

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 28, 2001

Suplement nr 18

Redaktorzy: L. Bablok, J. Polkowska, L. Zwierzchowski

**ZAGADNIENIA ROZRODU
CZŁOWIEKA I ZWIERZĄT 2**

ASPECTS OF REPRODUCTION
IN HUMAN AND ANIMALS 2

Redaktorzy: J. Kawiak, Z. Osuchowska

**TRANSPLANTACJA KOMÓREK
CELL TRANSPLANTATION**

<http://rcin.org.pl>

Postępy
Biologii
Komórki

Advances
in Cell
Biology

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILINSKI – biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – developmental biology, embryology, cytoskeleton, cell junctions – *Inst. Zoologii UJ, 30-060 Kraków, Ingardena 6*

Lilla HRYNIEWIECKA – energetyka komórki, mitochondria – cell energetics, mitochondria – *Zakład Bioenergetyki, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*

Bożena KAMIŃSKA – neurobiologia, biologia molekularna – neurobiology, molecular biology – *Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*

Jerzy KAWIAK – immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – immunology, cytometry, hematology, cancer biology – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*

Wincenty KILARSKI – mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – muscles, muscle contraction, cell movements – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Maria OLSZEWSKA – komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – plant cells, genetic information in plant and animal cells – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*

Barbara PŁYTYCZ – immunologia – immunology – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Maciej ZABEL – histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – histology, endocrinology, histochemistry (immunocytochemistry, hybrydocytochemistry), cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 6a*

Jan ŻEROMSKI – patologia, immunologia, cytometria – pathology, immunology, cytometry – *Katedra i Zakład Immunologii AM 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49*

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 8340 344, fax 8340470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl.

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd. 19,0. Ark. druk. 15,25. Podpisano do druku w październiku 2001 r. Druk ukończono w listopadzie 2001 r.

WSTĘP

W dniach 5–8 czerwca 2001 r. odbył się w Warszawie II Krajowy Zjazd Towarzystwa Biologii Rozrodu. Biologia rozrodu obejmuje wiele różnorodnych zagadnień, w których postęp w ostatnich latach jest ogromny. Komitet Organizacyjny Zjazdu zaprosił szereg specjalistów do wygłoszenia referatów przeglądowych celem zapoznania uczestników Zjazdu z nowymi trendami w tych dziedzinach. Referaty wygłoszone zostały w czterech sekcjach zatytułowanych: "Rozród człowieka"; "Fizjologia rozrodu – mechanizmy neurohormonalne"; "Biochemiczne i molekularne mechanizmy rozrodu" oraz "Rozród zwierząt".

Dzięki życzliwości Redakcji "Postępów Biologii Komórki" możemy referaty te w całości przedstawić w obecnym suplemencie, za co serdecznie dziękujemy. Dziękujemy również wszystkim prelegentom za wygłoszenie referatów i przygotowanie ich do druku,

*Komitet Organizacyjny
II Zjazdu Krajowego Towarzystwa Biologii Rozrodu*

Część pierwsza
**ZAGADNIENIA ROZRODU
CZŁOWIEKA I ZWIERZĄT 2**

ASPECTS OF REPRODUCTION IN HUMAN AND ANIMALS 2

Redaktorzy: Leszek Bablok, Jolanta Polkowska, Lech Zwierzchowski

Sekcja: ROZRÓD CZŁOWIEKA
HUMAN REPRODUCTION

GENETYCZNE ASPEKTY ROZRODU CZŁOWIEKA

GENETIC ASPECTS OF MALE INFERTILITY

Maciej KURPISZ, Monika SZCZYGIEŁ, Ewa WILAND

Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Streszczenie: Czynnikiem genetycznym jest jedną z najbardziej prominentnych przyczyn eliminacji zarodków/płodów, a także tzw. spontanicznych poronień. Nadal wiele trudności technicznych sprawia prowadzenie tzw. diagnostyki pre-implantacyjnej, na poziomie chromosomów gamet. Programy pozaustrojowego zapłodnienia w warunkach *in vitro* powinny być otoczone szczególnie starannym nadzorem genetycznym. Podnosi się niebezpieczeństwo wzrostu występowania wad genetycznych, zależnych od wieku rodziców. Teratozoospermia jawi się jako bardzo skomplikowany diagnostycznie objaw trudny dla oceny genetycznej, jak i uzyskiwania satysfakcjonujących wyników terapeutycznych. (*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28 suppl. 18: 3-7)

Summary: Genetic factor appears as the most prominent cause for elimination of early embryos, fetuses and reason for spontaneous abortions. Still, there are technical difficulties for good pre-implantation diagnosis on chromosomal level in gametes. Artificial insemination *in vitro* has to be very carefully supervised and evaluated on genetic level. It is discussed the possible rise of genetic defects associated with the age of parents. Teratozoospermia seems to present complex diagnostic issue as well as the therapeutic challenge.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28 suppl. 18 : 3-7)

Ocenia się, że częstość aberracji chromosomowych w materiale zarodkowo-płodowym ulegającemu aborcji wynosi ok. 50%. Spośród tych poronień, w ok. 50-52% występują trisomie, monosomie chromosomu X w 15-24%, triploidie w 15-22%, aberracje strukturalne w 4-8%, a tetraploidie w 2-7%. Aberracje chromosomowe są stosunkowo rzadko obserwowane u noworodków, a częstość ich występowania w zygocie prawdopodobnie osiąga aż 40%. Aneuploidie występują aż w 70% aberracji chromosomowych, uwidoczniionych w wyniku aborcji spontanicznych – u noworodków można zaobserwować aberracje chromosomów płci oraz trisomie chromosomów pary 13, 18 i 21. Aneuploidie u człowieka wynikają z błędów w segregacji chromosomów macznych i ojcowskich oraz wadliwej gametogenezy. W modnej

ostatnio diagnostyce preimplantacyjnej, do oceny aberracji chromosomowych występujących w gametogenezie używa się dość skomplikowanych technik – penetracji plemników do oocytów innych gatunków (HOPA), hybrydyzacji *in situ* z zastosowaniem różnych znaczników, w tym często fluorescencji (FISH stosuje się zarówno w jądrach plemników, jak i oocytów), oceny ciałek kierunkowych oocytu oraz analizy morfologicznej, prowadzonej zarówno w oocytach, jak i wczesnych zarodkach. Analiza cytogenetyczna ujawniła stosunkowo wysoki odsetek aneuploidii w dojrzałych mejotycznie oocytach (niezapłodnionych), pozyskanych dla programu wspomaganego rozrodu (na 4000 oocytów aż 23% ujawniło aneuploidie [2]). W tym w oocytach, które nie uległy zapłodnieniu w programie pozaustrojowym IVF – w 12% ujawniono aneuploidie. W innych badaniach, obejmujących 648 oocytów (analizowanych metodą FISH), anomalie chromosomowe ujawniono w 208, tj. 32,1% [11].

Stosunkowo dużą trudność sprawia analiza cytogenetyczna plemników. Metoda HOPA (spontaniczne wnikanie plemników do k. jajowej innych gatunków) nie gwarantuje analizy wszystkich plemników, zwłaszcza patologicznych, nieruchomych i o obniżonym potencjale penetracyjnym. Metody mikromanipulacji oraz FISH (na jądrach o nierozplecionych chromosomach) są aktualnie intensywnie wykorzystywane, ale nie mogą zagwarantować całkowitego zakresu analizy cytogenetycznej. Różne grupy autorów analizują od kilkuset do najwyżej kilkunastu tysięcy plemników. W normozoospermicznej ejakulacie można oczekiwać 10–14% plemników z anomaliami chromosomowymi, w tym 1–4% aneuploidii oraz 3–13% aberracji strukturalnych [10]. W populacji nieplodnych pacjentów aberracje chromosomowe zdarzają się znacznie częściej i to zarówno wśród chromosomów plemnikowych (w ekstremalnej amorfii plemnikowej mogą one sięgać aż kilkadziesiąt procent), jak i chromosomów analizowanych w leukocytach krwi obwodowej. W badaniach prowadzonych w obrębie Zespołu Biologii Rozrodu, szczególnie dużo zmian chromosomowych uwidacznianych jest pod postacią 'markerów' chromosomowych w leukocytach; w analizowanych populacjach z nieplodnością idiopatyczną odsetek 'markerów' może dochodzić do 36% [12]. Z kolei zjawisko to wydaje się nie wpływać na funkcję zapłodnieniową plemników, ocenianą w teście penetracji ksenogenicznej komórki jajowej. U nieplodnych mężczyzn z zaburzeniami spermogramu, zaobserwowaliśmy wzmożony polimorfizm wśród chromosomów, należących do grupy akrocentrycznej. To z kolei prowadziło do obniżenia stopnia penetracji plemników (Wiland i wsp. 2001, dane niepublikowane). Szczególnie gorącą dyskusję wśród genetyków wzbudzają techniki wspomaganego rozrodu, zwłaszcza, uważana za pozaewolucyjną, technika bezpośredniej inseminacji plemnika do komórki jajowej (ICSI). Ta technika, szczególnie uważnie (z zabezpieczeniem w postaci diagnostyki prenatalnej) powinna być stosowana w przypadku rodziców ze stwierdzanymi translokacjami. W jednej z serii analizowanych 71 płodów, uzyskanych metodą ICSI, zaobserwowano 12,7% aberracji chromosomowych [8].

W innej, monitorowanej serii 423 żywo urodzonych noworodków stwierdzono u 14 (ok. 3%) wady i malformacje. Jednak nie wydaje się to być wysokim odsetkiem [3]. Co nie podlega dyskusji, to fakt zwiększania się aberracji chromosomów płci, które nie eliminują dalszego rozwoju zarodka/płodu [7]. Potwierdzają to liczne grupy innych autorów. Ponadto, w technice ICSI mogą być łatwo przenoszone wady genowe, zwłaszcza dotyczące zespołu Kartagenera, dystrofii mięśniowej, zwłóknienia torbielowatego (mukowiscydoza), zespołu Younga i innych, co sugeruje potrzebę zwiększonego dozoru genetycznego nad ciążami, uzyskiwanymi metodą wspomaganego rozrodu

W programach zapłodnienia pozaustrojowego, wysoki odsetek (prawie stuprocentowy) uzyskanych zapłodnień kontrastuje ze współczynnikiem ukończonych ciąż – 30%. Wiele defektów genetycznych może i powinno być wykrytych jeszcze przed urodzinami – przy pomocy mikrobiopsji kosmówki czy też w drodze amniocentezy. Najlepszym sposobem byłoby jednak badanie samego zarodka, przy wykorzystaniu jednego z blastomerów, jednak prążkowanie chromosomów metafazalnych na blastomerach przedstawia dużą trudność techniczną i udaje się tylko w 25–30%. Z tego względu do analizy cytogenetycznej stosuje się w coraz szerszym zakresie FISH, jakkolwiek jest to metoda zależna od udostępnianych sond molekularnych. Analizowano 250 zarodków (od zygoty do stadium 8-komórkowego) o różnej morfologii. W tej grupie częstość anomalii chromosomowych osiągnęła aż 49% [1]. Zauważono związek pomiędzy zaburzeniem morfologii zarodka a anomaliaми, ujawniającymi się na wczesnych stadiach rozwoju. W innych badaniach morfologicznie prawidłowych zarodków [4], tylko około 50% nie miało żadnych aberracji, a 30% wykazywało mozaicyzm chromosomowy. Wielokolorowy FISH wydaje się techniką z wyboru w ustalaniu aneuploidii na tym stadium rozwojowym.

Innym, intrygującym genetyków pytaniem jest fakt zależności powstawania wad genetycznych od wieku rodziców. Wykazano, że jakość plemników jest najwyższa począwszy od wieku pokwitania aż do osiągnięcia 30 roku życia (zmiana w waskularyzacji kanalików). Wiek ojcowski związany jest z pojawieniem się dominujących mutacji autosomalnych, jak np. achondroplazja, zespół Marfana, obustronna retinoplastoma, choroba Aperta, fibrodysplazja i inne. Po zbadaniu 7 500 noworodków zaobserwowano wady u 2% noworodków od 20-letnich ojców, u 2,4% od ojców 40-letnich, u 2,6% od ojców 50-letnich [6]. Zatem wzrost wad genetycznych uwidoczniony u żywo urodzonych jest niewielki. Oczywiście wraz z wiekiem dochodzi też do pogorszenia parametrów jajczkowania u kobiet – liczba potencjalnych, zdolnych do pozyskania pęcherzyków zmniejsza się, a ich jakość pogarsza. Faza folikularna skraca się i pre-owulacyjne pęcherzyki są mniejsze. Obserwując anomalie chromosomowe dotyczące XY, pary 13, 18 i 21 stwierdzono, że u 40-letnich kobiet tylko 37% zarodków (od zygoty do stadium ośmiokomórkowego) jest normalna [9]. Oczywiście, w oocytach u starszych kobiet widać tendencje do non-dysjunkcji wskutek błędów mejotycznych. Obserwuje się wzrost odsetka spontanicznych po-

ronień zależny od wieku: w wieku 35 lat – 16,1% poronień, w wieku lat 38–39 – ok. 29% i u kobiet starszych niż 42 lata aż 52% [5]. Wszystkie te dane dotyczą zapłodnień dokonanych metodą rozrodu wspomaganego.

W Zespole Biologii Rozrodu, szczególnie aktywnie badane jest genetyczne tło teratozoospermii, tj. u osobników nieplodnych o dużym odsetku plemników z wadami budowy. Oprócz dużej liczby wariantów chromosomowych, ujawnionych w leukocytach krwi obwodowej u takich osobników, badano mutacje w genach kodujących białko 4.1. pro-akrozyne i p53. Ujawniono duży odsetek polimorfizmów, zwłaszcza w dwóch ostatnich, analizowanych genach. Wyniki będą szczegółowo analizowane i dyskutowane w miarę uzyskiwania danych z sekwencjonowania zmienionych sekwencji badanych egzonów.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALMEIDA PA, BOLTON VN. The relationship between chromosomal abnormality in the human preimplantation embryo and development *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 1996; 2: 235–241.
- [2] VAN BLERKOM J. Origin and detection of chromosomal defects in human oocytes and embryos. Presented on International Symposium on Genetic of Gametes and Embryos, June 2–5, 1994.
- [3] BONDUELLE M, LEGEIN J, BUYSSE A, VAN-ASSCHE E, WISANTO A, DEVREY P, VAN STEIRTEGHEM AC, LIEABAERS I. Prospective follow-up study of 423 children born after intracytoplasmic sperm injection as a way of treatment. *Hum Reprod* 1996; 7: 1558–1564.
- [4] DELHANTY JD, HERPER JC, AO A, HANDYSIDE AH, WINSTON RM. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from infertile patients. *Hum Genet* 1997; 6: 755–760.
- [5] HEDON B, GALTIER-DEREURE F, DECHAUD H. Womens age and assisted medical procreation. [w] Hedon B, Bringer J, Mares P [red.] *Fertility and Sterility: A current overview: Proceedings of the 15th World Congress on Fertility and Sterility*. The Parthenon Publishing Group, New York, 1995: 379–385.
- [6] LIAN ZH, ZACK MM, ERICKSON JD. Paternal age and the occurrence of birth defects. *Am J Hum Genet* 1986; 39: 648–660.
- [7] MESCHEDE D, HORST J. Sex chromosome anomalies in pregnancies conceived through intracytoplasmic sperm injection: a case for genetic counseling. *Hum Reprod* 1997; 2: 1125–1127.
- [8] MESCHEDE D, LOUWEN F, EIBEN B, HORST J. Intracytoplasmic sperm injection pregnancy with fetal trisomy 9p resulting from a balanced paternal translocation. *Hum Reprod* 1997; 12: 1913–1914.
- [9] MUNNE S, ALIKANI M, TOMKIN G, GRIFO J, COHEN J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995; 2: 382–391.
- [10] SZCZYGIEL M, KURPISZ M. Chromosomal anomalies in human gametes and preimplantation embryos and their potential effect on reproduction – a review. *Andrologia* 2001, w druku.

- [11] VERLINSKY J, CIEŚLAK J, FREIDINE M, IVAKHNENKO V, WOLFG, KOVALINSKAYA L, WHITE M, LIFCHEZ A, KAPLAN B, MOISE J, VALLE J, GINSBERG N, STROM C, KULIEV A. Polar body diagnosis of common aneuploidies by FISH. *J Assist Reprod Genet* 1996; 2: 157–162.
- [12] WILAND E, BARCZYK A, WOJDA A, JĘDRZEJCZAK P, LATOS-BIELEŃSKA A, KURPISZ M. Semen parameters, sperm penetration assay (SPA) and chromosome aberrations in males with idiopathic infertility. [W] *In vitro* fertilization and assisted reproduction. *Monduzzi Editore S.p.A.*: Bologna 1997: 923–929.

*Adres autorów: Zakład Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań*

WPŁYW OTYŁOŚCI I WIEKU NA WYNIKI STYMULACJI OWULACJI

EFFECTS OF OBESITY AND AGE ON THE RESULTS OF OVULATION INDUCTION

Longin MARIANOWSKI, Barbara GRZECHOCIŃSKA

I Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: Stymulacja owulacji jest bardzo ważnym etapem w całym procesie leczenia niepłodności. Podstawowym celem jest uzyskanie jednego lub kilku prawidłowych oocytów. Efekty leczenia mogą być zależne od wielu różnych czynników. Do najczęściej wymienianych i których znaczenie dla wyników stymulacji jest wciąż dyskutowane, należy otyłość i wiek. Otyłość może być objawem istniejącej endokrynopatii (zespół PCO) lub nieodpowiedniego odżywiania się. U kobiet otyłych częściej stwierdzane są zaburzenia owulacji związane z wydzielaniem, transportem i metabolizmem hormonów. Otyłość sama w sobie nie jest jedynym czynnikiem przyczynowym zaburzeń owulacji i niepłodności. Wiele kobiet otyłych ma prawidłowe cykle owulacyjne i zachodzi w ciążę. Istotne jest rozmieszczenie tkanki tłuszczowej. Otyłość typu androidalnego dodatkowo koreluje z zaburzeniami miesiączkowania, ujemnie z płodnością. Po 35 roku życia dość znacznie obniża się płodność kobiety. Wyniki prac dotyczących stymulacji owulacji u kobiet około 40 roku życia nie są jednoznaczne. Niektórzy autorzy wskazują, że wiek ma wpływ na wyniki stymulacji i liczbę pobranych oocytów, inni nie widzą takiej zależności. Być może odgrywają tutaj rolę inne czynniki, nie będące przedmiotem analizy. W niektórych pracach przewija się opinia, że efekty stymulacji zależne są bardziej od wieku biologicznego niż chronologicznego. Wydaje się, że należy w każdym przypadku dokładnie ocenić stan ogólny kobiety, dokonać wstępnej oceny odpowiedzi na stymulację oraz ocenić szansę na rozwój ciąży.
(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28 supl. 18: 9–15)

Słowa kluczowe: niepłodność, stymulacja owulacji, otyłość

Summary: There are various factors affecting the results of controlled ovarian stimulation. Obesity and age of the patients are being considered as important contributors in this treatment. In obese women hormonal disorders occur more frequently than the normal weight women. There is a correlation between the menstrual disorders as well as infertility and androidal type of obesity. Fertility significantly decreases in women above 35 years of age. This may be associated with the lower number of oocytes retrieved in this group after the routine ovulation protocols. However further studies are required to confirm these data. (*Advances in Cell Biology* 2001; 28 suppl. 18 : 9–15)

Key words: infertility, ovarian stimulation, obesity

Stymulacja owulacji jest bardzo ważnym etapem w procesie leczenia niepłodności. Podstawowymi wskazania do stymulacji są brak lub nieregularne występowanie cykli, w których ma miejsce jajczkowanie. Problemy te dotyczą około 10% niepłodnych małżeństw. Przyczynę braku jajczkowania mogą stanowić niewydolność lub dysfunkcja układu podwzgórzowo-przysadkowego, hiperprolaktynemia oraz niewydolność jajników.

Podstawowym celem indukcji owulacji jest uzyskanie optymalnie jednego pęcherzyka i jednej komórki jajowej w każdym stymulowanym cyklu. W większości ośrodków zajmujących się leczeniem niepłodności przerywa się stymulację, jeżeli dojdzie do rozwoju więcej niż trzech pęcherzyków o średnicy powyżej 16 mm (w nielicznych ośrodkach stosujących bardziej agresywne metody stymulacji – 6 pęcherzyków) [2]. Takie postępowanie zapobiega rozwojowi ciąży wielopłodowych, które ze względu na występowanie licznych powikłań pogarszają wyniki leczenia niepłodności w aspekcie *take home baby*.

W przypadku stosowania metod zapłodnienia pozaustrojowego, bez względu na przyczynę niepłodności, celem stymulacji owulacji (hiperstymulacji) jest uzyskanie pewnej liczby prawidłowych oocytów. Wyniki leczenia zależą od odpowiedzi jajników na podawane leki hormonalne. Odpowiedź z kolei stanowi odzwierciedlenie funkcji jajników lub tak zwanej rezerwy jajnikowej. W przypadku złej odpowiedzi każdy stosowany protokół stymulacji bądź hiperstymulacji jajników jest przedmiotem rozważań i często nie można w sposób jednoznaczny odpowiedzieć na pytanie, co jest tego powodem.

Efekty leczenia mogą być zależne od wielu różnych, przeplatających się wzajemnie czynników głównie od:

- przygotowania pacjentki do stymulacji (właściwa kwalifikacja, tj. ocena stanu zdrowia i stwierdzenie braku przeciwwskazań oraz wykonanie podstawowych badań diagnostycznych),
- zastosowania odpowiedniego protokołu leczenia (schematu podawania leków oraz odpowiednich dawek leków),
- rzetelnego monitorowania ultrasonograficznego i hormonalnego,
- przebiegu całego procesu stymulacji,
- innych, nie poznanych jeszcze czynników, które sprawiają, że kobiety zaliczane są do grupy źle odpowiadającej na leczenie.

Na każdy z wymienionych elementów i etapów przebiegu indukcji owulacji mają wpływ czynniki ogólnoustrojowe. Nierozpoznanie wyżej wspomnianych nieprawidłowości oraz niewykonanie podstawowych badań hormonalnych może w negatywny sposób wpłynąć na wyniki stymulacji i hiperstymulacji (brak odpowiedzi), zwiększyć liczbę powikłań (zespół hiperstymulacji). Przy tym należy zaznaczyć,

że stymulację prowadzi się zwykle u kobiet w dobrym stanie fizycznym i psychicznym. U kobiet poddanych temu leczeniu wpływ czynników ogólnoustrojowych zarówno na efekty leczenia, jak i powikłania jest wciąż dyskutowany.

Kobiety z chorobami ogólnoustrojowymi poddawane są leczeniu stymulującemu jajczkowanie, jeśli nie ma przeciwwskazań internistycznych i stan funkcjonalny chorego narządu jest wyrównany. Takich kobiet jest bardzo mało. Nie ma w związku z tym w dostępnej literaturze opracowań dotyczących kobiet chorych. Zwraca się natomiast uwagę na takie czynniki, jak: masa ciała i wiek.

OTYŁOŚĆ A WYNIKI STYMULACJI OWULACJI

Leczenie niepłodności u kobiet otyłych jest trudnym problemem. Może być ona objawem istniejącej endokrynopatii (zespół PCO) lub nieodpowiedniego odżywiania się. U kobiet otyłych częściej stwierdzane są zaburzenia owulacji związane z wydzielaniem, transportem i metabolizmem hormonów (zwiększona produkcja androgenów w jajnikach i nadnerczach, zaburzenia wydzielania gonadotropin, zmniejszenie stężenia SHBG, zwiększenie obwodowej aromatyzacji androgenów).

Otyłość sama w sobie nie jest jedynym czynnikiem przyczynowym zaburzeń owulacji i niepłodności. Wiele kobiet otyłych ma prawidłowe cykle owulacyjne i zachodzi w ciążę. Niezwykle istotne jest rozmieszczenie tkanki tłuszczowej. Otyłość typu androidalnego dodatnio koreluje z zaburzeniami miesiączkowania, ujemnie z płodnością. Natomiast kobiety, u których tkanka tłuszczowa rozmieszczona jest głównie w okolicach pośladków i ud, mają najczęściej prawidłowe cykle miesiączkowe.

U kobiet otyłych często stymulację owulacji rozpoczyna się od podawania cytrynianu klomifenu. Shepard i wsp. [12] stwierdzili, że skuteczne dawki klomifenu powinny zależeć od masy ciała. W wyniku przeprowadzonej analizy regresji stwierdzili liniową zależność pomiędzy dawką klomifenu a masą ciała kobiet, które odpowiedziały na stymulację. Praca jest dosyć stara, pochodzi sprzed 20 lat (1979). Natomiast Polson i wsp. [9] w pracy z 1989 roku stwierdzili, że kobiety z nadwagą, które źle odpowiedziały na stymulację 100 mg klomifenu, nie będą miały owulacji również wtedy, gdy zwiększy się dawkę.

Zasadniczo nie stwierdza się różnic pomiędzy indeksem masy ciała a odsetkiem ciąż po IVF. Zwraca się natomiast uwagę na androidalne rozmieszczenie tkanki tłuszczowej [13]. Współczynnik talia:biodro większy od 0,8 związany jest z mniejszą liczbą pozyskiwanych oocytów oraz oocytami gorszej jakości. Oba te elementy, jak również możliwość zmian funkcjonalnych endometrium mogą wpływać na odsetek implantacji.

Lashen i wsp. [7] oceniali wpływ masy ciała na wyniki hiperstymulacji i IVF. Porównywali uzyskane wyniki w grupie kobiet otyłych (BMI>27,9) z grupą kontrolną oraz w grupie kobiet z nadwagą (BMI 19–25) z grupą kontrolną. U kobiet otyłych stwierdzono niższe maksymalne stężenie estradiolu, nie było różnic dotyczących długości podawania gonadotropin, liczby pęcherzyków, liczby oocytów oraz odsetka ciąży i implantacji.

Lanzone i wsp. [6] przeprowadzili badania indukcji owulacji u kobiet z zespołem PCO z otyłością i prawidłową masą ciała. Porównywali stosowanie GnRH i FSH oraz samego FSH. Wyniki badań wykazały, że kobiety otyłe wymagają dłuższego czasu stymulacji i wyższych dawek gonadotropin, niezależnie od zastosowanego protokołu. Otyłość typu androidalnego jest dość powszechnie występującym objawem zespołu PCO. Dotyczy 40–50% kobiet i często związana jest z obwodową insulinoopornością i wynikającą z niej hiperinsulinemią [1]. Stwierdzono, że leczenie metforminą kobiet z zespołem PCO i hiperinsulinemią istotnie zmniejsza zarówno stężenie insuliny i testosteronu w surowicy krwi [5], jak również masę ciała (o 13%) u otyłych kobiet [4]. Nestler i wsp. [8] oceniali działanie metforminy w zespole PCO. Badanie przeprowadzono w grupie 61 kobiet z oligomenorrhea. Po wykonaniu testu tolerancji glukozy podawano cytrynian klomifenu w dawce 50 mg/dobę przez 5 dni oraz losowo albo metforminę (500 mg 3 razy dziennie), albo placebo. Owulacje stwierdzono u 19 z 21 kobiet leczonych metforminą i 3 z 26 kobiet, którym podawano placebo. Wyniki pracy wskazują na związek między insuliną i owulacją. Wciąż jednak nie wiadomo, czy wzrost częstości owulacji jest związany ze wzrostem liczby ciąży oraz jakie jest niekorzystne działanie insuliny.

WIEK A WYNIKI STYMULACJA OWULACJI

Maksymalna płodność kobiety przypada na 20–25 rok życia. Następnie obniża się, znacznie po 35 roku życia. Wyniki prac dotyczących stymulacji owulacji u kobiet około 40 roku życia nie są jednoznaczne. Niektórzy autorzy wskazują, że wiek ma wpływ na wyniki stymulacji i liczbę pobranych oocytów, inni nie widzą takiej zależności. Być może odgrywają tutaj rolę inne czynniki, nie będące przedmiotem analizy. W niektórych pracach przewija się opinia, że efekty stymulacji zależne są bardziej od wieku biologicznego niż chronologicznego. Jednak wiadomo, że wraz z wiekiem zmniejsza się rezerwa jajnikowa.

Wraz z wiekiem ulega zmniejszeniu liczba pęcherzyków pierwotnych w jajnikach. Wynosi 1 mln po urodzeniu, 250 tys. w wieku pokwitania. Stopniowe zmniejszanie się liczby pęcherzyków ulega przyśpieszeniu około 37 roku życia, na 10–12 lat przed menopauzą. Istnieją duże indywidualne różnice związane z odpowiedzią na prowadzone leczenie. Trudno jest niejednokrotnie przewidzieć, które z kobiet źle

odpowiedzą. Pomocne w tym względzie może okazać się badanie stężenia FSH w 2–3 dniu cyklu. U kobiet w wieku powyżej 38 lat oraz u tych, które źle odpowiedziały na hiperstymulację w poprzednich cyklach, przy stężeniu FSH powyżej pewnego progu (progowe stężenie określone jest przez dany ośrodek prowadzący IVF, na ogół wynosi 12 mIU/ml) nie należy spodziewać się dobrej odpowiedzi. W takich przypadkach nie powinno się prowadzić stymulacji. Należy powtórzyć badanie FSH w następnym cyklu i tylko wtedy indukować owulację, jeżeli wartość stężenia FSH w surowicy krwi będzie prawidłowa.

Powyżej wspomniano o wpływie podwyższonych stężeń FSH na wyniki stymulacji. Może przy tej okazji warto wspomnieć, że wysokie stężenie FSH na początku cyklu nie zawsze jest czynnikiem złym rokowniczo. Wyższe stężenia FSH w surowicy krwi można stwierdzić u kobiet z jednym jajnikiem. Porównywano [3] 140 cykli IVF u kobiet z jednym jajnikiem z 985 cyklami kobiet z dwoma jajnikami. Stwierdzono znamienne wyższe stężenia FSH u kobiet z jednym jajnikiem, ale w obu grupach uzyskano tyle samo oocytów i ciąż.

U kobiet starszych, u których stosuje się zabiegi wspomaganego rozrodu, dawka dobową FSH jest często większa niż u kobiet w młodszym wieku.

Pomocny w ocenie odpowiedzi na stymulację może być test z cytrynianem kłomifenu. Obniżone stężenie FSH 10 dnia cyklu po podaniu 100 mg cytrynianu kłomifenu w 5–9 dniu cyklu świadczy o obniżonej rezerwie jajnikowej. Podwyższone stężenie FSH może być wynikiem obecności pęcherzyków po rekrutacji i bardziej określa ich wielkość i jakość niż rezerwę jajnikową.

W diagnostyce złej, związanej z wiekiem odpowiedzi na stymulację bierze się pod uwagę również objętość jajników (pomiary ultrasonograficzne). Zmniejsza się ona wraz z wiekiem. Stwierdzenie obecności małych jajników (o objętości mniejszej niż 3 cm sześciennie) w obrazie USG jest złym czynnikiem prognostycznym dla wyników hiperstymulacji.

Sharma i wsp. [11] przeprowadzili analizę 2232 cykli, stwierdzili związane z wiekiem progresywne zmniejszanie się średniej liczby pozyskanych oocytów, zapłodnień i transferowanych zarodków. Zmniejszenie liczby oocytów związane było ze zmniejszeniem rezerwy jajnikowej (więcej pęcherzyków atretycznych), natomiast mniejsza liczba zapłodnień wiąże się z częściej występującymi nieprawidłowościami chromosomalnymi.

Nieco inne wyniki uzyskali Segal i Casper [10]. Badali oni odpowiedź na hiperstymulację u 25 kobiet starszych niż 35 lat i porównywali z odpowiedzią 48 kobiet młodszych niż 35 lat biorących udział w programie IVF. U kobiet starszych maksymalne stężenie estradiolu było proporcjonalne do liczby użytych ampułek HMG i nie różniło się od odpowiedzi u kobiet młodszych. Podobna również była liczba pęcherzyków o średnicy większej od 1 cm, liczba oocytów oraz zapłodnień. Natomiast w grupie starszych pacjentek uzyskano mniejszą liczbę ciąż. We wnioskach autorzy stwierdzili, że kobiety starsze podobnie odpowiadają na hiperstymulację jajników

jak kobiety młodsze, natomiast mniejszą liczbę rozwijających się ciąży wiązać należy z obniżonym odsetkiem zagnieżdżeń związanych albo z czynnikiem endometrialnym, albo wzrostem liczby zarodków z nieprawidłowościami chromosomalnymi (aneuploidia).

PODSUMOWANIE

Zarówno otyłość (szczególnie typu androidalnego), jak i wiek są istotnymi czynnikami wpływającymi na wyniki stymulacji owulacji. W każdym przypadku należy indywidualnie kwalifikować kobietę do stymulacji biorąc pod uwagę jej stan ogólny, stan narządu rodniego, stan hormonalny i inne czynniki, które pozwolą na wstępną ocenę odpowiedzi na stymulację. W wielu przypadkach zalecenie zmniejszenia masy ciała przez dietę i ćwiczenia fizyczne czy też stosowanie metforminy mogą przyczynić się do polepszenia efektów leczenia, zwiększyć jego skuteczność i obniżyć koszty. Ważne jest również to, aby dokonać próby wstępnej oceny szans na urodzenie dziecka. Spojrzeć na wyniki stymulacji jajczkowania pod kątem ogólnych szans na ciążę. Wiadomo na przykład, że kobiety starsze, mające prawidłowe poziomy hormonów i prawidłowe wyniki testu z cytrynianem klomifenu, nadal mają mniejsze szanse na ciążę z powodu gorszej jakości oocytów.

PIŚMIENNICTWO

- [1] FRANCS S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1995; **333**: 853–861.
- [2] GLEICHER N, OLESKE DM, TUR-KASPA I et al. Reducing the risk of high-order multiple pregnancy after ovarian stimulation with gonadotrophins. *N Engl J Med* 2000; **343**: 2–7.
- [3] KHALIFA E, TONER JP, MUASHER SJ et al. Significance of basal follicle-stimulating hormone levels in women with one ovary in a program of *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1992; **57**: 835–839, *Fertil Steril* 1992; **58**: 458.
- [4] KOŁODZIEJCZYK B, SPACZYŃSKI R, KUBIACZYK B et al. Effects of metformin therapy and weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Polish J Gynaecol Invest* 1999; **1**: 141–146.
- [5] KOŁODZIEJCZYK B, DULEBA A, SPACZYŃSKI R, PAWELCZYK L. Metformin therapy decreases hyperandrogenism and hyperinsulinemia in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000; **73**: 1149–1154.
- [6] LANZONE A, FULGHESU AM, ANDREANI CL et al. Correlation between body weight and pure FSH dosage in the induction of ovulation in patients with polycystic ovary disease (PCOD). *Infertility* 1988; **11**: 103–106.
- [7] LASHEN H, LEDGER W, BERNAL AL, BARLOW D. Extremes of body mass do not adversely affect the outcome of superovulation and in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1999; **14**: 712–715.

- [8] NESTLER JE, JAKUBOWICZ DJ, EVANS WS, PASQUALI R. Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1998; **338**:1876–1880.
- [9] POLSON DW, KIDDY DS, MASON HD et al. Induction with clomiphene citrate in women with polycystic ovary syndrome: the difference between responders and nonresponders. *Fertil Steril* 1989; **51**: 30–34.
- [10] SEGAL S, CASPER RF. The response to ovarian hyperstimulation and in-vitro fertilization in women older than 35 years. *Hum Reprod* 1999; **5**: 255–257.
- [11] SHARMA V, RIDDLE A, MASON BA et al. An analysis factors influencing the establishment of a clinical pregnancy in an ultrasound based ambulatory *in vitro* fertilization program. *Fertil Steril* 1988; **49**: 468–478.
- [12] SHEPARD MK, BALMACEDA JP, LELIA CG. Relationship of weight to successful induction of ovulation with clomiphene citrate. *Fertil Steril* 1979; **32**: 641–645.
- [13] WASS P, WALDENSTROM U, ROSSNER S, HELLBERG D. An android body fat distribution in females impairs the pregnancy rate of in-vitro fertilization-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999; **12**: 2057–2060.

*Adres autorów: I Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii AM w Warszawie,
02-015 Warszawa, Pl. Starynkiewicza 1/3*

OCENA JAKOŚCI LUDZKICH ZARODKÓW W PROGRAMIE LECZENIA NIEPŁODNOŚCI METODĄ POZAUSTROJOWEGO ZAPŁODNIENIA

ASSESSMENT OF HUMAN EMBRYOS QUALITY IN IVF-ET PROGRAMME

Sławomir WOŁCZYŃSKI

Zakład Endokrynologii Ginekologicznej Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie: Wyniki leczenia niepłodności metodą pozaustrojowego zapłodnienia pozostają stale niskie. Większość ośrodków IVF-ET przenosi dwa – trzy wybrane zarodki w drugim dniu hodowli w stadium czterech blastomerów. Ocena jakości takich zarodków dokonywana jest na podstawie cech morfologicznych i tempa podziałów komórkowych. Jednakże zarodki o prawidłowym wyglądzie morfologicznym i podziałach, wybrane według tych kryteriów mogą być nieprawidłowe cytogenetycznie i nie będą implantowały w jamie macicy. Głównym wyzwaniem współczesnej medycyny rozrodu jest opracowanie metod pozwalających na uzyskanie i identyfikację zarodków o pełnym potencjale rozwojowym i implantacyjnym. W artykule autor przedstawił strategię oceny jakości zarodków w czasie całego ich rozwoju przedimplantacyjnego: ocenę komórki jajowej, stadium przedjądrzy, dzielących się zarodków, blastocysty. W przyszłości tak wybrane do transferu zarodki powinny doprowadzić do wysokiego odsetka ciąży i niskiego wskaźnika ciąży mnogich. Można mieć nadzieję, że transfer jednego zarodka w programach IVF-ET stanie się rzeczywistością.

(Postępy Biologii Komórki 2001; 28 supl. 18: 17–24)

Słowa kluczowe: ludzkie zarodki, zygota, blastocysta, ocena ludzkich zarodków.

Summary: The overall live birth rates following IVF- ET treatment have remained low. Most of IVF-ET centres replace two – three selected embryos on the second day of culture at the 4 cells stage. The assessment of embryos in this stage is based on: key morphological features and cleavage rate. The quality of replaced embryos and their potential for implantation are of considerable importance. The embryos which appear to be good and show appropriate morphological grade and growth will be selected for transfer on this basis, however in fact it will be cytogenetically abnormal and may contribute to implantation failure. The main challenges of current medicine of reproduction is to elaborate methods in order to optimise conditions of obtaining and identifying embryos with full developmental and implantation potential. In this article the author presents the strategy of sequential assessment of the quality of embryos in IVF-ET programme i.e. assessment of oocytes, pronuclear stage embryos, cleavage stage

embryos and blastocysts stage. In the future the embryos selected in this way probably should give acceptable pregnancy rate and low incidence of multiple pregnancy rate. The single embryo transfer in IVF-ET programmes will hopefully become reality.

(*Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18 :17-24*)

Key words: human embryos, zygotes, blastocysts, scoring of human embryos.

Ocena jakości ludzkiego przedimplantacyjnego zarodka i jego potencjału rozwojowego wzbudza ogromne zainteresowanie klinicystów, biologów, filozofów i etyków. Ludzkie zarodki mają ograniczone możliwości rozwojowe. W cyklach naturalnych współczynnik ciąży u człowieka nie przekracza 23% [4, 19, 12, 16].

Oznacza to, że *in vivo* tylko ograniczony odsetek zarodków jest w stanie dokonać pełnego rozwoju przedimplantacyjnego i pomyślnie zagnieździć się w jamie macicy. Obecnie stosowane w klinice metody leczenia niepłodności z zastosowaniem stymulacji mnogiego jajczkowania i zapłodnienia pozaustrojowego doprowadzają do uzyskania kilku zarodków o generalnie nieznanym potencjale rozwojowym. Przeniesienie do jamy macicy dwóch zarodków prowadzi do uzyskania 28–32% ciąży na transfer [4,12,14,16]. Zwiększanie liczby transferowanych zarodków zwiększa wprawdzie szansę na ciążę, ale niebezpiecznie zwiększa ryzyko ciąży wielopłodowych i powikłań położniczo-neonatologicznych [9, 16].

Wyzwaniem współczesnej medycyny rozrodu jest opracowanie takich metod stymulacji jajczkowania, hodowli ludzkich zarodków i oceny ich potencjału rozwojowego, aby w przyszłości przenosić do jamy macicy jeden zarodek i uzyskiwać zadowalające wyniki leczenia niepłodności. Zaproponowano bardzo wiele metod oceny możliwości rozwojowych ludzkich zarodków. Zastosowanie w praktyce klinicznej wymaga, aby były one bezinwazyjne, mało kosztowne i nie wymagały zbyt dużo czasu na wykonanie. Ustalili się już poglądy, że rozwój przedimplantacyjny ludzkiego zarodka jest procesem ciągłym, wieloetapowym, na którym dokonują się podziały blastomerów, uruchomienie transkrypcji genomu zarodka, różnicowanie na komórki trofoblastu i wężła zarodkowego [6,10,17].

W pracy przedstawiono dotychczasowe próby oceny potencjału rozwojowego przedimplantacyjnych zarodków ludzkich z wykorzystaniem oceny komórki jajowej, zygoty, wczesnego zarodka, blastocysty.

