. In these groups, we noticed increased expression of genes for Hsp70-t and Bax (pro-apoptotic protein). Moreover, we detected significantly decreased expression of the gene for Ar in groups TC and TT. Interestingly, we also observed certain changes of gene expression in group CT (F2 generation), which had not been exposed to TBBPA (only the father was). Here, we observed increased expression of genes for Hsp70- 2 and Hsp60.

In summary, our results provide evidence that TBBPA is able to induce apoptosis of testicular cells, which is probably the cause of decreased thickness of seminiferous epithelium. The analyzed sperm parameters did not show any alterations after TBBPA exposure; however, real-time PCR analysis revealed changes in the expression of selected testicular genes. These genes were selected because of their essential role during spermatogenesis, and thus any alteration of their expression might lead to impairment of this process. Our results also suggest that permanent exposure to TBBPA slightly enhances its effect in the next generation, depending on whether the parents were affected or not.

In our next study, we decided to get a closer look on the effect of TBBPA on spermatozoa as the carrier of parental genetic information. We analyzed the protamine content and DNA integrity in the mouse sperm after TBBPA exposure. In this study we used the same TBBPA

concentration (200 µg/l) and treatment (continuous exposure during gestation, lactation, pre-pubertal, pubertal periods up to adulthood) as in previous study. Regarding the results from protamine analysis, we detected a decreased P1/P2 ratio ( $0.362 \pm 0.024$  in TBBPA group vs.  $0.494 \pm 0.052$  in controls) and increased total protamine/DNA ratio ( $0.517 \pm 0.073$  in TBBPA vs.  $0.324 \pm 0.081$  in controls) in animals exposed to TBBPA. To analyze the sperm DNA integrity, we performed the TUNEL assay. In animals exposed to TBBPA, we observed higher numbers of TUNEL positive spermatozoa compared to the control ( $39.5 \pm 4.5$  % vs  $21.2 \pm 3.1$  %), indicating higher sperm DNA fragmentation in the exposed animals. One of the main functions of protamines is to protect the paternal genetic information<sup>48</sup> and thus it is not surprising that in animals with altered sperm protamination we also observed higher sperm DNA fragmentation. Various studies have demonstrated the link of protamine imbalances and DNA fragmentation with male infertility<sup>11-13,49</sup>. However, protamines might also be involved in other aspects than protection of paternal DNA. It has been shown that protamines play an important role in the sperm epigenome<sup>17,50</sup>, and thus differential protamination of the sperm DNA may represent a possible mechanism of trans-generational transmission of the pathological phenotypes induced by environmental pollutants.

#### **4.2. The effect of treatment with a low dose of mycotoxin zearalenone on the male gonadal pathology, sperm quality and expression of important testicular genes.**

Zearalenone (ZEA) is a nonsteroidal oestrogenic mycotoxin produced by a variety of *Fusarium* fungi, which are common contaminants of cereal crops worldwide<sup>61</sup>. In this study, we investigated the effect of two different concentrations (150 µg/l and 0.15 µg/l) of ZEA on the reproductive parameters and expression of testicular genes in male mice *in vivo*. In this experiment there were two experimental groups (one exposed to ZEA in concentration 0.15 µg/l and second 150 µg/l) and one control group (not exposed). ZEA was administered in drinking water starting from the first day of mothers' pregnancy, then the born pups were exposed during gestation, lactation, pre-pubertal and pubertal period up to the age of 70 days, when they were sacrificed and analyzed. Animals exposed to the low dose were exposed to an environmentally relevant concentration (around 25 ng/kg bw)<sup>36</sup>.

