

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Obecność estrogenów w męskim układzie rozrodczym jest stanem fizjologicznym. Jednak zarówno podczas rozwoju, dojrzałego funkcjonowania, jak i starzenia się gonady samca niezbędna jest równowaga pomiędzy androgenami i estrogenami. Procesy zachodzące w komórkach i tkankach kontrolowane przez estrogeny odbywają się głównie z udziałem klasycznych receptorów estrogenowych α , β (ER, ang. *estrogen receptor α , β*). Ponadto, najnowsze dane wskazują, że w sygnalizację estrogenową zaangażowane są również receptory pokrewne receptorom estrogenowym (ERR, ang. *estrogen-related receptors*) oraz błonowy receptor estrogenowy sprzężony z białkami G (GPER, ang. *G protein-coupled estrogen receptor*). Celem niniejszej pracy było wyjaśnienie znaczenia i wpływu sygnalizacji estrogenowej z udziałem ERR i GPER na fizjologię niedojrzałej i dojrzałej tkanki interstycjalnej gonady samców gryzoni i knurów.

W badaniach wykorzystano dojrzałe płciowo nornice rude (łac. *Myodes glareolus*) oraz niedojrzałe i dojrzałe płciowo oraz starzejące się myszy szczepu C57BL/6 do eksperymentów *in vivo*, komórki Leydiga MA-10 w hodowli *in vitro*, a także fragmenty jąder niedojrzałych knurów (rasy Wielka Biała Polska) w hodowli organotypowej *ex vivo*. W zależności od typu eksperymentu i modelu badawczego użyto: antagonistę ERR α (XCT790) i GPER (G-15), agonistę ERR β / γ (DY 131), 17 β -estradiol, ICI 182,780 oraz ksenoestrogeny [bisfenol A (BPA,

ang. *bisphenol A*); tetrabromobisfenol A (TBBPA, ang. *tetrabromobisphenol A*); tetrachlorobisfenol A (TCBPA, ang. *tetrachlorobisphenol A*)]. Związki farmakologiczne były używane pojedynczo lub w kombinacjach, a stosowana dawka była dobrana na bazie danych literaturowych i eksperymentów poprzedzających.

W badaniach stosowano analizy mikroskopowe (m. świetlny i elektronowy), molekularne i biochemiczne pozwalające na wykazanie zmian cyto/histologicznych oraz zmian ekspresji genów na poziomie zarówno mRNA, jak i białka (odpowiednio qRT-PCR, Western blot), a także analizy umożliwiające lokalizację białek i zbadanie tkankowej koncentracji białek/molekuł sygnalizacyjnych (analiza immunocyto/histochemiczna, immunofluorescencyjna), które m.in. potwierdziły obecność badanych receptorów w tkance interstycjalnej nornic, myszy oraz knurów.

Analizy ultrastrukturalna i histologiczna wykazały, że zarówno blokowanie, jak i aktywacja ERR i GPER prowadzi do zmian na poziomie organelli w komórkach Leydiga i hipertrofii tkanki interstycjalnej. Zaburzenie sygnalizacji estrogenowej z włączeniem ww. receptorów oraz obecność ksenoestrogenów powodowała wzrost ekspresji kolagenu oraz koncentracji jonów wapnia (Ca^{2+}) i relaksyny (RLN, ang. *relaxin*) w tkance interstycjalnej. U nornic zaburzona sygnalizacja ERR zmieniła funkcję steroidogenną i wydzielniczą komórek Leydiga poprzez modulację ekspresji receptora hormonu luteinizującego (LHR, ang. *lutening hormone receptor*), białka natychmiastowo regulującego steroidogenezę (StAR, ang. *steroidogenic acute regulatory protein*), białka translokatorowego (TSPO, ang. *translocator protein*), insulinopodobnego czynnika wzrostu 3 (INSL3, ang. *insulin-like peptide 3*) i RLN oraz koncentrację Ca^{2+} i cAMP. Z kolei u myszy, w zależności od wieku, blokowanie działania GPER przez podanie G-15 powodowało zmiany poziomu ekspresji ER i aromatazy cytochromu P450 (P450arom, ang. *aromatase cytochrome P450*), co przekładało się na zaburzenie procesu steroidogenezy w komórkach Leydiga. Obserwacja tkanki interstycjalnej w mikroskopie elektronowym wykazała obecność telocytów oraz ich występowanie w grupach po zablokowaniu GPER, co korelowało ze wzrostem ekspresji CD34. Ponadto, zablokowanie GPER wywołane G-15 spowodowało wzrost ekspresji ERR. Natomiast, w jądrze niedojrzałych knurów podanie ksenoestrogenów oraz G-15 skutkowało zaburzeniem steroidogenezy na drodze epigenetycznej z udziałem molekuł kontrolujących biogenezę i funkcję miRNA tj.: DICER, DROSHA, ARGONAUTA 2 (AGO2, ang. *argonaute 2*) i EKSPORTYNA 5 (EXPO5, ang. *exportin 5*).