OCENA KOMÓRKI JAJOWEJ

Komórka jajowa zawiera materiały niezbędne w rozwoju zarodkowym co najmniej do stadium 4–8 blastomerów. Jakość komórki jajowej w dużym stopniu decyduje o tym, jak zarodek będzie się rozwijał i jaki będzie jego potencjał rozwojowy. Ocena komórki jajowej w klasycznym programie pozaustrojowego zapłodnienia jest pośrednia. Morfologiczny wygląd kompleksu wzgórek jajonośny-wieniec pro-

mienisty, stopień rozproszenia tych struktur i zmucyfikowania pozwala z dużym prawdopodobieństwem rozpoznać dojrzałe jądro komórki jajowej. Dokładniejszą ocenę umożliwi przygotowanie komórek do zabiegu ICSI. Komórki jajowe klasyfikujemy w zależności od dojrzałości jądrowej:

I GV – pęcherzyk zarodkowy zachowany – komórka jajowa niedojrzała jądrowo;

II GVB – pęcherzyk zarodkowy niewidoczny, w przestrzeni okołoośłtkowej brak pierwszego ciała kierunkowego;

III M II – dojrzała jądrowo komórka jajowa.

Dodatkowo, po usunięciu komórek otaczających, można ocenić morfologię komórki jajowej: kształt, ziarnistości, wakuole w cytoplazmie, kolor cytoplazmy, obecność fragmentów cytoplazmy w przestrzeni okołoośłtkowej, szerokość przestrzeni okołoośłtkowej, zmiany w kolorze, budowie i grubości osłonki przejrzystej, zmiany w wielkości i kształcie ciała kierunkowego. Wielu autorów opisywało związek między niepowodzeniami w zapłodnieniu, rozwojem zarodka, brakiem zagnieżdżenia a zmianami morfologii komórki jajowej. Nawet w takich komórkach udane zapłodnienie i rozwój zarodka o prawidłowych morfologicznie blastomerach związany był z małym odsetkiem implantacji, dużym odsetkiem poronień [4,16].

OCENA ZYGOTY

Pierwszymi łatwymi do obserwacji w 16–19 godzinie po zaplemnieniu objawami zapłodnienia jest obecność przedjądrza męskiego i żeńskiego. W prawidłowej zygocie przedjądrza pojawiają się w tym samym czasie, położone są centralnie w komórce, obok siebie, mają podobną wielkość. Zygoty, które mają przedjądrza różnej wielkości, w bardzo dużym odsetku wykazują nieprawidłowości chromosomalne. Podobne nieprawidłowości stwierdzano w zygotach z nieproporcjonalnie małymi przedjądrami. Ostatnio w badaniach dużą wagę przywiązuje się do oceny położenia ciałek kierunkowych i obecności ciałek prekursorowych jąderek w przedjądrazach (NPB), jako najbardziej miarodajnego wykładnika jakości rozwijającego się zarodka. Badania wymagają prowadzenia obserwacji z wykorzystaniem optyki kontrastowej Hoffmana lub Nomarskiego.

Tesarik i Greco [15] w badaniach retrospektywnych zaobserwowali zależność między potencjałem rozwojowym zarodka a wielkością, liczbą i rozmieszczeniem ciałek prekursorowych jąderek. Zarodki o wysokim potencjale rozwojowym i implantacyjnym charakteryzowały się na etapie zygoty obecnością 3–7 NPB. W obu przedjądrazach liczba NPB nie różniła się więcej niż o 3, prekursorzy jąderkowe były zawsze podobnej wielkości albo spolaryzowane (położone w jednej linii strefy łączenia się przedjądrzy) w obu przedjądrazach, albo niespolaryzowane w obu. Spolaryzowane położenie w jednym przedjądru, a niespolaryzowane w drugim, różnice

w wielkości prekursorów jąderek w znaczącym odsetku wykazują nieprawidłowości budowy morfologicznej, zatrzymują się w rozwoju i nie implantują w jamie macicy. Ciałka prekursorów jąderek w zygocie odzwierciedlają zjawiska zachodzące w przedjądrzach. Zygoty z licznymi małymi prekursorami jąderkowymi, z ich niesynchronicznym rozwojem prawdopodobnie opóźnione są w dojrzewaniu jądrowym, wykazują anomalie chromosomalne i ich potencjał rozwojowy jest niski.

Kolejnym kryterium jakości zarodka jest położenie ciałek kierunkowych w stosunku do przedjądrzy. Polaryzacja komórek jajowych jest wyraźnie widoczna u niższych gatunków. U ssaków i człowieka polaryzacja nie jest tak wyraźna, ale uważa się, że położenie pierwszego ciała kierunkowego wyznacza pole animalne, a drugiego – pole embrionalne. W ludzkich komórkach jajowych opisano różne rozmieszczenie wielu substancji i struktur komórkowych w cytoplazmie komórki jajowej, a nieprawidłowości w rozmieszczeniu wywierają wpływ na rozwój zarodka lub wręcz zatrzymują jego rozwój. Garello i wsp. [7] odnotowali różnice w rozwoju zarodka w zależności od położenia przedjądrzy w stosunku do ciałek kierunkowych. Kąt, mierzony między osią przechodzącą przez oba przedjądrza a osią przechodzącą przez najdalej położone ciało kierunkowe od osi do punktu łączącego oba przedjądrza, korelował z jakością zarodka. Kąt mniejszy od 50 stopni prognozował prawidłowy rozwój zarodka. Wzrost kąta ponad 50 stopni wiązał się z zaburzeniami rozwoju zarodka. Można przypuszczać, że zmiana kąta świadczy o zaburzeniach w rozmieszczeniu molekuł i organelli w komórce jajowej i źle rokuje co do dalszego rozwoju.

Kolejnym parametrem morfologicznym w ocenie możliwości rozwojowych na etapie zygoty jest wygląd cytoplazmy – obecność charakterystycznego halo wokół przedjądrzy związana jest z rozwojem prawidłowych zarodków. Taki obraz morfologiczny prawdopodobnie świadczy o rozmieszczeniu mitochondriów wokół przedjądrzy. Można zatem przypuszczać, że mimo formalnego rozdzielenia, na najwcześniejszym etapie embrionalnego rozwoju, materiału genetycznego matczynego i ojcowskiego, brak integralności i synchronicznego przygotowania obu przedjądrzy, nieprawidłowa polaryzacja komórki jajowej zapowiada z dużym prawdopodobieństwem niepowodzenie dalszego rozwoju przedimplantacyjnego i zdolności do zagnieżdżenia.

OCENA DZIELĄCEGO SIĘ ZARODKA WCZESNEGO

Najczęściej stosowana w klinice niepłodności metoda oceny jakości zarodka i jego potencjału rozwojowego stosuje kryterium morfologii zarodka w drugiej lub trzeciej dobie po zaplemnieniu – ocenia liczbę blastomerów, ich kształt i regularność, wielkość, obecność i stopień fragmentacji [1, 2, 3, 4, 12, 14, 16, 17]. Zarodki

o najwyższym potencjale rozwojowym w drugiej dobie mają cztery lub więcej blastomerów, wielkością odpowiadających podziałowi drugiemu lub trzeciemu, nie mają blastomerów wielojądrzastych, a fragmentacja nie przekracza 20%. Zarodki dzielące się szybciej mają większy potencjał rozwojowy, ale w ocenie zarodków o większej liczbie blastomerów należy różnicować, czy nie są to duże fragmenty cytoplazmy. Zrozumiałe jest, że ocena w trzeciej dobie jest dokładniejsza i świadczy o tym, iż zarodek może dokonać dalszych prawidłowych podziałów. W trzeciej dobie zarodki o najwyższych możliwościach rozwojowych powinny być ośmiolub więcej blastomerowe, a fragmentacja nie powinna przekroczyć 20% pola zajmowanego przez blastomery.

Powszechnie, w ocenie zarodków stosowana jest skala Cumminsa i wsp. [4], wyróżniająca 4 klasy zarodków i oceniająca je w punktacji od 4 do jednego, a w kumulacyjnej ocenie zarodka uwzględniająca liczbę blastomerów (ocena zarodka = punktacja według klasy x liczba blastomerów):

- Klasa I – równe blastomery, fragmentacja nie przekracza 10%, wartość punktacji według klasy – 4;
- Klasa II – nierówne blastomery, fragmentacja nie przekracza 20% lub równe blastomery, fragmentacja 10–30%, wartość punktacji według klasy – 3;
- Klasa III – nierówne blastomery, fragmentacja 30–50%, wartość punktacji według klasy – 2;
- Klasa IV – nierówne blastomery, fragmentacja powyżej 50%, wartość punktacji według klasy – 1.

Fragmentacja zachodzi w zarodkach rozwijających się i można ją uważać za cechę prawidłowego rozwoju, ale w zarodkach zatrzymanych w rozwoju proces fragmentacji nasila się. Fragmenty są strukturami niezależnymi od blastomerów, bezjądrowymi, otoczonymi błoną komórkową. W prawidłowej ocenie zarodka z fragmentacją należy, oprócz stopnia fragmentacji, ocenić jej typ [1, 2, 3, 13, 14, 17]. Wyróżniono 5 typów fragmentacji:

- I. fragmentacja jest minimalna (5% pola), związana z jednym blastomerem lub fragmentacją ciałek kierunkowych;
- II. fragmentacja nie przekracza 25% pola, fragmenty położone są w jednej linii, jest najczęściej wynikiem fragmentacji w jednym blastomerze;
- III. fragmenty są małe, rozrzucone po całym zarodku, ten typ występuje najczęściej;
- IV. fragmenty są różnej wielkości, część z nich naśladuje wielkością blastomery;
- V. fragmenty wykazują cechy nekrozy – występują ziarnistości i cytoplazma jest obkurczona.

Wyrzucenie poza blastomery dużych fragmentów cytoplazmy z mitochondriami, białkami, takimi jak: leptyna, STAT3, źle rokuje co do dalszego rozwoju zarodka [3].

Fragmentacja rzadko pojawia się już na etapie komórki jajowej i zygoty (2%), a najczęściej w czasie pierwszego i drugiego podziału. Wykazano, że 66% zarodków

z fragmentacją przekraczającą 35% wykazywało aberracje chromosomalne. W zarodkach, w których fragmentacja była mniejsza niż 35%, odsetek aberracji był z namiennie niższy i wynosił 47%. Wykazano, że stopień fragmentacji koreluje z mozaicyzmem chromosomalnym, poliploidią i haploidią, a nie z aneuploidią. Wiadomo, że u kobiet po 35 roku życia jakość zarodków obniża się. Wraz z wiekiem kobiety wzrasta odsetek zarodków z fragmentacją 0–5% i obniża się odsetek zarodków z fragmentacją powyżej 35%. Ponieważ fragmentacja jest procesem wymagającym energii, takie obserwacje świadczą o postępującej niewydolności systemu produkującego ATP i zmianach w cytoplazmie komórki jajowej [2].

OCENA BLASTOCYSTY

Wraz z postępem w metodach hodowli ludzkich zarodków do stadium blastocysty wzrasta zainteresowanie przenoszeniem do jamy macicy blastocyst [5, 6, 8, 9, 10, 16]. Być może w niedalekiej przyszłości przeniesienie jednej prawidłowej blastocysty do jamy macicy rozwiąże wiele problemów współczesnych technik rozrodu wspomaganego medycznie. W wyselekcjonowaniu blastocysty o największej zdolności implantacyjnej brany jest pod uwagę czas tworzenia się jamy blastocysty, morfologia wężła zarodkowego oraz komórek trofektodermalnych. Blastocysty o największym potencjale implantacyjnym rozwijają się w 5 dobie po zaplemnieniu.

Według Gardnera i Schoolcrafta [10] najlepsze blastocysty charakteryzują się dużą jamą blastocelu i większą objętością niż wcześniejsze stadia zarodkowe, wężel zarodkowy budują liczne komórki ściśle przylegające do siebie, trofektodermę budują również liczne przylegające do siebie komórki. Hodowla zarodka do blastocysty jest swoistą próbą biologiczną zatrzymującą w rozwoju część zarodków z nieprawidłowym kariotypem. Zarodki z brakiem chromosomów, niektórymi mozaikami zatrzymują się w rozwoju na etapie moruli, ale trisomie, poliploidie, niektóre mozaiki mogą kontynuować rozwój. Wykazano, że większość zarodków zatrzymanych w rozwoju ma duże nieprawidłowości chromosomalne. Przyczyn nieprawidłowości należy upatrywać w zaburzeniach oogenezy i mejozy. Nieprawidłowości postzygotyczne mogą być wynikiem niedostatecznej dojrzałości cytoplazmatycznej komórki jajowej. Zaburzenia budowy wrzeczona kariokinetycznego, cytoszkieletu komórki spowodowane jej niedojrzałością mogą w czasie mitoz i cytokinezy prowadzić do anomalii chromosomalnych. We wczesnych etapach rozwoju mechanizmy kontrolujące przebieg cyklu komórkowego w punktach kontrolnych nie funkcjonują lub funkcjonują mało sprawnie. Dopiero w dalszych etapach rozwoju embrionalnego uruchamianie punktów kontrolnych powoduje zatrzymanie w rozwoju i postępującą fragmentację zarodka z zaburzeniami kariotypu.

Duży odsetek anomalii chromosomalnych w rozwijających się zarodkach jest najbardziej uchwytną przyczyną obniżającą żywotność zarodków. Tylko przedimplantacyjna diagnostyka genetyczna umożliwia wyeliminowanie zarodków z nieprawidłowościami chromosomalnymi. Jak dotąd możliwe jest dokonanie jednoczesowe analizy z jednego blastomeru ośmiu par chromosomów z dokładnością 90%. Podobne możliwości stwarza biopsja pierwszego ciątka kierunkowego.

Jakie wnioski praktyczne wynikają z przedstawionych danych z piśmiennictwa i własnych?

Przez wiele lat traktowaliśmy rozwój zarodka bardzo statycznie. Dziś wiemy, że jego rozwój to bardzo dynamiczny wieloetapowy proces i aby uzyskać on zdolność do zaimplantowania w jamie macicy, wszystkie etapy jego rozwoju muszą się dokonać i przebiegać prawidłowo.

Pod względem zdolności implantacyjnych każdy zarodek powinien być oceniony indywidualnie. Przeprowadzenie prawidłowego wyboru zarodka do przeniesienia do jamy macicy wymaga zatem hodowli zarodka pojedynczo w kropli podłoża pod parafiną i hodowle powinny być oceniane często. Hodowle pod parafiną umożliwiają częste obserwacje bez narażania zarodka na uszkodzające warunki poza inkubatorem. Zgodnie z obecną wiedzą idealny zarodek do transferu powinien rozwijać się z komórki jajowej o regularnych kształtach, przedjądrza w 16–19 godzinie po zaplemnieniu powinny być typu O, w drugim dniu zarodek powinien być zbudowany z 4 regularnych blastomerów, nie może zawierać blastomerów wielojądrazdowych, fragmentacja nie powinna przekraczać 15% i wykazywać cech charakterystycznych dla IV typu fragmentacji. Nawet przy takiej ocenie odsetek zagnieżdżeń będzie poniżej 50% i co najmniej 30% zarodków będzie wykazywało nieprawidłowości chromosomalne. Wskazuje to na ograniczoną wartość wszystkich stosowanych dotychczas metod oceny jakości zarodków.

Wydaje się, że ten niekorzystny wynik biologiczny może zmienić tylko poprawa stymulacji jajeczkowania tak, aby komórki jajowe były lepiej dojrzałe cytoplazmatycznie, aby była lepsza selekcja plemników do zapłodnienia w celu zapobiegnięcia wniesieniu nieprawidłowej centrioli, stworzenia lepszych, bardziej optymalnych warunków hodowli, poznania i nauczenia się kontrolowania procesu przygotowania endometrium do implantacji. Wszystkie dotychczasowe obserwacje wskazują, że potencjał rozwojowy zarodka zdeterminowany jest już w stadium zygoty i warunki hodowli muszą ten potencjał utrzymać.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALIKANI M, COHEN J. Patterns of cell fragmentation in the human embryo. *J Assist Reprod Genet* 1995; **12**: 28S.
- [2] ALIKANI M, COHEN J, TOMKIN G et al. Human embryo fragmentation *in-vitro* and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 1999; **71**: 836–842.

- [3] ANTCZAK M, VAN BLERKOM J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod* 1999; **14**: 429–447.
- [4] CUMMINS M, BREEN TM, HARRISON KL, SHAW JM, WILSON LM, HENNESSEY JF. A formula for scoring human embryo - growth rates in *in vitro* fertilisation: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *In Vitro Fert Embryo Transf* 1986; **3**: 284–295.
- [5] DOKRAS A, SARGENT IL, ROSS C et al. The human blastocyst: morphology and human chorionic gonadotrophin secretion. *Hum Reprod* 1991; **6**: 1143–1151.
- [6] DOKRAS A, SARGENT IL, BARLOW DH. Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Hum Reprod* 1993; **8**: 2119–2127.
- [7] GARELLO C, BAKER H, RAI J et al. Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm mjection and *in-vitro* fertilisation: further evidence for polarity in human oocytes? *Hum Reprod* 1999; **14**: 2588–2595.
- [8] GARDNER R. The early blastocyst is bilaterally symmetrical and its axis of symmetry is aligned with the animal vegetal axis of the zygote in mouse. *Development* 1997; **124**: 289–301.
- [9] GARDNER DK, VELLA P, LANE M et al. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfer. *Fertil Steril* 1998b; **69**: 84–88.
- [10] GARDNER DK, LANE M, STEVENS J, SCHLENKER T, SCHOOLCRAFT WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000; **73**: 1155–1158.
- [11] GIORGETTI C, TERRIOU P, AUQUIER P et al. Embryo score to predict implantation after *in vitro* fertilisation: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod* 1995; **10**: 2427–2431.
- [12] MARTIN PM, WELCH HG. Probabilities for singleton and multiple pregnancies after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1998; **70**: 478–481.
- [13] MUNNE S, ALIKANI M, TOMKIN G et al. Embryo morphology developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995; **64**: 382–391.
- [14] STEER CV, MILLS CL, TAN SL, CAMPBELL S, EDWARDS RG. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an *in-vitro* fertilisation and embryo transfer programme. *Hum Reprod* 1992; **7**: 117–119.
- [15] TESARIK J, GRECO E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999; **14**: 1318–1323.
- [16] WOŁCZYŃSKI S. Przedimplantacyjny rozwój zarodków a kliniczne aspekty leczenia niepłodności metodą pozaustrojowego zapłodnienia. Rozprawa hab., Akademia Medyczna, Białystok. 1997.
- [17] VAN ROYEN E, MANGELSCHOTS K, De NEUBOURG D et al. Characterisation of top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999; **14**: 2345–2349.

Adres autora: Zakład Endokrynologii Ginekologicznej Akademii Medycznej
Białymstok, ul. M. Skłodowskiej-Curie 24a
e-mail-wolczynski@sitech.pl

GENETYCZNE PRZYCZYNY UTRATY WCZESNEJ CIĄŻY

GENETIC ASPECTS OF EARLY PREGNANCY LOSS

Jerzy Andrzej JAKOWICKI

II Katedra i Klinika Ginekologii Operacyjnej Akademii Medycznej w Lublinie

Streszczenie: Przedstawiono przegląd genetycznych aspektów poronień u kobiet w postaci: I. zaburzeń kariotypowych ocenianych cytogenetycznie w zakresie chromosomów oraz II. defektów molekularnych dotyczących jednego lub kilku genów ocenianych techniką analizy DNA. I. W zaburzeniach kariotypowych dotyczących chromosomów zarówno autosomalnych, jak i płciowych wyróżniono: 1) zaburzenia letalne niezależnie od płci występujące: a) w okresie przedimplantacyjnym, co dotyczy około 25% płodów, przy czym wielkość ta oparta jest głównie na badaniach w ramach programu IVF-ET; b) w I trymestrze pierwszej ciąży, kiedy ok. 5% poronionych płodów wykazuje anomalie chromosomalne, wśród których połowa to trisomie, podczas gdy triploidia i monosomia X nie przekraczają 10%, zaś tetraploidia – 2,5%; c) w II trymestrze pierwszej ciąży – wówczas notuje się 2,5% z przyczyn genetycznych, w tym do 20% dotyczących chromosomów; d) poronień nawykowych z zaburzeniami genetycznymi w około 3% ciąży; 2) zaburzeń letalnych dla płci męskiej, takich jak: zespół Retta i *incontinentia pigmenti* oraz 3) zaburzenia genetyczne trofoblastu dotyczące kompletnego zażniadru groniastego lub ograniczonego mozaicyzmu kosmówki. II. Mutacje molekularne dotyczą: 1) zaburzeń hemostazy powodujących utratę ciąży w skutek zwiększonego wykrzepiania w obrębie głównie trofoblastu i łożyska, gdzie odnotowano mutacje w obrębie: a) czynnika V Leiden (G1691A) i b) czynnika II (protrombiny) w 3' regionie (G20210A); 2) zaburzeń związanych z hypercystynurią, takich jak: a) w genie reduktazy metylenoczerohydrofaliowej (C677C→T), b) przy wrodzonym autosomalnym niedoborze β -syntazy cystationiny oraz 3) w allelach genów białek wiążących mannozę, co powoduje zanik nieczynniania drobnoustrojów chorobotwórczych i zapałne tło poronień.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28 supl. 18: 25–32)

Słowa kluczowe: poronienie, zaburzenia chromosomalne, mutacje

Summary: Genetics aspects of miscarriages (5% frequency of total miscarriages) can be categorised as: I. karyotypic abnormality or II. defect in one or more genes. I. In autosomal and sex chromosomal abnormalities appear: 1) lethal miscarriages sex independent a) in preimplantation period estimate mainly during IVF-ET procedure (about 25%), b) early primary abortion (5% genetic defected fetuses) when half of lost conceptus presented trisomies, less than 10% monosomy X and triploidy and 3% tetraploidy,

c) II trimester primary abortion (20% from 2.5% miscarriages), d) recurrent abortion (with 3% of genetic factor); 2) X-linked genetic disorder lethal in males as *incontinentia pigmenti* or Rett syndrome; 3) defects of trophoblast as molar pregnancy or chorion mosaicism. II. The groups of molecular mutations were discussed: 1) in haemostatic disorders with predisposition to thrombosis of placental bed vessels: a) Factor V Leiden (G1691A), b) Factor II prothrombin gene (G20210A); 2) associated with hyperhomocysteinemia, the risk factor for venous thrombosis: a) autosomal recessive inherited deficiency of cystathionine β -synthase, b) homozygosity for the 677C \rightarrow T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (T/T genotype), 3) mutant allele of mannan binding protein responsible for its deficiency caused infection-induced fetal loss.

(*Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18: 25–32*)

Key words: abortus, chromosomal aberration, mutations

Monitorowanie przebiegu wczesnej ciąży, a także implantacji zapłodnionej po-zaustrojowo komórki jajowej oceną stężenia podjednostki β -HCG wprowadziło do nomenklatury położniczej pojęcie tzw. *cięży chemicznej*. Pośrednie informacje dotyczące zaburzeń genetycznych w transferowanych embrionach pochodzą jedynie z postępowań diagnostycznych przeprowadzonych przed implantacją [6]. Stosując szereg współczesnych metod badawczych (wielobarwna fluorescencja hybrydyzacji *in situ* – FISH, PCR, kariotypowanie spektralne – SKY, porównawcza hybrydyzacja genomowa – CGH) wykazano występowanie szeregu anomalii chromosomowych w postaci translokacji, inwersji, mozaicyzmu, zaburzeń związanych z chromosomem X, poliploidią, aneuploidią. Z drugiej strony możliwa jest błędna diagnoza wynikająca z badania pojedynczej komórki, zanieczyszczeń i wypadania alleli. Niewielka liczba badań nie pozwala na określenie skali problemu, jak również na przewidywanie poronienia genetycznie uszkodzonej ciąży, zwłaszcza że w takich przypadkach odstępuje się od transferu.

PORONIENIE PIERWSZEJ CIĄŻY

Pierwszy trymestr – badania tkanek płodów po spontanicznym poronieniu wykazały nieprawidłowości chromosomalne w około połowie przypadków [3], a nawet w 60% poronień [4]. Plachot i Popescu [18] podają wartości odsetkowe eliminacji płodów z zaburzeniami chromosomalnymi 66 do 7 tygodnia i 23 pomiędzy 8 i 12 tygodniem ciąży. Według wspomnianych powyżej autorów najczęściej występuje trisomia – C, D, E, G (52%), triploidia (20%), monosomia 45x czy 45,-G (15%) natomiast rzadziej tetraploidia powstała w pierwszym podziale zygotycznym (6%), podwójna trisomia (2%) i mozaicyzm (1%). Boué i Boué [2] analizowali okres przeżycia uszkodzonych płodów wynoszący dla tetraploidii 2,9 tyg, dla triploidii 4,2 tyg, triploidii 5 i dla monosomii 45x, ale także w przypadku prawidłowego kariotypu 5,3–5,8 tygodni. Triploidii niezależnie od zaburzeń genetycznych towarzyszy potwierdzone histologicznie uszkodzenie centralnego układu nerwowego naj-

częściej w postaci nieprawidłowego rozdzielenia lub zrośnięcia pólkul, rozszczepienie czaszki i kręgosłupa, brak przysadki mózgowej, trisomii – niedorozwój trofoblastu, zaśniad lub puste jajo płodowe, w tertaploidii występuje pęcherzyk w kosmówce bez błon owodniowych i płodu.

Drugi trymestr – częstotliwość poronień związanych z anomaliami genetycznymi zmniejsza się znacznie w granicach od 5 do 10% [15]. Wprawdzie Warburton i wsp. [25] podali, że anomalie występują u płodów między 12 i 15 tygodniem w 40%, a do 20 tygodnia jeszcze w 19%, ale fakt wielokrotnego zalegania obumarłej ciąży podważa odniesienie tych danych do ścisłego terminu trwania ciąży.

Zmienia się w sposób zrozumiały spektrum tych zaburzeń, bowiem już w I trymestrze odrzucane są płody z głębokimi anomaliami, jak np. polyploidia. Najczęściej spotykanymi w badanych płodach nieprawidłowościami genetycznymi pozostają w drugim trymestrze monosomie X oraz trisomie. W materiale tkankowym poronionych płodów spotyka się trisomie występujące we wszystkich chromosomach z wyjątkiem pierwszego (odnotowanego jedynie w 8-komórkowym zarodku), ale najczęściej dotyczą chromosomów 13 (zespół Patau), 18 (zespół Edwardsa) czy 21 (zespół Downa) pozwalające na przeżycie, zaś rzadziej trisomię 16 letalną dla noworodków [21]. Snijders i wsp. [12] przeprowadzili kalkulację przeżywalności płodów genetycznie uszkodzonych i na przykładzie trisomii 21 wykazali, że obumieranie między 12 i 14 tygodniem dotyczy 41%, zaś od 16 do 40 tygodnia 32% tych płodów. Natomiast w ciągu pierwszych 20 tygodni występuje bardzo znacząca, bo wynosząca około 95%, eliminacja nie będącej uszkodzeniem letalnym monosomii X, stanowiącej 15–20% wszystkich anomalii. Powoduje to, że częstość występowania schorzenia wśród żywych noworodków wynosi 0,03%, przy czym nie zależy to od wieku ciężarnej, a związane jest w 75% z nondysjunkcją u ojca [4]. Trisomie chromosomów płciowych rzadko są powodem poronień samoistnych i ich występowanie notuje się u 0,01% noworodków. W polskim piśmiennictwie Stasiewicz-Jarocka i wsp. [23] wykazały, że nosicielstwo translokacji $t(1;2)(q42;q33)$ może być powodem poronień.

Przedstawiony powyżej rozkład poronień w obu okresach ciąży sugeruje istnienie różnych mechanizmów patofizjologicznych w eliminacji uszkodzonych płodów [15].

Poronienie nawykowe

Zaburzenia genetyczne, głównie translokacje i inwersje, stanowią potwierdzoną, ale stanowiącą jedynie 2–3%, a według innych danych do 5% przyczynę poronień nawykowych. Braekeleer i Dao [1] na podstawie zbadania ponad 22 tysięcy par rodziców stwierdzili przyczynę genetyczną nawrotowego poronienia w 4,7%, przy czym w populacji tej tylko 1% partnerów wykazywało nieprawidłowości genetyczne. W badaniach tych wzajemna translokacja występowała dwukrotnie częściej niż translokacja Robertsona. Podobne wyniki zaprezentowali Kajii i Ferrier [11], którzy

w płodach z drugiego poronienia bez uprzedniej etiologii genetycznej stwierdzili translokację u 2,7%, gdy u rodziców w tej populacji to zaburzenie genetyczne występowało z częstością 0,3%.

Szansę zwiększenia częstości translokacji o 20% stwarza poprzedzające poronienie o etiologii genetycznej lub urodzenie dziecka z wadami rozwojowymi [24]. Hassold [7] stwierdził, że aneuploidia powtórzyła się w drugim poronieniu w ponad 70% ciążach, podczas gdy po raz pierwszy wystąpiła w drugim poronionym płodzie z częstością poniżej 20%.

Genetyczne zaburzenia letalne dla jednej płci

Należy do nich **zespół Bloch-Sulzbergera** (*incontinentia pigmenti*) określane jako genodermatoza pęcherzykowa z zaburzeniami okulistycznymi i stomatologicznymi i niekiedy z ciężkimi objawami neurologicznymi. Zaburzenie dotyczy chromosomu X i jest letalne dla płodów męskich, jakkolwiek opisano dwa przypadki występowania zespołu u osobników 47XXY. Początkowo sugerowano wiązanie genetyczne Xp11, ale ustalono na większej populacji związek z regionem Xq28 [17].

Zespół Retta – przebiegający z ciężkimi zaburzeniami układu nerwowego, z niedorozwojem umysłowym jest letalny dla płci męskiej, zaś u noworodków płci żeńskiej często notuje się nagłe zgony [5].

Zaśniad groniasty

Jest to twór diploidalny pochodzący głównie z DNA ojca, przy czym mitochondrialny DNA w pełni rozwiniętym zaśniadzie jest pochodzenia matczynego. Duplikacja haploidowego genomu ojca w jajach pozbawionym materiału genetycznego powoduje, że w 75–85% zaśniad jest homozygotyczny [12]. Mechanizm duplikacji występuje albo wskutek braku rozdzielienia chromosomów (*nondisjunction*) w czasie mejozy II, lub przez endoreduplikację plemników po zapłodnieniu. Brak materiału genetycznego matki w zapłodnionym jajku nie jest wyjaśniony i brane są pod uwagę różne mechanizmy, takie jak: brak rozdzielienia chromosomów w czasie mejozy, wyluszczenie jądra komórki jajowej (*enucleatio*) czy eliminacja chromosomów przy podziałach komórkowych po zapłodnieniu [19].

Na pozostały odsetek zaśniadów składają się: 1) mola z kariotypem 46XY (4–15%) po zapłodnieniu pustego jaja dwoma plemnikami: jednym z chromosomem X i drugim z chromosomem Y oraz 2) zaśniady 46XX (ok. 5%) homozygotyczne, ale z genetycznie odrębnymi miejscami w genie. Podkreśla się, że układ 46YY nie ma możliwości dalszego rozwoju [14].

Ograniczony mozaicyzm kosmówki (ang. *confined placental mosaicism -- CMP*)

Jest to zjawisko, w którym kosmki i zarodek mają różny układ genetyczny, prawidłowy u płodu i zaburzony w kosmkach. Istnieją dane pozwalające przyjąć, że występowanie CMP może towarzyszyć opóźnieniu wzrostu wewnątrzmacicznego płodu. W badaniach wielośrodkowych stwierdzono wyższy niż w obecności genetycznie prawidłowych kosmków odsetek utraty ciąży – 8,6% v 3,4%.

Mutacje molekularne

Zaburzenia hemostazy w ciąży przebiegające z trombofilią mogą powodować zakrzepy w naczyniach kosmówki i łożyska. Wpływ na to ma wrodzony brak takich inhibitorów krzepnięcia, jak: 1) antytrombiny (AT), 2) białka C wiążącego na powierzchni czynniki V i VIII i inhibitor plazminogenu, 3) białka S niezbędnego w pośredniczeniu aktywowania białka C przez kompleks trombomodulina-trombina.

Mutacje w obrębie czynnika V Leiden (FVL) – oporność białka C na aktywację (ang. *activated protein C resistance – APCR*) wynika z mutacji punktowej nukleotydu w pozycji 1691 przez zastąpienie guanozyny adeniną (G1691A), co w odczycie białkowym daje sekwencję Arg560Gln. Hatzis i wsp. [8] wykazali wzrost APCR u 21% kobiet z przebytymi poronieniami, podczas gdy w kontroli odsetek ten wyniósł 12%.

Mutacje w obrębie czynnika II (protrombiny) – częstsze od poprzednich zwłaszcza w rasie kaukaskiej powodują podwyższone stężenie protrombiny we krwi zwiększając generację trombiny zależą od zastąpienia również guaniny przez adeninę w 3'-regionie czynnika II (FII G20210A).

Wrodzony autosomalny niedobór β -syntazy cystationy powodujący łagodny wzrost stężenia hemocysteiny we krwi i stałej hemocysteinurii prowadzi w przebiegu ciąży do jej utraty w połowie przypadków i to zarówno pod postacią poronienia, jak i powikłań przebiegu ciąży (gestozy, zawały i odklejanie łożyska) i szeregu uszkodzeń płodów i noworodków.

Mutacje w obrębie genu reduktazy 5,10-metyleno-hydro-foliowej (MTHFR) jako przyczyna poronień i zaburzeń ciąży zostały ujawnione dzięki badaniom nad hemocysteinemią pochodzącą z transmetylacji metioniny i dotyczą wymiany cytozyny na tyminę w pozycji 677 (C677T), co powoduje u homozygotów przy stężeniu hemocysteiny powyżej 15 μ mol/l (na czczo) dwu do trzech razy częstszą utratę ciąży lub uszkodzenie cewy nerwowej płodów. Isolato i wsp. [10] nie stwierdzając zmian we krwi pępowinowej w tkankach poronionych płodów wykazali wszystkie możliwe kombinacje genotypowe MTHFR i allele 677T i 1289C w konfiguracjach cis i trans. Możliwość przeżycia płodów zmniejsza występowanie 3 lub 4 zmutowanych alleli, co występuje w genotypach 677TT1298C i 677T/1298C.

Meta-analiza wpływu hyperhomocysteinemii na występowanie nawykowych poronień wykazała, że genotyp T/T mutacji C677T genu MTHFR wykazuje średnio 1,4 OR (*odds ratio*), a także wiąże się to z wysokim stężeniem homocysteiny ocenianej na czczo (defekt remetylacji) i po obciążeniu metioniną (defekt trans-sulfurylacji) [16]. We wspomnianej meta-analizie cytowani są Holmes i wsp. [9], którzy podają w wątpliwość uznanie mutacji za czynnik ryzyka poronień podając dla homozygot T/T 0,9 *odds ratio* (95% CI 0,3–2,4).

Zmutowane allele białka wiążącego mannozę (ang. *mannan binding protein* – MBP) – białko to jest lektyną typu C należąca do rodziny kollektyn, którego celem jest obronne wiązanie się ze strukturami drożdży, bakterii, wirusów aktywując komplement i stanowi krążący we krwi ekwiwalent receptora mannozy w makrofagach. Niskie stężenie MBP jest uwarunkowane genetycznie i u człowieka dotyczy około 0,17% populacji. Niedobór ten powoduje wzrost cytokin predysponujących do wystąpienia infekcji jaja płodowego i destrukcji trofoblastu. Wśród par małżeńskich tracących ciężę deficyt MBP (>0,63 U/ml) notowano u 14,8% wobec kontroli 4,8%, zaś bardzo niskie stężenia (>0,13 U/ml) u 9,5% v 1,0% [13].

Perspektywy badań nad genetycznymi przyczynami poronień

1. Aktualnie nie wykryto [20] u człowieka jednoznacznych mutacji powodujących utratę wczesnych ciąży w rodzaju spotykanych u gryzoni w postaci letalnego dla homozygot kompleksów genu *t* na chromosomie 17 u myszy czy innych chromosomach, zaś u szczura jako gen *grc* reprezentujący tzw. geny semiletalne. Rozwój badań w zakresie genetyki molekularnej potencjalnie może doprowadzić do detekcji takich genów u człowieka.

2. Istnieje możliwość występowania niewykrytych dotychczas mutacji w receptorach zarówno jajników, jak i kosmówce dla hormonów biorących udział w reprodukcji (progesteron – HCG). Także detekcja nieprawidłowych białek inwazyjnych czy adhezyjnych w trofoblaście lub doczesnej może wyjaśnić trudności w nidacji zapłodnionego jaja płodowego lub jego późniejsze uszkodzenia.

PIŚMIENNICTWO

- [1] de BRAEKELEER MD, DAO TN. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Human Reprod* 1990; **5**: 519–528.
- [2] BOUÉ JG, BOUÉ A. Chromosomal anomalies in early spontaneous abortion *Curr Topics in Pathology* 1976; **62**: 193–208.
- [3] EGOZCUE J. Chromosomal abnormalities and IVF. In cellular aspects of IVF. *Cell Biol Rev* 1987; **13**: 63–72.

- [4] FABRICANT JD, BOUÉ J, BOUÉ A. Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortion. [w] Queenan JT [red] Management of High-Risk Pregnancy. II wyd. Oradel NJ Medical Economics Book 1985: 65–77.
- [5] FYFE S, LEONARD H, DYE D, LEONARD S. Patterns of pregnancy loss, perinatal mortality, and postneonatal childhood death in families of girls with Rett syndrome. *J Child Neurol* 1999; **14**: 440–445.
- [6] HARPER JC, DELHANTY JDA. Preimplantation genetic diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000; **12**: 67–72.
- [7] HASSOLD TJ. A cytogenetic study of repeat spontaneous abortion. *Am J Hum Genet* 1980; **32**: 723–730.
- [8] HATZIS T, CARDAMAKIS E, DRIVALAS E, MAKATSORIS K, BEVAN D, PANTOS C, MALLIOPOULOU V, TSAGARIS N, KREATSA O, ANTONIADI T, PETERSEN MB, KARAGEOR-GIOU H, MANTOUVALOS H. Increased resistance to activated protein C and factor V Leiden in recurrent abortions. Review of other hypercoagulability factors. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 1999; **4**: 135–144.
- [9] HOLMES ZR, REGAN L, CHILCOTT I, COHEN H. The C677T MTHFR gene mutation is not predictive risk for recurrent fetal loss. *Br J Haematol* 1999; **105**: 98–101.
- [10] ISOTALO PA, WELLS GA, DONNELLY JG. Neonatal and fetal methylene-tetra-hydrofolate reductase: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet* 2000; **67**: 986–990.
- [11] KAJII T, FERRIER A. Cytogenetics of aborters and abortuses. *Am J Obstet Gynecol* 1978; **131**: 33–38.
- [12] KAJII T, OHAMA K. Androgenetic origin of hydatidiform mole. *Nature* 1977; **268**: 633–634.
- [13] KILPATRICK DC, BEVAN BH, LISTON WA. Association between mannan binding protein deficiency and recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod in Human Reprod* 1995; **9**: 2501–2505.
- [14] LAWLER S, FISHER R, DENT J. A prospective genetic study of complete and partial hydatiform moles. *Am J Obstet Gynecol* 1991; **164**: 1270–1277.
- [15] MARCH ChM, MISHELL jr DR. Recurrent Spontaneous Abortion. [w] Lobo RA, Mishell jr DR, Paulson RJ, Shoupe D [red.], Infertility, Contraception, and Reproductive Endocrinology Wyd. IV Malden, Blackwell Science 1997: 710–729.
- [16] NELEN WDM, BLOM HJ, STEEGERS EAP, den HEIJER M, ESKES TKAB. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2000; **74**: 1196–1199.
- [17] PETTIGREW R, KUOH-CH, SCRIVEN P, ROWELL P, PAL K, HANDYSIDE A, BRAUDE P, OGILVIE CM. A pregnant following PDG for X-linked autosomal dominant Incontinentia Pigmenti (Bloch-Sulzberger syndrome). *Hum Reprod* 2000; **15**: 2650–2652.
- [18] PLACHOT M, POPESCU P. Chromosome and gene anomalies. Their consequences on reproduction and embryonic development [w] Thibault Ch, Levasseur M-C, Hunter RHF [red.] Reproduction in Mammals and Man, Paris, Elipses 1993: 715–730.
- [19] ROBERTS DJ, MUTTER GL. Advances in the molecular biology of gestational trophoblastic disease. *J Reprod Med* 1994; **39**: 201–207.
- [20] SCOTT JR, BRANCH DW. Evaluation and Treatment of Recurrent Miscariages. [w] Keye WR, Chang RJ, Rebar RW, Souls MR [red.]: Philadelphia, W.B. Saunders Company 1995: 230–248.
- [21] SIMPSON JL. The Genetic Factor. [w] Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z [red.] Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology, Philadelphia, Lippincott-Raven Publ. 1996: 2245–2255.
- [22] SNIJDERS RJ, SEBIRE NJ, NICOLAIDES K H. Maternal age and gestational age specific risk for chromosomal defects. *Fetal Diagn Ther* 1955; **10**: 356–365.

- [23] STASIEWICZ-JAROCKA B, RĄCZKIEWICZ B, KOWALCZYK D, ZAWADA M, MIDRO AT. Ryzyko genetyczne rodzin obciążonych translokacją chromosomową t(1;2)(q42,q33) GTG, RHG, QFQ, FISH. *Gineko Pol* 2000; **71**:1262–1272.
- [24] THO PT, BYRD JR, McDONOUGH PC. Etiologies and subsequent reproductive performance of 100 couples with recurrent abortion. *Fertil Steril* 1979; **32**: 389–395.
- [25] WARBURTON D, KLINE R, STEIN Z, HUTZLER M, CHIN A, HASSOLD T. Does the karyotype of a spontaneous abortion predict the karyotype of a subsequent abortion? *Am J Hum Genet* 1987; **41**: 465–483.