We did not observe any changes of the body weight or weight of reproductive organs between the control and experimental groups. However, we observed decreased sperm quality mainly in group exposed to low concentration of ZEA. In this group we observed decreased sperm concentration, increased amount of morphologically abnormal spermatozoa and increased

binding of apoptotic marker annexin V. Using qPCR technique we evaluated expression profile of 28 testicular genes. The tested genes can be divided into five groups according to their function – genes expressed in the germ cells (Vegfa, Sycp3, Sycp1, Ccna1, Meig1, Grth, Prm1, Tnp1, Tnp2), genes expressed in Sertoli cells (Sox9, Wt1, Eps8, Icap1, Mas1), genes playing a role in hormonal response (Ar, Fkbp5, Tff1, Igfbp5, Ctsd, Fshr), genes playing a role during apoptosis (p21, Bcl, p53), and genes related to epigenetic processes (Ccnd1, Crem, Kdm4a, Spata2, Dnmt1). In general, we observed more alterations in expression of selected genes in animals exposed to low dose of ZEA. In this group, we detected decreased expression of the Vegfa gene, which is specifically expressed in spermatogonial cells. We also detected decreased expression of several genes specific for spermatocytes – Sycp3, Ccna1, and Grth. Interestingly, in group exposed to higher dose of ZEA we did not observe any significant changes in the expression of the tested germ-cell specific genes. Regarding genes expressed in Sertoli cells, we noticed significantly decreased expression of Sox9 genes in both groups and also decreased expression of Wt1 genes in the group exposed to the high dose. In the case of genes related to epigenetic processes, we observed decreased expression of genes for Ccnd1 and Dnmt1 in the animals exposed to the low dose of ZEA and decreased expression of genes for Ccnd1, Kdm4a and Spata2 in animals exposed to the high dose.

We have shown that ZEA is able to negatively influence the sperm quality, mainly sperm concentration and morphology. Based on our results from gene expression analysis we assume that most affected cells are spermatogonia and meiotic germ cells. In this study, animals exposed to the low ZEA concentration were affected markedly more than animals exposed to the high ZEA concentration. This phenomenon, when lower dosages of hormones have some effect while the high dosages have no or opposite effect, is quite common in endocrinology. There are several explanations for this phenomenon. The hormonally active endocrine disruptors interfere with endogenous hormones and act through the same mechanism, which means they bind to the receptors that subsequently mediate the response which depends on ligand concentration <sup>51</sup>. Also, it has been shown that at concentrations exceeding its physiological value the ligand may bind to receptors for a different hormone and induce the response <sup>52</sup>. Apparently different responses may therefore be observed depending on the hormone concentration.



### **4.3. Expression of spermatogenesis-related genes in specimens from testicular biopsies of infertile men who underwent TESE for the ICSI procedure.**

Many couples in our population experience some form of infertility problems. Many of them search for medical assistance and use services of some of the centers of assisted reproduction. One of the common causes of male infertility is absence of spermatozoa in ejaculate – azoospermia. Azoospermic patients still have the opportunity to father a child with the help of testicular sperm extraction (TESE) and ICSI<sup>53</sup>. At present, the only reliable and routinely used predictor of successful TESE is testicular histology. In this study, we used specimens from testicular biopsies of azoospermic patients who underwent TESE and we analyzed expression of selected genes. We assumed that this analysis could provide an additional approach to increase the prediction of successful TESE.

Genes tested in this study were – GAPDH (expressed in somatic testicular cells and spermatogonia); MND1/GAJ and SPATA22 (expressed prior to meiotic division); GAPDHS and ACR (expressed in haploid spermatids). In total we analyzed 34 samples, out of which 9 were diagnosed as Sertoli cell only (SCO); 12 as maturation arrest at spermatocyte stage (MA); 12 as hypospermatogenesis with a few spermatozoa present (HS) and one as obstructive azoospermia. In three samples from the HS group and in six samples from the MA group we detected no or low expression of the studied genes. In one sample from the HS group and two samples from the MA group we noticed expression of MND1 and SPATA22, but we did not detect any ACR or GAPDHS gene products. In the SCO group, in two samples we observed decreased expression of the tested genes, whereas in the remaining seven samples we noticed only residual presence of GAPDHS, ACR and SPATA22.