Podsumowując, w niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano rolę ERR i GPER w komórkach tkanki interstycjalnej jądra nornic, myszy i knurów. Na podstawie otrzymanych

wyników można wnioskować, iż sygnalizacja estrogenowa z udziałem badanych receptorów wpływa na utrzymanie prawidłowej histologii tkanki interstycjalnej oraz ultrastruktury komórek. Należy podkreślić, że sygnalizacja przez ERR i GPER odgrywa również kluczową rolę w prawidłowym przebiegu procesu steroidogenezy w komórkach Leydiga gonady niedojrzałej i dojrzałej oraz w tworzeniu lokalnego środowiska tkanki interstycjalnej z udziałem telocytów. Zrozumienie mechanizmów komórkowych, molekularnych i epigenetycznych leżących u podstaw działania ERR i/lub GPER w gonadzie jest niezwykle istotne dla przewidywania i zapobiegania zaburzeniom steroidogenezy, jak i spermatogenezy.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

The presence of estrogens in the male reproductive system is a physiological condition. However, during testis development, mature functioning, and aging, the balance between androgens and estrogens needs to be maintain. The estrogen-controlled processes in cells and tissues that occur *via* action of classical estrogen receptors (ERs). In addition, recent data confirmed that estrogen-related receptors (ERRs) and G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) are also involved in estrogen signaling. The aim of this study was to elucidate the meaning and impact of estrogen signaling through ERR and GPER on the physiology of the immature and mature testicular interstitial tissue of rodents and boars.

To understand estrogen signaling mechanism with the involvement of respective receptors, *in vivo* study in the mature bank voles (*Myodes glareolus*) and the immature, mature and aging common inbred mice strains C57BL/6, and *ex vivo* study with the use of testis fragments of immature boars (Polish Large White) were performed. Apart from this, mouse Leydig cells (MA-10) were used for *in vitro* study. The experiments were based on the use of several antagonists e.g. ERR α (XCT790) and GPER (G-15) along with agonist e.g. ERR β / γ (DY 131) as well as 17 β -estradiol, antiestrogen (ICI 162,780), and xenoestrogens [bisphenol A (BPA), tetrabromobisphenol A (TBBPA), and tetrachlorobisphenol A (TCBPA)]. These pharmacological compounds were used alone or in combinations. The dosage of particular compounds was standardized based on literature and previous experiments.

For the studies cellular (light and electron microscopy), molecular and biochemical analyses that investigate cyto/histology as well as gene expression at both mRNA and protein levels (qRT-PCR, Western blot) were used. Protein localization and protein/signaling molecule tissue concentration were performed using immunocyto/histochemical, immunofluorescence analyses in the interstitial tissue of bank voles, mice, and boars. Electron microscopic analysis revealed that blocking or activation of ERR and GPER resulted in ultrastructural changes in Leydig cells and hypertrophy of the interstitial tissue. The disturbance of estrogen signaling and/or exposure to xenoestrogens led to an increase in collagen expression, calcium (Ca^{2+}) and relaxin (RLN) concentration in the interstitial tissue. It was revealed that disturbed ERR signaling in bank voles, affected the steroidogenic and secretory function of Leydig cells by modulating the expression of luteinizing hormone receptor (LHR), steroidogenic acute regulatory protein (StAR), translocator protein (TSPO), insulin-like peptide 3 (INSL3) and RLN, along with changes in Ca^{2+} and cAMP concentration. Whereas in mice of various age, GPER blockage affected the level of *ER* and *cytochrome P450 aromatase (P450arom)* expression, which negatively impacted steroidogenesis in Leydig cells. Analyses of the interstitial tissue by electron microscope revealed the presence of telocytes and their localization in groups after blocking of GPER, that correlated with an increase in expression of telocyte marker (CD34) in mouse testis. In addition, an increase in ERR expression was found. On the other hand, in the testis of immature boars, the administration of xenoestrogens and/or G-15 resulted in perturbations of steroidogenesis through epigenetic mechanisms involving molecules that control miRNA biogenesis and function, e.g. DICER, DROSHA, ARGONAUTE 2 (AGO2) and EXPORTIN 5 (EXPO5).

In conclusion, the role of ERR and GPER in the interstitial tissue cells was demonstrated for the first time in bank vole, mouse and boar testis. Based on the obtained data it could be summarized that estrogen signaling with the implication of ERR and GPER effects on the maintenance of normal histology of the interstitial tissue and cell ultrastructure. It should be emphasized that signaling by ERR and GPER plays also a pivotal role in Leydig cell steroidogenesis and the creation of the local environment of interstitial tissue involving telocytes in immature and mature gonads. Understanding the cellular, molecular, and epigenetic mechanisms underlying ERR and/or GPER action in the gonad is extremely important for predicting and preventing steroidogenesis and spermatogenesis disorders.