Adres autora: 20-954 Lublin ul. Jaczewskiego 8

Sekcja
**FIZJOLOGIA ROZRODU,
MECHANIZMY NEUROHORMONALNE**

PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION,
NEUROHORMONAL MECHANISMS

ZALEŻNA OD GONADOLIBERYNY REGULACJA AKTYWNOŚCI TRANSKRYPCYJNEJ GENÓW KODUJĄCYCH PODJEDNOSTKI HORMONU LUTEINIZUJĄCEGO W PRZYSADCE MÓZGOWEJ

GONADOLIBERIN-DEPENDENT TRANSCRIPTION ACTIVITY
OF GENES ENCODING LUTEINIZING HORMONE SUBUNITS
IN THE PITUITARY GLAND

Alina GAJEWSKA, Kazimierz KOCHMAN

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN im. J. Kielanowskiego
w Jabłonie k/Warszawy

Streszczenie: Gonadoliberyna (GnRH) jest kluczowym regulatorem specyficznej ekspresji genów kodujących trzy podjednostki gonadotropin (α , LH β i FSH β) w przysadce. Na promotorze genu LH β białka SF-1, EGR-1 i SP-1 tworzą złożony, trzyczęściowy element regulacyjny odpowiedzialny za pełną aktywację transkrypcyjną tego genu przez GnRH. W pozycji -443 promotora zidentyfikowano sekwencję CCATTTTGG (tzw. CArG box) odpowiedzialną za aktywację genu LH β przez pulsacyjnie uwalniany GnRH. Zależna od GnRH specyficzna ekspresja genu podjednostki α wiąże się natomiast z aktywacją dwóch miejsc wiążących białka ETS na jego promotorze.

(Postępy Biologii Komórki 2001; 28 supl. 18: 35–46)

Słowa kluczowe: gonadoliberyna, aktywność transkrypcyjna, geny podjednostek α i LH β

Summary: Gonadoliberin (GnRH) is a crucial regulator governing the specific expression of the genes encoding gonadotropin subunits (α , LH β , FSH β) in the pituitary gland. Three proteins: SP-1, steroidogenic factor 1 (SF-1) and early growth response protein (EGR-1) form a tripartite element in the rat luteinizing hormone β -gene regulating its GnRH-dependent transcription activity. Localized on the promotor of LH β gene the CArG box element (position -443, sequence: CCATTTTGG) is responsible for the gene responsiveness for pulsatile GnRH stimulation. GnRH regulates α subunit gene transcription activity through two ETS binding protein domains localized on the promoter of this gene.

(Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18: 35–46)

Key words: gonadoliberin, transcription activity, α , LH β subunits genes

GnRH, hormon uwalniający hormony gonadotropowe (LH – hormon luteinizujący i FSH – hormon folikulotropowy) jest dekapetydem uwalnianym pulsacyjnie z zakończeń nerwowych wyniosłości pośrodkowej podwzgórza. Jako kluczowe ogniwo w neuroendokrynej regulacji rozrodu odpowiedzialny jest zarówno za regulację uwalniania gonadotropin z przedniego płata przysadki, jak też za regulację wysoce specyficznej przysadkowej ekspresji genów kodujących trzy podjednostki gonadotropin: (α , LH β i FSH β). Po uwolnieniu do krążenia wrotnego przysadki, hormon ten wiąże się na błonie komórek gonadotropowych ze swym specyficznym, sprzężonym z białkiem G_{q/11} α receptorem [37], a konsekwencją tego związania jest aktywacja wewnątrzkomórkowej fosfolipazy C β , wzrost stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego i aktywacja kinazy białkowej C (PKC) [38] prowadzące do stymulacji uwalniania i biosyntezy gonadotropin w przysadce. Istnieją też dane świadczące o zaangażowaniu GnRH w aktywację zarówno kaskady kinaz aktywowanych mitogenem (MAPK) [29,33], jak i kinazy białkowej aktywowanej stresem (JNK/SAPK) [26].

Od wielu już lat wiadomo, iż pulsacyjne uwalnianie hormonów jest zjawiskiem powszechnie występującym w układach endokrynych centralnych i obwodowych. Liczne badania u wielu gatunków ssaków dowiodły, że mechanizm pulsacyjny zlokalizowany w centralnym układzie nerwowym (generator pulsów GnRH) spełnia kluczową rolę w regulacji rozrodu zwierząt, odpowiadając za precyzyjny wzór uwalniania GnRH do krążenia wrotnego przysadki, ściśle determinując uwalnianie gonadotropin z komórek gonadotropowych przysadki [8]. Rola pulsacyjnego uwalniania GnRH w regulacji uwalniania gonadotropin wydaje się być obecnie stosunkowo dobrze poznana, a głównym wewnątrzkomórkowym regulatorem tego procesu jest wzrost stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego następujący po stymulacji receptora GnRH.

Zmienna częstotliwość pulsów GnRH jest nie tylko głównym elementem regulującym podstawowe i okołoowulacyjne uwalnianie gonadotropin, ale pełni też zasadniczą rolę w specyficznej stymulacji ekspresji trzech genów (α , LH β i FSH β) kodujących podjednostki gonadotropin [11,12]. Pulsacyjna stymulacja przysadki przez GnRH prowadzi do zwiększenia poziomu receptora GnRH, dzięki czemu wzmacniany jest sygnał transkrypcyjny [17] faworyzujący transkrypcję genu LH β w stosunku do genu podjednostki α , wykazano na somatomammotropowej linii komórkowej stabilnie transfekowanej konstruktami promotor-reporter dla ludzkiego genu podjednostki α oraz szczurzych genów LH β i FSH β [20]. Poszukując wewnątrzkomórkowych mechanizmów, poprzez które GnRH mógłby selektywnie regulować ekspresję genów α i LH β w przysadce szczura, Weck i wsp. [44] badały tempo transkrypcji genów kodujących podjednostki LH w hodowli komórek pierwotnych przysadki, w transfekowanej linii komórek gonadotropowych α T3 oraz w komórkach przysadki pobranych od transgenicznych myszy niosących szczurzy, 5' flankujący region promotora genu LH β . Oba analizowane geny były znacząco

stymulowane przez GnRH (gen dla podjednostki α 5-krotnie, zaś gen dla LH β 9-krotnie), lecz różniły się w swej reakcji na badane modulatory wewnątrzkomórkowej sygnalizacji GnRH. W badaniach tych stwierdzono, iż gen podjednostki α był bardziej wrażliwy na stymulację wewnątrzkomórkowego szlaku PKC, podczas gdy napływ jonów wapnia do komórki preferencyjnie stymulował transkrypcję genu LH β . Natomiast obserwowana zarówno w hodowli komórek pierwotnych, jak i w komórkach α T3 stymulacja promotora genu podjednostki α przez PKC wiązała się z aktywacją kinaz MAP, podczas gdy aktywacja tego szlaku nie była niezbędna do stymulacji promotora genu LH β . Wymagania aktywacji kinazy MAP dla stymulacji promotora szczerzego genu dla podjednostki α są w zgodzie z danymi dotyczącymi mysiego i ludzkiego promotora genu α [33,39]. Stwierdzono bowiem, iż podwyższona ekspresja uszkodzonej kinazy MAP (*kinase-defective MAPK*) lub też fosfatazy-2 MAPK w komórkach α T3 powoduje znaczące osłabienie aktywacji promotora genu α przez GnRH [33]. Specyficznie wapniozależnej stymulacji aktywności promotora genu LH β , jak też specyficznie zależnej od szlaku PKC/MAPK aktywacji promotora genu α przeczą wyniki uzyskane przez Saunders i wsp. [35]. Używając linii komórek somatolaktotropowych (GGH₃-1') stabilnie transfekowanych cDNA dla receptora GnRH i kotransfekowanych 5'-flankującym regionem promotora α (-846/0), LH β (-791/+5) lub FSH β (-2000/+1709), badali oni wpływ aktywowanych w komórkach gonadotropowych przez GnRH wtórnych przekaźników na specyficzną ekspresję genów kodujących podjednostki gonadotropin. Stymulacja komórek aktywatorem kinazy białkowej C (PMA) wykazała, iż wszystkie badane promotory genów były stymulowane przez PMA, lecz stymulacja ta była wyraźniejsza w przypadku promotorów genów podjednostek LH β i FSH β . Natomiast aktywacja genów poszczególnych podjednostek obserwowana po stymulacji bądź zablokowaniu kanałów wapniowych typu L wskazywała na większą rolę jonów wapnia w aktywacji genu podjednostki α niż genów obu podjednostek β . Zależną od PMA stymulację syntezy LH β mRNA i obniżenie jej poziomu przez aktynomycynę D obserwowali też Park i wsp. [32], zaś Call i Wolfe [6] wykazali, że aktywacja końskiego promotora genu LH β przez GnRH wymaga aktywacji kaskady PKC/MAPK w komórce, a w procesie indukcji promotora genu LH β nie jest zaangażowany wapń.

Zgromadzone dane wskazują, że poszczególne geny są wrażliwe albo na wzrastające stężenie wapnia wewnątrzkomórkowego, albo na stymulację poprzez kaskadę PKC/MAPK. Nie jest jednak jasne, który z genów jest specyficznie regulowany przez wapń i PKC, ani też, w jaki sposób zmienna pulsacja GnRH mogłaby preferencyjnie aktywować poszczególne szlaki wtórnych przekaźników w komórce gonadotropowej.

Zidentyfikowano już kilka elementów regulatorowych działających w układzie *in trans*, które wiążąc się z sekwencjami regulatorowymi na promotorze genu LH β są bezpośrednio zaangażowane w modulację jego transkrypcji. Jednym z nich jest czynnik steroidogenny SF-1 należący do nadrodziny białek receptorów jądrowych

o nieznanym ligandzie, ulegający selektywnej ekspresji w komórkach gonadotropowych przysadki, jak również w nadnerczach i gonadach [17]. Sekwencje wiążące czynnik SF-1 zidentyfikowano na wielu genach związanych ze steroidogenezą, różnicowaniem płciowym i funkcjami reprodukcyjnymi [28]. Do DNA promotora genu LH β czynnik SF-1 wiąże się w obszarze zwanym GSE (*gonadotrope specific element*), po raz pierwszy zidentyfikowanym na promotorze genu podjednostki α przez Barnhardt i Mellon [2]. Na promotorze szczurzego genu podjednostki LH β zidentyfikowano natomiast dwa, znajdujące się w pozycji -127 i -59, miejsca wiążące czynnik SF-1 [14]. Badania *in vivo* dowiodły znaczenia czynnika SF-1 w regulacji ekspresji genu LH β . U myszy pozbawionych genu *ftz-fl* kodującego białko SF-1, poziom mRNA dla podjednostki LH β był niewykrywalny [17], zaś mutacja w obrębie miejsca 5-GSE bydlęcego promotora genu LH β znacząco zmniejszyła jego ekspresję w stosunku do poziomu stymulowanego przez niezmutowany promotor [24]. Innym białkiem (w komórkach przysadki występującym jedynie w komórkach gonado- i somatotropowych) o bardzo znacznej roli w regulacji transkrypcji genu LH β jest białko EGR-1 (*early growth response protein*) znane także jako ZIF/268, KROX-24 i NGFI-A. Należy ono do rodziny białek transkrypcyjnych, których geny ulegają szybkiej transkrypcji (*immediate early gene family*) i charakteryzuje się obecnością tzw. palców cynkowych z motywami Cys₂-His₂ rozpoznającymi bogate w GC sekwencje DNA na promotorze genu [13]. W badaniach na modelach *in vivo* stwierdzono, że u myszy pozbawionych genu *egr-1* występuje selektywna utrata ekspresji genu LH β przy normalnej ekspresji genu FSH β i genu dla podjednostki α [41,25]. W eksperymentach z użyciem transfekowanych linii komórkowych obserwowano natomiast wzrost aktywności szczurzego promotora genu LH β po stymulacji białkiem EGR-1 i efekt ten był związany z miejscami wiązania białka EGR-1 na promotorze w pozycji -112 i -50 [14]. Na promotorze końskiego genu kodującego podjednostkę LH β białko EGR-1 wiąże się do sekwencji CCGGGGGCG w obszarze dystalnym oraz do sekwencji GTGGGGGAG w obszarze proksymalnym promotora, a mutacje w obrębie tych dwu miejsc wiążących białko EGR-1 całkowicie hamują jego zdolność do indukcji promotora genu eLH β [46].

Białko EGR-1 zawiera wewnętrzną inhibitorową domenę składającą się z 34 aminokwasów i nawet pojedyncza mutacja punktowa w obrębie tej domeny uniemożliwia interakcje między białkiem EGR-1 a innymi białkami komórkowymi, powodując 15-krotny wzrost aktywności transkrypcyjnej białka EGR-1. Ostatnie badania wykazały, iż białkami tymi są białka NAB-1 i NAB-2, których funkcją jest represja aktywności białka EGR-1 [34,40]. Transfekując komórki α T3-1 białkami EGR-1 i NAB-1 wykazano, iż NAB-1 hamuje aktywację promotora eLH β przez białko EGR-1, lecz nie wpływa na jego aktywność podstawową [46]. Białko NAB-1 ulega ekspresji w wielu tkankach [34], chociaż dotąd nie wykazano jego ekspresji w komórkach gonadotropowych. Niemniej jednak jest potencjalnym kandydatem, który mógłby aktywnie uczestniczyć w regulacji aktywności promotora genu LH β

w przysadce. Nie można więc wykluczyć, iż zależna od częstotliwości pulsów GnRH aktywacja genu LH β może być regulowana przez zależną od tej częstotliwości indukcję czynników aktywujących i hamujących aktywność jego promotora. Najbardziej efektywny w indukcji ekspresji genu LH β profil pulsacji GnRH mógłby zatem maksymalizować ekspresję lub aktywność czynników aktywacyjnych przy jednoczesnej minimalizacji ekspresji lub aktywności czynników hamujących aktywność tego promotora.

Dla regulacji ekspresji genu LH β i jego wrażliwości na stymulację GnRH bardzo znaczący okazał się być również obszar -490/-352 promotora [20]. W obszarze tym zidentyfikowano bowiem kilka miejsc wiążących białko SP-1, które podobnie do białka EGR-1 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych Cys₂-His₂ wiążących się z DNA za pomocą palców cynkowych, rozpoznając sekwencje bogate w GC [4]. Mutacje uniemożliwiające wiązanie się białka SP-1 z tym regionem promotora znacząco redukują zarówno podstawową aktywność promotora genu LH β , jak też zmniejszają stymulacyjny wpływ wywierany na ten gen przez GnRH [20]. Na promotorze genu LH β , białka SF-1 i EGR-1 tworzą dwa złożone elementy regulacyjne wiążące się do jego proksymalnej części w pozycjach -59 i -127, zaś miejsca wiązania białka SP-1 zajmują bardziej dystalny obszar promotora pomiędzy pozycją -451 a -386. Taka lokalizacja miejsc wiążących białka transkrypcyjne powoduje, iż niezbędna do pełnej aktywacji promotora genu LH β interakcja między białkami SF-1, EGR-1 i SP-1 wymaga zarówno zmian w topologii tego fragmentu DNA prowadzącej do tworzenia odpowiedniej pętli, jak i obecności dodatkowego czynnika integrującego umożliwiającego ową interakcję. W zaproponowanym przez Kaiser i wsp. [19] modelu zależnej od GnRH regulacji aktywności promotora genu LH β przez czynniki transkrypcyjne SF-1, SP-1 i EGR-1 zakłada się ich interakcję z niezidentyfikowanym jeszcze i niewiążącym się do DNA kofaktorem. Zgodnie z tym modelem, białko SF-1 w niewielkim tylko stopniu odpowiedzialne jest za bezpośredni wpływ na stymulację genu LH β przez GnRH, odgrywa natomiast kluczową rolę w integracji wpływu wywieranego przez białka SP-1 i EGR-1. Zmiany układu przestrzennego promotora pomiędzy miejscami wiążącymi białka SP-1 a miejscami wiązania kompleksów białek SF-1/EGR-1 znacząco zmniejszają wrażliwość genu LH β na stymulację GnRH.

Przy nieobecności czynnika SF-1 GnRH indukuje syntezę białka EGR-1, które wprawdzie wiąże się ze specyficznymi sekwencjami na promotorze genu, ale nie może ulegać interakcji z kofaktorem. Mimo braku takiej interakcji możliwa jest jednak aktywacja genu LH β przez GnRH, a zasadniczą rolę odgrywa wówczas białko SP-1, które wiążąc się ze specyficznymi sekwencjami na promotorze i ulegając interakcji z kofaktorem indukuje transkrypcję. Jeśli jednak przy braku czynnika SF-1 do promotora nie zwiąże się białko SP-1 (np. w wyniku mutacji w sekwencji wiążącej), to wprawdzie struktura przestrzenna promotora umożliwia współdziałanie kofaktora z indukowanym przez GnRH białkiem EGR-1, lecz zmiany w strukturze

przestrzennej promotora będą tak znaczące, że doprowadzą do wydatnego zmniejszenia wrażliwości genu LH β na stymulacyjny wpływ GnRH. A zatem, przy nieobecności czynnika SF-1, kofaktor mógłby oddziaływać tylko z białkiem SP-1 (to wiązanie wydaje się być szczególnie preferowane) lub białkiem EGR-1, lecz nigdy z obydwoma z nich. Dopiero w obecności czynnika SF-1 występuje interakcja kofaktora z trzema czynnikami transkrypcyjnymi i możliwa jest pełna odpowiedź promotora genu LH β na stymulację GnRH. Próby identyfikacji domniemanego kofaktora odpowiedzialnego za integrację trzech czynników transkrypcyjnych w obrębie promotora genu LH β jak dotąd nie przyniosły rezultatów, wiadomo jednak, iż nie są nimi ich koaktywatory, czyli białka SRC-1 ani CBP/P300. Niewykluczone więc, iż czynnikiem tym może być inny, specyficzny gonadotropowo lub regulowany przez GnRH kofaktor transkrypcyjny. Może to być także nowy czynnik transkrypcyjny, bezpośrednio wiążący się do niezidentyfikowanej jeszcze sekwencji DNA w obrębie promotora genu LH β . Nie można też wykluczyć, iż białka SP-1, SF-1 i EGR-1, oddziałują na sekwencję zależną od GnRH bez pośrednictwa kofaktora. Obserwowano bowiem bezpośrednie interakcje białko – białko pomiędzy SF-1 i EGR-1 [14]. Nie jest również jasny ewentualny udział czynnika transkrypcyjnego Ptx-1, o którym wiadomo, iż działając synergistycznie z białkami SF-1 i EGR-1 podwyższa ekspresję genu LH β [42].

Poszukiwania wewnątrzkomórkowych przekaźników, zaangażowanych w zależną od GnRH indukcję ekspresji białek transkrypcyjnych w przysadce, w sposób naturalny dotyczą szlaku kinazy białkowej C i szlaku MAPK. Wiadomo, iż aktywacja genu LH β wymaga synergistycznego działania czynnika SF-1 i EGR-1 [10,14,42]; wykazano też, że ekspresję białka EGR-1 w przysadce może indukować zarówno aktywacja PKC, jak i szlaku MAPK [13,46], co sugeruje zaangażowanie tego białka w modulację aktywności transkrypcyjnej genu LH β spowodowanej aktywacją PKC. Używając linii komórek somatolaktotropowych transfekowanych konstruktem zawierającym region od -207 do +5 promotora szczurzego genu LH β Halvorson i wsp. [15] zaobserwowały, że aktywacja systemu PKC przez PMA powoduje wzrost ekspresji genu LH β poprzez stymulację ekspresji białka EGR-1, a jednym z mechanizmów rządzących regulacją ekspresji genu LH β jest nie tylko intensywne, synergistyczne oddziaływanie PMA i białka SF-1, lecz także szybkość indukcji EGR-1 przez PMA.

Badaniom nad indukcją działających *in trans* białek bezpośrednio zaangażowanych w zależną od GnRH stymulację transkrypcji genu podjednostki LH β towarzyszyły poszukiwania zależnych od GnRH i działających w układzie *in cis* elementów regulatorowych w obrębie promotora genu LH β . Doprowadziły one do identyfikacji dwóch obszarów, które tworzą tzw. region A (-490/-352 pz) i region B (-207/-82 pz) w obrębie promotora [22]. Szczególne znaczenie wydaje się mieć region A, gdyż jego delecja (zarówno od końca 5', jak i wewnętrzna) z konstruktów: promotor genu LH β – gen reporterowy lucyferazy znacząco zmniejsza

szła zdolność GnRH do stymulacji promotora genu LH β . Mniej jasna jest natomiast rola regionu B. Choć delecja regionu B u 5' delecyjnych mutantów spowodowała zmniejszenie wrażliwości promotora na GnRH, to jednak delecje wewnętrzne tego elementu nie wpłynęły na tę odpowiedź. Niewykluczone więc, iż regiony A i B promotora genu LH β działają wspólnie jako złożony element wrażliwy na GnRH (GnRH-RE).

Analiza sekwencji DNA w obrębie regionu A i B wykazała szereg interesujących homologii z sekwencjami zidentyfikowanymi na innych genach. Stwierdzono, iż sekwencja w pozycji od -419 do -412 wykazuje 100% homologii z konserwowanym motywem w obrębie promotora prolaktyny, zaś nakładający się na tę sekwencję obszar -421/-414 odznacza się 75% homologią z regionem określanym jako GnRH-RE na promotorze genu dla szczurzej podjednostki α [36]. Natomiast fragment -375/-361w regionie A wykazuje 75% homologię do sekwencji DNA wiążących GnRH na promotorze genu ludzkiej podjednostki α [23]. Również w obrębie regionu B promotora genu LH β występują homologie z sekwencjami DNA znanymi z wiązania kilku czynników transkrypcyjnych. W obszarze -157/-151 stwierdzono bowiem 85% homologii w porównaniu z miejscem wiążącym czynnik AP-1, (*activating protein-1*) [1], zaś sekwencja w obszarze -171/-164) odznacza się 75% homologią z sekwencją specyficznie wiążącą cAMP [5]. 100% homologię stwierdzono natomiast w obszarze -125/-11 regionu B, który na promotorze genu podjednostki α u człowieka, bydła, myszy, szczura i konia jest wysoce (czy konserwatywną?) konserwowaną sekwencją wiążącą GSE (*gonadotrope specific element*) [45]. Ostatnio, używając linii komórkowej L β T2 transfekowanej fragmentem -617/+44 szczurzego promotora genu LH β , Weck i wsp. [43] zidentyfikowały wrażliwy na GnRH obszar tego genu znajdujący się w pozycji od -495 do -342 promotora (region A), którego koniec 3' zawiera dwa miejsca wiążące białko SP-1 (pozycja -416 sekwencja: GGGGGCTGGG oraz pozycja -403, sekwencja: GGGGCGGCGCCCA), zaś koniec 5' jedno (pozycja -450: sekwencja: ACCACACCCATTTTTGG). Natomiast w pozycji -443 (a więc na obszarze częściowo pokrywającym się z miejscem 5' SP-1) znajduje się tzw. region CARG (CARG *box*) o sekwencji CCATTTTTGG odgrywający krytyczną rolę we wrażliwości genu LH β na pulsację GnRH. Elementy CARG (sekwencja CC(A/T)₆GG) występują w wielu enhancerach promotorów genów, np. SRE (*serum response element*), *c-fos*, są także częścią złożonych elementów zaangażowanych w szybką transkrypcję genu. Pojedyncze mutacje w obrębie obszaru CARG, jak też w miejscach wiązania białek SP-1 w obszarze 3' i 5' promotora genu LH β efektywnie eliminowały jego wrażliwość na pulsacyjnie podawany GnRH. Można więc sądzić, iż do zależnej od GnRH stymulacji promotora genu LH β o pełnej długości potrzebne są przynajmniej trzy odrębne elementy: dwa miejsca wiążące białko SP-1 oraz obszar CARG. Mutacje w obrębie obszaru CARG promotora genu LH β wprawdzie nie uniemożliwiają białku SP-1 wiązania się do promotora genu, ale jednocześnie znoszą jego zdolność do

odpowiedzi na pulsację GnRH. Chociaż pulsacja GnRH jest warunkiem stymulacji genu LH β *in vivo*, to stymulacja komórek L β T2 jednorazową wysoką dawką GnRH również może indukować aktywność promotora genu LH β . W takich warunkach stymulacji, pojedyncze mutacje w obrębie miejsc 5' SP-1 i 3' SP-1 hamują stymulację przez GnRH, podczas gdy mutacje w obszarze CARG nie mają wpływu na stymulację tego genu przez GnRH. Tak więc utrata precyzyjnego mechanizmu współdziałania pomiędzy różnymi elementami regulatorowymi na genie LH β po statycznym oddziaływaniu GnRH dodatkowo potwierdza, że wiążące się do obszaru CARG białka odgrywają kluczową rolę we wrażliwości tego genu na pulsację GnRH.

Używając długiego (-617 do +44) obszaru promotora genu LH β , Weck i wsp. [43] wykazały ponadto, iż do zależnej od GnRH stymulacji genu LH β niezbędna jest zintegrowana odpowiedź wielu czynników transkrypcyjnych, wiążących się do kilku oddzielnych obszarów promotora zarówno niezależnych, jak i będących częścią obszaru wiążącego czynniki SF-1 i EGR-1. Co więcej, region promotora genu LH β od -456 do -342 pz może reagować na GnRH niezależnie od obszaru SF-1/EGR-1. Tak więc, odpowiedź promotora na GnRH może być częściowo modulowana przez białko EGR-1, które samo jest modulowane przez GnRH i częściowo przez inne szlaki zależne od GnRH, które mogą stymulować obszar Sp1/CARG. Relatywnie wysoki poziom białka EGR-1 w komórkach przysadki mógłby umożliwiać obszarowi SP-1/CARG intensywniejszą reakcję na pulsację GnRH.

Zależny od GnRH obszar na promotorze genu podjednostki α jest wysoce odmienny od tego, jaki występuje na genie LH β . Używając tej samej linii komórkowej (L β T2) transfekowanej fragmentem o długości -479 do +77 pz szczurzego promotora genu podjednostki α , Weck i wsp. [43] wykazały, że w obszarze pomiędzy -411 a -287 występują dwie, zlokalizowane na obu niciach DNA charakterystyczne sekwencje GGAA tworzące domeny wiążące białka ETS. Białka te należą do rodziny regulatorów transkrypcyjnych i wiążą się do DNA w postaci monomeru [9]. Analiza porównawcza sekwencji na promotorze szczurzym, mysim i ludzkim genu α , wykazała, iż na genach mysiej i ludzkiej podjednostki α znajduje się tylko jedno miejsce wiązania białka ETS. Białka ETS są fosforylowane bezpośrednio lub w odpowiedzi na aktywowanie kinaz MAP, mogą więc być bezpośrednimi mediatorami zaangażowanymi w stymulacyjne statyczne działanie GnRH na ekspresję tego genu [7]. Po zmutowaniu miejsc wiążących białka ETS obserwowano zahamowanie takiej aktywności; wydaje się więc, iż miejsca te modulują aktywność promotora genu podjednostki α poprzez szlak MAPK. Fakt, iż na genie szczurzej podjednostki α są dwa miejsca wiązania białek ETS niezbędne do stymulacji tego genu przez GnRH, sugeruje ich funkcjonalne współdziałanie na promotorze. Na promotorze genu prolaktyny zidentyfikowano niedawno, odpowiedzialny za wrażliwość tego promotora na insulinę, kompleks białka GABP (również należącego do rodziny białek ETS) [31], którego jedna podjednostka zachowuje się jak białko ETS wiążące się do DNA, podczas gdy druga podjednostka zawiera szereg powtórzeń anky-

rinowych [3]. Wprawdzie na promotorze genu podjednostki α nie ma miejsc wiążących białko GABP, to jednak podobny typ białka (lub białek) tworzący funkcjonalne interakcje typu białko-białko może być zaangażowany w regulację wrażliwości tego promotora na stymulację GnRH.

Gwałtowny postęp w dziedzinie biologii molekularnej dostarczył precyzyjnych narzędzi badawczych, dzięki którym możliwe stało się badanie skomplikowanej regulacji aktywności transkrypcyjnej genów podjednostek gonadotropin w przysadce. Szczególna uwaga, jaką poświęca się badaniom zadziwiającego zjawiska zależnej od GnRH i wysoce specyficznej regulacji aktywności tych genów, pozwala mieć nadzieję, iż poznany będzie precyzyjny molekularny mechanizm rządzący ich zróżnicowaną ekspresją. Znaczenie badań regulacji ekspresji genów podjednostek gonadotropin to przede wszystkim możliwość genetycznych interwencji i stosowania leków specyficznych wobec promotorów genów odpowiedzialnych za przysadkowe zaburzenia w funkcjonowaniu osi rozrodczej.

LITERATURA

- [1] ANGEL P, IMAGAWA M, CHIU R, STEIN B, IMBRA RJ, RAHMSDORF HJ, JONAT C, HERRLICH P, KARIN M. Phorbol ester-inducible genes contain a common *cis* element recognized by a TPA-modulated *trans*-acting factor. *Cell* 1987; **49**: 729–739.
- [2] BARNHARDT KM, MELLON PL. The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone α -subunit gene in pituitary gonadotropes. *Mol Endocrinol* 1994; **8**: 878–885.
- [3] BATCHELOR AH, PIPER DE, de la BROUSSE FC, McKNIGHT SL, WOLBERGER C. The structure of GABP $\alpha\beta$; an ETS domain ankyrin repeat heterodimer bound to DNA. *Science* 1998; **279**: 1037–1041.
- [4] BERG JM. SP-1 and the subfamily of zinc finger proteins with guanine-rich binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 11109–11110.
- [5] BOKAR JA, KERI RA, FRAMERIV TA, FENSTERMAKER RA, ANDEREN B, HAMERNIK BL, YUN J, NILSON JH. Expression of the glycoprotein hormone alpha-subunit gene in placenta requires a functional cyclic AMP response element, whereas a different *cis*-acting element mediates pituitary specific expression. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 5113–5122.
- [6] CALL GB, WOLFE MW. Gonadotropin-releasing hormone activates the equine luteinizing hormone β promoter through a protein kinase C/mitogen activated protein kinase pathway. *Biol Reprod* 1999; **61**: 715–723.
- [7] COFFER P, DE JONGE M, METTOUCHI A, BINETROY B, GHYSDEAL J, KRUIHER N. Jun promoter B regulation: ras mediated transactivation by c-ETS and c-ETS-2. *Oncogene* 1993; **9**: 911–921.
- [8] COUNIS R. Gonadotropin Biosynthesis. [W]: J.Neill, E.Knobel (Eds.), Encyclopedia of Reproduction, vol. 2, Academic Press, New York 1999: 507–520.
- [9] CREPIEUX P, COLL J, STEHELIN D. The ETS family of proteins: weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners. *Critical Rev in Oncogenesis* 1994; **5**: 615–638.

- [10] DORN C, OU Q, SVAREN J, CRAWFORD PA, SADOVSKY Y. Activation of luteinizing hormone β -gene by gonadotropin-releasing hormone requires the synergy of early growth response-1 and steroidogenic factor-1. *J Biol Chem* 1999; **274**: 13870–13876.
- [11] GAJEWSKA A, KOCHMAN K, LERRANT Y, KOCHMAN H, COUNIS R. Modulation of luteinizing hormone subunit gene expression by intracerebroventricular microinjection of gonadotropin-releasing hormone or β -endorphin in female rats. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1523**: 217–224.
- [12] GAJEWSKA A, LERRANT Y, COUNIS R, KOCHMAN K. FSH β -subunit gene expression in long-term ovariectomized rat after pulsatile intracerebroventricular microinjections of GnRH. *Neuroendocrinol Lett* 2000; **21**: 277–281.
- [13] GASHLER A, SUKHATME VP. Early growth response protein 1 (EGR-1); prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Progress Nucleic Acid Res* 1995; **50**: 191–224.
- [14] HALVORSON LM, ITO M, JAMESON JL, CHIN WW. Steroidogenic factor-1 and early growth response protein 1 act through two composite DNA binding sites to regulate luteinizing hormone β -subunit gene expression. *J Biol Chem* 1998; **273**: 14712–14720.
- [15] HALVORSON LM, KAISER UB, CHIN WW. The protein kinase C system acts through the early growth response protein 1 to increase LH β gene expression in synergy with steroidogenic factor-1. *Mol Endocrinology* 1999; **13**: 106–116.
- [16] IKEDA I, LUO X, ABBUD R, NILSON JH, PARKER KL. The nuclear receptor steroidogenic factor-1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol* 1995; **9**: 478–486.
- [17] INGRAHAM HA, LALA DS, IKEDA Y, LUO X, SHEN WH, NACHTIGAL MW, ABBUD R, NILSON JH, PARKER KL. The nuclear receptor steroidogenic factor acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* 1994; **8**: 2302–2312.
- [18] KAISER UB, CONN PM, CHIN WW. Studies of gonadotropin-releasing hormone action using GnRH receptor expressing cell lines. *Endocr Rev* 1997; **18**: 46–70
- [19] KAISER UB, HALVORSON LM, CHEN M.T. Sp1, steroidogenic factor 1 (SF-1), and early growth response protein 1 (EGR-1) binding sites form a tripartite gonadotropin-releasing hormone response element in the rat luteinizing hormone β gene promoter: an integral role for SF-1. *Mol Endocrinol* 2000; **14**:123–1245.
- [20] KAISER UB, SABBAGH E, CHEN MT, CHIN WW, SAUNDERS BD. Sp1 binds to the rat luteinizing hormone β gene promoter and mediates gonadotropin-releasing hormone stimulated expression of the LH β subunit gene. *J Biol Chem* 1998; **273**: 12943–12951.
- [21] KAISER UB, SABBAGH E, KATZENELLEBOGEN RA, CONN PM, CHIN WW. A mechanism for the differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 12280–12284.
- [22] KAISER UB, SABBAGH E, SAUNDERS BD, CHIN WW. Identification of cis-acting deoxyribonucleic acid elements that mediate gonadotropin-releasing hormone stimulation of the rat luteinizing hormone β -subunit gene. *Endocrinology* 1998; **139**: 2443–2451.
- [23] KAY TWH, JAMESON JL. Identification of gonadotropin-releasing hormone-responsive region in the glycoprotein hormone α -subunit promoter. *Mol Endocrinol* 1992; **6**: 1767–1773.
- [24] KERI RA, NILSON JH. A steroidogenic factor-1 binding site is required for activity of the luteinizing hormone beta subunit promoter in gonadotropes of transgenic mice. *J Biol Chem* 1996; **271**: 10782–10785.
- [25] LEE SL, SADOVSKY Y, SWIRNOFF AH, POLISH JA, GODA P, GAVRILINA G, MILBRANDT J. Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (EGR-1). *Science* 1996; **273**:1219–1221.

- [26] LEVI NL, HANOCH T, BENARD O, ROZENBLAT M, HARRIS D, REIS N, NAOR Z, SEGER R. Stimulation of Jun N-terminal kinase (JNK) by gonadotropin-releasing hormone in pituitary α T3-1 cell line is mediated by protein kinase C, c-Src and CDC42. *Mol Endocrinol* 1998; **12**: 815–824.
- [27] LIU Z, SIMPSON ER. Steroidogenic factor 1 (SF-1) and SP-1 are required for regulation of bovine CYP11A gene expression in bovine luteal cells and adrenal Y1 cells. *Mol Endocrinol* 1997; **11**: 127–137.
- [28] LUO X, IKEDA Y, PARKER KL. A cell specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 1994; **77**: 481–490.
- [29] MITCHELL R, SIM PJ, LESLIE T, JOHNSON MS, THOMPSON FJ. Activation of MAP kinase associated with the priming effect of LHRH. *J Endocrinol* 1994; **140**: 8–9.
- [30] OHAGAN RC, TOZER RG, SYMONS M, McCORMICK F, HASSEL HA. The activity of ETS transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades. *Oncogene* 1996; **13**: 1323–1333.
- [31] OUYANG L, JACOB KK, STANLEY FF. GABP mediates insulin-increased prolactin gene transcription. *J Biol Chem* 1996; **271**:10425–10428.
- [32] PARK D, KIM C, CHEON M, KIM K, RYU K. cAMP and protein kinase C elevate LH beta mRNA levels by activating transcription rather than stabilizing mRNA in rat pituitary cells. *Mol Cell* 1997; **7**: 98–103.
- [33] ROBERSON MS, MISRA PA, LAURANCE ME, STORK PJ, MAURER RA. A role for mitogen-activated protein kinase in mediating activation of the glycoprotein hormone α -subunit promoter by gonadotropin-releasing hormone. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 3531–3539.
- [34] RUSSO MW, SEVETSON BR, MILBRANDT J. Identification of NAB-1, a repressor of NGFI-A and Krox20-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 6873–6877.
- [35] SAUNDERS BD, SABBAGH E, CHIN WW, KAISER UB. Differential use of signal transduction pathways in the gonadotropin-releasing hormone-mediated regulation of gonadotropin subunit gene expression. *Endocrinology* 1998; **13**: 1835–1843.
- [36] SCHODERBERK WE, ROBERSSON MS, MAURER RA. Two different DNA elements mediate gonadotropin releasing hormone effects on expression of the glycoprotein hormone α -subunit gene. *J Biol Chem* 1993; **268**: 3903–3910.
- [37] STANISLAUS D, JANOVICK JA, BROTHER S, CONN PM. Regulation of $G_{q/11}\alpha$ by the gonadotropin releasing hormone receptor. *Mol Endocrinol* 1997; **11**: 738–740.
- [38] STOJILKOVIC SS, REINHART J, CATT KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev* 1994; **15**: 462–499.
- [39] SUNDARESAN S, COLIN IM, PESTELL RG, JAMESON JL. Stimulation of mitogen activated protein kinase by gonadotropin-releasing hormone: evidence for the involvement of protein kinase C. *Endocrinology* 1996; **137**: 304–311.
- [40] SWIRNOFF AH, APEL ED, SVAREN J, SEVETSON BR, ZIMONJIC DB, MILBRANDT J. NAB-1, a corepressor of NGFI-A (EGR-1), contains an active transcriptional expression domain. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 512–524.
- [41] TOPILKOP, SHNEIDER-MAUNOURY S, LEVIG, TREMBLAU A, GOURDJID, DRIAN-COURT MA, RAO CV, CHARNAY. Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24(NGFI-A, EGR-1)-targeted mice. *Mol Endocrinol* 1997; **12**: 107–122.
- [42] TREMBLAY JJ, DROUIN J. EGR-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx and SF-1 to enhance luteinizing hormone β gene transcription. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 2567–2576.
- [43] WECK J, ANDERSON AC, JENKINS S, FALLEST PC, SHUPNIK MA. Divergent and composite gonadotropin-releasing hormone-responsive elements in the rat luteinizing hormone subunit genes. *Mol Endocrinol* 2000; **14**: 472–485.

- [44] WECK J, FALLEST PC, PITT LK, SHUPNIK MA. Differential-gonadotropin-releasing hormone stimulation of rat luteinizing hormone subunit gene transcription by calcium influx and mitogen-activated protein kinase-signaling pathways. *Mol Endocrinol* 1998; **12**: 451–457.
- [45] WINDLE JJ, BARNHARDT KM, MELLON PL. Tissue-specific gene expression in the pituitary: the glycoprotein hormone α -subunit gene is regulated by a gonadotrope-specific protein. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 2143.
- [46] WOLFE MF, CALL GB. Early growth response protein binds to the luteinizing hormone β promoter and mediates gonadotropin-releasing hormone-stimulated gene expression. *Mol Endocrinol* 1999; **13**: 752–763.

Adres autorów: Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN im. Jana Kielanowskiego
05-110 Jabłonna k/Warszawy, ul. Instytucja 3
e-mail: a.gajewska@ifzz.pan.pl;
k.kochman@fzz.pan.pl

ROLA OPIOIDÓW W LOKALNEJ REGULACJI FUNKCJI SEKRECYJNYCH PRZYSADKI I JAJNIKA U ŚWIŃ*

ROLE OF OPIOIDS IN THE LOCAL REGULATION OF SECRETORY FUNCTIONS OF THE PORCINE PITUITARY AND OVARY

Stanisław OKRASA, Tadeusz KAMIŃSKI, Jadwiga PRZAŁA,
Iwona BOGACKA, Gabriela SIAWRYS

Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski,
Olsztyn

Streszczenie: W artykule przedstawiono wyniki własnych badań dotyczące sekrecji immunoreaktywnej β -endorfiny *in vitro* przez komórki przedniej części przysadki oraz różne typy komórek jajnika świni: lutealne, ziarniste i osłonki wewnętrznej. Opisano także rolę opioidów w lokalnej regulacji wydzielania LH przez przysadkę oraz hormonów steroidowych przez jajnik u świń.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28 suppl. 18: 47–55)

Słowa kluczowe: opioidy, β -endorfina, przysadka, jajnik, świnia.

Summary: In the article, data pertaining to *in vitro* immunoreactive β -endorphin secretion by the porcine anterior pituitary cells and various types of ovarian cells: luteal, granulosa and theca are presented. The role of opioids in the local regulation of LH secretion by the pituitary and steroid hormones by the ovary in the pig has been also described.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28 suppl. 18: 47–55)

Key words: opioids, β -endorphin, pituitary, ovary, pig.

*Badania były finansowane ze środków KBN (Badania własne: 020600. 205).