In this study, the expression analysis of selected genes provided sensitive confirmation of histologically diagnosed SCO. Concerning MA and hypospermatogenesis, gene expression analysis could help determine in which stage the spermatogenesis arrest occurred and thus help assess the most suitable procedure for each patient.

### **5. Conclusion**

In the presented study, we focused on the effect of two environmental pollutants (TBBPA and ZEA) on various male reproductive parameters using a mouse model. According to our results, these pollutants have a significant effect on spermatogenesis and can negatively influence the sperm quality. In the case of TBBPA we even observed a slight transgenerational effect which

has been previously observed in some other endocrine disruptors<sup>54</sup>. In the case of ZEA, we observed a negative effect mainly on sperm parameters and expression of important testicular genes. We also noticed that the lower concentration of ZEA had a stronger effect than the high concentration. Many toxicological studies use high concentrations of the tested compounds and it is assumed that if high concentrations do not have any negative effect, the same is true for the low concentrations. Our as well as other studies have disproved this hypothesis, especially for compounds that can be hormonally active.

Nevertheless, during our experiments we did not observe any significant effect on fertility of the exposed animals. However, we have to realize that humans and wildlife are exposed to thousands of various organic or synthetic compounds which can influence their health and/or fertility. With growing number of infertile couples and rapidly decreasing sperm quality reported from European and American countries, it is crucial to reveal compounds that are hazardous for our reproductive health and to eliminate their usage.

The growing number of infertile couples is linked with higher demand for assisted reproductive technology (ART). At present, many techniques are available and it is important to choose the proper one for each patient. For this purpose there are diagnostic methods that help select the most suitable ART. In our study, we have shown that gene expression analysis could be an important additional tool for more precise and help to choose the best approach for each patient.

## 6. References

1. Hirsh, A. Male subfertility. *BMJ* **327**, 669-672 (2003).
2. Poongothai, J., Gopenath, T.S. & Manonayaki, S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J* **50**, 336-347 (2009).
3. Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. & Skakkebaek, N.E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* **305**, 609-613 (1992).
4. Swan, S.H., Elkin, E.P. & Fenster, L. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect* **105**, 1228-1232 (1997).
5. Swan, S.H., Elkin, E.P. & Fenster, L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect* **108**, 961-966 (2000).
6. Dym, M. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11287-11289 (1994).
7. 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).
8. Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C. & Fisher, J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* **125**, 769-784 (2003).
9. de Kretser, D.M., Loveland, K.L., Meinhardt, A., Simorangkir, D. & Wreford, N. Spermatogenesis. *Hum Reprod* **13 Suppl 1**, 1-8 (1998).
10. Abou-Haila, A. & Tulsiani, D.R. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* **379**, 173-182 (2000).