WSTĘP

Endogenne peptydy opioidowe (EOP) wywodzą się z trzech wielkocząsteczkowych prekursorów: proopiomelanokortyny (POMC), proenkefaliny i prodynorfiny. W wyniku proteolizy ograniczonej z POMC, wielofunkcyjnego prekursora, powstaje m.in. β -endorfina, z proenkefaliny powstają met- i leu-enkefaliny, a z prodynorfiny – dynorfiny A i B oraz α - i β -neoendorfiny. Peptydy opioidowe działają poprzez receptory opioidowe, spośród których zazwyczaj wyróżnia się trzy podstawowe klasy: *mi* (μ), *delta* (δ) i *kappa* (κ). β -Endorfina, powstająca z POMC, wykazuje największe powinowactwo do receptorów typu μ , enkefaliny do receptorów δ , zaś pochodne prodynorfiny do receptorów κ . Wskutek rozszerzonego powinowactwa, poszczególne typy receptorów opioidowych, oprócz preferowanych ligandów, w mniejszym stopniu także wiążą pozostałe peptydy opioidowe [17].

Wcześniejsze badania wykazały, że EOP są wytwarzane w ośrodkowym układzie nerwowym oraz innych strukturach organizmu i biorą udział w regulacji wielu procesów fizjologicznych. Działając na poziomie podwzgórza, EOP m.in. uczestniczą w centralnej kontroli funkcjonowania osi neurohormonalnych, w tym także osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowej. U loszek, podobnie jak u samic innych gatunków, stwierdzono hamujący wpływ peptydów opioidowych na wydzielanie hormonu luteinizującego (LH), który jest realizowany głównie poprzez oddziaływanie na wytwarzanie i/lub neurosekrecję hormonu uwalniającego gonadotropiny (GnRH) [14, 16, 17]. W piśmiennictwie dostępne są również dane wykazujące działanie regulacyjne peptydów opioidowych na innych poziomach osi podwzgórze-przysadka-jajnik. Celem niniejszej prezentacji jest omówienie roli EOP w lokalnej regulacji funkcji sekrecyjnych przysadki i jajnika u świni na podstawie wyników własnych badań oraz danych z piśmiennictwa.

SEKRECJA IMMUNOREAKTYWNEJ β -ENDORFINY PRZEZ KOMÓRKI PRZYSADKI ORAZ UDZIAŁ OPIOIDÓW W LOKALNEJ REGULACJI WYDZIELANIA LH

Badania wielu autorów przeprowadzone na różnych gatunkach zwierząt wykazały, że w przedniej części przysadki mogą być wytwarzane peptydy opioidowe powstające z trzech wcześniej wymienionych prekursorów opioidowych [5, 13, 21]. W badaniach własnych [2, 22] sprawdzano wpływ GnRH, oksytocyny (OT), wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP) oraz środków α - i β -adrenergicznych (fenylefryny i izoprenaliny) na wydzielanie β -endorfiny, reprezentującej system POMC, przez komórki

izolowane z przysadek loszek owarietomizowanych (OVX) otrzymujących placebo, progesteron (P_4 ; status hormonalny typowy dla fazy lutealnej cyklu) lub benzoestan estradiolu (BE; indukowany wyrzut LH). Komórki przysadkowe loszek OVX otrzymujących zarówno placebo, jak i P_4 wydzielają zwiększone ilości immunoreaktywnej β -endorfiny (ir- β -endorfiny) pod wpływem OT i VIP (tab. 1). Agonista receptorów β -adrenergicznych zwiększał sekrecję ir- β -endorfiny przez komórki przysadkowe loszek OVX, natomiast agonista receptorów α -adrenergicznych pobudzał wydzielanie ir- β -endorfiny przez komórki pochodzące od loszek OVX otrzymujących P_4 . Komórki przysadkowe loszek OVX, 30–36 h po podaniu BE (faza ujemnego sprzężenia zwrotnego) wykazywały zwiększone wydzielanie ir- β -endorfiny *in vitro* jedynie w odpowiedzi na VIP, natomiast po 60–66 h od iniekcji BE (faza dodatniego sprzężenia zwrotnego) – pod wpływem wszystkich badanych czynników. Fakt ten sugeruje występowanie zwiększonej reaktywności komórek przysadki na działanie czynników stymulujących (potencjalnie) wydzielanie β -endorfiny w szczytowej fazie wyrzutu LH. Przejściowo zwiększone w tym okresie, przysadkowe wydzielanie β -endorfiny może być jednym z elementów mechanizmu hamującego wyrzut LH. Hipoteza ta jest zgodna z wynikami badań Zięcika i wsp. [24], w których stwierdzono, że infuzje morfiny – agonisty receptorów opioidowych typu μ , trwające od 60 do 64 h po podaniu loszkom BE, zmniejszają amplitudę wyrzutu LH.

Możliwość lokalnego oddziaływania peptydów opioidowych na wydzielanie LH u świń wykazano również w badaniach Barba i wsp. [1]. Stwierdzono bowiem, że egzogenna β -endorfina nie tylko ogranicza wydzielanie LH przez izolowane komórki przysadki, ale także zmniejsza jego wewnątrzkomórkową koncentrację. Nalokson, antagonist receptorów opioidowych, powoduje zwiększenie wydzielania

TABELA 1. Wpływ badanych czynników na sekrecję ir- β -endorfiny *in vitro* przez komórki przedniego płata przysadki loszek OVX otrzymujących placebo lub hormony steroidowe [7, 8]

Badane czynniki	Loszki doświadczalne			
	OVX + placebo	OVX+P4	OVX+BE	
			30–36 h przed ubojem	60–66 h przed ubojem
GnRH	brak	brak	brak	↑
OT	↑	↑	brak	↑
VIP	↑	↑	↑	↑
Środki adrenergiczne				
α -agonista (fenylefryna)	brak	↑	brak	↑
β -agonista (<i>izoprenalina</i>)	↑	brak	brak	↑

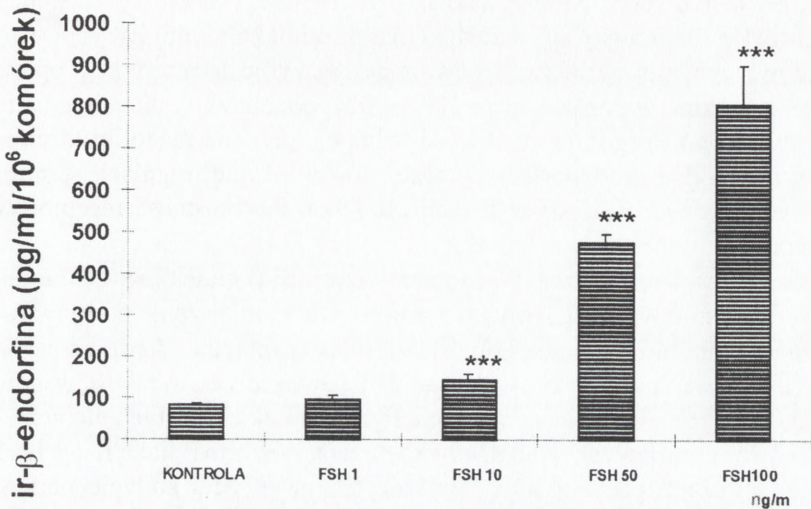
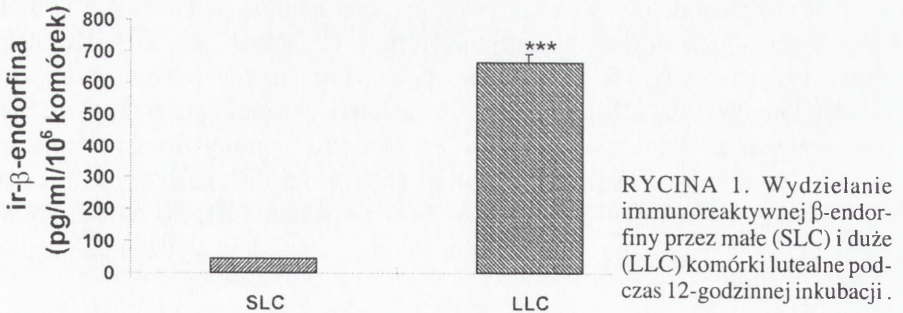
Objaśnienia: ↑ – wzrost sekrecji ir- β -endorfiny pod wpływem badanych czynników;
brak – nie stwierdzono wpływu

LH. W cytowanych badaniach zarówno nalokson, jak i β -endorfina wykazywały właściwości modulujące reaktywność komórek przysadki na działanie GnRH.

SEKRECJA IMMUNOREAKTYWNEJ β -ENDORFINY PRZEZ KOMÓRKI JAJNIKA ORAZ WPŁYW OPIOIDÓW NA STEROIDOGENEZĘ JAJNIKOWĄ U ŚWIŃ

Peptydy opioidowe powstające z głównych prekursorów także wykryto w materiale pochodzącym z jajników różnych gatunków [3, 4, 9, 10, 15, 19, 20, 23]. Wyniki naszych badań wykazały, że zawartość ir- β -endorfiny w ciałkach żółtych świni wielokrotnie wzrasta w miarę ich rozwoju, osiągając najwyższe wartości między 14 a 18 dniem cyklu rujowego [19]. W badaniach *in vitro* stwierdziliśmy, że komórki lutealne wydzielają zwiększone ilości ir- β -endorfiny pod wpływem ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (HCG) [20], przy czym duże komórki lutealne wytwarzają znacznie więcej (ok. 15-krotnie) tego peptydu niż małe komórki (ryc. 1). Prolaktyna (PRL) i OT działały przeciwstawnie do HCG, tzn. hamująco, na wydzielanie ir- β -endorfiny przez komórki lutealne [19]. Natomiast jedna z cytokin uczestniczących w lokalnej regulacji funkcji jajnika – czynnik martwicy nowotworów (TNF α) sama nie wykazywała wpływu na produkcję β -endorfiny przez komórki lutealne, jednakże całkowicie znosiła jej stymulację przez HCG w dużych komórkach lutealnych [20]. Komórki ziarniste pęcherzyków jajnikowych świni również wytwarzają ir- β -endorfinę [10] w warunkach *in vitro* i proces ten jest silnie stymulowany (ponad 8-krotnie) przez FSH (ryc. 2). Komórki osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego świni wykazują zbliżone możliwości do komórek ziarnistych w zakresie wytwarzania β -endorfiny [9]. Spośród przebadanych czynników (LH, PRL, hormony steroidowe), jedynie LH (10–100 ng/ml) i PRL (1–100 ng/ml) wykazywały tendencje, odpowiednio, do podwyższania ($p=0,094$) i obniżania ($p=0,056$) sekrecji ir- β -endorfiny *in vitro* przez komórki osłonki. Działanie LH było całkowicie znoszone przez hormony steroidowe, takie jak: P $_4$, testosteron (T) i 17 β -estradiol (E $_2$). Przytoczone dane sugerują, że wytwarzanie β -endorfiny oraz prawdopodobnie innych peptydów opioidowych przez komórki ciała żółtego i pęcherzyka jajnikowego może podlegać znacznym wahaniom w zależności od panującego statusu hormonalnego.

Występowanie specyficznych receptorów opioidowych w komórkach jajnika [7, 12, 23] stwarza endogennym opioidom, szczególnie lokalnie wytwarzanym, możliwość oddziaływania na steroidogenezę jajnikową. W badaniach własnych przeprowadzonych na loszkach stwierdzono wpływ agonisty opioidowego FK 33-824, wykazującego powinowactwo do receptorów opioidowych typu μ i δ ($\mu > \delta$), na wydzielanie niektórych hormonów steroidowych przez komórki lutealne [11, 18]



RYCINA 2. Wydzielanie immunoreaktywnej β -endorfiny przez komórki ziarniste z dużych pęcherzyków pod wpływem różnych dawek FSH (ng/ml). Gwiazdkami oznaczono istotne różnice w porównaniu z kontrolą ($p < 0,001$)

oraz komórki ziarniste [10] i osłonki wewnętrznej [9] dużych pęcherzyków jajnikowych (tab. 2).

Zastosowany w naszych badaniach agonista opioidowy FK 33-824 miał wybiórczy wpływ na podstawową sekrecję hormonów steroidowych przez poszczególne komórki jajnika. W większości przypadków zwiększał wydzielanie P_4 , T i androstendionu (A_4) przez komórki pęcherzykowe (tab. 2), ale nie powodował zmian w sekrecji estrogenów. Komórki lutealne reprezentujące wczesną i środkową fazę lutealną wykazywały stosunkowo niewielką reaktywność na FK 33-824. Biorąc pod uwagę występowanie największej zawartości ir- β -endorfiny w ciałkach żółtych z 14–18 dnia cyklu rujowego, można przypuszczać, że komórki lutealne są bardziej podatne na działanie opioidów w późniejszym okresie cyklu, np. podczas luteolizy.

FK 33-824 modulował także proces steroidogenezy w badanych komórkach w obecności odpowiednich czynników tropowych, takich jak: LH, HCG, FSH lub PRL. Przykładowo, FK 33-824, działając samodzielnie powodował zwiększenie wydzielania P_4 , A_4 i T przez komórki osłonki wewnętrznej dużych pęcherzyków jajnikowych świni, lecz stosowany z LH i PRL zmniejszał stymulujący wpływ tych hormonów na sekrecję P_4 . Z kolei, w obecności PRL całkowicie tracił zdolność do pobudzania sekrecji T, mimo że dodanie samej PRL do zawiesiny komórek osłonki wewnętrznej nie spowodowało istotnych zmian w wydzielaniu tego steroidu [9].

W badaniach przeprowadzonych na komórkach pęcherzyka jajnikowego [9, 10] niekiedy obserwowano podobne, zamiast przeciwstawnych, efekty działania agonisty (FK 33-824) i antagonisty opioidowego (naloksonu), które mogły być spowodowane różnicami w powinowactwie zastosowanych związków do receptorów opioidowych. Fakt, że nalokson, w porównaniu z FK 33-824, dodatkowo oddziałuje na receptory opioidowe typu κ , sugeruje możliwość pełnienia przez te receptory i ich naturalne ligandy (pochodne prodynorfiny) istotnej roli w lokalnej regulacji steroidogenezy jajnikowej. We wcześniejszych badaniach wykazano obecność receptorów typu κ w komórkach ziarnistych świni [23].

W badaniach Gregoraszcuk i Słomczyńskiej [6] β -endorfina – naturalny ligand receptorów opioidowych (głównie μ), powodował zmniejszenie podstawowego wydzielania P_4 , ale nie E_2 , przez komórki ziarniste z małych i średnich pęcherzyków jajnikowych świni. Nalokson wykazywał działanie przeciwstawne w porównaniu z β -endorfiną, tzn. pobudzał wydzielanie P_4 z komórek ziarnistych małych i średnich pęcherzyków jajnikowych. Podstawowa sekrecja, zarówno P_4 jak i E_2 , przez komórki ziarniste z dużych pęcherzyków jajnikowych nie ulegała zmianie pod wpływem β -endorfiny, podobnie jak w naszych doświadczeniach po zastosowaniu FK 33-824 (tab. 2). W obecności LH, β -endorfina ograniczała wydzielanie P_4 i E_2 przez komórki ziarniste pochodzące z pęcherzyków jajnikowych wszystkich rozpatrywanych kategorii. Przyczyną obserwowanej interakcji peptydów opioidowych z LH może być m.in. ich modulujące oddziaływanie na zawartość receptorów LH w komórkach jajnika, bowiem w naszych wcześniejszych badaniach odnotowano wpływ FK 33-824 na ekspresję genu receptora LH w komórkach lutealnych reprezentujących środkową fazę lutealną: w małych – pobudzający, a w dużych – hamujący [8]. Na podstawie wyników badań własnych oraz Gregoraszcuk i Słomczyńskiej [6], które przeprowadzono w podobnych warunkach, można sądzić, że zróżnicowane oddziaływania (pobudzające lub hamujące) związków opioidowych na steroidogenezę w komórkach ziarnistych są powiązane z procesami selekcji i dojrzewania pęcherzyków jajnikowych.

W obecnie wykonywanych przez nas doświadczeniach (dane niepublikowane), zmierzających do wyjaśnienia aktywności wewnątrzkomórkowych systemów przekazywania sygnału w komórkach dużych pęcherzyków jajnikowych w odpowiedzi

TABELA 2. Wpływ FK 33-824 na steroidogenezę jajnikową u świń [14, 15, 21, 22]

Rodzaj komórek jajnika	Zmiany w sekrecji hormonów steroidowych				
	Progesteron (P ₄)	Androsten-dion (A ₄)	Testosteron (T)	Estron (E ₁)	Estradiol (E ₂)
PĘCZERZYKI DUŻE					
K. osłonki wewnętrznej (interakcje)	↑ (LH, PRL)	↑	↑ (PRL)	brak	brak
K. ziarniste (interakcje)	brak (FSH, PRL)	↑ (FSH, PRL)	↑	brak	brak
CIAŁKA ŻÓLTE					
Dzień cyklu: 2-4					
Małe k. lutealne	brak	brak	-	-	-
Duże k. lutealne	brak	brak	-	-	-
Mieszana k. lutealnych	↑	brak	-	-	-
Dzień cyklu: 8-10					
Małe k. lutealne (interakcje)	brak (HCG)	brak	-	-	-
Duże k. lutealne	brak	brak	-	-	-

Objaśnienia:

↑ – wzrost sekrecji steroidu pod wpływem FK 33-824; brak – nie stwierdzono wpływu; – – nie badano wpływu; w nawiasach podano hormony, z którymi FK 33-824 wchodził w interakcję, wpływając na steroidogenezę w kresłobnych komórkach jajnika.

na działanie opioidów, skrócono czas inkubacji badanych komórek z 24 do 4 h. Po wprowadzeniu tej zmiany, w przeciwieństwie do wcześniej występującej stymulacji (tab. 2) obserwowano hamujący wpływ większości stosowanych agonistów receptorów opioidowych (μ , δ i κ) na sekrecję steroidów przez komórki ziarniste (A₄, T, E₂) i osłonki wewnętrznej (P₄, A₄, T, E₂). Obserwacja ta wskazuje, że oprócz wyżej wymienionych czynników także czas ekspozycji komórek jajnika na działanie opioidów może znacząco modyfikować ich reakcję wydzielniczą.

PODSUMOWANIE

Peptydy opioidowe pochodzące z trzech głównych prekursorów są wytwarzane w przedniej części przysadki i w jajniku. W piśmiennictwie najczęściej prac dotyczy regulacji wytwarzania β -endorfiny, reprezentującej system POMC. Do czynników wykazujących wpływ na sekrecję β -endorfiny przez komórki przysadkowe świni, obok hormonu uwalniającego kortykotropinę (CRH), można zaliczyć GnRH, OT, VIP i środki adrenergiczne (α i β), zaś przez komórki jajnika, w zależności od ich rodzaju FSH, HCG (LH), OT, PRL i TNF α . Hormony steroidowe także wykazują właściwości modulujące wydzielanie β -endorfiny zarówno z przysadki, jak i jajnika.

Badania na izolowanych komórkach wykazały, że opioidy mogą hamować sekrecję LH przez komórki przysadki oraz modyfikować proces steroidogenezy w różnych komórkach jajnika. Wpływ opioidów na steroidogenezę jajnikową może być pobudzający lub hamujący, w zależności od rodzaju komórek i czasu ich ekspozycji na działanie opioidu, współdziałania z innymi czynnikami regulującymi ten proces oraz statusu hormonalnego zwierzęcia.

Wytwarzanie EOP przez komórki przysadkowe i jajnikowe oraz stwierdzone możliwości ich oddziaływania na aktywność wydzielniczą tych komórek dowodzi istotnego udziału endogennych opioidów w lokalnej – autokrynnej i parakrynnej – regulacji czynności przysadki i jajnika u świni.

LITERATURA

- [1] BARB CR, BARRETT JB, WRIGHT JT, KRAELING RR, RAMPACEK GB. Opioid modulation of LH secretion by pig pituitary cells *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1990; **90**: 213–219.
- [2] BOGACKA I, SIAWRYS G, OKRASA S, KAMIŃSKI T, PRZAŁA J. The influence of GnRH, OT and VIP on β -endorphin secretion and cyclic nucleotides (cAMP and cGMP) production by porcine pituitary cells *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 2001; (w druku).
- [3] CUPO A, MENEZO Y, BUENO L. Enkephalin production by the *corpus luteum*. *Neuropeptides* 1987; **9**: 237–245.
- [4] EHRENREICH H, STOCK A, SCHULZ R. Opioids in the bovine luteal cell culture (*in German*). *Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung*. 1985 X Veterinar-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, Berlin.
- [5] FULLERTON MJ, SMITH I, FUNDER JW. Immunoreactive dynorphin is regulated by estrogen in rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 1988; **47**: 16.
- [6] GREGORASZCZUK E, SŁOMCZYŃSKA M. β -endorphin inhibition of progesterone secretion by porcine granulosa cells during follicle development. *Reprod Nutr Dev* 1998; **38**: 227–234.
- [7] HAMADA H, KISHIOKA S, YAMOTO M, NAKANO R. [³H]-naloxone binding sites in porcine ovarian follicles and *corpora lutea* during the ovarian cycle. *Eur J Endocrinol* 1995; **132**: 622–626.
- [8] KAMIŃSKI T, GAWROŃSKA B, DERECKA K, OKRASA S, PRZAŁA J. Gene expression and peptide localisation for LH/hCG receptor in porcine small and large luteal cells: possible regulation by opioid peptides. *J Physiol Pharmacol* 2000; **51**: 359–368.
- [9] KAMIŃSKI T, OKRASA S, BOGACKA I, SIAWRYS G, PRZAŁA J. Porcine theca cells produce immunoreactive β -endorphin and change steroidogenesis in response to opioid agonist. *Acta Vet Hun* 2001; **49**: 319–329.
- [10] KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, BOGACKA I, PRZAŁA J. The physiological role of β -endorphin in porcine ovarian follicles. *Reprod Nutr Dev* 2000; **40**: 113.
- [11] KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, OKRASA S, PRZAŁA J. Action of the opioid agonist FK 33-824 on porcine small and large luteal cells from the mid-luteal phase: effect on progesterone, cAMP, cGMP and inositol phosphate release. *Anim Reprod Sci* 1999; **56**: 245–257.
- [12] KATO S, FUKUDA K, MORIKAWA H, SHODA T, MIMA H, MORI K. Adaptations to chronic agonist exposure of mu-opioid receptor-expressing chinese hamster ovary cells. *Eur J Pharmacol* 1998; **345**: 221–228.

- [13] KINEMAN RD, KRAELING RR, CRIM JW, LESHIN LS, BARB CR, RAMPACEK GB. Localization of proopiomelanocortin (POMC) immunoreactive neurons in the forebrain of the pig. *Biol Reprod* 1989; **40**: 1119–1126.
- [14] KRAELING RR, BARB CR. Hypothalamic control of gonadotrophin and prolactin secretion in pigs. *J Reprod Fert* 1990; **40**: 317.
- [15] LOLAIT SJ, AUTELITANO DJ, MARKWICK AJ, TOH BH, FUNDER JW. Co-expression of vasopressin with β -endorphin and dynorphin in individual cells from the ovaries of Brattleboro and Long-Evans rats: immunocytochemical studies. *Peptides* 1986; **7**: 267–276.
- [16] OKRASA S, KALAMARZ H, ZIĘCIK AJ. Gonadotrophin-releasing hormone release *in vitro* from the stalk median eminence of cyclic and ovariectomized gilts in response to naloxone or morphine. *Anim Reprod Sci* 1995; **40**: 151–163.
- [17] OKRASA S. Udział opioidów w regulacji wydzielania LH u świń w różnych okresach aktywności płciowej. *Endokrynol Pol* 1997; **2** (Supl. 5): 169.
- [18] PRZAŁA J, KAMIŃSKI T, BOGACKA I, SIAWRYS G. The role of opioids in porcine *corpus luteum* function. *J Physiol Pharmacol* 1996; **42** (Supl. 1): 101–110.
- [19] PRZAŁA J, KAMIŃSKI T, OKRASA S, SIAWRYS G, BOGACKA I. The content of β -endorphin-like immunoreactivity in porcine *corpus luteum* (*in vivo*) and the potential roles of progesterone, oxytocin and prolactin in the regulation of β -endorphin release from luteal cells *in vitro*. *Reprod Dom Anim* 2001; **36**: 107–112.
- [20] PRZAŁA J, KAMIŃSKI T, SIAWRYS G, OKRASA S. Large luteal cells are the source of immunoreactive β -endorphin in the pig: effects of hCG and TNF on its secretion by luteal cells *in vitro*. *Endocrine Reg* 1999; **33**: 117–123.
- [21] SCHÄFER MK, DAY R, ORTEGA MR, AKIL H, WATSON SJ. Proenkephalin messenger RNA is expressed both in the rat anterior and posterior pituitary. *Neuroendocrinology* 1990; **51**: 444–448.
- [22] SIAWRYS G. Wpływ GnRH oraz stymulatorów i blokerów układu adrenergicznego na wydzielanie hormonu luteinizującego (LH), prolaktyny (PRL) i β -endorfiny przez komórki przysadki loszek. *Praca doktorska* 1999; Biblioteka UWM, Olsztyn.
- [23] SŁOMCZYŃSKA M, PIERZCHAŁA-KOZIEC K, GREGORASZCZUK E, MADERSPACH K, WIERZCHOŚ E. The Kappa-opioid receptor is present in porcine ovaries: localization in granulosa cells. *Cytobios* 1997; **92**: 195–202.
- [24] ZIĘCIK AJ, YEARWOOD HA, ESPAOA F. Effect of naloxone and morphine on the estradiol induced LH surge in gilts. *Arch Zootech* 1994; **43**: 514.

Adres autorów: Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, UWM,
10-718 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 5

The text is extremely faint and illegible, appearing to be a dense block of academic writing. It likely contains a discussion or argument related to the journal's focus on the philosophy of education.

MECHANIZM DZIAŁANIA PROLAKTYNY W UKŁADZIE ROZRODCZYM SAMICY*

MECHANISM OF PROLACTIN ACTION IN FEMALE REPRODUCTIVE TRACT

Renata CIERESZKO

Katedra Fizjologii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Streszczenie: Prolaktyna reguluje wiele różnorodnych procesów biologicznych zachodzących w jajniku i macicy. Poszczególne warianty prolaktyny, wiążąc się do jednej z izoform swojego receptora, mogą stymulować różne wewnątrzkomórkowe szlaki transdukcji sygnałów. Prowadzi to do aktywacji zestawu genów specyficznego dla danej tkanki, gatunku i okresu rozrodczego. Poznanie związku pomiędzy określoną funkcją biologiczną prolaktyny a sposobem jej oddziaływania w komórce docelowej, pomimo postępu zanotowanego w ostatniej dekadzie, jest aktualnym celem wielu badań.

(Postępy Biologii Komórki 2001; 28 supl. 18: 57–67)

Słowa kluczowe: prolaktyna, jajnik, macica, receptory, transdukcja sygnału

Summary: Prolactin regulates many diverse biological processes in ovary and uterus. Particular variants of prolactin can bind different forms of the prolactin receptor, activate various cellular signaling pathways and regulate a diverse set of genes. The specific prolactin action depends on tissue, species and reproductive period. Despite the recent effort of many research groups, most of the details concerning the relationship between biological function of prolactin and the specific signal transduction pathway remains to be explored.

(Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18: 57–67)

Key words: prolactin, ovary, uterus, receptors, signal transduction

W latach dwudziestych ubiegłego wieku prolaktyna (PRL) została zidentyfikowana jako przysadkowy czynnik indukujący sekrecję mleka u królików. Aktualnie przypisuje się jej ponad 300 różnych funkcji pełnionych u kręgowców. Oddziaływania PRL obejmują tak różnorodne procesy, jak: gospodarka wodno-mineralna; wzrost

*Pracę wykonano w ramach grantu Komitetu Badań Naukowych nr 5P06D 048 14.

i rozwój; endokrynologia i metabolizm oraz układ nerwowy, immunologiczny i rozrodczy. Chociaż funkcje PRL związane z procesem reprodukcji są bardzo zróżnicowane, można je uporządkować w następujące grupy:

- 1) odżywanie młodych,
- 2) działanie na jajnik i macicę,
- 3) działanie na jądra i dodatkowe gruczoły płciowe [3].

Celem niniejszego opracowania jest charakterystyka oddziaływania PRL na jajnik i macicę.

Prolaktyna jest hormonem produkowanym przez komórki laktotropowe przedniego płata przysadki. W ostatniej dekadzie ukazało się jednak wiele doniesień wskazujących na istnienie PRL pozaprzysadkowej. Ekspresję genu PRL stwierdzono m.in. w myometrium i błonie doczesnowej. Immunologiczne dowody na obecność PRL znaleziono w ciałku żółtym i endometrium, zidentyfikowano ją w płynie pęcherzykowym i owodniowym. Istnienie pozaprzysadkowej PRL podkreślają wyniki doświadczeń przeprowadzonych na hipofizektomizowanych szczurach, w których krwi obwodowej znaleziono 20% biologicznie aktywnej PRL [2]. Receptory PRL (PRLR) wykryto w wielu narządach, w tym w pęcherzyku jajnikowym, ciałku żółtym i macicy. Jednoczesne występowanie PRL i jej receptorów w strukturach układu rozrodczego sugeruje możliwość para- lub autokrynnego oddziaływania tego hormonu na komórki docelowe [2, 3].

U większości zwierząt, cząsteczka PRL składa się ze 197–199 aminokwasów (ok. 23 kDa) i jest kodowana przez pojedynczy gen. Znalezione u ssaków warianty PRL powstają w wyniku alternatywnego składania mRNA lub są rezultatem posttranslacyjnych modyfikacji: glikozylacji, fosforylacji, deamidacji, dimeryzacji, siarczanowania i rozszczepienia cząsteczki PRL przez enzymy proteolityczne. Do tych ostatnich należy wariant PRL 1-173 występujący tylko u samic. Innym wariantem mającym znaczenie dla regulacji procesów rozrodu jest fosforylowana forma PRL, której sekrecja u bydła zależy od okresu rozrodczego [27].

Udokumentowane działania PRL na układ rozrodczy obejmują jej wpływ na receptory, enzymy, inhibitory enzymów oraz inne białka. Do genów, których ekspresja w komórkach układu rozrodczego samicy jest regulowana przez prolaktynę, zalicza się obecnie geny kodujące receptor hormonu luteinizującego (LH), 20 α -hydroksysteroidową dehydrogenazę (20 α HSD), alfa-2-makroglobulinę, (α_2 M) i aromatazę [26]. W macicy PRL zwiększa aktywność sekrecyjną komórek endometrium i zmniejsza aktywność skurczową myometrium. U szczura stwierdzono, że sprzyja implantacji blastocysty. Na poziomie komórkowym PRL zwiększa ilość receptorów progesteronowych i estrogenowych, potęguje efekty wywoływane przez progesteron (P_4) i ogranicza metabolizm tego hormonu w macicy. Stymulujący wpływ PRL na dojrzewanie oocyta i rozwój embrionów był stwierdzony u królików [3]. W jajniku, poza oddziaływaniem na oocyt, PRL wpływa na funkcjonowanie komórek pęcherzyka jajnikowego i ciałka żółtego.

W regulacji funkcji ciała żółtego szczurów PRL pełni podwójną rolę, będąc czynnikiem zarówno luteotropowym, jak i luteolitycznym. Wyrzuty PRL przed owulacją i w czasie kopulacji wspierają rozwój nowo tworzonych ciałek żółtych cyklicznych i ich przekształcenie w ciała ciążowe. Te wysokie poziomy PRL przyczyniają się jednocześnie do strukturalnej regresji ciała żółtego z poprzedniego cyklu [14, 18]. Luteotropowe działanie PRL jest wynikiem:

- 1) hamowania $20\alpha\text{HSD}$, która kontroluje redukcję P_4 do jego nieaktywnych pochodnych;
- 2) indukcji receptorów LH;
- 3) zwiększenia wykorzystania prekursora hormonów steroidowych – cholesterolu zawartego w lipoproteinach osoczowych [12, 21, 28].

Luteolityczne działanie PRL u szczurów związane jest z indukcją apoptozy w komórkach lutealnych oraz akumulacją makrofagów w ciałku żółtym. Wśród mediatorów stymulowanej prolaktyną regresji ciała żółtego wymienia się prostaglandyny, wolne rodniki tlenowe i cytokiny [14].

Wyniki badań *in vitro* [5, 15] i *in vivo* [4, 6] wskazują na luteotropowy wpływ PRL u świń. To stymulujące działanie PRL obserwowane jest u tego gatunku tylko w czasie formowania się ciała żółtego (luteinizacja) i w drugiej połowie ciąży. U świń stymulacja produkcji P_4 przez PRL jest prawdopodobnie wynikiem zwiększenia przez komórki lutealne wykorzystania cholesterolu pochodzącego z osoczowych lipoprotein [21]. Intrygująca jest także obserwowana u loch w czasie luteolizy, ciągle niewyjaśniona zależność pomiędzy PRL a prostaglandyną $\text{F}_{2\alpha}$ [11].

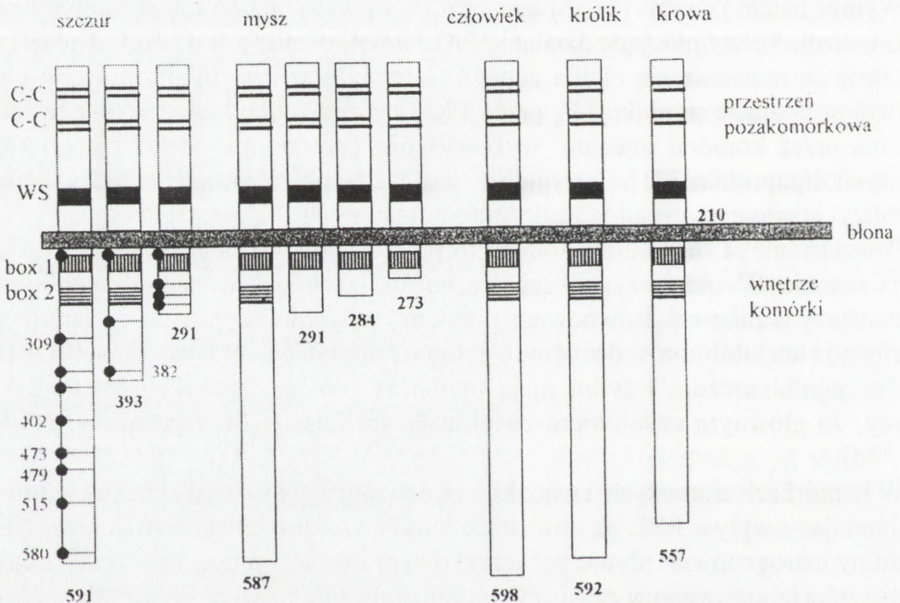
Powstawanie i liza ciała żółtego to procesy, w których zachodzi restrukturyzacja tkanek. W obu przypadkach ważne jest zachowanie stanu proteolitycznej homeostazy tkankowej. Równowaga pomiędzy aktywnością proteaz (plazmina, kolagenazy) i ich inhibitorów decyduje o zasięgu i stopniu przebudowy tkanek. Okazuje się, że jajniki szczura i świni mają inhibitory proteaz, w tym $\alpha_2\text{M}$. Podkreślić należy, że głównym czynnikiem zwiększającym ilość $\alpha_2\text{M}$ u szczurów jest PRL [24, 26].

W komórkach ziarnistych i osłonki wewnętrznej u większości zwierząt obserwuje się hamujący wpływ PRL na aromatazę jajnikową i produkcję estrogenów. Niskie poziomy estrogenów w płynie pęcherzykowym i osoczu mogą się wiązać z atrezią pęcherzyka jajnikowego w czasie cyklu, zahamowaniem jego dojrzewania w okresie laktacji czy też niepłodnością [12, 20, 28].

Przeciwnie do wpływu wywieranego na estrogeny, PRL stymuluje produkcję P_4 przez komórki ziarniste i osłonki. U świni PRL zwiększa syntezę P_4 w komórkach ziarnistych pochodzących z dużych, a hamuje w komórkach pochodzących z małych pęcherzyków jajnikowych [8, 22, 28]. Ostatnio ukazało się doniesienie, w którym niskie koncentracje PRL w medium hodowlanym (10 ng) stymulowały, a wyższe stężenia PRL (≥ 25 ng) obniżały wiązanie hormonu dojrzewania pęcherzyków (FSH) i produkcję P_4 przez świńskie komórki ziarniste [25]. Ciągle aktualna wydaje się

koncepcja McNeilly i wsp. [20], wg której PRL w niskich stężeniach wspomaga funkcje rozrodcze, a w wysokich wykazuje działanie hamujące.

Powstaje pytanie, jakie mechanizmy umożliwiają prolaktynie realizację tak różnorodnych i często przeciwstawnych zadań. Pierwsze informacje, dotyczące mechanizmu działania PRL, pochodzą z początku lat dziewięćdziesiątych, kiedy odkryto, że PRLR należą do rodziny receptorów cytokinowych. Od tego czasu wyróżniono trzy formy PRLR: długą, średnią i krótką (ryc. 1). Wszystkie izoformy receptora PRL powstają w wyniku alternatywnego składania pierwotnego transkryptu i wyróżnia się w nich część pozakomórkową, przezbłonową i cytoplazmatyczną. Różnią się one ilością i składem aminokwasowym części cytoplazmatycznej receptora. Formę długą receptora (PRLR_L) znaleziono u wszystkich badanych dotąd gatunków (ryc. 1). Krótkie formy receptora PRL (PRLR_S) stwierdzono u szczura i myszy. Występowanie formy pośredniej ograniczone jest tylko do komórek NB2 (linia komórkowa chłoniaka bogata w receptory PRL). Część pozakomórkowa PRLR bierze



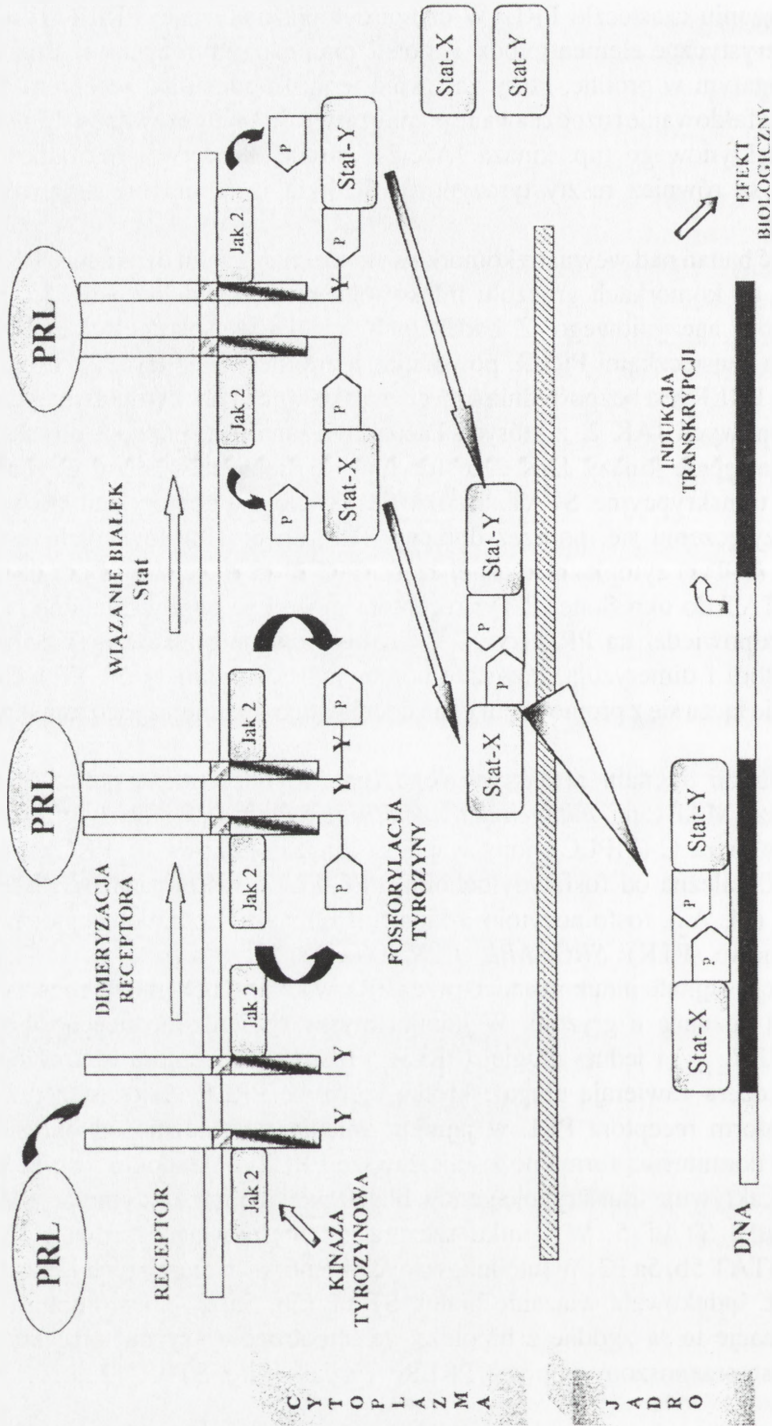
RYCINA 1. Schematyczne przedstawienie znanych izoform receptora prolaktyny (PRLR). Domena pozakomórkowa, decydująca o wiązaniu cząsteczki PRL (210 aminokwasów), zawiera 2 pary cystein połączone mostkami dwusiarczkowymi (C-C) oraz motyw WS (Trp-Ser-aminokwas-Trp-Ser). Domena cytoplazmatyczna PRLR zawiera konserwatywny region box 1 (wiązanie kinazy JAK 2). Formy krótkie receptora nie mają regionu box 2. Miejsca fosforylacji reszt tyrozynowych – czarne kropki – zaznaczono na schemacie izoform PRLR szczura. Poprzez fosforylowane reszty tyrozynowe (P-Tyr), białka mające domenę SH2 (np. białka STAT) mogą się wiązać z receptorem. Fosforylacja określonej tyrozyny może decydować o funkcji receptora i specyficzności odpowiedzi na PRL: 1/P-Tyr 580 wydaje się być krytyczna dla aktywacji genów białek mleka, 2/P-Tyr 309 i 382 są wymagane do aktywacji genów związanych ze wzrostem. Krótkie formy receptora PRL prawdopodobnie w ogóle nie ulegają fosforylacji

udział w wiązaniu cząsteczki PRL. W części cytoplazmatycznej PRLR występują trzy charakterystyczne elementy: box 1, box 2 oraz reszty tyrozynowe. Box 1 jest regionem bogatym w prolinę, który zapewnia temu fragmentowi receptora charakterystyczne sfałdowanie rozpoznawane przez cząsteczki zaangażowane w transdukcję sygnału prolaktynowego (np. kinaza JAK 2). Istotne dla wywołania odpowiedzi biologicznej są również reszty tyrozynowe. Krótkie izoformy nie mają regionu box 2 [1, 3].

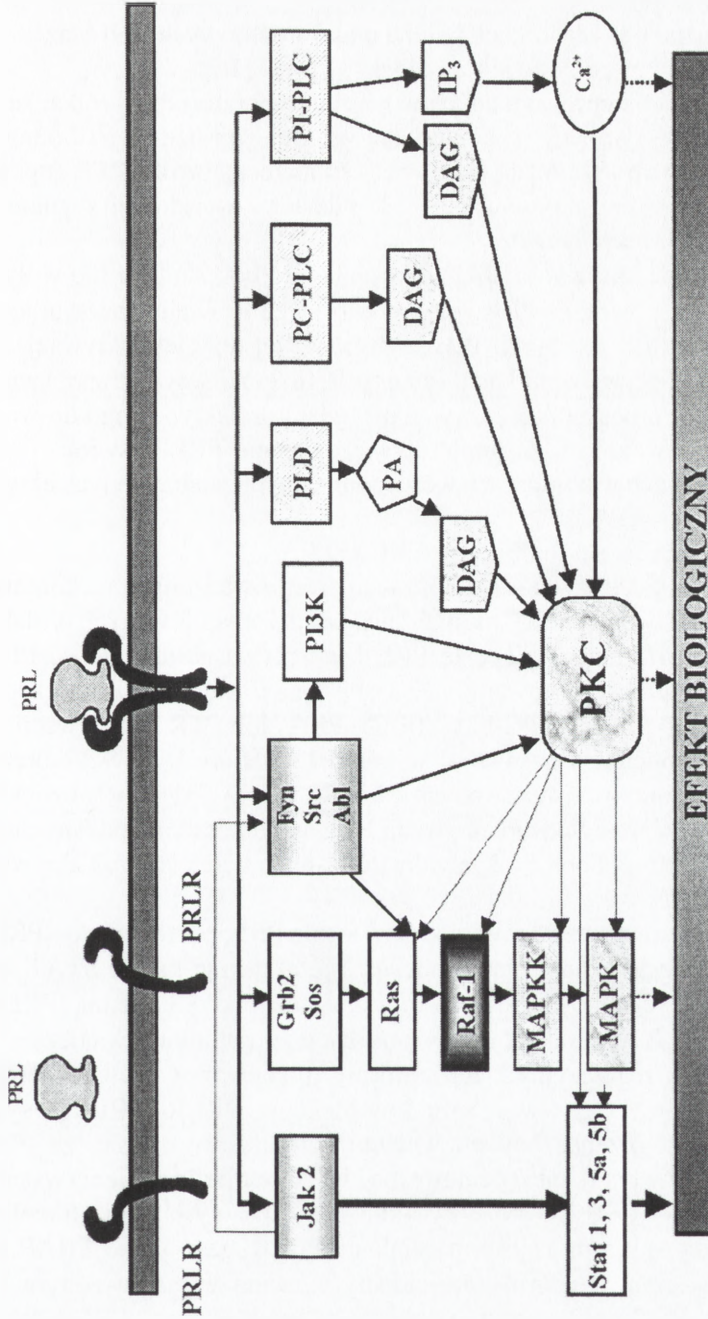
Większość badań nad wewnątrzkomórkowym mechanizmem działania PRL przeprowadzono na komórkach gruczołu mlekowego oraz układu nerwowego, białokrwinkowego i naczyniowego. Z badań tych wynika, że cząsteczka PRL łączy się z dwiema cząsteczkami PRLR, powodując ich dimeryzację (ryc. 2). Powstanie homodimeru PRLR jest bezpośrednią przyczyną aktywacji pary cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych JAK 2, z których każda związana jest, poprzez box 1, z receptorem. Następnie kinazy JAK 2 fosforylują: 1) siebie nawzajem, 2) receptor, 3) czynniki transkrypcyjne STAT. Białka STAT ulegają fosforylacji po wcześniejszym przyłączeniu się, poprzez domeny SH2, do ufosforylowanych reszt tyrozynowych (P-Tyr) cytoplazmatycznej części PRLR. Wydaje się, że przyłączenie się białka STAT do określonej P-Tyr receptora może być odpowiedzialne za specyficzność odpowiedzi na PRL (ryc. 1). Ufosforylowane białka STAT odłączają się od receptora i dimeryzują. Powstałe homo- lub heterodimery STAT wchodzi do jądra, gdzie łączą się z promotorem genu docelowego, indukując jego transkrypcję [3, 9, 23].

W transdukcji sygnału prolaktynowego (ryc. 3) uczestniczą ponadto: szlak Ras/Raf/kinazy MAP (ang. *mitogen activated protein kinase*), fosfatydyloinozytolozależna fosfolipaza C (PIPLC), jony wapnia i kinaza białkowa C (PKC), a także fosfolipaza C zależna od fosfatydylocholino (PC-PLC), fosfolipaza D (PLD), fosfolipaza A₂ (PL A₂), fosfoinozytolo-3-kinaza (PI3kinaza) oraz niereceptorowe kinazy tyrozynowe (PTK): *SRC*, *ABL*, *FYN*, *LCK* [3, 9].

Transdukcja sygnału indukowanego przez PRL w komórkach układu rozrodczego jest najlepiej poznana u gryzoni. W jajniku myszy stwierdzono obecność trzech krótkich (PRLR_{S1-3}) i jednej długiej (PRLR_L) izoformy receptora PRL. Komórki jajnikowe szczura zawierają długą i krótką izoformę PRLR. Choć stężenie i lokalizacja izoform receptora PRL w jajniku zmienia się zależnie od okresu rozrodczego, to dominującą formą pozostaje zawsze PRLR_L. Wiadomo jest, że długa forma PRLR aktywuje transkrypcję genów białek mleka poprzez stymulację kinazy JAK 2 i białka STAT 5. W jajniku szczura zidentyfikowano zarówno JAK 2, jak i białka STAT 5b, 5a i 3. W luteinizowanych komórkach ziarnistych i lutealnych szczura, PRL indukowała wiązanie białek STAT (5b, 5a, 3) do promotora genu $\alpha 2M$. Informacje te są zgodne z hipotezą, że luteotropowy sygnał prolaktynowy u szczura jest przenoszony poprzez PRLR_L i szlak JAK/ STAT [23, 26, 30].



RYCINA 2. Szlak JAK/STAT – jedna z ważniejszych wewnątrzkomórkowych dróg oddziaływania prolaktyny (PRL); JAK 2: niereceptorowa kinaza tyrozynowa z grupy JAK (ang. Janus kinase); STAT-X i STAT-Y: czynniki transkrypcyjne STATt (ang. signal transducers and activators of transcription)



RYCINA 3. Wewnątrzkomórkowe szlaki działania prolaktyny (PRL); kinazy tyrozynowe niereceptorowe: JAK, FYN, SRC, ABL; kinazy serynowo-treoninowe: kinaza białkowa (PKC), kinaza aktywująca kinazy aktywowane mitogenami (Raf1/ MAPKKK), kinaza aktywowana mitogenami (MAPK); kinaza o aktywności kinazy serynowo-treoninowej i tyrozynowej: kinaza aktywująca kinazy aktywowane mitogenami (MAPKK); PI3K fosfatydoinozytolo-3-kinaza; PI-PLC – fosfatydoinozytolo-3-kinaza; PC-PLC – fosfatydoinozytolo-3-kinaza; PC-PLC – fosfatydoinozytolo-3-kinaza; PLD – fosfatydoinozytolo-3-kinaza; PA – fosfatydoinozytolo-3-kinaza; DAG – fosfatydoinozytolo-3-kinaza; IP₃ – fosfatydoinozytolo-3-kinaza; Ca²⁺ – fosfatydoinozytolo-3-kinaza; RAS – fosfatydoinozytolo-3-kinaza; GRB2 – białko adaptorowe; STAT – czynnik transkrypcyjny; DAG – diacyloglicerol; IP₃ – inozytolo(1,4,5)trisfosforan; PA – kwas fosfatydowy

Badania z zastosowaniem inhibitorów PTK wskazują, że kinazy te pośredniczą również w działaniu PRL na

- 1) aktywność aromatazy w komórkach jajnika ptaków domowych [19] oraz
- 2) produkcję P₄ przez komórki lutealne i osłonki świni [7, 16].

Z wstępnych badań przeprowadzonych w naszym laboratorium wynika, że PRL stymuluje fosforylację tyrozyny w komórkach osłonki wewnętrznej i komórkach wczesnolutealnych świni [8]. Wydaje się więc, że niereceptorowe PTK (np. JAK, SRC) i czynniki przez nie aktywowane biorą udział w transdukcji sygnału prolaktynowego w komórkach jajnika.

Fakt, że hamowanie aktywności JAK 2 w ciałku żółtym szczura nie wpływało na regulację genu $20_{\alpha HSD}$ przez PRL [10], wskazuje, że PTK nie stanowią jedynej drogi oddziaływania PRL na jajnik. Potwierdzeniem tej tezy jest aktywacja PKC wywoływana przez PRL w komórkach lutealnych i osłonki wewnętrznej świni [5, 7, 22]. O roli PKC w procesie przekazywania sygnału prolaktynowego do wnętrza komórki świadczy również to, że luteotropowe działanie PRL u świni:

- 1) nie było obserwowane w komórkach wczesnolutealnych pozbawionych aktywnej PKC,
- 2) było znoszone w obecności inhibitorów PKC [5, 7].

Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniach przeprowadzonych na komórkach osłonki [22]. Droga aktywacji PKC w komórkach jajnika stymulowanych prolaktyną nie jest wyjaśniona. Wiadomo tylko, że PRL nie wpływa na aktywność PI-PLC i nie zwiększa wewnątrzkomórkowej koncentracji jonów wapnia w komórkach lutealnych [5]. Sugeruje to udział PC-PLC, PLD, PLA₂ lub PTK w aktywacji PKC w omawianych komórkach. Przeciwnie, w komórkach ziarnistych [29] oraz komórkach jajnika chomika transfekowanych PRL-R_L cDNA [31], PRL zwiększała koncentrację jonów wapnia. Sposób aktywacji PKC w komórkach poddanych działaniu PRL zależy prawdopodobnie od gatunku, rodzaju komórek i okresu aktywności rozrodczej zwierzęcia.

Znaleziona w jajniku szczura i myszy krótka forma PRL, przeciwnie do PRLR_L, nie wpływa na ekspresję genów białek mleka i nie aktywuje białek STAT. Fakt, że w komórkach atretycznego pęcherzyka myszy znaleziono tylko jedną (PRLR_{S2}) z czterech form PRLR występujących w jajniku tego gatunku, świadczy o potencjalnym znaczeniu regulacyjnym tej izoformy. Ponieważ w wyniku heterodimeryzacji receptorów PRL (tworzenie kompleksów PRLR_L/PRLR_S) sygnał prolaktynowy nie jest przenoszony do wnętrza komórki, uważa się, że PRLR_S może regulować wrażliwość tkanki docelowej na PRL. Ostatnie doniesienia wskazują, że stosunek PRLR_L do PRLR_S może być kluczowy dla wystąpienia luteolizy u szczura. Innym interesującym aspektem działania PRLR_S jest białko PRAP (ang. *PRL receptor associated protein*), które zidentyfikowano w ciałku żółtym kilku gatunków zwierząt. Białko to u szczura wiąże się do krótkiej formy PRLR. Wydaje

się, że kompleks PRLR_S/PRAP może być mediatorem działania PRL w komórkach ciała żółtego szczura [10, 23, 30].

Nieliczne prace dotyczące wewnątrzkomórkowego mechanizmu działania PRL w komórkach macicy wskazują na udział PKC [17] i PI3kinazy [13] w transmisji sygnału prolaktynowego w komórkach ludzkiego endometrium.

Podsumowując, prolaktyna reguluje wiele różnorodnych procesów biologicznych, zachodzących w jajniku i macicy. Wiążąc się do jednej z izoform swojego receptora, poszczególne warianty PRL mogą stymulować różne wewnątrzkomórkowe szlaki transdukcji sygnału, doprowadzając do aktywacji zestawu genów specyficznego dla danej tkanki, gatunku i okresu rozrodczego. Poznanie związku pomiędzy określoną funkcją biologiczną PRL a sposobem jej oddziaływania w komórce docelowej, pomimo postępu zanotowanego w ostatniej dekadzie, jest aktualnym celem wielu badań.

PODZIĘKOWANIA

Pragnę podziękować Pani Prof. Luizie Duszy za krytyczny komentarz do pierwszej wersji tekstu. Paniom A. Raszkowskiej i E. Kitowskiej dziękuję za pomoc w przygotowaniu rysunków.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ANTHONY RV, LIANG R, KAYLEP, PRATT SL. The growth hormone/prolactin gene family in ruminant placentae. *J Reprod Fertil* 1995; **49**: 83–95.
- [2] BEN-JONATHAN N, MERSHON JL, ALLEN DL, STEINMETZ RW. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Rev* 1996; **17**: 639–669.
- [3] BOLE-FEYSOT C, GOFFIN V, EDERY M, BINART N, KELLY PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Rev* 1998; **19**: 225–268.
- [4] CIERESZKO R, DUSZA L. Exogenous prolactin elevates plasma progesterone concentrations and reduces androgen concentrations during the early luteal phase of the porcine estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 1993; **31**: 141–154.
- [5] CIERESZKO RE, PETROFF BK, OTTOBRE AC, GUAN Z, STOKES BT, OTTOBRE JS. Assessment of the mechanism by which prolactin stimulates progesterone production by early corpora lutea of pigs. *J Endocrinol* 1998; **159**: 201–209.
- [6] CIERESZKO R, KAMIŃSKI T, OPAŁKA M, KAMIŃSKA B, DUSZA L. Prolactin involvement in the regulation of the hypothalamic-pituitary ovarian axis during the early luteal phase of the porcine estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 2001, w druku.
- [7] CIERESZKO R, OPAŁKA M, KAMIŃSKA B, DUSZA L. Luteotrophic action of prolactin during the early luteal phase in pigs: the involvement of protein kinases and phosphatases. *Reprod Biol* 2001, w druku.
- [8] CIERESZKO R, OPAŁKA M, RASZKOWSKA A, KITOWSKA E, DUSZA L. Udział kinazy i fosfatazy tyrozynowej w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnału niesionego przez prolaktynę w komórkach jajnika świni. *II Krajowy Zjazd Tow Biol Rozrodu*, Warszawa, 2001,

- [9] DOPPLER W. Regulation of gene expression by prolactin. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1994; **124**: 93–130.
- [10] DUAN WR, LINZER DIH, GIBORI G. Cloning and characterization of an ovarian-specific protein that associates with the short form of the prolactin receptor. *J Biol Chem* 1996; **271**: 15602–15607.
- [11] DUSZA L, OKRASA S, CIERESZKO R, KOTWICA G, TILTON JE. Endocrine changes associated with spontaneous luteolysis in sows. I. Temporal relationships among prolactin, prostaglandinF_{2α}, progesterone and LH. *Anim Reprod Sci* 1988; **17**: 115–122.
- [12] DUSZA L, TILTON JE. Role of prolactin in the regulation of ovarian function in pigs. *J Reprod. Fertil* 1990; Suppl. **40**: 33–45.
- [13] FURUI T, IMAI A, TAKAGI H, TAKAHASHI K, OHNO T, TAMAYA T. Inhibition by prolactin of membrane-associated phosphatidylinositol kinase of human endometrial fibroblast. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; **205**: 140–145.
- [14] GAYTAN F, MORALES C, BELLIDO C, AGUILAR R, MILLAN Y, MARTIN DE LAS MULAS J, SANCHEZ-CRIADO JE. Progesterone on an oestrogen background enhances prolactin-induced apoptosis in regressing corpora lutea in the cyclic rat: possible involvement of luteal endothelial cell progesterone receptors. *J Endocrinol* 2000; **165**: 715–724.
- [15] GREGORASZCZUK E. Steroid hormone release in cultures of pig corpus luteum and granulosa cells: effect of LH, hCG, PRL, and estradiol. *Endocrinol Exp* 1983; **17**: 59–68.
- [16] GREGORASZCZUK E, SŁOMCZYŃSKA M, STOKŁOSOWA S. Effect of genistein, typhostin and herbimycin on prolactin-stimulated progesterone production by porcine theca and luteal cells. *J Physiol Pharmacol* 1999; **50**: 477–484.
- [17] KALBAG SS, ROGINSKY MS, JELVEH Z, SULIMOVICI S. Phorbol ester, prolactin and relaxin cause translocation of protein kinase C from cytosol to membranes in human endometrial cells. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1094**: 85–91.
- [18] KANUKA H, MATSUYAMA S, OHNISHI M, MATSUMOTO Y, NISHIHARA M, TAKAHASHI M. Prolactin expresses differential effects on apoptotic cell death of luteal cells *in vivo* and *in vitro*. *Endocrine J* 1997; **44**: 11–22.
- [19] LI YH, WANG LX, YANG CR. Mechanism of action of prolactin on follicular theca cells from domestic fowls. *Chinese J Vet Sci* 1998; **18**: 77–80.
- [20] MCNEILLY AS, GLASIER A, JONASSEN J, HOWIE PW. Evidence for direct inhibition of ovarian function by prolactin. *J Reprod Fertil* 1982; **65**: 559–569.
- [21] MURPHY BD, RAJKUMAR K. Prolactin as a luteotrophin. *Can J Physiol Pharmacol* 1986; **257**–264.
- [22] OPAŁKA M, GÓRSKA T, KRZEPOTA T, DUSZA L, CIERESZKO R. Prolactin signaling in porcine theca cells derived from the preovulatory follicles: the role of protein kinase C and serine-threonine phosphatases. *4th Conf Eur Soc Dom Anim Reprod*, Prague, Czech Republic, 2000; p.49.
- [23] PERROT-APLANAT M, GUALILLO O, PEZET A, VINCENT V, EDERY M, KELLY PA. Dominant negative and cooperative effects of mutant forms of prolactin receptor. *Mol Endocrinol* 1997; **11**: 1020–1032.
- [24] PITZEL L, LUDEMANN S, WUTTKE W. Secretion and gene expression of metalloproteinases and gene expression of the inhibitors in porcine corpora lutea at different stages of the luteal phase. *Biol Reprod* 2000; **62**: 1121–1127.
- [25] PORTER MB, BRUMSTED JR, SITES CK. Effect of prolactin on follicle-stimulating hormone receptor binding and progesterone production in cultured porcine granulosa cells. *Fertil Steril* 2000; **73**: 99–105.
- [26] RUSSEL DL, NORMAN RL, DAJEE M, LIU X, HENNINGHAUSEN L, RICHARDS JS. Prolactin-induced activation and binding of Stat Proteins to the IL-6RE of the α₂-macroglobulin (α₂M) promoter: relation to the expression of α₂M in the rat ovary. *Biol Reprod* 1996; **55**: 1029–1038.

- [27] SINHA YN. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine Rev* 1995; **16**: 354–369.
- [28] STOKŁOSOWA S, GREGORASZCZUK E. The involvement of prolactin in steroidogenesis. *Gin Pol* 1996; 67, Suppl. **6**: 21–28.
- [29] SZAFRAŃSKA B, TILTON JE, ARY T. Useful technique for the study of intracellular calcium fluxes in single porcine granulosa cells in culture. *Reprod Dom Anim* 1999; **34**: 391–397.
- [30] TELLERIA CM, PARMER TG, ZHONG L, CLARKE DL, ALBARRACIN CT, DUAN WR, LINZER DIH, GIBORI G. The different forms of the prolactin receptor in the rat *corpus luteum*: developmental expression and hormonal regulation in pregnancy. *Endocrinology* 1997; **138**: 4812–4820.
- [31] VACHER P, TRAN VAN CHUOI M, PALY J, DIJANE J, DUFY B. Short term effect of prolactin on intracellular calcium in Chinese Hamster Ovary Cells stably transfected with prolactin receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 1994; **134**: 1213–1218.

Adres autora: Katedra Fizjologii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, 10-718 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 5, e-mail: reniac@uwm.edu.pl

UDZIAŁ UKŁADU NORADRENERGICZNEGO W REGULACJI CZYNNOŚCI CIAŁKA ŻÓŁTEGO*

INVOLVEMENT OF NORADRENERGIC SYSTEM IN THE CORPUS LUTEUM FUNCTION

Jan KOTWICA, Marek BOGACKI, Robert RĘKAWIECKI

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk,
Olsztyn-Kortowo

Streszczenie: Praca zawiera podsumowanie oryginalnych badań nad rolą katecholamin w czynności wydzielniczej ciała żółtego (CL). Krótkotrwałe pobudzenie β -receptorów w CL wzmacnia sekrecję progesteronu oraz jajnikowej oksytocyny (OT) w ciągu kilku minut, natomiast zablokowanie β -receptorów obniża podstawową sekrecję CL o 20–40%. W procesie tym uczestniczą β_1 - i β_2 -receptory, których ilość w błonach komórek lutealnych jest dodatnio skorelowana z obwodowym stężeniem P₄ i ujemnie ze stężeniem noradrenaliny (NA) i dopaminy (DA) w tkance lutealnej. CL jest zdolne syntetyzować NA z DA jako prekursora, co wskazuje na obecność β -hydroksylazy dopaminy w tkance lutealnej. NA wzmacnia także proces post-translacyjnej syntezy OT oraz syntezę P₄ wpływając na aktywność cytochromu P₄₅₀sc_c i 3 β -HSD. Krótkotrwałe zmiany lokalnego krążenia w CL pod wpływem NA nie upośledzają jego funkcji. Dane te wskazują, iż CL ma znaczny obszar autoregulacji własnej czynności, co może mieć istotne znaczenie w stanach krótkotrwałego stresu, szczególnie u samic ciężarnych.

(*Postępy Biologii Komórki 2001; 28 supl. 18: 69–76*)

Słowa kluczowe: noradrenalina, β -receptory, ciało żółte, progesteron, oksytocyna

Summary: Data from our original studies on the involvement of catecholamines in secretory function of corpus luteum (CL) are summarised. Short-lasting stimulation of β -receptors in CL increases progesterone (P₄) and ovarian oxytocin (OT) secretion within a few minutes, whereas blockade of β -receptors decreases basal secretion of P₄ by 20–40%. Both β_1 - and β_2 -receptors take part in this process. Amount of these receptors are positively correlated with peripheral concentrations of P₄ and negatively with concentrations of NA and dopamine (DA) in luteal tissue. CL is able to synthesise NA from DA as a precursor, and this suggests the presence of dopamine- β -hydroxylase in this tissue. NA stimulates the

*Praca finansowana przez Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, Olsztyn oraz grant KBN (5P06K 048 17).

post-translational processing of OT and synthesis of P4 by increase activity of cytochrome P450_{sec} and 3 β -HSD. Short-lasting changes in the ovarian blood flow evoked by NA does not impair CL function. These data indicate that CL itself is able to regulate own function, which is essential in short-lasting stress in pregnant females.

(Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl.18: 69–76)

Key words: noradrenaline, β -receptors, corpus luteum, progesterone, oxytocin

Jednym z warunków pomyślnej implantacji zarodka oraz przebiegu ciąży jest zmniejszenie aktywności motorycznej macicy oraz zapewnienie w niej odpowiednich warunków środowiskowych. Stan ten poprzez wielokierunkowe oddziaływanie zapewnia progesteron (P_4), hormon steroidowy wytwarzany w ciałku żółtym (CL). Z kolei istnienie CL zależy od stanu nierównowagi między wpływem czynników luteotropowych wspierających czynność CL, a wytwarzaną w macicy prostaglandyną $F_{2\alpha}$ (PGF), która powoduje funkcjonalną i morfologiczną regresję CL. Układ β -adrenergiczny poprzez wpływ na jajnik oraz na macicę odgrywa ważną rolę w tych procesach.

Stężenie noradrenaliny (NA) w $\mu\text{g/g}$ tkanki jajnika, odzwierciedlające gęstość unerwienia tkanki jajnikowej [2, 24], wykazuje znaczną zmienność w jajniku u różnych gatunków ssaków. Jajniki krów mają ponad 10 razy więcej adrenergicznych włókien nerwowych w porównaniu z myszami, królikami i chomikami, co sugeruje ważność tego unerwienia u bydła. Zawartość NA w jajniku wzrasta 10-krotnie u szczurów [4] i u świnek morskich [6] w miarę osiągnięcia dojrzałości płciowej.

W poszczególnych fazach cyklu rujowego różna jest zawartość katecholamin w CL u krowy [19], która była modelem w naszych badaniach. Skorelowana ilość NA i jej prekursora dopaminy (DA) jest najwyższa w pierwszych dniach cyklu, po czym zmniejsza się w środkowej fazie cyklu, a następnie ponownie wzrasta przy końcu cyklu. Zatem ilość katecholamin w CL na jednostkę jego masy jest dodatnio skorelowana z ilością β -receptorów/mg białka CL w okresie jego wzrostu oraz odwrotnie skorelowana z obwodowym stężeniem P_4 [21]. Wyniki te sugerują, iż stymulacja β -adrenergiczna, jakkolwiek ważna w czasie całej fazy lutealnej, jest szczególnie istotna w nowo tworzącym się CL. Tym bardziej, że LH jako hormon luteotropowy u bydła odgrywa istotną rolę w już rozwiniętym CL [3, 20].

Wykazaliśmy ponadto [21], że długotrwały stres przedubojowy sprawia, iż błony komórek lutealnych nie wykazują powinowactwa do β -mimetyku. Równocześnie, zawartość NA we krwi uśmierconych zwierząt była ponad 30 razy, a zawartość adrenaliny ponad 100-krotnie wyższa niż u zwierząt trzymanyh na swoich stanowiskach w oborze, tj. w warunkach, które uznaliśmy za bezstresowe. Na tej podstawie uważamy, że długotrwały stres uwalniając katecholaminy powoduje zniesienie stymulującego wpływu układu β -adrenergicznego na CL oraz na macicę, co przywraca jej aktywność motoryczną. W konsekwencji może to doprowadzać do zakłóceń w implantacji zarodka lub do ronień.

WPLYW UNERWIENIA NA FUNKCJĘ CIAŁKA ŻÓŁTEGO

Biosynteza P_4 regulowana jest poprzez dostępność i wykorzystanie cholesterolu oraz obecność aktywnych enzymów uczestniczących w steroidogenezie. Pierwszym etapem syntezy P_4 jest przemiana pod wpływem cytochromu P-450sc cholesterolu do pregnenolonu, który następnie pod wpływem 3β -dehydrogenazy hydroksysteroidowej (3β -HSD) ulega przekształceniu do P_4 . Brak stałej stymulacji β -adrenergicznej [9] lub odnerwienie jajnika [4, 6] powoduje obniżenie podstawowej syntezy i sekrecji P_4 , zwiększenie ilości β -receptorów w jajniku (na zasadzie ujemnego sprzężenia z obniżoną ilością NA) i zakłócenia w cykliczności. Natomiast dodatkowa stymulacja sympatykomimetyczna zwiększa syntezę, jak i sekrecję P_4 oraz oksytocyny (OT) jajnikowej [5, 8, 10, 11]. Zależna od tej stymulacji jest również aktywność 3β -HSD, cytochromu P-450sc [18] oraz monoooksygenazy peptydylo-glicylo- α -aminowej (PGA) [5] odpowiedzialnej za post-translacyjne etapy syntezy OT. Ponadto katecholaminy aktywując α -adrenoreceptory naczyniowe zwiększają przepływ krwi przez CL [23, 26], co wpływa na dostarczanie do jajnika lipoprotein jako źródła cholesterolu do syntezy P_4 [25]. Wykazaliśmy, że wraz z wiekiem krów wrażliwość ich CL na stymulację noradrenergiczną znacznie zmniejsza się [15], co także może być przyczyną zakłóceń w czynności tego gruczołu, a w konsekwencji zaburzeń płodności.

Przedstawione wyniki dowodzą, że NA wraz z prostaglandynami (PGE_2 , PGI_2) wytworzonymi w CL, komórkowymi czynnikami wzrostu (IGF-I, EGF, PDGF) oraz OT [22] stanowią ważny element lokalnych mechanizmów wspierających czynność CL w pierwszych dniach jego rozwoju, podczas cyklu rujowego, jak również w czasie ciąży. Wykazaliśmy ponadto (niepublikowane dane), że $PGF_{2\alpha}$ obniża zarówno podstawową, jak i stymulowaną przez NA aktywność 3β -HSD oraz syntezę progesteronu w CL krów. Można więc sądzić, że przewyciężenie przez $PGF_{2\alpha}$ luteotropowej funkcji katecholamin może być jednym z elementów składowych luteolizy.

ROLA RECEPTORÓW ADRENERGICZNYCH

Stymulujący wpływ katecholamin na funkcję sekrecyjną jajnika odbywa się poprzez β -receptory obecne w błonach komórek lutealnych [21]. Dalsze badania wykazały, że NA wpływa na CL zarówno poprzez β_1 -, jak i β_2 -adrenoreceptory [18] oraz poprzez β_2 -receptory wzmaga relaksację macicy [17]. W końcowych stadiach ciąży synteza β_2 -receptora w macicy gwałtownie maleje, co pośrednio zwiększa jej wrażliwość na czynniki wzmagające kurczliwość i ułatwiające poród (OT, $PGF_{2\alpha}$). Jednakże tuż po porodzie synteza białek β_2 -receptora ponownie wzrasta, gdyż.

sądzi się, iż każdorazowe uwalnianie OT, związane ze ssaniem lub dojem, może stymulować kurczliwość macicy bez zasadnej konieczności. Fakt zwiększonej ilości β_2 -receptora w macicy w okresie poporodowym wykorzystywany jest w terapii przyspieszającej inwolucję macicy, skrócenie okresu poporodowego, ułatwienie odejścia łożyska itp. poprzez stosowanie leków zawierających w swoim składzie β -bloker.

W doświadczeniach *in vivo* u bydła, NA stymulowała niemal równocześnie sekrecję jajnikowej OT i P_4 [11, 12, 23]. Jednakże dalsze badania wykazały, że różna jest regulacja uwalniania obu tych hormonów na poziomie podklas β -receptorów. Wyniki badań *in vitro* [18] z zastosowaniem agonistów i antagonistów β_1 - i β_2 -receptora dowiodły, iż stymulacja zarówno β_1 - i β_2 -receptora wzmagą syntezę i uwalnianie P_4 , podczas gdy OT jest uwalniana w następstwie pobudzenia błonowych β_2 -receptorów w CL. Należy jednak zaznaczyć, że oddziaływanie NA na CL odbywa się także poprzez naczyniowe α -receptory [23]. Obecność obu klas adrenoreceptorów w CL pozwala przypuszczać, że aktywacja układu noradrenergicznego zwiększa jajnikowy przepływ krwi, zaopatrując ten narząd w niezbędne substraty, głównie lipoproteiny jako źródło cholesterolu do steroidogenezy [25], oraz stymuluje β -receptory komórek lutealnych, a następnie enzymy uczestniczące w syntezie P_4 .

WPLYW KATECHOLAMIN NA STEROIDOGENEZĘ

Infuzja NA (0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) przez 30 min, naśladująca stan mobilizacji lub umiarkowany krótkotrwały stres, już po upływie kilku minut zwiększa niemal 2-krotnie sekrecję P_4 i wielokrotnie sekrecję OT jajnikowej podczas całego okresu fazy lutealnej [7,11]. Zniesienie tej stymulacji poprzez zablokowanie β -receptorów przy użyciu propranololu, zmniejsza o 20–40% podstawową sekrecję P_4 [10]. Można więc przyjąć, że stymulacja noradrenergiczna warunkuje podstawową sekrecję P_4 w 20–40%. Pobudzenie układu noradrenergicznego aktywując m.in. układ krążenia nie tylko nie upośledza, ale wręcz wspiera funkcję czynnościową CL z uwagi na unikalną budowę naczyń w tym narządzie [26]. Sądzymy więc, że krótkotrwałe pobudzenie układu nerwowego wzmagają czynność CL chroniąc ciężę u zwierząt. Natomiast chroniczny stres upośledza funkcję CL m.in. poprzez redukcję ilości β -receptorów [21], co w konsekwencji niekorzystnie zmienia środowisko w macicy, wywołując szereg zakłóceń w rozrodzie.

Stymulujący wpływ katecholamin na steroidogenezę nie jest procesem jednokierunkowym. Między ilością wytwarzanych hormonów steroidowych w jajniku a reprezentacją β -adrenergiczną w macicy i jajniku istnieje wzajemnie warunkująca się zależność. Wzrost ilości β -receptorów w jajniku oraz wzrost sekrecji P_4 pod wpływem stymulacji adrenergicznej po pierwszej owulacji u szczurów [1] potwierdza tę sugestię.

Badania na izolowanym CL krów dowodzą, że przeniesienie sygnału z β -receptorów na enzymy zaangażowane bezpośrednio w syntezę P₄, tj. cytochrom P-450sc [18] oraz 3 β -HSD [5,18] w komórce lutealnej odbywa się za pośrednictwem cAMP. Szlak przemian fosfatydoloinozytoli oraz kinazy białkowej C nie uczestniczy w tym procesie [16].

Zaznaczyć należy, że β -adrenomimetyki stymulują steroidogenezę w wyizolowanych komórkach jajnika po upływie kilku godzin, podczas gdy w warunkach *in vivo* wpływ ten był statystycznie istotny już po upływie kilku minut [7, 11, 12]. Sądzić można na tej podstawie, że NA z uwagi na swoje ambireceptorowe właściwości, wpływa na czynność CL prawdopodobnie dwiema drogami, bezpośrednio na komórki lutealne (stymulacja receptora β) lub poprzez układ naczyniowy jajnika (stymulacja α -receptora) i wpływ na proces lipolizy.

W świetle przedstawionych danych związek pomiędzy układem noradrenergicznym a funkcją sekrecyjną CL była wyraża się następująco:

1. Stała β -adrenergiczna stymulacja warunkuje podstawową sekrecję/syntezę P₄, gdyż brak tej stymulacji powoduje obniżenie stężenia P₄ we krwi o 20–40%.
2. Zmienna i zależna od fazy cyklu ilość β -receptorów w jajniku jest miarą jego gotowości do odbierania stymulacji z układu adrenergicznego.
3. W kilka minut po podaniu NA do tętnicy brzusznej występuje istotnie statystyczny wzrost sekrecji P₄ i OT jajnikowej. Sugeruje to wysoką sprawność luteotropowego wpływu układu noradrenergicznego w sytuacjach stresowych.
4. Redystrybucja przepływu krwi przez CL wynika z unikalnych morfologicznych przystosowań naczyń w tym narządzie i wskazuje na znaczenie ochrony tych struktur przed niedokrwieniem.
5. Wykorzystywanie cholesterolu do syntezy P₄, wiąże się ściśle z poprzednim punktem, wskazując na potrzebę lokalnej regulacji ukrwienia narządu rodnego samicy.

Na tej podstawie sugeruje się [10, 14], że aktywacja układu noradrenergicznego powoduje dwukierunkowe następstwa:

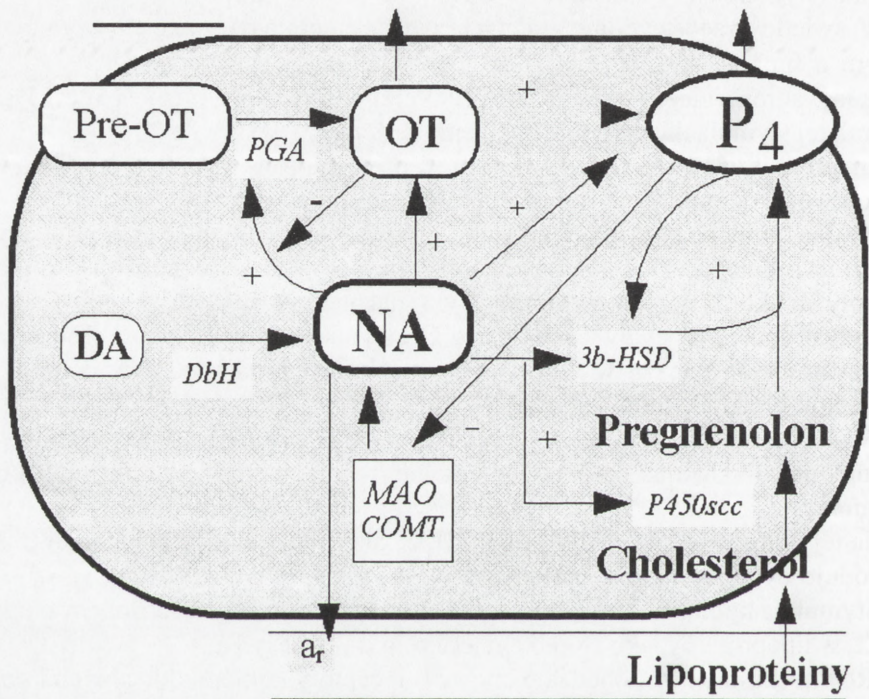
- (a) Stymuluje lipolizę i wzmacnia przepływ krwi przez jajnik, tym sposobem zaopatruje CL w lipoproteiny jako źródło cholesterolu do syntezy P₄.
- (b) Równocześnie NA pobudza błonowe β -receptory komórek lutealnych i poprzez aktywację przekaźników wewnątrzkomórkowych uczestniczy w syntezie P₄.

Na tej podstawie przypuszczamy, że lokalny wpływ NA na CL odbywa się na kilku poziomach regulacyjnych:

- (i). NA stymuluje uwalnianie z CL zmagazynowanych tam hormonów, tj. P₄ i OT. Wskazuje na to wzrost ich stężenia we krwi obwodowej już po upływie kilku minut od chwili podania NA do tętnicy brzusznej [9].
- (ii). NA syntetyzowana w CL z DA [13] pobudza syntezę hormonów w CL poprzez wpływ na aktywność enzymów oddziałujących na powstawanie tych hormonów i ich prekursorów, tj. (a) PGA, która odsłania C-terminalny fragment liniowy OT i

powoduje oksydacyjną amidację reszty glicyny tworząc grupę karboksamidową [5]. Proces ten określa się mianem post-translacyjnych przemian OT. (b) Enzymów uczestniczących w steroidogenezie CL, tj. cytochromu P₄₅₀_{sc} syntetyzującego w mitochondriach pregnenolon z cholesterolu i 3β-HSD, przetwarzającej pregnenolon do P₄.

(iii). Progesteron, stymulowany przez NA, pobudza z kolei własną syntezę, aktywując 3β-HSD poprzez specyficzne receptory jądrowe oraz wywiera hamujący wpływ na aktywność enzymów degradujących NA (MAO, COMT), przez co może wydłużać jej pobudzający wpływ na CL. Dane te przedstawiono w zsumowany sposób na rycinie 1.