11. Carrell, D.T. & Liu, L. 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. *J Androl* **22**, 604-610 (2001).
12. Mengual, L., Balleca, J.L., Ascaso, C. & Oliva, R. Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. *J Androl* **24**, 438-447 (2003).
13. Oliva, R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* **12**, 417-435 (2006).
14. Jodar, M. & Oliva, R. Protamine alterations in human spermatozoa. *Adv Exp Med Biol* **791**, 83-102 (2014).
15. Li, Y., Lalancette, C., Miller, D. & Krawetz, S.A. Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. *Asian J Androl* **10**, 535-541 (2008).
16. van der Heijden, G.W. *et al.* Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol* **8**, 34 (2008).
17. Hammoud, S.S. *et al.* Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* **460**, 473-478 (2009).
18. Cho, C. *et al.* Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* **28**, 82-86 (2001).
19. Damstra, T., Page, S.W., Herrman, J.L. & Meredith, T. Persistent organic pollutants: potential health effects? *J Epidemiol Community Health* **56**, 824-825 (2002).
20. Crisp, T.M. *et al.* Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environ Health Perspect* **106 Suppl 1**, 11-56 (1998).
21. Alaei, M., Arias, P., Sjodin, A. & Bergman, A. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environ Int* **29**, 683-689 (2003).
22. Birnbaum, L.S. & Staskal, D.F. Brominated flame retardants: cause for concern? *Environ Health Perspect* **112**, 9-17 (2004).
23. Kierkegaard, A., Sellstrom, U. & McLachlan, M.S. Environmental analysis of higher brominated diphenyl ethers and decabromodiphenyl ethane. *J Chromatogr A* **1216**, 364-375 (2009).
24. Watanabe, I., Kashimoto, T. & Tatsukawa, R. Identification of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in the river sediment and the mussel collected in Osaka. *Bull Environ Contam Toxicol* **31**, 48-52 (1983).
25. Fernandez, M.P., Ikonomou, M.G. & Buchanan, I. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Sci Total Environ* **373**, 250-269 (2007).
26. Sjodin, A. *et al.* Flame retardants in indoor air at an electronics recycling plant and at other work environments. *Environ Sci Technol* **35**, 448-454 (2001).
27. Takigami, H., Suzuki, G., Hirai, Y. & Sakai, S. Transfer of brominated flame retardants from components into dust inside television cabinets. *Chemosphere* **73**, 161-169 (2008).
28. Takigami, H., Suzuki, G., Hirai, Y. & Sakai, S. Brominated flame retardants and other polyhalogenated compounds in indoor air and dust from two houses in Japan. *Chemosphere* **76**, 270-277 (2009).
29. Meerts, I.A. *et al.* Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicol Sci* **56**, 95-104 (2000).
30. Fini, J.B. *et al.* An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ Sci Technol* **41**, 5908-5914 (2007).
31. Kitamura, S., Jinno, N., Ohta, S., Kuroki, H. & Fujimoto, N. Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun* **293**, 554-559 (2002).
32. Korner, W. *et al.* Validation and application of a rapid in vitro assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals. *Chemosphere* **37**, 2395-2407 (1998).

33. Samuelsen, M. *et al.* Estrogen-like properties of brominated analogs of bisphenol A in the MCF-7 human breast cancer cell line. *Cell Biol Toxicol* **17**, 139-151 (2001).
34. Van der Ven, L.T. *et al.* Endocrine effects of tetrabromobisphenol-A (TBBPA) in Wistar rats as tested in a one-generation reproduction study and a subacute toxicity study. *Toxicology* **245**, 76-89 (2008).
35. Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M. & Watanabe, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol* **7**, 253-306 (1987).
36. Zinedine, A., Soriano, J.M., Molto, J.C. & Manes, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol* **45**, 1-18 (2007).
37. Ruhr, L.P., Osweiler, G.D. & Foley, C.W. Effect of the estrogenic mycotoxin zearalenone on reproductive potential in the boar. *Am J Vet Res* **44**, 483-485 (1983).
38. Alm, H., Greising, T., Brussow, K.P., Torner, H. & Tiemann, U. The influence of the mycotoxins deoxynivalenol and zearalenol on in vitro maturation of pig oocytes and in vitro culture of pig zygotes. *Toxicol In Vitro* **16**, 643-648 (2002).
39. Yang, J.Y., Wang, G.X., Liu, J.L., Fan, J.J. & Cui, S. Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice. *Reprod Toxicol* **24**, 381-387 (2007).
40. Kim, I.H., Son, H.Y., Cho, S.W., Ha, C.S. & Kang, B.H. Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. *Toxicol Lett* **138**, 185-192 (2003).
41. Yang, J.Y., Zhang, Y.F., Wang, Y.Q. & Cui, S. Toxic effects of zearalenone and alpha-zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. *Toxicology in Vitro* **21**, 558-565 (2007).
42. Wosnitzer, M.S. & Goldstein, M. Obstructive azoospermia. *Urol Clin North Am* **41**, 83-95 (2014).
43. de Yebra, L. & Oliva, R. Rapid analysis of mammalian sperm nuclear proteins. *Anal Biochem* **209**, 201-203 (1993).
44. Simon, L., Castillo, J., Oliva, R. & Lewis, S.E. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online* **23**, 724-734 (2011).
45. Tepla, O. *et al.* Evaluation of reproductive potential after intracytoplasmic sperm injection of varied human semen tested by antiacrosomal antibodies. *Fertil Steril* **86**, 113-120 (2006).
46. Holstein, A.F., Schulze, W. & Davidoff, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* **1**, 107 (2003).
47. Silber, S.J. *et al.* High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* **10**, 148-152 (1995).
48. Carrell, D.T., Emery, B.R. & Hammoud, S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update* **13**, 313-327 (2007).
49. Aoki, V.W., Liu, L. & Carrell, D.T. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod* **20**, 1298-1306 (2005).
50. Brykczynska, U. *et al.* Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 679-687 (2010).
51. Welshons, W.V. *et al.* Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect* **111**, 994-1006 (2003).
52. Fox, T.O. Androgen- and estrogen-binding macromolecules in developing mouse brain: biochemical and genetic evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 4303-4307 (1975).
53. Mansour, R. Intracytoplasmic sperm injection: a state of the art technique. *Hum Reprod Update* **4**, 43-56 (1998).
54. Anway, M.D. & Skinner, M.K. Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the prostate transcriptome and adult onset disease. *Prostate* **68**, 517-529 (2008).