RYCINA 1. Noradrenalina (NA) obecna w ciałku żółtym (CL) pochodzi zarówno ze źródeł pozakomórkowych, jak też może być syntetyzowana w CL z dopaminy jako prekursora. NA w kilka minut po podaniu uwalnia do krwi progesteron (P₄) oraz oksytocynę jajnikową (OT), które wzajemnie oddziałując na siebie wzmagają efekt wywołany przez NA. Ponadto NA aktywując monooksygenazę peptydylo-glicylo- α -amidową (PGA) wzmacnia syntezę OT z formy pro-hormonu oraz zwiększa aktywność cytochromu P₄₅₀_{sc} i 3β-dehydrogenazy hydroksysteroidowej (3β-HSD). Równocześnie NA wzmagając jajnikowy przepływ krwi zwiększa zaopatrzenie komórek lutealnych w lipoproteiny jako źródło cholesterolu. Prowadzi to w efekcie do wzrostu komórkowej syntezy P₄. Progesteron z kolei obniża aktywność monoaminooksydazy (MAO) i catechol-O-metylotransferazy (COMT) enzymów degradujących NA, przez co przedłuża czas oddziaływania NA na syntezę P₄, który także wzmacnia własną syntezę przez pobudzenie aktywności 3β-HSD we wczesnych stadiach rozwoju CL (wg [10])

PODSUMOWANIE

Krótkotrwałe pobudzenie układu nerwowego wzmacnia funkcję CL. Jest to zatem mechanizm ochrony ciąży u zwierząt, a w szczególności u zwierząt żyjących dziko, np. reakcja ucieczki na zagrożenie. W każdej takiej sytuacji CL, a więc i ciąża jest przedmiotem takiej samej troski jak troska o własne życie. I odwrotnie, długotrwałe i silne pobudzenie układu nerwowego, np. chroniczny stres, wywołuje szereg negatywnych zmian w organizmie samicy, przyczyniając się także do upośledzenia funkcji CL, co w konsekwencji może wywołać poronienie.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AGUADO LI, PETROWIC SL, OJEDA SL. Ovarian β -adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* 1982; **110**: 1124–1132.
- [2] BAHR J, KAO L, NALBANDOV AV. The role of catecholamines and nerves in ovulation. *Biol Reprod* 1974; **10**: 273–290.
- [3] BAIRD DT. Luteotrophic control of the *corpus luteum*. *Anim Reprod Sci* 1992; **28**: 95–102.
- [4] BEN-JONATAN N, ARBOGAST LA, RHOADES TA, BAHR MJ. Noradrenaline in the rat ovary: ontogeny and *de novo* synthesis. *Endocrinology* 1984; **115**: 1426–1431.
- [5] BOGACKI M, KOTWICA J. Noradrenaline affects the post-translational synthesis of oxytocin in bovine *corpus luteum*. *Theriogenology* 1999; **52**: 91–102.
- [6] BURDEN HW, LAWRENCE IE, LOUIS TM. The adrenergic innervation of the guinea pig ovary during prenatal and postnatal periods. *Acta Anat* 1985; **122**: 193–196.
- [7] JAROSZEWSKI J, KOTWICA J. Reduction of oxytocin content in *corpus luteum* does not effect the duration of the estrous cycle in cattle. *Reprod Nutr Develop* 1994; **34**: 174–182.
- [8] KOTWICA J, SKARŻYŃSKI D, JAROSZEWSKI J. Coccygeal artery as a route for the administration of drugs into the reproductive tract of cattle. *Vet Rec* 1990; **127**: 38–40.
- [9] KOTWICA J, SKARŻYŃSKI D, JAROSZEWSKI J. Involvement of β -adrenoceptors in the regulation of luteal function in cattle. *Br Vet J* 1991; **147**: 189–196.
- [10] KOTWICA J, MISZKIEL G. Wpływ stymulacji β -adrenergicznej na funkcję układu rodneg krowy podczas cyklu rujowego i ciąży. *Med Wet* 1998; **54**: 523–529.
- [11] KOTWICA J, SKARŻYŃSKI D. Influence of oxytocin removal from *corpus luteum* on secretory function and duration of the oestrous cycle in cattle. *J Reprod Fert* 1993; **97**: 411–417.
- [12] KOTWICA J, SKARŻYŃSKI D, JAROSZEWSKI J, BOGACKI M. Noradrenaline affects secretory function of *corpus luteum* independently of prostaglandins in conscious cattle. *Prostaglandins* 1994; **48**: 1–10.
- [13] KOTWICA J, SKARŻYŃSKI D, BOGACKI M, MISZKIEL G. The influence of dopamine as a noradrenaline precursor on the secretory function of bovine *corpus luteum* using *in vitro* model. *Br J Pharmacol* 1996; **118**: 1669–1674.
- [14] KOTWICA J, BOGACKI M. Physiological importance of dopamine as a noradrenaline precursor in the *corpus luteum*. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; **26**: S29–S35.
- [15] KOTWICA J, JAROSZEWSKI J, BOGACKI M. Lack of ovarian response in ageing cows to noradrenaline infused into the abdominal aorta. *Pol J Vet Sci* 2000; **4**: 239–241.

- [16] KOTWICA J, SKARŻYŃSKI DJ, BOGACKI M, MŁYNARCZUK J. Szlak przemian fosfatydyloinozytoli i kinazy białkowej C nie uczestniczy we wpływie noradrenaliny na sekrecję progesteronu przez komórki lutealne krowy. XI Kongres PTNW, Lublin, 20–24. IX. 2000.
- [17] LUCK MR, PAYNE JH. The neurocrine status of the mammalian ovary. *Bibl Reprod* 1991; **57**: B1–B8.
- [18] MISZKIEL G, KOTWICA J. Mechanism of action of noradrenaline on secretion of progesterone and oxytocin by the bovine *corpus luteum in vitro*. *Acta Vet Hung* 2001; **49**: 39–51.
- [19] MISZKIEL G, SKARŻYŃSKI D, BOGACKI M, KOTWICA J. Concentrations of catecholamines, ascorbic acid, progesterone and oxytocin in the *corpora lutea* of cyclic and in pregnant cattle. *Reprod Nutr Develop* 1999; **39**: 509–516.
- [20] NISWENDER GD, SCHWALL RH, FITZ TA, FARIN CE, SAWYER HR. Regulation of luteal function in domestic ruminants: new concepts. *Rec Prog Horm Res* 1985; **41**: 101–151.
- [21] PESTA M, MUSZYŃSKA A, KUCHARSKI J, SUPERATA J, KOTWICA J. Beta-adrenergic receptors in *corpora lutea* from different stages of the estrous cycle in conscious and slaughtered cattle. *Biol Reprod* 1994; **24**: 215–221.
- [22] SCHAMS D, LIEBERMANN J, MIYAMOTO A. Luteotrophic role of bovine luteal oxytocin *in vitro*. In: Oxytocin, Cellular and Molecular Approaches in Medicine and Research. Eds. Ivell R., Russel J.A., Plenum Press, New York, 1995; 543–544.
- [23] SKARŻYŃSKI D, KOTWICA J. Mechanism of noradrenaline influence on the secretion of ovarian oxytocin and progesterone in conscious cattle. *J Reprod Fert* 1993; **97**: 419–424.
- [24] SORGER T, PITTMAN R, SODERWALL AL. Principal features of the nerve supply to the ovary, oviduct and tubal third of the uterus in the golden hamster. *Biol Reprod* 1983; **28**: 461–482.
- [25] WILLIAMS GL. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. *J Anim Sci* 1989; **67**: 785–793.
- [26] WILTBANK MC, GALLAGHER KP, CHRISTENSEN AK, BRABEC RK, KEYES PL. Physiological and immunological evidence for a new concept of blood flow regulation in the CL. *Biol Reprod* 1990; **42**: 139–149.

*Adres autorów: Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk,
ul. Prawocheńskiego 5, 10-718 Olsztyn*

LEPTYNA A ROZRÓD

LEPTIN AND REPRODUCTION

Anna WALCZEWSKA

Zakład Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej, Instytut Fizjologii i Biochemii,
Akademia Medyczna w Łodzi

Streszczenie: Leptyna – produkt genu otyłości została odkryta w 1994 roku. Jest syntetyzowana głównie w białej tkance tłuszczowej, ale również w jajnikach, łożysku oraz w gruczole sutkowym podczas laktacji. Głównym docelowym miejscem działania leptyny w regulacji bilansu energetycznego oraz czynności rozrodczych są jądra podwzgórza, gdzie modyfikuje czynność układu podwzgórzowo-przysadkowego. U genetycznie otyłych i bezpłodnych myszy (*ob/ob*) egzogenna leptyna przywraca płodność zarówno samcom, jak i samicom. U dorosłych szczurów leptyna stymuluje zarówno uwalnianie gonadoliberyny (LHRH) z podwzgórza, jak i hormonu luteinizującego (LH) z przysadki. Bardziej wyraźne stymulujące działanie leptyny na czynność rozrodczą ujawnia się w czasie uzyskiwania dojrzałości płciowej oraz kiedy ilość dostarczanej do organizmu energii jest niewystarczająca i zostaje zahamowane uwalnianie gonadotropin. Oprócz działania na układ podwzgórzowo-przysadkowy, leptyna wpływa również bezpośrednio na czynność jajników. Jednakże fizjologiczne i patofizjologiczne działanie leptyny w układzie rozrodczym zarówno u zwierząt, jak i u ludzi powinno być dalej wyjaśniane.
(*Postępy Biologii Komórki 2001; 28 suppl. 18: 77–85*)

Słowa kluczowe: leptyna, receptory leptyny, LHRH, LH, FSH, pokwitanie, jajniki.

Summary: Leptin was discovered in 1994 as a product of *ob* gene. Primarily, leptin is synthesized by white adipose tissue, and in addition in ovary, placenta, and lactating mammary gland. Leptin acts on the level of the hypothalamic nuclei, participating in regulation of energy balance and reproductive function via modulation of hypothalamic-pituitary function. In genetically obese and infertile *ob/ob* mouse, administration of exogenic leptin rescues their fertility, both females and males. In normal rats, leptin stimulates gonadoliberine (LHRH) release from the hypothalamus and luteinizing hormone (LH) from the pituitary gland. Furthermore, the distinct stimulatory role of central leptin action is realized at puberty, and during inhibition of gonadotrophins release due to fasting or dietary energy restriction. Leptin also directly influences ovary function. However, exact role of leptin action in physiology and pathophysiology in murine and human reproductive system needs to be further elucidated.
(*Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18: 77–85*)

Key words: leptin, leptin receptors, LHRH, LH, FSH, puberty, ovary

WSTĘP

Sekwencja aminokwasowa leptyny, nazywanej również białkiem genu otyłości (*obese protein*), została określona w grudniu 1994 roku [47]. Jednak od wielu lat przypuszczano, że może istnieć białkowy produkt biorący udział w mechanizmie utrzymywania równowagi pomiędzy ilością pobieranego pokarmu a wydatkami energetycznymi organizmu. W 1950 roku Ingalls i wsp. [13] opisali po raz pierwszy autosomalną, recesywną mutację w chromosomie 6 u myszy, która powodowała ich otyłość. Gen ten został nazwany genem otyłości, a myszy z tą mutacją oznaczone symbolem *ob/ob*. Jedną z ważniejszych cech szczepu myszy *ob/ob* jest ich bezpłodność. Prowadzone na przestrzeni ponad dwudziestu lat badania na tych myszach wykazały, że niepłodność zarówno samców, jak i samic *ob/ob* myszy jest odwracalna. Zredukowanie masy ciała *ob/ob* samców [16] lub wprowadzenie egzogennych hormonów gonadotropowych przysadki u *ob/ob* samic [31] przywracało ich czynność rozrodczą. Dalsze doświadczenia prowadzone na tym szczepie myszy, szczególnie przez Swerdloffa i współpracowników [33], potwierdziły obniżone stężenie hormonu luteinizującego (LH) i dopęcherzykowego (FSH) oraz hormonów płciowych we krwi u tych zwierząt. Z badań tych nasuwał się jednoznaczny wniosek. Myszy z mutacją genu *ob* cechuje zahamowana czynność podwzgórzowo-przysadkowa układu rozrodczego, porównywalna do stanu niedojrzałości płciowej. Dopiero zidentyfikowanie produktu tego genu – leptyny oraz sklonowanie receptora dla leptyny, pozwoliły rozszerzyć wiedzę o postulowanych od wielu lat związkach regulacji bilansu energetycznego organizmu z układem rozrodczym.

Leptyna, produkt genu *ob*, jest hormonem produkowanym głównie, ale nie jedynie, przez białą tkankę tłuszczową w postaci pro-hormonu o masie cząsteczkowej około 16 kD. Po oddzieleniu od pro-hormonu peptydu sygnałowego, 146-aminokwasowa leptyna jest pulsacyjnie wydzielana do krwi, z dobowym szczytem stężenia w godzinach nocnych [18]. Pełni ona rolę analogowego sygnału dla ośrodków homeostazy energii i reakcji neuroendokrynologicznych w podwzgórz, dla czynności narządów regulujących procesy metaboliczne, jak też dla wielu różnych tkanek.

Leptyna oddziałuje na komórki za pośrednictwem błonowego receptora o wysokim stopniu pokrewieństwa do glikoproteinowego receptora gp 130 należącego do podrodziny receptorów cytokin klasy I [34]. Do tej grupy należą receptory dla takich cytokin, jak: interleukina 6, czynnik wzrostu komórek macierzystych granulocytów (G-CSF) czy czynnik hamujący białaczkę (LIF). Po związaniu się ligandu z tym typem receptora, wewnątrzkomórkowy szlak przekazywania informacji prowadzi przez fosforylację kinaz proteinowo-tyrozynowych z rodziny Janus (JAK), które fosforylują białka aktywujące transkrypcję STATs (*signal transducers and activators of transcription*) [15]. Intensywne badania nad czynnością receptorów leptyny (OB-R) i ich rozmieszczeniem w organizmie doprowadziły do zidentyfi-

kowania kilku izoform tego receptora [17, 35]. Główna różnica między nimi polega na długości wewnątrzkomórkowej domeny receptora. OB-Rb (*long form*) ma najdłuższą, 302-aminokwasową domenę cytoplazmatyczną zawierającą miejsca wiązania kinazy JAK (*box 1 i box 2*) oraz sekwencje tyrozyna-X-X-glutamina (*Y-X-X-Q motif*), które dokują STATs do receptora. Ta forma receptora z całą pewnością przenosi sygnał leptyny do jądra komórki. OB-Rb w największej ilości występuje w jądrach podwzgórza oraz w nadnerczach i nerkach. Znalezione go również w przednim płacie przysadki u gryzoni [14]. Z kolei najbardziej rozpowszechnioną formą receptora leptyny o krótkiej 34-aminokwasowej części cytoplazmatycznej jest OB-Ra (*short form*). Receptor ten występuje w wielu strukturach mózgowia, w splocie naczyniówkowym komórek mózgu i w większości narządów wewnętrznych, w tym w jajnikach, jądrach i macicy [46]. Postuluje się kilka funkcji tego receptora: (1) modulowanie aktywności OB-Rb (*long form*) [41]; (2) transportowanie leptyny z krwi do mózgu w splocach naczyniówkowych komórek mózgu [20, 35] lub (3) przenoszenie sygnału leptyny do wnętrza komórek efektorowych inną drogą wewnątrzkomórkową niż OB-Rb [23].

Z przeprowadzonych jeszcze przed odkryciem leptyny badań na *ob/ob* myszach wynikało, że nowo odkryte białko powinno działać stymulująco na czynność układu rozrodczego. Doświadczenia przeprowadzone w dwóch laboratoriach w Uniwersytecie Kalifornijskim i Uniwersytecie Washington w Seattle (USA) szybko potwierdziły tę hipotezę. Codzienne wstrzykiwanie leptyny w dawce od 10 µg do 50 µg/g masy ciała myszy przez okres miesiąca do dwóch nie tylko obniżyło masę ciała badanych myszy od 30% do ponad 50%, zwiększyło także stężenie LH w osoczu, przywróciło czynność jajników i jąder. Histologiczna weryfikacja jajników wykazała oprócz statystycznie znaczącego wzrostu ich masy, wzrost ilości pęcherzyków jajnikowych w różnych stadiach rozwoju i pojawienie się dojrzałych pęcherzyków Graafa, które nie występują u dorosłych *ob/ob* samic myszy [2]. Znacząco zwiększyła się też masa macicy, wielkość komórek nabłonkowych, powierzchnia endometrium i ilość gruczołów w macicy. Opisane zmiany pozwoliły na zajęcie i utrzymanie ciąży samic *ob/ob* myszy po kopulacji z normalnymi samcami i urodzenie w prawidłowym czasie od 2 do 7 sztuk potomstwa w dwóch kolejnych ciążach [5]. Podobnie stymulujące działanie na układ rozrodczy i płodność zaobserwowano u *ob/ob* samców po chronicznym stosowaniu egzogennej leptyny. Również w tym przypadku nie tylko wzrosła masa jąder, ale nastąpiła regeneracja komórek Leydiga. W wyniku tych zmian samce były w pełni zdolne do zapłodnienia normalnych samic, które urodziły zdrowe potomstwo [22].

Opisane doświadczenia udowodniły, że leptyna przywraca płodność zwierzętom, których tkanka tłuszczowa w wyniku defektu genetycznego nie produkuje leptyny od urodzenia. Pozostało poszukiwanie odpowiedzi na pytania. W jaki sposób leptyna działa w układzie rozrodczym normalnych zwierząt? Czy przywraca wytwarzanie

i uwalnianie gonadotropin z przysadki, które pobudzają czynność gonad, czy działa bezpośrednio na gonady, czy działa na każdym z tych poziomów systemu rozrodczego niezależnie?

WPŁYW LEPTYNY NA CZYNNOŚĆ PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWĄ

Z doświadczeń *in vitro* przeprowadzonych w zespole McCanna wynika, że po trwającej 3 godziny inkubacji przedniego płata przysadki szczura leptyna stymuluje uwalnianie, najsilniej LH, w mniejszym stopniu FSH i przy najwyższych stężeniach prolaktyny [44]. Inkubacja fragmentu brzuszego podwzgórza obejmująca jądro łukowate i wyniosłość środkową z leptyną w stężeniu od 10^{-12} do 10^{-10} M również zwiększyła uwalnianie gonadoliberyny (LHRH) do płynu inkubującego [44]. Te doświadczenia wskazują na stymulujące działanie leptyny zarówno na poziomie przysadki, jak i podwzgórza. Udało się również stwierdzić, że w działaniu leptyny na uwalnianie LHRH z wyniosłości środkowej oraz LH z przedniego płata przysadki pośredniczy tlenek azotu [43]. Doświadczenia *in vivo* przeprowadzone na dorosłych szczurach obu płci rozszerzyły dotychczas uzyskane wyniki. Ośrodkowe wprowadzenie leptyny do III komory mózgu zwiększyło uwalnianie LH w ciągu pierwszej godziny po infuzji u owarietomizowanych samic szczura, którym podskórnie wstrzyknięto 3 dni wcześniej 10 μ g benzoesanu estradiolu. Natomiast leptyna wprowadzona do III komory mózgu była nieefektywna u kastrowanych samic bez substytucji estrogenami, a także w grupie otrzymującej benzoesan estradiolu w dawce 50 μ g [40]. Tak więc, działanie leptyny na uwalnianie gonadotropin z przysadki jest zależne od stężenia estrogenów we krwi. Równolegle przeprowadzone doświadczenia na samcach wykazały, że o ile leptyna nie miała wpływu na uwalnianie gonadotropin u kastrowanych samic, to znacząco zwiększyła średnie uwalnianie LH i amplitudę pulsów LH u kastrowanych samców (wyniki niepublikowane). Wskazuje to na płciowe różnice w działaniu leptyny na czynność podwzgórzo-przysadkową. Stymulujące działanie leptyny na uwalnianie LH i FSH z przysadki potwierdzają ostatnie badania Ogura i wsp. [25], chociaż w literaturze światowej można też znaleźć wyniki przeciwne. Carro i wsp. [4] stwierdzili zahamowanie cyklu rujowego i pulsacyjnego uwalniania LH u samic szczura po ośrodkowym wprowadzeniu surowicy z przeciwciałami przeciwko leptynie.

Uzyskane dotychczas wyniki badań skłaniają do wniosku, że leptyna działa na czynność układu podwzgórzo-przysadkowego ośrodkowo, poprzez system neuronów zaangażowanych w sterowanie pulsacyjnym uwalnianiem LHRH [24, 40], a także bezpośrednio na uwalnianie hormonów gonadotropowych z przysadki [25, 44]. Ponadto, leptyna została wykryta w większości komórek wydzielniczych przy-

sadki i jest pakowana w granule sekrecyjne razem z głównymi hormonami przysadki [38]. Można spekulować następujące działania leptyny pochodzącej z przedniego płata przysadki:

- (1) parakryny wpływ na czynność komórek wydzielniczych przysadki;
- (2) współdziałanie wraz z głównymi hormonami przedniego płata przysadki na czynność innych narządów i metabolizm komórkowy.

Podsumowując dotychczas opublikowane wyniki badań dotyczące wpływu leptyny na uwalnianie gonadotropin z przysadki oraz własne niepublikowane jeszcze wyniki doświadczeń można pokusić się o postawienie następującej hipotezy. Przy prawidłowej i stabilnej masie ciała, jaka występuje w dojrzałym płciowo organizmie, stymulujące działanie leptyny na czynność układu podwzgórzowo-przysadkowego ujawnia się w niewielkim stopniu [10]. Natomiast znacznie wyraźniej zaznacza się jej stymulujące działanie w dwóch sytuacjach.

I. W trakcie uzyskiwania dojrzałości płciowej. Wyniki wielu doświadczeń wskazują na leptynę jako na jeden z czynników biorących udział w rozpoczęciu dojrzałości płciowej u gryzoni [1, 5, 7]. Prawdopodobnie podobną rolę pełni leptyna u ludzi. U dzieci jej stężenie wzrasta systematycznie wraz z masą ciała do okresu dojrzewania. Na początku okresu dojrzewania zarówno u dziewcząt, jak i u chłopców stężenie leptyny we krwi gwałtownie wzrasta. Następnie u dziewcząt wzrasta dalej proporcjonalnie do masy ciała, natomiast u chłopców gwałtownie spada równoległe ze wzrostem stężenia testosteronu we krwi i dopiero po uzyskaniu dojrzałości ustala się na względnie stałym poziomie [11, 21].

II. W okresie głodu. Wyraźniejsze i zdecydowanie pobudzające działanie leptyny wykazano w sytuacji, kiedy zahamowane zostaje uwalnianie hormonów gonadotropowych z przysadki na skutek pozbawienia organizmu pokarmu. Zmniejszenie uwalniania LH następuje po 2 dniach pozbawienia pokarmu szczurów [3] i małp [30] oraz po 5 dniach u ludzi [37]. Egzogennie wprowadzona leptyna po dwóch dniach pozbawienia pokarmu szczurów i małp wyraźnie stymulowała uwalnianie LH i FSH do krwi [10, własne niepublikowane wyniki].

WPLYW LEPTYNY NA CZYNNOŚĆ GONAD

Badania wykazały obecność receptorów leptyny tak w jądrach, jak i w jajnikach [46]. Ponadto, stwierdzono wewnątrzjajnikową produkcję leptyny u człowieka [8] i wydaje się, że odgrywa ona większą rolę w czynności jajników niż jąder. Badania *in vitro* wpływu leptyny na produkcję hormonów płciowych wykazały jej hamujący wpływ na podstawowe i stymulowane przez hCG wydzielanie testosteronu u dojrzałych płciowo szczurów [36] oraz na wydzielanie progesteronu i estradiolu przez komórki ziarniste pęcherzyków jajnikowych stymulowane insuliną lub IFG-I wraz z FSH [32, 45]. Stwierdzono także hamujący wpływ pulsacyjnej infuzji dużych dawek leptyny na owulację u szczura *in vivo* i *in vitro*, choć jednocześnie nie

zarejestrowano znaczących zmian stężenia estrogenów i progesteronu pod wpływem infuzji leptyny [9]. Przytoczone wyniki badań wskazują, że leptyna działa bezpośrednio na jajniki niezależnie od jej wpływu na uwalnianie gonadotropin z przysadki.

Monitorowanie stężenia leptyny w cyklu rujowym u zwierząt i w cyklu płciowym u kobiet dostarcza różnych danych. U kobiet z prawidłową masą ciała stężenie leptyny we krwi zwiększa się w okresie przedowulacyjnego wyrzutu LH i utrzymuje się na statystycznie wyższym poziomie w fazie lutealnej cyklu płciowego [12]. Z drugiej strony część publikacji donosi o braku korelacji pomiędzy stężeniem leptyny a stężeniem hormonów płciowych w cyklu miesięcznym u kobiet i w cyklu rujowym u zwierząt oraz u kobiet po menopauzie [19, 26–28].

W relacjach zwrotnych pomiędzy leptyną a hormonami płciowymi zaznacza się wyraźny ich wpływ na ekspresję genu *ob* w tkance tłuszczowej. Otóż estrogeny wykazują działanie stymulujące, natomiast testosteron działanie hamujące syntezę i uwalnianie leptyny do krwi [39, 42]. Fakt ten jest jedną z przyczyn znanych różnic w stężeniu leptyny występujący pomiędzy obu płciami tak u zwierząt, jak i u ludzi. U kobiet bez względu na wiek i masę ciała stężenie leptyny jest kilkakrotnie wyższe niż w odpowiadającej im grupie mężczyzn [29].

PODSUMOWANIE

Pomimo krótkiego okresu badań nad leptyną i jej rolą w czynności układu rozrodczego, a także mimo trudności interpretacyjnych wynikających z faktu, że część doświadczeń jest przeprowadzana na zwierzętach, a część pochodzi bezpośrednio z badań na ludziach, można stwierdzić, że leptyna odgrywa znaczącą rolę w czynności układu rozrodczego i wskazać jej podstawowe funkcje.

1. Leptyna stymuluje wydzielanie gonadotropin z przedniego płata przysadki działając prawdopodobnie zarówno na poziomie podwzgórza, jak i przysadki.
2. Leptyna jest produkowana przez jajniki, gdzie niezależnie od wpływu na czynność układu podwzgórzowo-przysadkowego, prawdopodobnie na zasadzie oddziaływań parakrynych wpływa na sterydogenzę i rozwój komórek płciowych.
3. Leptyna bierze udział w procesie uzyskiwania dojrzałości płciowej.
4. Leptyna jest produkowana i wydzielana do krwi przez łożysko w czasie ciąży, szczególnie w ostatnim trymestrze u ludzi, oraz przez gruczoł sutkowy w okresie laktacji i najprawdopodobniej uczestniczy w rozwoju płodu i noworodków.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AHIMA RS, DUSHAY J, FLIER SN, PARABAKARAN D, FLIER JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 1997; **99**: 391–395.

- [2] BARASH IA, CHUENG CC, WEIGLE DS, REN H, KABIGTING EB, KUIJPER JL, CLIFTON DK, STEINER RA. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 1996; **137**: 3144–3147.
- [3] CAGAMPANG FRA, MAEDA K-I, YOKOYAMA A, OTA K. Effect of food deprivation on the pulsatile LH release in the cycling and ovariectomized female rat. *Hor Matab Res* 1990; **22**: 269–272.
- [4] CARRO E, PINILLA L, SEOANE LM, CONSIDINE RV, AQUILLAR E, CASANUEVA FF, DIEGUEZ C. Influence of endogenous leptin tone on the estrus cycle and luteinizing hormone pulsatility in female rats. *Neuroendocrinology* 1997; **66**: 375–377.
- [5] CHEBAB FF, LIM ME, LU R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996; **12**: 318–320.
- [6] CHEBAB FF, MOUNZIH K, LU R, LIM ME. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 1997; **275**: 88–90.
- [7] CHEUNG CC, THORNTON JE, KUIJPER JL, CLIFTON DK, STEINER RA. Leptin is a metabolic gate for the onset puberty in the female rats. *Endocrinology* 1997; **138**: 855–858.
- [8] CIOFFI JA, VAN BLERKOM J, ANTCZAK M et al. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod* 1997; **3**: 467–472.
- [9] DUGGLAS PS, VAN DER HOEK KH, MILNER CR, RYAN NK, AMSTRONG DT, MAGOFFIN DA, NORMAN RJ. The *in vivo* and *in vitro* effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology* 2000; **141**: 1971–1976.
- [10] FINN PD, CUNNINGHAM MJ, PAU K-YF, SPIES HG, CLIFTON DK, STEINER RA. The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. *Endocrinology* 1998; **139**: 4652–4662.
- [11] GARCIA-MAYOR RV, ANDRADE MA, RIOS M, LAGE M, DIEGUEZ C, CASANUEVA FF. Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 2849–2855.
- [12] HARDIE L, TRAYHURN P, ABRAMOVICH D, FOWLER P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol Oxf* 1997; **47**: 101–106.
- [13] INGALLS AM, DICKIE MM, SMITH GD. Obesity, new mutation in the mouse. *J Heredity* 1950; **41**: 315–318.
- [14] JIN L, ZHANG S, BURGUERA BG, COUCE ME, OSAMURA RY, KULIGE, LLOYD RV. leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology* 2000; **141**: 333–339.
- [15] KISHIMOTO T, TAGA T, AKIRA S. Cytokine signal transduction. *Cell* 1994; **76**: 253–262.
- [16] LANE PW, DICKIE MM. Fertile obese mice. Relative sterility in obese males corrected by dietary restriction. *J Heredity* 1954; **45**: 56–58.
- [17] LEE G-H, PROENCA R, MONTEZ JM, CARROLL KM, DARVISHZADEH JG, LEE JI, FRIEDMAN JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996; **379**: 632–635.
- [18] LICINIO J, MANTZOROS C, NEGRAO AB, CIZZA G, WONG M-L, BONGIORNO PB, CHROUSOS GP, KARP B, ALLEN C, FLIER JS, GOLD PW. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nature Med* 1997; **3**: 575–579.
- [19] LUDWIG M, KLEIN HH, DIETRICH K, ORTMANN O. Serum leptin concentrations throughout the menstrual cycle. *Arch Gynecol Obstet* 2000; **263**: 99–101.
- [20] MALIK KF, YOUNG WS III. Localization of binding sites in the central nervous system for leptin (OB-protein) in normal, obese (ob/ob), and diabetic (db/db) C57BL/6J mice. *Endocrinology* 1996; **137**: 1497–1499.
- [21] MANTZOROS C, FLIER JS, ROGOL AD. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 1066–1070.

- [22] MOUNZIH K, LU R, CHEBAB FF. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 1997; **138**: 1190–1197.
- [23] MURAKAMI T, YAMASHITA T, IIDA M, KUWAJIMA M, SHIMA K. A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; **231**: 26–29.
- [24] NAGATANI S, GUTHIKONDA P, THOMPSON RC, TSUKAMURA H, MAEDA K-I, FOSTER DL. Evidence for GnRH regulation by leptin: leptin administration prevents reduced pulsatile LH secretion during fasting. *Neuroendocrinology* 1998; **67**: 370–376.
- [25] OGURA K, IRAHARA M, KIYOKAWA M, TEZUKA M, MATSUZAKI T, YASUI T, KAMADA M, AONO T. Effects of leptin on secretion of LH and FSH from primary cultured female rat pituitary cells. *Eur J Endocrinol* 2001; **144**:653–658.
- [26] PAOLISSO G, RIZZO MR, MAZZIOTTI G, ROTONDI M, TAGLIAMONTE MR, VARRICCHIO G, CARELLA C, VARRICCHIO M. Lack of association between changes in plasma leptin concentration and in food intake during the menstrual cycle. *Eur J Clin Invest* 1999; **29**: 490–495.
- [27] PINILLA L, SEOANE LM, GONZALEZ L, CARRO E, AGUILAR E, CASANUEVA FF, DIEGUEZ C. Regulation of serum leptin levels by gonadal function in rats. *Eur J Endocrinol* 1999; **140**: 468–473.
- [28] RIAD-GABRIEL MG, JINAGOUDA SD, SHARMA A, BOYADJIAN R, SAAD MF. Changes in plasma leptin during the menstrual cycle. *Eur J Endocrinol* 1998; **139**: 528–531.
- [29] SAAD MF, DAMANI S, GINGERICH RL, RIAL-GABRIEL MK, KHAN A, BOYADJIAN R, JINAGOUDA SD, EL-TAWIL K, RUDE RK, KAMDAR V. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 579–584.
- [30] SCHREIHOFFER DA, AMICO JA, CAMERON JL. Reversal of fasting-induced suppression of luteinizing hormone (LH) secretion in male Rhesus monkey by intragastric nutrient infusion: evidence for rapid stimulation of LH by nutritional signals. *Endocrinology* 1993; **132**: 1890–1897.
- [31] SMITHBERG M, RUNNER MN. Pregnancy induced in genetically sterile mice. *J Heredity* 1957; **48**: 97–100.
- [32] SPICER LJ, FRANCISCO CC. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology* 1997; **138**:3374–3379.
- [33] SWERDLOFF RS, BATT RAL, BRAY GA. Reproductive hormonal function in the genetically obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology* 1976; **98**: 1359–1364.
- [34] TARTAGLIA LA, DEMBSKI M, WENG X, DENG N, CULPEPPER J, DEVOS R, RICHARDS GJ, CAMPFIELD LA, CLARK FT, DEEDS J, MUIR C, SANKER S, MORIARTY A, MOORE KJ, SMUTKO JS, MAYS GG, WOOLF EA, MONROE CA, TEPPER RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995; **83**:1263–1271.
- [35] TARTAGLIA LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; **272**: 6093–6096.
- [36] TENA-SEMPERE M, PINILLA L, GONZALES LC, DIEGUEZ C, CASANUEVA FF, AGUILAR E. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis *in vitro*. *J Endocrinol* 1999, **161**:211–218.
- [37] VELDHUIS JD, IRANMANESH A, EVANS WS, LIZARRALDE G, THORNER MO, VANCE ML. Amplitude suppression of the pulsatile mode of immunoradiometric luteinizing hormone release in fasting-induced hypoandrogenemia in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; **76**: 587–593.
- [38] VIDAL S, COHEN SM, HORVATH E, KOVACS K, SCHEITHAUER BW, BURGUERA BG, LLOYD RV. Subcellular localization of leptin in non-tumorous and adenomatous human pituitaries: and immuno-ultrastructural study. *J Histochem Cytochem* 2000; **48**: 1147–1152.
- [39] WABITSCH M, BLUM WF, MUCHE R, BRAUN M, HUBE F, RASCHER W, HEINZE E, TELLER W, HAUNER H. Contribution of androgen to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Invest* 1997; **100**: 808–813.

- [40] WALCZEWSKA A, YU WH, KIMURA M, KARANATH S, MCCANN SM. Estrogen and leptin have differential effects on FSH and LH release in female rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; **222**: 170–177.
- [41] WHITE DW, KUROPATWINSKI KK, DEVOS R, BAUMANN, TARTAGLIA LA. Leptin receptor (OB-R) signaling. *J Biol Chem* 1997; **272**:7: 4065–4071.
- [42] YONEDA N, SAITO, S, KIMURA M, YAMADA M, IIDA M, MURAKAMI T, IRAHARA M, SHIMA K, AONO T. The influence of ovariectomy on ob gene expression in rats. *Horm Metab Res* 1998; **30**: 263–265.
- [43] YU H, WALCZEWSKA A, KARANATH S, MCCANN SM. Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland. *Endocrinology* 1997; **138**: 5055–5058.
- [44] YU WH, KIMURA M, WALCZEWSKA A, KARANATH S, MCCANN SM. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 1023–1028.
- [45] ZACHOW RJ, MAGOFFIN DA. Direct intraovarian effects of leptin: Impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I in follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 1997; **138**: 847–850.
- [46] ZAMORANO PL, MAHESH VB, DE SEVILLA LM, CHORICH LP, BHAT GK, BRANN DW. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissue of rat. *Neuroendocrinology* 1997; **65**: 223–228.
- [47] ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; **372**: 425–432.

Adres autora: Akademia Medyczna w Łodzi,
ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź.
e-mail:walczeab@csk.am.lodz.pl

ROLA RECEPTORÓW GABA_A W NEURALNEJ REGULACJI UWALNIANIA GONADOLIBERYNY Z PODWZGÓRZA U ANESTRALNYCH OWIEC

THE INVOLVEMENT OF GABA_A RECEPTORS IN THE CONTROL OF GONADOLIBERIN RELEASE IN ANESTROUS EWES

Dorota TOMASZEWSKA-ZAREMBA, Franciszek PRZEKOP

Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. J. Kielanowskiego, PAN w Jabłonnej

Streszczenie: Rolę receptorów A kwasu γ -aminomasłowego (GABA_A) w neuralnej regulacji uwalniania gonadoliberyny (GnRH) w podwzgórze u anestralnych owiec określano na podstawie zewnątrz komórkowych stężeń GnRH, β -endorfiny, noradrenaliny, dopaminy oraz ich metabolitów MHPG i DOPAC w czasie perfuzji muscimolu i bicuculliny (agonisty i antagonisty receptorów GABA_A) do jądra lejka – wyniosłości pośrodkowej (NI/ME) i okolicy przedwzrokowej (MPOA). Stymulacja receptorów GABA_A w NI/ME obniżała stężenie GnRH, β -endorfiny i dopaminy oraz MHPG i DOPAC, natomiast nie miała wpływu na stężenie noradrenaliny. Blokowanie receptorów GABA_A w tej strukturze podwzgórza nie powodowało istotnych zmian w stężeniu GnRH, noradrenaliny i MHPG, natomiast obniżało stężenie β -endorfiny, dopaminy i DOPAC. W MPOA perfuzja muscimolu podwyższała stężenie noradrenaliny i MHPG, natomiast obniżała stężenie dopaminy i DOPAC. Nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie GnRH i β -endorfiny, natomiast zaobserwowano istotne zmniejszenie uwalniania gonadotropiny (LH). Perfuzja bicuculliny nie miała istotnego wpływu na poziom wymienionych związków. Przedstawione wyniki sugerują, że GABA może hamować sekrecję GnRH poprzez receptory GABA_A w MPOA i NI/ME zarówno bezpośrednio poprzez receptory na zakończeniach neuralnych bądź na perikarionach GnRH lub pośrednio poprzez te receptory na neuronach opioidergicznych lub katecholaminergicznym w tych strukturach podwzgórza.

(*Postępy Biologii Komórki 2001; 28 supl. 18: 89–93*)

Słowa kluczowe: receptory GABA_A, GnRH, podwzgórze, owca

Summary: To examine the role of γ -aminobutyric acid receptors A (GABA_A) in the control of gonadoliberin (GnRH) release, the extracellular concentrations of GnRH, β -endorphin, catecholamines and their main metabolites MHPG and DOPAC were quantified during local infusion of muscimol and bicuculline (agonist and antagonist of GABA_A receptors respectively) to the nucleus infundibularis-me-

POLISPERMICZNE ZAPŁODNIENIE U PTAKÓW – ROLA DNaz W DEGRADACJI NADLICZBOWYCH PLEMNIKÓW*

POLISPERMIC FERTILIZATION IN BIRDS – THE ROLE OF DNases IN DEGRADATION OF SUPERNUMERARY SPERMATOZOA

Urszula STĘPIŃSKA, Bożenna OLSZAŃSKA

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec k. Warszawy

Streszczenie: Ptaki charakteryzują się fizjologiczną polispermia, oznacza to, że liczne plemniki wnikają do cytoplazmy jaja podczas normalnego zapłodnienia, ale tylko jedno z utworzonych przedjądrz męskich uczestniczy w tworzeniu jądra zygoty. Natomiast wszystkie nadliczbowe przedjądrza męskie degenerują we wczesnym okresie bruzdkowania. Dotychczas nie zostało wyjaśnione, co w istocie dzieje się z tymi nadliczbowymi przedjądrzami i jaki mechanizm odpowiada za ich degradację. Wyniki naszych badań wskazują, że w oocytach przepiórki japońskiej występują DNazy I i II, zdolne do degradacji w warunkach *in vitro* nagiego DNA faga λ , jak również DNA zawartego w plemnikach przepiórki. Przypuszczamy, że enzymy te mogą rozkładać DNA pochodzące z nadliczbowych plemników wnikających do jaja ptaka podczas polispermicznego zapłodnienia, a więc są jednym z czynników późnego cytoplazmatycznego bloku przeciwko polispermii. Obecność dużych aktywności DNaz w oocytach może również tłumaczyć trudności w otrzymywaniu ptaków transgenicznych metodą nastrzyknięcia obcego DNA do cytoplazmy zapłodnionego jaja.

(*Postępy Biologii Komórki 2001; 28 supl. 18: 103–110*)

Słowa kluczowe: ptaki, oocyty, polispermia, DNaza

Summary: Birds exhibit physiological polyspermy, i.e. numerous spermatozoa enter the cytoplasm of an oocyte during normal fertilization, but only one sperm nucleus participates in formation of a zygote nucleus, whereas the accessory sperm nuclei degenerate at the early cleavage stages. The fate of supernumerary sperm nuclei and the mechanism responsible for their degradation are not clear. The results of our *in vitro* studies showed, in oocytes of the Japanese quail, the existence of high DNase I and II activities which are able to digest not only naked phage λ DNA but also DNA contained in quail

*Praca została napisana i wykonana w ramach tematu statutowego S. 1. 2. i grantu KBN 5P06D 01218.

dian eminence (NI/ME) and the medial preoptic area (MPOA) in anestrous ewes. Stimulation of GABA_A receptors in NI/ME significantly attenuated GnRH release with concomitant increase of β -endorphin, dopamine, MHPG and DOPAC levels. Blockade of the GABA_A receptors in this structure of the hypothalamus did not affect GnRH and noradrenaline release but inhibited β -endorphin release and decreased dopaminergic activity. In MPOA, infusion of muscimol increased noradrenergic activity and decreased dopaminergic activity. We did not observe any changes in GnRH and β -endorphin levels, but luteinizing hormone (LH) levels in the blood plasma were significantly decreased. Blockade of GABA_A receptors with bicuculline had no evident effect neither on catecholaminergic system activity nor β -endorphin-like immunoreactivity. These results suggest, that GABA may suppress GnRH release directly through GABA_A receptors located on the axon terminals or on perikaria of the GnRH neurons in NI/ME and MPOA or indirectly by GABA_A receptors located on β -endorphinergic and catecholaminergic neurons.

(*Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18 : 89–93*)

Key words: GABA_A receptors, GnRH, ewe, hypothalamus,

WSTĘP

Sekrecja gonadotropin u zwierząt jest regulowana przez gonadoliberynę (GnRH), na którą z kolei wpływają neurotransmitery i neuromodulatory tak o charakterze stymulującym, jak i hamującym. Wiele badań wskazuje na to, że neurony kwasu γ -aminomasłowego (GABA) w podwzgórzu są włączone w regulację sekrecji GnRH/LH. Generalnie przyjmuje się, że GABA jest neurotransmiterem hamującym uwalnianie GnRH/LH. Sposób działania GABA jest uzależniony tak od rodzaju receptorów GABA, jak i ich lokalizacji na neuronach GnRH lub układach neuralnych uczestniczących w regulacji sekrecji GnRH. Większość badań *in vivo* i *in vitro* sugeruje, że GABA hamuje bądź stymuluje uwalnianie GnRH/LH i biosyntezę mRNA GnRH [2, 4, 6]. Prace immunohistochemiczne i manipulacje farmakologiczne z receptorami GABA w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) u szczura wskazują, że funkcjonalne połączenia GABA-GnRH, GABA-układ katecholaminergiczny i GABA-układ opioidergiczny w przednim podwzgórzu (MPOA) i jądrze lejka – wyniosłości pośrodkowej (NI/ME) odgrywają ważną rolę w stymulacji bądź hamowaniu uwalniania GnRH [5, 9].

Jak dotąd badania prowadzone na owcach nie wykazały ściśle określonego typu i miejsca działania GABA na sekrecję GnRH. Często wyniki są sprzeczne i trudne do interpretacji. Badania wykazały, że GABA może w różnorodny sposób regulować sekrecję GnRH w zależności od typu receptora GABA (receptora typu A bądź typu B) w danym układzie neuralnym i w danej strukturze podwzgórza [1]. W przypadku działania hamującego na uwalnianie GnRH, GABA może wpływać przynajmniej w dwojaki sposób: po pierwsze poprzez aktywację receptorów GABA obecnych na perikarionach GnRH w MPOA lub na zakończeniach neuronów GnRH w NI/ME oraz poprzez receptory GABA na innych neuronach stymulujących uwal-

nianie GnRH [8]. Z drugiej strony stymulujący wpływ GABA na uwalnianie LH mógłby być pośrednim efektem wpływu tego związku na hamujące układy neuralne mające połączenie z GnRH. Sugeruje się, że GABA może obniżać uwalnianie hamujących neurotransmiterów w podwzgórzu zmniejszając w ten sposób ich hamujące działanie na uwalnianie GnRH. Jak dotąd nie wiadomo dokładnie, które hamujące neurotransmitery lub neurohormony uczestniczą w tym procesie. Sugeruje się, że u owiec w okresie anestrалnym tę rolę spełniają β -endorfina i katecholaminy.

W naszych badaniach podjęliśmy próbę wyjaśnienia roli receptorów $GABA_A$ w regulacji sekrecji GnRH/LH u owiec w okresie anestrалnym.

MATERIAŁ I METODY

Rolę receptorów w neuralnej regulacji uwalniania GnRH określano na podstawie zewnątrzkomórkowych stężeń GnRH, β -endorfiny, noradrenaliny, dopaminy oraz głównych metabolitów tych amin MHPG i DOPAC w czasie perfuzji muscimolu (agonisty receptorów $GABA_A$) lub bicuculliny (antagonisty receptorów $GABA_A$) do NI/ME i MPOA. Stężenia GnRH w perfuzatach oznaczano metodą RIA opisaną u Domańskiego i wsp. [3], β -endorfina oznaczano w perfuzatach metodą RIA opisaną przez Leshin i wsp. [7], LH natomiast oznaczano w osoczu krwi metodą RIA opisaną wcześniej przez Stupnickiego i Madeja [10].

Noradrenalina, dopamina oraz ich metabolity DOPAC i MHPG oznaczano w perfuzatach metodą HPLC z detekcją elektrochemiczną [11].

WYNIKI I DYSKUSJA

Stymulacja receptorów $GABA_A$ w NI/ME obniżała stężenie zewnątrzkomórkowe GnRH, podwyższała poziom β -endorfiny i dopaminy oraz MHPG i DOPAC. Perfuzja muscimolu nie wywierała istotnego wpływu na stężenie noradrenaliny w perfuzatach. Blokowanie zaś receptorów $GABA_A$ w NI/ME nie powodowało istotnych zmian w poziomie GnRH, noradrenaliny i MHPG, obniżało natomiast stężenie β -endorfiny, dopaminy i DOPAC.

Te wyniki wskazują, że regulacja uwalniania GnRH przez GABA włącza całą serię interakcji pomiędzy układami GnRH, β -endorfiny i dopaminergicznym w NI/ME. Ogólnie, nasze wyniki wskazują, że aktywacja receptorów $GABA_A$ w NI/ME hamuje uwalnianie GnRH u owiec w okresie anestrалnym. Nasze wyniki pozostają w zgodzie z innymi badaniami *in vivo* i *in vitro* na owcach i szczurach, które wykazywały, że w obszarze jądra łukowatego w podwzgórzu aktywacja receptorów $GABA_A$ obniża sekrecję GnRH/LH [2,4].

W drugiej badanej strukturze podwzgórza, MPOA, stymulacja receptorów $GABA_A$ podwyższała stężenie noradrenaliny i MHPG; stężenie zaś dopaminy i

TABELA 1. Wpływ muscimolu i bicuculliny na stężenie GnRH, LH, β -endorfiny, noradrenaliny (NE), dopaminy (DA), MHPG i DOPAC w NI/ME i MPOA. Podane są wartości średnie \pm SEM; istotna różnica * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$

Grupa	% zmiany od wartości kontrolnej				Stężenie		
	NE	MHPG	DA	DOPAC	GnRH [pg/50 μ l]	LH [ng/ml]	β -end [pg/50 μ l]
NI/ME							
kontrola	100	100	100	100	1,91 \pm 0,41	–	33,87 \pm 3,20
muscimol	101 \pm 10	141 \pm 1**	151 \pm 26*	158 \pm 30*	0,68 \pm 0,4**	–	46,73 \pm 4,21*
bicucullina	104 \pm 16	150 \pm 30*	63 \pm 10**	57 \pm 10**	2,01 \pm 0,52	–	16,46 \pm 3,81**
MPOA							
kontrola	100	100	100	100	–	2,90 \pm 0,30	47,33 \pm 11,88
muscimol	149 \pm 9**	132 \pm 9*	63 \pm 5**	73 \pm 6*	–	2,30 \pm 0,1**	44,16 \pm 8,89
bicucullina	107 \pm 16	96 \pm	104 \pm 19	98 \pm 17	–	3,05 \pm 0,50	46,53 \pm 13,47

DOPAC istotnie obniżało się. Muscimol nie powodował istotnych zmian w poziomie β -endorfiny. Stężenia GnRH były niskie i w większości prób mieściły się w granicach czułości metody lub były nieoznaczalne. W czasie perfuzji muscimolu nie stwierdzono GnRH w większości perfuzatów. Ponieważ GnRH uwalnia się głównie z zakończeń neuronalnych w NI/ME, dokonano analizy wpływu perfuzji muscimolu do MPOA na sekrecję LH. Muscimol istotnie obniżył średnie stężenie LH oraz częstotliwość pulsów LH bez wyraźnego wpływu na amplitudę pulsów. Perfuzja bicuculliny do MPOA nie miała wpływu na poziom wymienionych związków.

Przedstawione wyniki wskazują, że stymulacja receptorów GABA_A w NI/ME i MPOA wywiera różny wpływ na uwalnianie GnRH, β -endorfiny oraz na aktywność układu katecholaminergicznego. W NI/ME muscimol obniża uwalnianie GnRH jednocześnie podwyższając sekrecję β -endorfiny oraz aktywuje układ dopaminergiczny i zwiększa metabolizm w układzie noradrenergicznym. W MPOA muscimol obniża uwalnianie GnRH; zmniejszony poziom LH we krwi w czasie perfuzji muscimolu do MPOA wskazuje, że muscimol poprzez działanie na perikaryony GnRH w tej strukturze podwzgórza wywiera hamujący wpływ na uwalnianie GnRH z zakończeń nerwowych w NI/ME. Stymulacja receptorów GABA_A w MPOA nie wywiera istotnego wpływu na uwalnianie β -endorfiny, natomiast aktywuje układ noradrenergiczny i hamuje aktywność układu dopaminergicznego.

Podsumowując, wyniki z naszych doświadczeń wskazują, że stymulacja receptorów GABA_A w NI/ME znacznie hamuje uwalnianie GnRH z jednoczesnym wzrostem uwalniania β -endorfiny i dopaminy, podczas gdy blokada tych receptorów nie ma wpływu na poziom GnRH, ale obniża poziom β -endorfiny i dopaminy. W MPOA natomiast stymulacja receptorów GABA_A wpływa hamująco na uwalnianie LH, zmniejsza aktywność układu dopaminergicznego, a zwiększa aktywność układu

noradrenergicznego. Blokowanie tych receptorów w tej strukturze podwzgórza nie ma wpływu na wymienione układy. Te wyniki wskazują, że GABA hamuje sekrecję GnRH poprzez receptory GABA_A w MPOA i NI/ME zarówno bezpośrednio poprzez receptory na zakończeniach neuronalnych bądź na perikarionach GnRH lub pośrednio poprzez te receptory na neuronach opioidergicznych lub katecholaminergicznych w tych strukturach podwzgórza.

LITERATURA

- [1] AKEMA T, KIMURA F. Differential effects of GABA_A and GABA_B receptor agonists on NMDA- induced and noradrenaline-induced luteinizing-hormone release in the ovariectomized estrogen-primed rat. *Neuroendocrinology* 1993; **57**: 28–33.
- [2] BOURGUIGNON J-P, GERARD A, PURNELLE G, CZAJKOWSKI V, YAMANAKA C, LEMAITRE M, RIGO J-M, MOONEN G, FRANCHIMONT P. Duality of glutamatergic and gabaergic control of pulsatile GnRH secretion by rat hypothalamic explants: I. Effects of antisense oligodeoxynucleotides using explants including the preoptic area. II. Reduced NR2C- and GABA_A-receptor-mediated inhibition of sexual maturation. *J Neuroendocrinol* 1997; **9**: 183–191.
- [3] DOMAŃSKI E, GAJEWSKA A, KOCHMAN H, MASIUKIEWICZ E, RZESZOTARSKA B, KOCHMAN K. Production of antibody specific against mammalian LHRH decapeptide. *Endocrinol Pol* 1994; **45**: 147–153.
- [4] FERREIRA SA, SCOTT CJ, KUEHL DC, JACKSON GL. Differential regulation of luteinizing hormone release by γ -aminobutyric acid receptor subtypes in the arcuate-ventromedial region of the castrated ram. *Endocrinology* 1996; **137**: 3453–3460.
- [5] JUNGH, SHANNON EM, FRITSCHY J-M, OJEDA SR. Several GABA receptor subunits are expressed in LHRH neurons of juvenile female rats. *Brain Res* 1998; **790**: 219–229.
- [6] LEONHARDT S, BONING B, LUFT H, WUTTKE W, JARRY H. Activation of gene expression of the γ -aminobutyric acid rather than the glutamatergic system in the preoptic area during the preovulatory gonadotropin surge of the rat. *Neuroendocrinology* 2000; **71**: 8–15.
- [7] LESHIN LS, MALVEN PV. Radioimmunoassay for β -endorphin in unextracted plasma from sheep. *Domestic Animal Endocrinol* 1984; **1**: 175–188.
- [8] PETERSEN SL, MCCRONE S, COY D, ADELMAN JP, MAHOM LC. GABA_A receptor subunit mRNA in cells of preoptic area; colocalization with LHRH mRNA using dual-label *in situ* hybridization histochemistry. *Endocrine J* 1993; **1**: 29–34.
- [9] ROBINSON JE. Gamma amino-butyric acid and control of GnRH secretion in sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 1995; **49**: 221–230.
- [10] STUPNICKI R, MADEJ A. Radioimmunoassay of LH in blood plasma of farm animals. *Endocrinologie* 1976; **68**: 6–13.
- [11] TOMASZEWSKA D, PRZEKOP F. Catecholaminergic activity in the medial preoptic area and nucleus infundibularis-median eminence of anestrous ewes in normal physiological state and under stress condition. *J Neural Transm* 1999; **106**: 1031–1043.

Adres autorów: Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt, PAN,
05-110 Jabłonna, ul. Instytucka 3
e-mail: infizyz@atos.warman.com.pl

MOLEKULARNE PODSTAWY KRWAWIENIA MIESIĄCZKOWEGO

MOLECULAR PATHWAYS INVOLVED IN HUMAN MENSTRUATION

Jan KOTARSKI

I Katedra i Klinika Ginekologii Operacyjnej Akademii Medycznej w Lublinie

Streszczenie: W okresie dojrzałości płciowej błona śluzowa macicy ulega cyklicznym zmianom morfologicznie określanym jako faza wzrastania, wydzielania oraz złuszczenia. Zachodzą one w następstwie okresowo powtarzających się zmian w zakresie czynności osi podwzgórzowo-przysadkowo-jajnikowej, czego efektem są fluktuacje w stężeniu estrogenów oraz progesteronu we krwi. W cyklu płciowym, w którym nie doszło do zapłodnienia komórki jajowej, czynność hormonalna ciała żółtego wygasa, zmniejsza się stężenie estradiolu i progesteronu we krwi, w czego następstwie dochodzi do złuszczenia błony śluzowej macicy i wystąpienia krwawienia miesięczkowego. Omówiono teorie wyjaśniające mechanizm krwawienia miesięczkowego w świetle badań eksperymentalnych.

(Postępy Biologii Komórki 2001; 28 suppl. 18: 95–100)

Słowa kluczowe: endometrium, krwawienie miesięczne, apoptoza.

Summary: Endocrine changes occurring during the menstrual cycle influence the morphology and function of epithelial and stromal cells of the endometrium preparing them for implantation. If conception does not occur, the *corpus luteum* regress and hormonal changes lead to menstruation. Mechanism of tissue shedding during menstruation involving changes in cellular membranes function, vessels reactions, immune cell paracrine stimulation and induction of apoptosis are discussed in view of experimental data *(Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18 : 95–100)*

Key words: endometrium, menstruation, cell adhesion, apoptosis.

Błona śluzowa macicy kobiet, a także niektórych zwierząt doświadczalnych stanowi modelowy układ badawczy nad zależnościami pomiędzy steroidami płciowymi wydzielanymi przez gonady i zmianami morfologicznymi i biochemicznymi w tkankach hormonozależnych [5,28]. Proliferacja, różnicowanie, a także podjęcie czynności wydzielniczej przez komórki nabłonka endometrium są następstwem działania

estrogenów oraz progesteronu [5,13]. Miejscowo wytwarzane substancje biologicznie aktywne, takie jak: czynniki wzrostu, cytokiny, prostanoidy, a także estrogeny wytwarzane głównie w komórkach zrębu, grają ważną rolę w przemianach endometrium umożliwiających implantację zarodka [1,29,36]. Jeżeli w cyklu płciowym nie dojdzie do zapłodnienia komórki jajowej, czynność hormonalna ciała żółtego wygasa, obniża się stężenie estrogenów oraz progesteronu we krwi i dochodzi do złuszczenia śluzówki macicy, co manifestuje się wystąpieniem krwawienia miesięczkowego. Istnieje wiele teorii wyjaśniających wystąpienie krwawienia miesięczkowego.

I. TEORIA DEPOLIMERYZACJI

Oparta jest na obserwacjach stwierdzających zmiany w przepuszczalności błon lizosomalnych, w czego następstwie dochodzi do uwolnienia enzymów proteolitycznych do cytoplazmy i destrukcji komórek. Teoria ta sformułowana została w na podstawie badań Garcii-Bunneli i Brandesa [8], którzy stwierdzili, że w aparacie Golgiego i lizosomach izolowanych z endometrium stężenie enzymów proteolitycznych jest ok. 40 000 razy wyższe niż we krwi.

Międzykomórkowe połączenia szczelinowe (ang. *gap junctions*) sąsiadujących komórek umożliwiające bezpośrednie przekazywanie sygnałów zbudowane są z koneksyny. W błonie śluzowej macicy ludzi, a także gryzoni i królików zidentyfikowano trzy koneksyny (ang. *Connexins* – Cx): C26, Cx32 oraz Cx 43 [15]. Tworzenie i funkcjonowanie połączeń szczelinowych determinuje receptywność endometrium i przebieg wczesnej fazy implantacji. Granot i wsp.[11] Stwierdzili, że zarówno estrogeny, jak i progesteron stymulują ekspresję genu *Cx 43* ocenianą na poziomie mRNA oraz białka w endometrium odnotowując najwyższe wartości między 21 i 25 dniem cyklu. Przypuszczać można, że dezintegracja połączeń międzykomórkowych w następstwie obniżenia stężeń obu sterydów przed miesiączką może odgrywać ważną rolę w przebiegu krwawienia miesięczkowego.

Ciągłość nabłonka zabezpieczona jest kilkoma typami przyczepów mechanicznych [22]. Desmosomy, których integralną składową są transbłonowe białka kadheryny, łączą cytoszkielety sąsiadujących komórek. W tak zwanych połączeniach zwiernających (ang. *Adherens junctions*) kadheryny łączą się za pośrednictwem α , β i γ katenin (ang. *catenin*) z filamentami aktynowymi wewnątrz komórki przylegającej [31]. W czasie krwawienia miesięczkowego komórki z warstwy czynnościowej endometrium tracą cząsteczki kompleksów desmosomów oraz połączeń zwiernających, których elementy zostały zidentyfikowane w macierzy pozakomórkowej i dochodzi do dezintegracji błony śluzowej macicy.

II. TEORIA NACZYNIOWA

Hipoteza zakładająca, że regulacja unaczynienia błony śluzowej macicy ma kluczowe znaczenie w mechanizmie krwawienia miesięczkowego, została sformułowana na podstawie obserwacji, że pod koniec fazy wydzielniczej następuje zmiana morfologii tętniczek spiralnych, a także zaburzenie funkcji błon komórkowych śródbłonna naczyń endometrium, w wyniku czego dochodzi do gromadzenia i przylegania płytek krwi, tworzenia zakrzepów, wynaczynienia krwi i martwicy tkanki [16,20]. Badania Ishihary i wsp. [14] wykazały, że $\text{PGF}_{2\alpha}$ jest ilościowo dominującą prostaglandyną w błonie śluzowej macicy w przebiegu cyklu płciowego, a także że największe nasilenie jej syntezy występuje w fazie miesięczkowej [21]. Stwierdzono także, że koncentracja receptora dla prostaglandyny $\text{F}_{2\alpha}$ w tętnicach spiralnych endometrium pod koniec fazy wydzielniczej jest najwyższa [21]. Tłumaczy to mechanizm skurczu naczyń powodujący niedokrwienie warstwy czynnościowej błony śluzowej macicy i wystąpienie krwawienia miesięczkowego.

III. TEORIA REAKCJI ZAPALNEJ

Teoria ta została sformułowana przez Fina i Pope [7]. W zrębie błony śluzowej macicy około 20% komórek stanowią elementy morfotyczne układu immunologicznego (makrofagi, eozynofile, neutrofile, komórki tuczne, limfocyty T i B), przy czym w okresie przedmiesiączkowym stwierdzono ich największe nagromadzenie [2,3,25]. Uwalniane przez leukocyty proteazy i elastaza dezintegrują błonę podstawną naczyń oraz substancję pozakomórkową [16,19].

Występujący przed miesiączką obrzęk podścieliska jest następstwem wzrostu przepuszczalności naczyń krwionośnych. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) wytwarzany przez neutrofile endometrium oprócz działania mitogennego na śródbłonek jest silnym czynnikiem zwiększającym przepuszczalność naczyń krwionośnych [23,34]. Stwierdzono, że w błonie śluzowej macicy występują neutrofile zarówno syntetyzujące VEGF (warianty: VEGF 121 i VEGF 165), jak i nie wykazujące tej właściwości [4,18].

Zaobserwowano, że endometrium ma zdolność syntetyzowania czynnika martwicy nowotworów – $\text{TNF}\alpha$, przy czym pik jej nasilenia występował w fazie miesięczkowej. Badania immunohistochemiczne wykazały, że ilość receptora $\text{TNF}\alpha$ zarówno typu I ($\text{TNF}\alpha\text{-I}$), jak i typu II ($\text{TNF}\alpha\text{-II}$) w endometrium jest zbliżona w przebiegu cyklu [32]. Sądzić więc należy, że zmiany w ilości $\text{TNF}\alpha$ a nie zmiany w receptywności tkanki odpowiadają za przebieg miesięczkowania. Udział $\text{TNF}\alpha$ w cyklu endometrialnym związany jest z działaniem [30,33]:

- hamującym proliferację i indukującym apoptozę nabłonka endometrium,
- zaburzającym funkcję naczyń krwionośnych,
- pobudzającym wytwarzanie metaloproteinaz (MMP-2, MMP-7, MMP-9, stromeliziny),
- wywołującym dysocjację komórek nabłonkowych [7].

Komórki układu immunologicznego są też źródłem innych biologicznie aktywnych substancji powodujących degradację macierzy pozakomórkowej, dezintegrację nabłonka oraz obkurczenie tętniczek spiralnych, niedokrwienie i martwicę tkanki [6].

IV. TEORIA ZEGARA BIOLOGICZNEGO OPARTEGO NA PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓREK

Komórki błony śluzowej macicy ulegają eliminacji z tkanki drogą programowanej śmierci. Apoptoza komórek endometrium regulowana jest przez sterydy płciowe, a także obniżenie stężenia niektórych cytokin we krwi, np. interleukiny 2, IL-3, IL-13, CSF-1, prowadzi do zapoczątkowania kaskady zjawisk prowadzących do śmierci komórek [33]. Badania na myszach wykazały, że estrogeny powodują proliferację komórek nabłonkowych endometrium, zaś eliminacja estrogenów – apoptozę [24]. U chomików operacyjne usunięcie gonad powodowało już po 24 godzinach wystąpienie apoptozy w endometrium [26]. Wycięcie jajników królikom powodowało gwałtowny spadek koncentracji progesteronu, w czego następstwie indukowana była apoptoza komórek endometrium. W badaniach na małpach wykazano, że podanie antagonisty progesteronu RU 486 wywoływało apoptozę nabłonka błony śluzowej macicy [27]. Eksperymenty, wybiórczo zacytowane z dość obfitego piśmiennictwa, wykazują, że apoptoza endometrium zależy od cyklicznych zmian stężenia zarówno estrogenów, jak i progesteronu we krwi. Badania Gebel i wsp. [9] wykazały, że zmniejszenie spontanicznej apoptozy komórek endometrium może odgrywać rolę w patogenezie endometriozy.

☞ Sterydy płciowe nie są jedynymi regulatorami programowanej śmierci komórki, także niektóre cytokiny i czynniki wzrostu (np. TNF α) mogą ją zapoczątkować [10,29].

Złuszczenie błony śluzowej macicy i wystąpienie krwawienia miesięczkowego jest zjawiskiem złożonym. Jego prawidłowy przebieg uwarunkowany jest zmianami zachodzącymi w przebiegu całego cyklu endometrialnego, w których fluktuacje stężenia sterydów płciowych wydzielanych przez gonady odgrywa główną rolę [28,35].

PIŚMIENNICTWO

- [1] BENEDETTO MT, TABANELLI S, GURPIDE E. Estrone sulfatase activity is increased during *in vitro* decidualization of stromal cells from human endometrium, *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 342–345.
- [2] BULMER JN, LONGFELLOW M, RITSON A. Leukocytes and resident blood cells in endometrium. *Ann NY Acad Sci* 1991; 622: 57–68.
- [3] BULMER JN. Human endometrial lymphocytes in normal pregnancy and pregnancy loss. *Ann NY Acad Sci* 1994; 734: 185–192.
- [4] CHARNOCK-JONES D, SHARKEY A, RAJPUT-WILIAMS J, BURCH D, SCHOFIELD J, FOUNTAIN S. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod* 1993; 48: 1120–1128.
- [5] FERENCZY A, BERGERON C. Histology of the human endometrium: from birth to senescence. [w] Bulletti C, Gurpide E [red.] The primate endometrium. *Ann NY Acad Sci* 1991: 6–27.
- [6] FINN CA. Implantation, menstruation and inflammation. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1986; 61: 313–328.
- [7] FINN CA, POPE M. Control of leukocyte infiltration into decidualized mouse uterus. *J Endocrinol* 1986; 110: 93–96.
- [8] GARCIA-BUNNEL R, BRANDES D. Lysosomal enzymes in human endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1966; 94: 1045–1055.
- [9] GEBEL HM, BRAUN DP, TAMBUR A, FRAMED, RANA N, DMOWSKI WP. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 69: 1042–1047.
- [10] GIUDICE LC. Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. *Fertil Steril* 1994; 61: 1–17.
- [11] GRANOT I, DEKEL N, BECHOR E, SEGAL I, FIELDUSY S, BARASH A. Temporal analysis on connexin43 protein and gene expression throughout the menstrual cycle in human endometrium. *Fertil Steril* 2000; 73: 381–386.
- [12] HUNT JS, CHEN HL, HU X-L, TABIBZADEH S. Tumor necrosis factor- α mRNA and protein in human endometrium. *Biol Reprod* 1992; 47: 141–147.
- [13] IRVIN JC, UTIAN WH, ECKERT RL. Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 1991; 129: 2385–2392.
- [14] ISHIHARA O, TSUTSUMI O, MIZUNO M. Metabolism of arachidonic acid and synthesis of prostanoids in human endometrium and decidua. *Prostaglandins Leukotriens Med* 1986; 24: 93–102.
- [15] JAHN E, CLASSEN-LINKE I, KUSHE M, BEIER HM, TRAUB O, GRUMMER R. Expression of gap junction connexins in the human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* 1995; 10: 2666–2670.
- [16] JAKOWICKI JA. Mechanizm krwawień miesięcznych. [w] Endometrioza (red.) J.A. Jakowicki Folium Lublin 1997: 15–22.
- [17] KAMAT B, ISAACSON DM. The immunochemical distribution of leukocytic subpopulations in human endometrium. *Am J Pathol* 1987; 127: 66–73.
- [18] KARURI A, KUMAR A, MUKHOPADHYAY D. Differential expression and selective localisation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in the rat uterus during the estrous cycle. *J Endocrinol* 1998; 159: 488–499.
- [19] KING A, BURROWS T, VERMA S, HIBY S, LOKE YW. Human uterine leukocytes. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 480–485.

- [20] LEI ZM, RESHEF E, RAO CV. The expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors in human endometrial and myometrial blood vessels. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; **75**: 651–659.
- [21] LIGGINS GC, CAMPOS GA, ROBERTS CM, SKINNER SJ. Production rates of prostaglandin F, 6-ketoPGF α and tromboxane B₂ by perfused human endometrium. *Prostaglandins* 1980; **19**: 461–470.
- [22] LUNA EJ, HITT AL. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science* 1992; **258**: 955–963.
- [23] MUELLER M, LBOVIC DI, GARRETT E, TAYLOR RN. Neutrophils infiltrating the endometrium express vascular endothelial growth factor: potential role in endometrial angiogenesis. *Fertil Steril* 2000; **74**: 107–112.
- [24] POLLARD JW, PACEY J, CHENG SVY, JORDAN EG. Estrogens and cell death in murine luminal epithelium. *Cell Tissue Res* 1987; **249**: 533–540.
- [25] POROPATICH C, RAJOS M, SILVERBERG S. Polymorphonuclear leukocytes in the endometrium during the normal menstrual cycle. *Int J Gynecol Path* 1987; **6**: 230–234.
- [26] SANDOW BA, WEST NB, NORMAN RL, BRENNER RM. Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium. *Am J Anat* 1979; **156**: 15–36.
- [27] SLAYDEN OD, HIRST JJ, BRENNER RM. Estrogen action in the reproductive tract of rhesus monkeys during antiprogestin treatment. *J Endocrinol Metab* 1993; **132**: 1845–1856.
- [28] STRAUSS J, COUTIFARIS Ch. The endometrium and myometrium: regulation and dysfunction. [w] Yen SC, Jaffe RB, Barbieri RL [red.] Reproductive endocrinology. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo. W.B.Saunders Comp. 1999: 218–256.
- [29] TABIBZADEH S. Human endometrium: an active site of cytokine production and action. *Endocrine Rev* 1991; **12**: 272–290.
- [30] TABIBZADEH S, KONG QF, SUN XZ. Regulatory roles of TNF- α on transepithelial migration of leukocytes and epithelial dyscohesion. *Endocrine* 1993; **1**: 417–425.
- [31] TABIBZADEH S, BABAKNIA A, KONG QF, ZUPI E, MARCONI D, ROMANINI C, SATYASWAROOP PG. Menstruation is associated with disordered expression of desmoplakin I/II and cadherin/catenins and conversion of F to G actin in endometrial epithelium. *Human Reprod* 1995; **10**: 776–784.
- [32] TABIBZADEH S, BABAKNIA A, LIU R. Site and menstrual cycle dependent expression of proteins of the TNF receptor family, and BCL-2 oncoprotein and phase specific production of TNF α in human endometrium. *Hum Reprod* 1995; **10**: 277–286.
- [33] TABIBZADEH S. The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling. *Mol Hum Reprod* 1996; **2**: 77–92.
- [34] TAICHMAN N, YOUNG S, CRUCHLEY A, TAYLOR P, PALEOLOG E. Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J Leukoc Biol* 1997; **62**: 397–400.
- [35] TAZUKE SI, GIUDICE LC. Growth factors and cytokines in endometrium, embryonic development, and maternal:embryonic interactions. *Seminars Reprod Endocrinol* 1996; **14**: 231–243.
- [36] ZEITOUN KM, BULUN SE. Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target. *Fertil Steril* 1999; **2**: 961–969.

Adres autora: ul. Staszica 16, 20 093 Lublin
email: Kotarski@eskulap.am.lublin.pl

Sekcja
**BIOCHEMICZNE I MOLEKULARNE
MECHANIZMY ROZRODU**

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR
MECHANISMS OF REPRODUCTION

POLISPERMICZNE ZAPŁODNIENIE U PTAKÓW – ROLA DNaz W DEGRADACJI NADLICZBOWYCH PLEMNIKÓW*

POLISPERMIC FERTILIZATION IN BIRDS – THE ROLE OF DNases IN DEGRADATION OF SUPERNUMERARY SPERMATOZOA

Urszula STĘPIŃSKA, Bożenna OLSZAŃSKA

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec k. Warszawy

Streszczenie: Ptaki charakteryzują się fizjologiczną polispermia, oznacza to, że liczne plemniki wnikają do cytoplazmy jaja podczas normalnego zapłodnienia, ale tylko jedno z utworzonych przedjądrzy męskich uczestniczy w tworzeniu jądra zygoty. Natomiast wszystkie nadliczbowe przedjądrza męskie degenerują we wczesnym okresie bruzdkowania. Dotychczas nie zostało wyjaśnione, co w istocie dzieje się z tymi nadliczbowymi przedjądrzami i jaki mechanizm odpowiada za ich degradację. Wyniki naszych badań wskazują, że w oocytach przepiórki japońskiej występują DNazy I i II, zdolne do degradacji w warunkach *in vitro* nagiego DNA faga λ , jak również DNA zawartego w plemnikach przepiórki. Przypuszczamy, że enzymy te mogą rozkładać DNA pochodzące z nadliczbowych plemników wnikających do jaja ptaka podczas polispermicznego zapłodnienia, a więc są jednym z czynników późnego cytoplazmatycznego bloku przeciwko polispermii. Obecność dużych aktywności DNaz w oocytach może również tłumaczyć trudności w otrzymywaniu ptaków transgenicznych metodą nastrzyknięcia obcego DNA do cytoplazmy zapłodnionego jaja.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28 supl. 18: 103–110)

Słowa kluczowe: ptaki, oocyty, polispermia, DNaza

Summary: Birds exhibit physiological polyspermy, i.e. numerous spermatozoa enter the cytoplasm of an oocyte during normal fertilization, but only one sperm nucleus participates in formation of a zygote nucleus, whereas the accessory sperm nuclei degenerate at the early cleavage stages. The fate of supernumerary sperm nuclei and the mechanism responsible for their degradation are not clear. The results of our *in vitro* studies showed, in oocytes of the Japanese quail, the existence of high DNase I and II activities which are able to digest not only naked phage λ DNA but also DNA contained in quail

*Praca została napisana i wykonana w ramach tematu statutowego S. 1. 2. i grantu KBN 5P06D 01218.

sperm. We suppose that the enzymes participate in degradation of DNA of supernumerary sperm entering the oocyte during polyspermic fertilization in birds. Thus they could be one of the factors of the late block to polyspermy in the cytoplasm of avian eggs. The presence of high DNase activities in avian oocytes might be also responsible for difficulties in obtaining transgenic birds by microinjection of exogenous DNA into the cytoplasm of fertilized ovum.

(*Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18: 103–110*)

Key words: birds, oocytes, polyspermy, DNase

WSTĘP

U ptaków występuje fizjologiczna polispermia, tzn. że podczas normalnego zapłodnienia do cytoplazmy jaja wnika kilka do kilkudziesięciu (niekiedy do kilkuset) plemników [4, 11, 12, 18]. Można to wiązać z nieobecnością w oocytach ptaków ziaren korowych [2], a więc z brakiem reakcji korowej i bloku przeciwko polispermii po wnিকnięciu pierwszego plemnika, które obserwujemy np. u jeźowców czy ssaków [7, 19]. Zapłodnienie polispermiczne u ptaków wydaje się konieczne do aktywacji dużych, bogatych w żółtko jaj tych zwierząt. Jajo ptaka jest zapładniane w lejku jajowodu w ciągu 15–30 min od owulacji [4, oraz nasze obserwacje], po czym wędruje ono w dół jajowodu. W ciągu kilku minut po wnিকnięciu pierwszej partii plemników, gdy jajo znajduje się na granicy lejka i magnum, zostaje ono otoczone zewnętrzną błoną żółtkową [4]. Błona ta stanowi barierę przed nadmierną polispermią, gdyż następne plemniki nie są już zdolne do jej penetracji i zostają w niej uwięzione.

Jądra wszystkich plemników, które wnिकnęły do blastodysku, pęcznią i przekształcają się w przedjądrza męskie; liczba ich u kury wynosi od kilku do kilkudziesięciu [11, 12]. Spośród licznych przedjądrzy męskich tylko jedno zajmuje centralną pozycję w blastodysku obok przedjądrza żeńskiego i tworzy z nim jądro zygoty. Pozostałe przedjądrza męskie przesuwane są na obrzeże blastodysku i chociaż niektóre z nich mogą przechodzić pierwszy podział mitotyczny, ostatecznie wszystkie zanikają we wczesnym okresie brudzkowania [12, 18]. Dotychczas proces ten nie został dokładnie poznany i właściwie nie było wiadomo, co tak naprawdę dzieje się z dodatkowymi przedjądrzami męskimi i pochodzącym z nich DNA.

Przesuwanie się dodatkowych przedjądrzy męskich z miejsca wnिकnięcia plemników na półkuli animalnej jaja w kierunku półkuli wegetatywnej obserwowano również u polispermicznej traszki, *Cynops pyrrhogaster* [6]; jednakże w przeciwieństwie do ptaków przedjądrza te nie dzielą się i degenerują jeszcze przed pierwszym podziałem brudzkowania.

Ponieważ zarodek ptaka, jak i innych zwierząt polispermicznych, pomimo wnिकnięcia do jaja wielu plemników, rozwija się przy udziale tylko jednego przedjądrza męskiego, to u tych zwierząt musi istnieć w jaju pewnego rodzaju późny cyto-

plazmatyczny blok przeciwko polispermii, zapewniający prawidłowy rozwój zarodkowy. Mechanizm ten nie zapobiegałby wnikaniu do jaja większej liczby plemników, lecz uniemożliwiałby już powstałym przedjądrzom męskim – z wyjątkiem jednego – połączenie z przedjądrzem żeńskim.

Metodą powszechnie stosowaną u ssaków dla otrzymania osobników transgenicznych jest wprowadzanie obcego DNA do genomu poprzez mikroiniekcję do jednego z przedjądrzy zapłodnionego jaja. U ptaków metody takiej stosować nie można, gdyż przedjądrza są zamaskowane obecnością dużej ilości żółtka w jaju, a ponadto, ze względu na zapłodnienie polispermiczne, jest ich wiele i nie wiadomo, które z nich weźmie udział w tworzeniu jądra zygoty. Dlatego też obce DNA wprowadza się do genomu ptaka (kura, przepiórka) za pomocą mikroiniekcji do cytoplazmy zapłodnionego jaja w centrum blastodysku, gdzie powinny znajdować się przedjądrza tworzące jądro zygoty. Wprowadzony w ten sposób DNA utrzymuje się w zarodku ptaka w formie episomalnej i chociaż początkowo może ulegać replikacji, to jednak stopniowo zanika we wczesnym okresie embriogenezy [13, 14]. Może to być jedną z przyczyn niepowodzeń w uzyskiwaniu ptaków transgenicznych metodą wstrzyknięcia DNA do cytoplazmy zapłodnionego jaja [9, 10].

Powyższe dane nasunęły nam przypuszczenie, że w oocytach ptaka występują enzymy nukleolityczne (DNazy) zdolne do degradacji dodatkowego DNA we wczesnych zarodkach.

W związku z tym badania nasze miały na celu stwierdzenie ewentualnej obecności, a następnie identyfikację i określenie poziomu aktywności tych enzymów w oocytach przepiórki.

MATERIAŁ I METODY

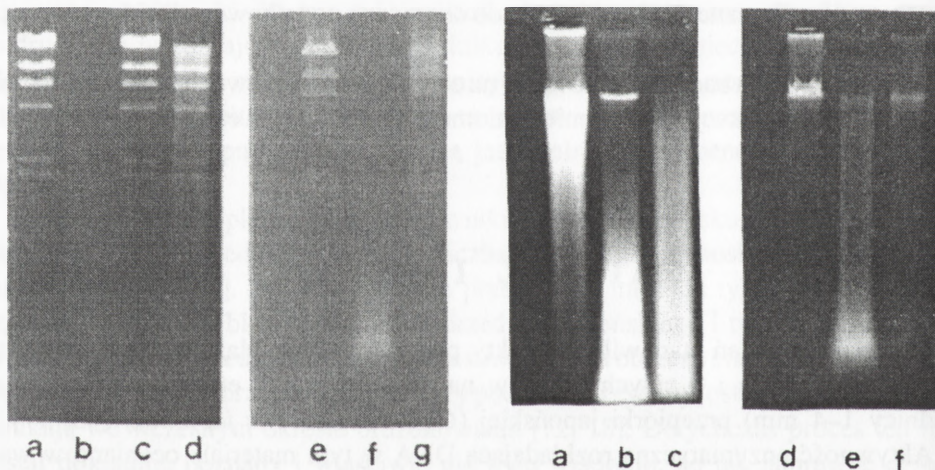
Materiał do badań stanowiły ekstrakty przygotowane z blastodysków oocytów przedowulacyjnych i z całych oocytów na wcześniejszych etapach oogenezy (o średnicy 1–4 mm) przepiórki japońskiej (*Coturnix coturnix japonica*) [15, 17].

Aktywność enzymatyczną rozkładającą DNA w tym materiale oceniano w warunkach *in vitro* na podstawie degradacji substratu: nagiego DNA (λ DNA/*Hind* III) lub DNA zawartego w plemnikach przepiórki odmytych od plazmy nasienia, po inkubacji z ekstraktami z oocytów. Rozkład DNA oceniano elektroforetycznie (po oczyszczeniu od białek metodą fenolową) w żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny. Substrat DNA z faga λ strawiony enzymem restrykcyjnym *Hind* III wykazuje po elektroforezie w żelu agarozowym 6 wyraźnych prążków DNA. Po inkubacji z DNazą prążki te ulegają mniejszej lub większej degradacji, zależnie od stężenia enzymu.

Warunki inkubacji substratów z ekstraktami z oocytów dobrano tak, aby można było wykryć obecność dwóch DNaz powszechnie występujących w organizmach eukariotycznych – DNazy I i DNazy II [15, 17]. Obecność DNazy I badano w buforze: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, a DNazy II – w 100 mM octanie sodu, pH 4,8, 5 mM EDTA. Doświadczenia kontrolne z zastosowaniem handlowych preparatów DNaz I i II potwierdziły brak rozkładu DNA przez DNazę I w warunkach optymalnych dla DNazy II i *vice versa*. Na ogół stosowano ekstrakty o stężeniu 200 µg białka/ml. W próbie kontrolnej substrat inkubowano w obecności albuminy surowicy bydlęcej (BSA).

WYNIKI

Ekstrakty z blastodysków oocytów przedowulacyjnych przepiórki powodowały wyraźną degradację λ DNA/*Hind* III zarówno w warunkach optymalnych dla DNazy I, jak i dla DNazy II (ryc. 1) [15, 16]. Degradacja substratu była wprost pro-



RYCINA 1. Degradacja DNA przez ekstrakty z blastodysków oocytów przedowulacyjnych przepiórki. Elektroforeza w 0,7% żelu agarozowym λ DNA/*Hind* III (4 µg/ml) inkubowanego 1 godz. w 37°C z ekstraktem (200 µg białka/ml) w 400 µl mieszaniny, w warunkach optymalnych dla DNazy I (a–d) lub dla DNazy II (e–g): a – kontrola (DNA + BSA), b – DNA + ekstrakt, c – DNA + ekstrakt inaktywowany przez 5 min w 100°C, d – DNA + ekstrakt + 20 mM EDTA, e – kontrola (DNA + BSA), f – DNA + ekstrakt, g – DNA + ekstrakt inaktywowany przez 5 min w 100°C

RYCINA 2. Degradacja DNA zawartego w plemnikach przepiórki przez ekstrakt z blastodysków oocytów przedowulacyjnych przepiórki; elektroforeza w 0,7% żelu agarozowym DNA z plemników (2×10^6) inkubowanych 24 godz. w 41°C z ekstraktem (~500 µg białka/ml) w 400 µl mieszaniny, w warunkach optymalnych dla DNazy I (a–c) lub dla DNazy II (d–f): a – kontrola (plemniki + BSA), b – plemniki + ekstrakt, c – plemniki + DNaza I (0,02 KU/ml), d – kontrola (plemniki + BSA), e – plemniki + ekstrakt, f – plemniki + DNaza II (0,02 KU/ml)

porcjonalna do stężenia białka w ekstrakcie. Aktywności DNaz w ekstraktach ulegały całkowitemu zahamowaniu po ich termicznej inaktywacji. W warunkach optymalnych dla DNazy II rozkład substratu przez ekstrakty z oocytów był większy niż w warunkach optymalnych dla DNazy I. W celu oszacowania aktywności DNazy I i II w blastodyskach oocytów przepiórki porównano degradację DNA przez ekstrakty z blastodysków z rozkładem substratu przez różne stężenia handlowych preparatów DNazy I i II (o znanej aktywności właściwej), w warunkach optymalnych dla danego enzymu. Oszacowano, że w przeliczeniu na 1 blastodysk oocytu przedowulacyjnego przepiórki aktywność DNazy I wynosi $\sim 3 \times 10^{-3}$ jednostek Kunitza (KU), a aktywność DNazy II $\sim 4 \times 10^{-2}$ KU, a więc aktywność DNazy II wydaje się być ~ 10 razy wyższa niż DNazy I.