## 7. Selected publication

1. **Žatecká E., Děd L., Elzeinova F., Kubatová A., Dorosh A., Margaryan H., Dostalová P. and Pěkníková J.** 2013 Effect of tetrabrombisphenol A on induction of apoptosis in the testes and changes in expression of selected testicular genes in CD1 mice. *Reprod Toxicol.* **35**:32-9.  
**IF: 2.771**
2. **Dorosh A., Teplá O., Žatecká E., Děd L., Kočí K., and Pěkníková J.** 2013 Expression analysis of MND1/GAJ, SPATA22, GAPDHS and ACR genes in testicular biopsies from non-obstructive azoospermia (NOA) patients. *Reprod Biol Endocrinol.* **15**:11-42.  
**IF: 2.409**
3. **Žatecká E., Děd L., Elzeinová F., Kubatová A., Dorosh A., Margaryan H., Dostálová P., Korenková V., Hošková K. and Pěkníková J.** 2014 Effect of zearalenone on reproductive parameters and expression of selected testicular genes in mice. *Reprod Toxicol.* **45**:20-30.  
**IF: 2.771**
4. **Žatecká E., Castillo J., Elzeinová F., Kubatová A., Děd L., Pěkníková J. and Oliva R.** 2014 The effect of tetrabromobisphenol A on protamine content and DNA integrity in mouse spermatozoa. *Andrology* **2**:910-7.  
**IF: 3.206**

## 8. Curriculum Vitae

Name: Eva Žatecká

Nationality: Czech

Date of birth: 12<sup>th</sup> December 1984

E-mail: [zatecka.eva@gmail.com](mailto:zatecka.eva@gmail.com)

### Education

Since October 2011	PhD student at the Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Developmental Biology. Supervisor: Dr. J. Peknicova. PhD
2008-2011	Master student at the Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Cellular and Developmental Biology (MSc.).
Septemper 2010 – February 2011	Erasmus exchange programme at University of Aberdeen, Scotland
2004-2008	Bachelor student at the Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Biology (Bc.).

### Professional experience

Since 2011	PhD student, Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Biotechnology, Academy of Sciences of the Czech Republic (current position).
January 2013 – July 2013	Internship in Human Genetics Laboratory, Faculty of Medicine, University of Barcelona