Stwierdziliśmy, że aktywność DNazy I zmienia się w trakcie oogenezy [16]. Największą aktywność enzymu obserwowano w blastodyskach oocytów przedowulacyjnych. Po inkubacji λ DNA/*Hind* III z ekstraktami z blastodysków stwierdzano praktycznie całkowitą degradację charakterystycznych dla tego DNA prążków. Natomiast niższą aktywność DNazy I stwierdziliśmy w oocytach prewitellogenicznych i najmłodszych witellogenicznych. Po inkubacji substratu z ekstraktami z całych oocytów w tym stadium pozostawały jeszcze widoczne charakterystyczne prążki DNA/*Hind* III, ale znacznie słabsze niż w przypadku kontroli. Można więc przypuszczać, że DNaza I gromadzi się w oocytach ptaka w trakcie ich wzrostu.

W przypadku użycia jako substratu plemników przepiórki okazało się, że ekstrakty z blastodysków oocytów przedowulacyjnych powodowały degradację DNA znajdującego się w plemnikach zarówno w warunkach optymalnych dla DNazy I, jak i DNazy II (ryc. 2). Należy zauważyć, że degradacji DNA zawartego w plemnikach przepiórki nie obserwowano w reakcjach kontrolnych, gdzie plemniki przepiórki były inkubowane bez dodatku ekstraktu.

DYSKUSJA

Wyniki naszych badań wskazują na istnienie dużej aktywności DNaz w oocytach przepiórki. Aktywność ta obejmuje zarówno DNazę I, jak i DNazę II, gdyż λ DNA/*Hind* III może być degradowane przez ekstrakty z blastodysków oocytów przedowulacyjnych w warunkach optymalnych dla DNazy I (pH obojętne, obecność jonów Mg^{2+}), jak i dla DNazy II (pH kwaśne, obecność EDTA). Odpowiedni skład mieszaniny inkubacyjnej umożliwił badanie aktywności tylko jednej z dwóch DNaz, albo DNazy I albo DNazy II, a nie dwóch jednocześnie. Porównując stopień rozkładu DNA po inkubacji z ekstraktami z oocytów z rozkładem przez różne stężenia handlowych preparatów DNazy I i DNazy II szacunkowo obliczono, że aktywność enzymatyczna DNazy II w blastodysku oocytu przedowulacyjnego prze-

piórki jest ~10 razy wyższa niż DNazy I. Obecność dużych aktywności DNazy I i II w blastodyskach przedowulacyjnych oocytów ptaka sugeruje możliwość udziału tych enzymów w degradacji DNA pochodzącego z dodatkowych plemników wnijkających do cytoplazmy jaja ptaka podczas polispermicznego zapłodnienia.

Nasuwa się pytanie, dlaczego w oocytach ptaka obecne są dwie DNazy i która z nich może być aktywna w jaju po zapłodnieniu. Prawdopodobnie aktywność tych DNaz jest regulowana poprzez pH i dostępność jonów dwuwartościowych w bezpośrednim sąsiedztwie plemników po ich wnikięciu do jaja. Brak jest danych na temat pH w komórkach wczesnych zarodków ptaków. Wiemy natomiast, że żółtko położone bezpośrednio pod blastodyskiem oocytów czy pod tarczką zarodkową ptaków ma pH kwaśne ~6 [8, 16], a białko przylegające do zewnętrznej strony wczesnych zarodków ma pH zasadowe powyżej 8 [8, 16]. Tak więc przeciwne środowiska: zasadowe – białka, a kwaśne – żółtka mogłyby, poprzez oddziaływanie na najbliższą okolicę wczesnych zarodków, umożliwić działanie odpowiednio DNazy I lub II.

Wyniki nasze wskazują, że aktywność DNazy typu I jest akumulowana w oocycie w trakcie oogenezy i jest najwyższa w blastodyskach największych oocytów witellogenicznych, gdzie może być wkrótce potrzebna do degradacji dodatkowych przedjądrzy męskich tuż po zapłodnieniu. Przeciwna sytuacja była obserwowana u ssaków, w oocytach szczura. Metodą histochemiczną Boone i Tsang [1] wykazali obecność DNazy I w młodszych oocytach pochodzących z niedojrzałych pęcherzyków jajnikowych, natomiast nigdy nie obserwowano obecności enzymu w oocytach z dojrzałych antralnych pęcherzyków jajnikowych. Obecność aktywności DNazy I w młodszych oocytach (a także w komórkach ziarnistych dojrzałych pęcherzyków jajnikowych i komórkach ciała żółtego) autorzy korelują z degradacją DNA związaną z procesami apoptozy zachodzącymi w jajniku. U ssaków w warunkach fizjologicznych do jaja podczas zapłodnienia może wnikać tylko jeden plemnik [19]. Tak więc aktywność DNaz w prawidłowych oocytach ssaków byłaby zbędna, a nawet szkodliwa. Jednakże zapłodnienie polispermiczne jaj ssaczy jest często obserwowane w warunkach doświadczalnych, np. w przypadku nadmiaru plemników przy zapłodnieniu *in vitro* lub w warunkach *in vivo*, np. przy opóźnionej, w stosunku do owulacji, inseminacji. W przeciwieństwie do ptaków, zapłodnienie polispermiczne u ssaków jest na ogół patologiczne, gdyż liczne plemniki, które wnikięły do jaja, nie są degradowane i zwykle prowadzi do nieprawidłowego rozwoju zarodkowego [3, 5, 19].

U większości zwierząt występuje zapłodnienie monospermiczne, gdyż wytworzyły one mechanizmy (tzw. blok przeciwko polispermii), które zabezpieczają komórkę jajową przed wnikięciem do niej większej niż jeden liczby plemników [7, 19]. Mechanizmy te obejmują szybki, ale przejściowy blok przeciwko polispermii związany z depolaryzacją błony plazmatycznej oocytu po wnikięciu plemnika oraz trwałe blok określany mianem reakcji korowej. Reakcja korowa polega na uwalnianiu

się na powierzchni zapłodnionego jaja enzymów zawartych w ziarnach korowych, położonych tuż pod powierzchnią oocytu. Enzymy te powodują modyfikacje osłon jajowych i/lub powierzchni oocytu, które uniemożliwiają wniknięcie dodatkowych plemników.

U ptaków brak bloku zapobiegającego wnikaniu wielu plemników do jaja [4, 11, 12, 18] mógłby być rekompensowany wysoką aktywnością DNaz, zakumulowanych w oocycie w trakcie oogenezy. Enzymy te mogą brać udział w degradacji DNA pochodzącego z dodatkowych przedjądrzy męskich w cytoplazmie jaj już po zapłodnieniu. Tak więc DNazy w blastodyskach oocytów przedowulacyjnych mogą być jednym z elementów późnego cytoplazmatycznego bloku przeciwdziałającego polispermii u ptaków. Nasze wstępne doświadczenia, w których jako substrat były używane plemniki przepiórki, wykazały, że ekstrakty z blastodysków przedowulacyjnych oocytów przepiórki w warunkach *in vitro* są zdolne do degradacji nie tylko nagiego DNA, ale również DNA zawartego w plemnikach ptaka.

Zanik we wczesnej embriogenezie sekwencji obcego DNA, wprowadzanego do blastodysku zapłodnionego jaja [13, 14] i niska wydajność uzyskiwania ptaków transgenicznych metodą mikroiniekcji plazmidowego DNA do cytoplazmy zapłodnionego jaja [9, 10] może również być skutkiem obecności DNaz w oocytach.

Nasuwa się oczywiście pytanie, dlaczego jednak nie wszystkie przedjądrza męskie, wykształcone w blastodysku jaja ptaka po zapłodnieniu, są niszczone przez DNazy, a jedno z nich nie ulega degradacji i może uczestniczyć w tworzeniu jądra zygoty. Mechanizm odpowiedzialny za to nie jest znany. Być może jest to związane z lokalizacją tego jedyne go przedjądrza męskiego w blastodysku, z gradientem aktywności DNaz, z obecnością jakichś inhibitorów DNaz, czy może ze szczególnymi cechami tego jedyne go plemnika. Problemy związane z degradacją plemników przez zawarte w oocytach ptaków DNazy i z mechanizmem wyboru jedyne go plemnika do zapłodnienia i jego ochroną przed degradacją są obecnie przedmiotem naszych badań.

LITERATURA

- [1] BOONE DL, TSANG BK. Identification and localization of deoxyribonuclease I in rat ovary. *Biol Reprod* 1977; **17**: 813–821.
- [2] GURRAYA SS. Ooplasmic components. [w] Farner DS [red.] *Ovarian Follicles in Reptiles and Birds*. Berlin: Springer-Verlag 1989: 35–62.
- [3] HAN Y-M, ABEYDEERA LR, KIM J-H, MOON H-B, CABOT RA, DAY BN, PRATHER RS. Growth retardation of inner cell mass cells in polyspermic porcine embryos produced *in vitro*. *Biol Reprod* 1999; **60**: 1110–1113.
- [4] HOWARTH B. Maturation of spermatozoa and mechanism of fertilization. [w] Cunningham FJ, Lake PE, Hewitt D [red.] *Reproductive Biology of Poultry*. Oxford: British Poultry Science Ltd 1984: 161–174.

- [5] HUNTER RHF. Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilisation to avoid polyspermy. *Mol Reprod Dev* 1996; **44**: 417–422.
- [6] IWAO Y, SAKAMOTO N, TAKAHARA K, YAMASHITA M, NAGAHAMA Y. The egg nucleus regulates the behaviour of sperm nuclei as well as cycling of MPF in physiologically polyspermic newt eggs. *Dev Biol* 1993; **160**: 15–27.
- [7] JAFFE LA, GOULD M. Polyspermy-preventing mechanisms. [w] Metz CB, Monroy A [red.] *Biology of Fertilization*. San Diego: Academic Press, 1985; **3**: 223–250.
- [8] KUWANA T, HASHIMOTO K, NAKANISHI A, YASUDA Y, TAJIMA A, NAITO M. Long-term culture of avian embryonic cells *in vitro*. *Int J Dev Biol* 1996; **40**: 1061–1064.
- [9] LOVE J, GRIBBIN C, MATHER C, SANG H. Transgenic birds by DNA microinjection. *Biotechnology* 1994; **12**: 60–63.
- [10] NAITO M, SASAKI E, OHTAKI M, SAKURAI M. Introduction of exogenous DNA into somatic and germ cells of chickens by microinjection into the germinal disc of fertilized ova. *Mol Reprod Dev* 1994; **37**: 167–171.
- [11] NAKANISHI A, UTSUMI K, IRITANI A. Early nuclear events of *in vitro* fertilization in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Mol Reprod Dev* 1990; **26**: 217–221.
- [12] PERRY MM. Nuclear events from fertilisation to the early cleavage stages in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J Anat* 1987; **150**: 99–109.
- [13] PERRY MM, MORRICE D, HETTLE S, SANG H. Expression of exogenous DNA during the early development of the chick embryo. *Roux's Arch Dev Biol* 1991; **200**: 312–319.
- [14] SANG H, PERRY MM. Episomal replication of cloned DNA injected into fertilised ovum of the hen, *Gallus domesticus*. *Mol Reprod Dev* 1989; **1**: 98–106.
- [15] STĘPIŃSKA U, OLSZAŃSKA B. The presence of deoxyribonuclease (DNase) activity in Japanese quail oocytes. *Anim Sci Pap Rep* 1997; **15**: 195–199.
- [16] STĘPIŃSKA U, OLSZAŃSKA B. Detection of DNase I and II activities in oocytes of Japanese quail. *Zygote* 2001; **9**: 1–7.
- [17] TAKESHITA H, YASUDA T, NADANO D, TENJO E, SAWAZAKI K, IIDA R, KISHI K. Detection of deoxyribonuclease I and II (DNases I and II) activities in reproductive organs of male rabbits. *Int J Biochem* 1994; **26**: 1025–1031.
- [18] WADDINGTON D, GRIBBIN C, STERLING RJ, SANG HM, PERRY MM. Chronology of events in the first cell cycle of the polyspermic egg of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Int J Dev Biol* 1998; **42**: 625–628.
- [19] YANAGIMACHI R. Mammalian fertilization. [w] Knobil E, Neil JD (red.) *The Physiology of Reproduction*, 2 wyd. New York: Raven Press 1994: 189–319.

*Adres autora: Instytut Genetyki Hodowli Zwierząt PAN,
Jastrzębiec k. Warszawy, 05-552 Wólka Kosowska*

ROLA KWAŚNYCH GLIKOZYDAZ W PROCESIE ZAPŁODNIENIA

ROLE OF ACID GLYCOSIDASES IN THE FERTILIZATION PROCESS

Maria DROBA, Bogusław DROBA

Zakład Przyrodniczych Podstaw Produkcji Rolniczej, Wydział Ekonomii,
Uniwersytet Rzeszowski

Streszczenie: Kwaśne glikozydazy (EC 3.2.1.) w jądrze ssaków występują w lizosomach komórek somatycznych i płciowych. W komórkach rozrodczych podczas spermatogenezy pojawiają się ich formy akrosomowe, a lizosomowe zostają odrzucone. Dojrzewanie plemników zachodzi w najądrzu. W procesie tym powierzchniowe glikoproteiny plemnika mogą być eliminowane, maskowane i modyfikowane przez proteiny, glikozylotransferazy oraz kwaśne glikozydazy, które są syntetyzowane i wydzielane głównie przez komórki nabłonkowe. Sugeruje się, że kwaśne glikozydazy biorą udział w wiązaniu się plemnika z glikoproteinami powierzchniowymi osłony przejrzystej jaja. W „Roli kwaśnych glikozydaz w procesie zapłodnienia” napotyka się więcej intrygujących zagadek niż wyjaśniających rozstrzygnięć. Ostatnio pojawiły się przekonujące dowody wyjaśniające jedną z nich: dlaczego kwaśne glikozydazy wykazujące optimum aktywności w kwaśnym zakresie pH występują i mogą funkcjonować w neutralnym środowisku dróg rozrodczych. Stwierdzono bowiem, że aktywność kwaśnych glikozydaz w neutralnym środowisku ujawnia się wobec ich specyficznych (naturalnych) substratów, a proces ten może dodatkowo być uwarunkowany stopniem asocjacji/dysocjacji podjednostek enzymatycznych. (*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28 supl. 18: 111–121)

Słowa kluczowe: kwaśne glikozydazy, zapłodnienie

Summary: In mammalian testes, acid glycosidases (EC 3.2.1.) are found in lysosomes of somatic and germ cells. Their acrosomal forms appear at the stage of spermatogenesis in reproductive cells, while their lysosomal forms are discarded. Maturation of spermatozoa takes place in the epididymis. In this process, surface glycoproteins of the spermatozoon can be eliminated, masked and modified by proteinases, glycosyltransferases and acid glycosidases, which are synthesized and secreted by epithelial cells. It has also been suggested that acid glycosidases are involved in binding the spermatozoon to surface glycoproteins of the zona pellucida of an ovum. More puzzling questions than conclusive evidence appear from studies on the role of acid glycosidases in the fertilization process. Recent studies have provided conclusive evidence to answer the question why acid glycosidases, although optimally active in the acid

pH range, occur and can function in the neutral pH environment of the reproductive tract. It turned out that acid glycosidases become active in the neutral environment in the presence of their specific (natural) substrates, and that this process can be additionally conditioned by the degree of association/dissociation between enzymatic subunits.

(Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18: 111–121)

Key words: acid glycosidases, fertilization

Kwaśne glikozydazy lizosomowe i akrosomowe, ze względu na ich wysoką aktywność w męskim układzie rozrodczym ssaków, były od dawna podejrzewane o pełnienie istotnej roli w procesie zapłodnienia. Pomimo wieloletnich badań w dalszym ciągu wiedza na ich temat ma istotne luki.

Jedną z poważnych przeszkód w zrozumieniu funkcji tych enzymów była aktywność kwaśnych glikozydaz w bardzo niskim pH, podczas gdy najobficiej występują one w neutralnym środowisku płynu najądrzowego odpowiedzialnego za modyfikację powierzchni plemników podczas dojrzewania. Ta sprzeczność została w ostatnich latach wyjaśniona. Uzyskano dane eksperymentalne wskazujące na to, że optimum działania kwaśnych glikozydaz może być zbliżone do neutralnego, a to wtedy kiedy enzymy działają na naturalne substraty oraz jeśli występują we właściwym stanie asocjacji/dysocjacji swoich podjednostek.

Z drugiej strony, zdawałoby się najbardziej pewny i udokumentowany udział tych enzymów w trawieniu osłonki przejrzystej jaja został zakwestionowany przez mechanistyczną koncepcję forsowania tej osłony przez plemnik oraz przez dowody eksperymentalne wskazujące na to, że „znokautowane” myszy, których plemniki pozbawiono tak kluczowych enzymów, jak: proakrozyna/akrozyna i hialuronidaza, potrafią skutecznie zapładniać oocyty.

W tej sytuacji większego znaczenia nabiera poznanie ogólnego planu budowy kwaśnych glikozydaz oraz potranslacyjnych zmian zachodzących w ich cząsteczkach; od syntezy do momentu dostarczenia ich do miejsca przeznaczenia (lizosom, akrosom, płyn najądrzowy). Istotne są zarówno modyfikacje w obrębie części białkowej cząsteczki enzymu, w których biorą udział proteinazy, jak i dotyczące części glikanowej, przebiegające z udziałem glikohydrolaz.

Kwaśne glikozydazy można rozpatrywać łącznie z glikozylotransferazami, które towarzyszą im od momentu syntezy poprzez potranslacyjną obróbkę aż po wspólną obecność w płynie najądrzowym i prawdopodobnie skoordynowane działanie.

WSTĘP

Glikohydrolazy lizosomowe i akrosomowe działające w kwaśnym zakresie pH (3,5–5,5) wykazują wysoką specyficzność substratową. Enzymy te katalizują hydrolizę końcowych reszt cukrowych glikanowych komponentów w glikoproteinach

i glikolipidach. Rozróżniają one rygorystycznie rodzaj wiązania glikozydowego, hydrolizując wyłącznie wiązania α lub β [38]. Ich nazewnictwo oparte jest na nazwie cukrowego substratu. Tak więc glukozydaza będzie hydrolizowała tylko reszty glukozowe, a mannozydaza tylko mannozyłowe. *In vivo*, enzymy te działają sekwencyjnie w taki sposób, że produkt działania jednego enzymu staje się substratem dla następnego [17].

Kwaśne glikozydazy są glikoproteinami przechodzącymi przez skomplikowany proces „dojrzwania” związany z „obróbką” komponenty zarówno białkowej, jak i oligosacharydowej. Plemniki ssaków zawierają liczne kwaśne glikozydazy o własnościach katalitycznych i immunologicznych podobnych do hydrolaz obecnych w lizosomach. Tak więc informacje dotyczące biosyntezy i transportu docelowego enzymów lizosomowych mogą być przydatne w rozszyfrowaniu biogenezy akrosomu [17].

Pojedyncza cząsteczka glikohydrolazy może posiadać wielokrotne N-glikanowe łańcuchy typu wysokomannozowego, kompleksowego (bi-, tri- i tetraantenowego) i hybrydowego. Nowosyntetyzowane enzymy są przenoszone z miejsca ich syntezy w siateczce śródplazmatycznej poprzez aparat Golgiego, gdzie uzyskują marker mannozo-6-fosforanowy (M-6-P), który pełni funkcję ligandu wiążącego się z mannozo-6-fosforanowymi receptorami (MPR) [17, 21].

Pęcherzyki transportujące zawierające kompleks receptora z ligandem oddzielają się od aparatu Golgiego dostarczając kompleks do endosomów, gdzie ulega on dysocjacji w niskim pH. Hydrolazy lizosomowe są umieszczane w lizosomach, a receptory ulegają recyklicacji do aparatu Golgiego albo do błony komórkowej.

Dwa receptory zostały zidentyfikowane: kationo-zależny (CD-MPR) oraz kationo-niezależny (CI-MPR). W komórkach somatycznych CD-MPR kieruje glikoproteiny zawierające M-6-P do lizosomów, podczas gdy CI-MPR jest wielofunkcyjny; występując wewnątrz komórki przesyła mające M-6-P glikoproteiny do lizosomów, zaś występując na powierzchni komórki pośredniczy w endocytozie tych glikoprotein. Brak dowolnego z tych receptorów w kulturach komórkowych powoduje wydzielanie nowosyntetyzowanych hydrolaz lizosomowych do środowiska [24, 25]. Mysz pozbawiona CD-MPR w sposób wzmożony wydziela enzymy lizosomowe do płynów ustrojowych, przy czym ich zawartość w tkankach pozostaje na zwykłym poziomie, z czego by wynikało, że wydzielane enzymy mogą być wychwytywane w drodze endocytozy z udziałem CI-MPR. Należy zaznaczyć, że w przypadku defektu komórki, w wyniku którego brakuje receptorów MP lub markera M-6-P, ujawniają się inne, dotychczas nie rozpoznane drogi kierowania hydrolaz do lizosomów [25].

Z ostatnio opublikowanej pracy [9] wynika, że żaden z receptorów M-6-P nie jest potrzebny do docelowego transportu β -galaktozydazy, α -mannozydazy i β -N-acetyloheksozaminidazy do akrosomu. Uzyskane dane sugerują, że albo akrosom nie wykorzystuje typowej drogi transportu docelowego do lizosomów, albo może

wykorzystywać mechanizmy typowe dla transportu docelowego białek wydzielniczych. Natomiast formowaniu się akrosomu podczas spermiogenezy towarzyszy ciągła reorganizacja. Różne białka, w tym hydrolazy zmieniają swoje usytuowanie w obrębie akrosomu, zajmując swoje pozycje strategiczne przed reakcją akrosomową [35].

Przyjmuje się, że podczas spermiogenezy zostają ukonstytuowane pewne struktury tworzące różne przedziały w obrębie akrosomu oraz zostaje wykształcone powinowactwo enzymów hydrolitycznych do tych struktur. Zgodnie z tym hydrolazy akrosomowe nie są uwalniane podczas reakcji akrosomowej równocześnie, ale w odpowiedniej kolejności. Przykładowo, β -N-acetyloglukozaminidaza z akrosomu plemników chomika jest uwalniana wcześniej niż proteinaza akrozyna/proakrozyna [6, 12, 28].

Najważniejszymi kwaśnymi glikozydazami, których obecność w akrosomie została potwierdzona metodami cytochemicznymi oraz immunocytochemicznymi, są: hialuronidaza (HIAL), α - i β -galaktozydaza (α -, β -GAL), β -glukuronidaza (β -GLUK), β -N-acetyloheksosaminidaza (β -HEX), α - i β -mannozydaza (α -, β -MAN) oraz α -L-fukozydaza (α -FUK) [6, 38].

BIOSYNTETA, OBRÓBKA ORAZ LOKALIZACJA GLIKOZYDAZ W MĘSKIM UKŁADZIE ROZRODCZYM

Kwaśne glikozydazy w jądrze występują w lizosomach komórek somatycznych (Sertoliego, Leydiga, makrofagach) oraz w lizosomach komórek rozrodczych. Synteza enzymów akrosomowych zaczyna się najwcześniej w pachytenowych spermatocytach, kiedy to akrosom nie jest jeszcze uformowany [44].

W najądrzu plemniki poddane są oddziaływaniu środowiska dróg wyprowadzających kształtowanego w wyniku sekrecyjnej i endocytarnej aktywności komórek nabłonka. Komórki nabłonkowe najądrzy syntetyzują kwaśne glikozydazy, które częściowo kierowane do lizosomów, są również intensywnie wydzielane w postaci form dojrzałych i niedojrzałych do płynu najądrzowego [30].

Glikozydazy razem z glikozylotransferazami i proteinazami modyfikują glikoko-niugaty powierzchniowe błon plemników, biorąc tym samym udział w tak zwanym dojrzewaniu najądrzowym plemników. Procesowi temu towarzyszy również adsorbcja/asocjacja cząsteczek z płynu najądrzowego na powierzchni błony plemnika oraz ujawnianie się (ekspozycja) wcześniej zamaskowanych cząsteczek na powierzchni plemnika [41].

β -D-Galaktozydaza [10, 31, 32, 40]

Przyszłe, akrosomowe formy β -GAL plemników szczura są syntetyzowane w pachytenowych spermatocytach. Są one N-glikozylowanymi białkami o masie 90

i 88 kDa, które częściowo mogą być poddane obróbce, w wyniku której powstaje N-glikozylowana forma o masie 56 kDa, odnajdywana następnie w kropli cytoplazmatycznej plemników głowy najądrza. Ta ostatnia forma β -GAL jest przekształcana w formę o masie 52 kDa, stwierdzaną w kropli cytoplazmatycznej plemników ogona najądrzy.

Natomiast forma akrosomowa o masie 90 kDa w miarę przemieszczania się plemników z głowy do ogona najądrzy, jest poddawana wewnątrz-akrosomowej obróbce do formy o masie 74 kDa, z czym związany jest znaczny wzrost aktywności tego enzymu w plemnikach.

Komórki nabłonka najądrzy wydzielają do płynu najądrzowego lizosomowe formy β -GAL zarówno niedojrzałe (o większej masie) jak i dojrzałe (o mniejszej masie). Dwie formy β -GAL z płynu najądrzowego (o masie 94 i 97 kDa) oraz forma akrosomowa z plemników wykazywały bardzo podobne parametry kinetyczne. Wykazywały one optimum aktywności w kwaśnym zakresie pH (3,5) względem powszechnie stosowanego, syntetycznego substratu (p-nitrofenylo- β -D-galaktozydu) oraz optimum aktywności w obojętnym pH (6,6) względem naturalnego substratu, którym była glikoproteina znakowana [3 H]-galaktozą. Dla najądrzowej β -GAL wykazano, że „kwaśna” aktywność jest związana z tetrameryczną formą tego enzymu (320 kDa w pH 3,5–4,3), a „neutralna” aktywność z formą zdysocjowaną występującą jako dimer/monomer (180/92 kDa w pH 6,8).

Powyższe właściwości β -GAL sugerują, że forma tetrameryczna może być zaangażowana w wewnątrz-akrosomowe dojrzewanie hydrolaz, natomiast forma zdysocjowana może brać udział w modyfikowaniu glikokoniugatów powierzchniowych plemników podczas dojrzewania w najądrzu. Podobny wzór dysocjacji/asocjacji zależnej od pH wykazuje β -GAL z jąder królika [29], a także β -GAL i β -HEX z akrosomu plemnika knura [22, 34].

β -D-Glukuronidaza

β -GLUK pojawia się już w pachytenowych spermatocytach. Jest odnajdywana w aparacie Golgiego oraz w strukturach podobnych do lizosomów. W miarę postępu spermiogenezy struktury te zanikają równolegle do rozwoju akrosomu. Komórki rozrodcze do etapu skondensowanych/wydłużonych spermatyd zawierają wyłącznie formę lizosomową β -GLUK. Forma lizosomowa miała podobne właściwości kinetyczne i immunologiczne do formy akrosomowej plemników (o masie 74 kDa) [1].

Brak różnic pomiędzy formą lizosomową a akrosomową odnotowano również w przypadku α -L-FUK [15].

β -GLUK jest syntetyzowana przez komórki nabłonka głowy i ogona najądrzy jako forma prekursorowa o masie 78 kDa, która po obróbce przechodzi w formę

dojrzałą o masie 72 kDa. Do płynu najądrzowego komórki głowy i ogona najądrzy wydzielają dojrzałą formę enzymu oraz dodatkową formę o masie 94 kDa [30].

β -N-acetyloheksosaminidaza

Lizosomowa β -HEX występuje w tkankach ssaków w postaci dwóch głównych form, jako HEX-A (heterodimer podjednostki α i β) oraz HEX-B (homodimer podjednostki β) [26].

Wyniki badań dotyczące ekspresji mRNA podjednostki α i β wykazały, że poziom mRNA podjednostki α jest wysoki w spermatocytach i spermatydach (bez towarzyszącego mu wzrostu mRNA podjednostki β). Natomiast poziom mRNA podjednostki β był najwyższy podczas wczesnego etapu rozwoju jąder szczura, kiedy w nabłonku plemnikotwórczym dominowały komórki Sertoliego, Leydiga i makrofagi. Brak ekspresji podjednostki β w izolowanych pachytenowych spermatocytach i kulistych spermatydach sugeruje, że głównym miejscem syntezy tej podjednostki w jądrach są komórki somatyczne [16].

Ponieważ akrosomy plemników prawdopodobnie zawierają β -HEX typu B, przypuszcza się, że podjednostka β może być dostarczana do komórek rozrodczych przez komórki Sertoliego. Stwierdzono bowiem, że kultury mysich komórek Sertoliego wydzielają do środowiska β -HEX, która może być kierowana w drodze endocytozy do pachytenowych spermatocytów i kulistych spermatyd. W najądrzach poziom mRNA podjednostki β był bardzo wysoki, dlatego jest również możliwe, że β -HEX typu B wydzielana przez komórki nabłonka najądrzy wiąże się z plemnikami [16].

Hialuronidaza

Antygen ZB1 o aktywności hialuronidazy pojawia się na całej powierzchni błony plazmatycznej kulistych spermatyd szczura. Na etapie wydłużania się spermatyd przemieszcza się on z rejonu główki plemnika w rejon witki. Podczas dojrzewania najądrzowego plemników ZB1 podlega obróbce proteolitycznej, w wyniku której powstaje dojrzała heterodimerska glikoproteina (o masie podjednostek 40 i 19 kDa). Ta forma przemieszcza się po powierzchni błony z rejonu witki do rejonu akrosomu podczas kapacytacji [18, 20, 35].

Białko PH-20 (o aktywności hialuronidazy) jest zakotwiczone w błonie plazmatycznej w obrębie główki plemnika świnki morskiej i wewnętrznej błonie akrosomowej poprzez glikozylo-fosfatydyloinozytol. Ekspresja tego białka ma miejsce podczas spermiogenezy i jego obecność stwierdzano w błonie akrosomowej (PH-20_{AM}) oraz na całej powierzchni plemników jądrowych (PH-20_{PM}), następnie przemieszcza się ono do tylnej części główki. Podczas dojrzewania plemników w najądrzach masa cząsteczkowa PH-20_{PM} zmniejsza się i białko to przechodzi do

wewnętrznej błony akrosomowej (PH-20_{IAM}) [14, 23]. Obydwie te cząsteczki są wielofunkcyjne, ponieważ oprócz aktywności hialuronidazowej wykazują zdolność do wiązania się z osłoną przejrzystą jaja [14].

α -D-Mannozydaza [39, 42, 43]

W błonie plazmatycznej plemników szczura znajduje się α -MAN o neutralnym optimum pH (6,2–6,5) syntetyzowana podczas spermatogenezy. W płynie najądrzowym występuje jej izoforma, która może pochodzić od formy związanej z błoną plazmatyczną.

Podczas dojrzewania najądrzowego plemników α -MAN podlega enzymatycznej obróbce powodującej jej przejście z formy nieaktywnej/mniej aktywnej (o masie 135 i 125 kDa) w formę dojrzałą/aktywną (o masie 115 kDa).

Przyjmuje się, że występująca na powierzchni plemnika α -MAN może być jednym z receptorów wiążących mannozowe oligosacharydy osłony przejrzystej jaja. Natomiast na powierzchni plemnika knura zidentyfikowano kwaśną α -MAN (o masie 230 kDa) zakotwiczoną w błonie plazmatycznej rejonu akrosomowego poprzez fosfatydyloinozitol [22]. W płynie najądrzowym knura stwierdzono dwie rozpuszczalne formy α -MAN. Jedną z nich jest forma o masie 135 kDa i optymalnej aktywności w pH 6,5 (całkowicie nieaktywna w kwaśnym pH) oznaczona jako MAN 2B2 [19]. Druga forma, złożona z podjednostek o masie 63 i 51 kDa wykazywała aktywność znacznie przewyższającą MAN 2B2 zarówno w kwaśnym, jak i neutralnym zakresie pH. W płynie najądrzowym jest ona główną formą α -MAN biorącą udział w modyfikowaniu glikoprotein powierzchniowych plemnika podczas dojrzewania.

Kwaśna, lizosomowa forma α -MAN wydzielana przez najądrza szczura wiąże się z CI-MPR, którego obecność (jak i CD-MPR) wykazano w błonie plazmatycznej plemników. Zdolność wiązania hydrolaz lizosomowych przez cząsteczki MPR może być wykorzystywana do przenoszenia tych enzymów z najądrzy do żeńskich dróg rozrodczych, których bardziej kwaśny odczyn sprzyja ich aktywności [4, 5].

α -L-Fukozydaza

α -FUK jest syntetyzowana przez pachytenowe spermatocyty i wczesne kuliste spermatydy szczura. Jest stwierdzana w akrosomach plemników najądrzowych i ejakulowanych. Ponieważ jej synteza nie wykracza poza etap kulistych spermatyd, a komórki nabłonkowe najądrzy syntetyzują i wydzielają α -FUK *in vitro*, przyjmuje się, że enzym związany z plemnikami może być pozyskiwany z płynu najądrzowego [15], podobnie jak w przypadku HEX-B.

Neutralna α -FUK z rejonu główki powierzchni błony plazmatycznej plemników szczura została wykryta w aparacie Golgiego spermatocytów i spermatyd (ale nie

w akrosomie). Specyficzna lokalizacja i wysoka aktywność w obojętnym pH wskazuje na jej możliwą rolę w wiązaniu się plemnika z osłoną przejrzystą jaja [2].

ROLA GLIKOZYDAZ W ZAPŁODNIENIU

Ejakulowane plemniki w drogach rozrodczych samicy podlegają procesowi kapacytacji, czyli biochemicznym i funkcjonalnym zmianom, które przygotowują i umożliwiają reakcję akrosomową [6, 33]. Tylko kapacytowane plemniki mające nienaruszony akrosom mogą wiązać się z osłonką przejrzystą (*zona pellucida*; ZP) jaja. Wcześniej muszą sforsować substancję międzykomórkową wzgórka jajonośnego złożoną z kwaśnych mukopolisacharydów, kwasu hialuronowego i białek [33, 38]. Proponowanymi hydrolazami biorącymi udział w tym procesie są: hialuronidaza, β -glukuronidaza, β -N-acetyloglukozaminidaza, β -galaktozydaza, a także arylosulfataza oraz być może proteiny [44].

W dalszej kolejności receptory plemnika wiążą się z ligandami glikoprotein osłonki przejrzystej. W tym wiązaniu się gamet biorą udział glikoproteiny oznaczone jako ZP3. Mysie glikoproteiny ZP3 (mZP3) wykazują obecność glikanów typu wysoko-mannozowego/hybrydowego [36]. Te N-związane glikany są prawdopodobnie rozpoznawane przez plemnikową α -mannozydazę, przez tworzenie kompleksu enzym-substrat. Z kolei na N-związanych polilaktozoaminylowych glikanach stwierdzono obecność reszt: α -galaktozylowych, α -sjalilowych, β -galaktozylowych i β -N-acetyloglukozaminylowych. Wszystkie te cukry terminalne były proponowane jako znaczniki rozpoznawane przez odpowiednie białka znajdujące się na powierzchni błony plazmatycznej plemnika [36]. Takie glikozydazy, jak: α -mannozydaza u myszy [11], β -galaktozydaza u królika [29], β -N-acetyloheksosaminidaza u człowieka [7], α -L-fukozydaza u szczura [2] oraz hialuronidaza u świnki morskiej [14], były rozważane jako receptory plemnika specyficznie rozpoznające ZP.

Wiązanie się receptorów plemnika z osłonką przejrzystą jest sygnałem do uruchomienia ciągu wydarzeń prowadzących do zainicjowania reakcji akrosomowej. Uwalniane enzymy akrosomowe trawią osłonkę przejrzystą, umożliwiając fuzję plemnika z błoną plazmatyczną oocytu. Za główny czynnik lizujący ZP jest uważana akrozyna, z którą mogą współdziałać β -N-acetyloheksosaminidaza oraz arylosulfataza A [8, 13, 27, 33].

Glikohydrolazy plemników są zaledwie jednymi z wielu cząsteczek, które mogą brać udział w procesach prowadzących do zapłodnienia [33]. Wiązanie plemnika z jajem, jak się przyjmuje, jest procesem kompleksowym, w którym uczestniczą liczne i różnorodne receptory błonowe. Natomiast pokonywanie osłony przejrzystej przez plemnik może być przede wszystkim mechaniczne (nie enzymatyczne), za czym przekonująco argumentuje Bedford [3].

Z ostatniej chwili: Ukazał się doskonały artykuł przeglądowy dotyczący powyższych zagadnień autorstwa Tulsiani i Abou-Haila [37].

LITERATURA

- [1] ABOU-HAÏLA A, FOUQUET J-P, TULSIANI DRP. Characterization and immunolocalization of β -D-glucuronidase in mouse testicular germ cells and spermatozoa. *Exp Cell Res* 1999; **247**: 48–60.
- [2] AVILÉS M, ABASCAL I, MARTÍNEZ-MENÁRGUEZ JA, CASTELLS MT, SKALABAN SR, BALLESTA J, ALHADEFF JA. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of a novel plasma membrane-associated, neutral pH optimum α -L-fucosidase from rat testis and epididymal spermatozoa. *Biochem J* 1996; **318**: 821–831.
- [3] BEDFORD JM. Mammalian fertilization misread? Sperm penetration of the eutherian zona pellucida is unlikely to be a lytic event. *Biol Reprod* 1998; **59**: 1275–1287.
- [4] BELMONTE SA, CHALLA A, GUTIERREZ LS, BERTINI F, SOSA MA. α -Mannosidase from rat epididymal fluid is a ligand for phosphomannosyl receptors on the sperm surface. *Int J Androl* 1998; **21**: 277–282.
- [5] BELMONTE SA, ROMANO PS, FORNÉS WM, SOSA MA. Changes in distribution of phosphomannosyl receptors during maturation of rat spermatozoa. *Biol Reprod* 2000; **63**: 1172–1178.
- [6] BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z, SYSA P. Ultrastruktura plemnika ssaka. [w] Łukaszuk A, Bilińska B, Kawiak J, Bielańska-Osuchowska Z. [red.] Ultrastruktura i funkcja komórki. T 7. Mechanizmy regulujące spermatogenezę. Warszawa: PWN 1998: 76–98.
- [7] BRANDELLI A, MIRANDA PV, TEZON JG. Participation of glycosylated residues in the human sperm acrosome reaction: possible role of N-acetylglucosaminidase. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1220**: 299–304.
- [8] BRANDON CI, SRIVASTAVA PN, HEUSNER GL, FAYRER-HOSKEN RA. Extraction and quantification of acrosin, β -N-acetylglucosaminidase, and arylsulfatase-A from equine ejaculated spermatozoa. *J Exp Zool* 1997; **279**: 301–308.
- [9] CHAYKO CA, ORGEBIN-CRIST M-C. Targeted disruption of the cation-dependent or cation-independent mannose 6-phosphate receptor does not decrease the content of acid glycosidases in the acrosome. *J Androl* 2000; **21**: 944–953.
- [10] CHAYKO CA, ORGEBIN-CRIST M-C, SKUDLAREK MD, TULSIANI DRP. Biosynthesis, processing, and subcellular localization of rat sperm β -D-galactosidase. *Biol Reprod* 2000; **63**: 688–696.
- [11] CORNWALL GA, TULSIANI DRP, ORGEBIN-CRIST M-C. Inhibition of the mouse sperm surface α -D-mannosidase inhibits sperm-egg binding *in vitro*. *Biol Reprod* 1991; **44**: 913–921.
- [12] DICARLANTONIO G, TALBOT P. Evidence for sequential deployment of secretory enzymes during the normal acrosome reaction of guinea pig sperm *in vitro*. *Gamete Res* 1988; **21**: 425–438.
- [13] FAROOQUI AA, SRIVASTAVA PN. Isolation of β -N-acetylhexosaminidase from rabbit semen and its role in fertilization. *Biochem J* 1980; **191**: 827–834.
- [14] GMACHL M, KREIL G. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 3569–3573.
- [15] HANCOCK LW, RAAB LS, ARONSON NN Jr. Synthesis and processing of rat sperm-associated α -L-fucosidase. *Biol Reprod* 1993; **48**: 1228–1238.
- [16] HERMO L, ADAMALI HI, MAHURAN D, GRAVEL RA, TRASLER JM. β -Hexosaminidase immunolocalization and α - and β -subunit gene expression in the rat testis and epididymis. *Mol Reprod Dev* 1997; **46**: 227–242.
- [17] HOLTZMAN E. Lysosomes. London, New York: Plenum Press 1989: 1–439.

- [18] HOU S-T, MA A, JONES R, HALL L. Molecular cloning and characterization of rat sperm surface antigen 2B1, a glycoprotein implicated in sperm-zona binding. *Mol Reprod Dev* 1996; **45**: 193–203.
- [19] JIN Y-Z, DACHEUX F, DACHEUX J-L, BANNAIS, SUGITA Y, OKAMURA N. Purification and properties of major α -D-mannosidase in the luminal fluid of porcine epididymis. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1432**: 382–392.
- [20] JONES R, SHALGI R, HOYLAND J, PHILLIPS DM. Topographical rearrangement of a plasma membrane antigen during capacitation of rat spermatozoa *in vitro*. *Dev Biol* 1990; **139**: 349–362.
- [21] KORNFELD S, MELLMAN I. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* 1989; **5**: 483–525.
- [22] KUNO M, YONEZAWA N, AMARI S, HAYASHI M, ONO Y, KISS L, SONOHARA K, NAKANOM. The presence of a glycosyl phosphatidylinositol-anchored α -mannosidase in boar sperm. *IUBMB Life* 2000; **49**: 485–489.
- [23] LIN Y, MAHAN K, LATHROP WF, MYLES DG, PRIMAKOFF P. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol* 1994; **125**: 1157–1163.
- [24] LUDWIG T, MUNIER-LEHMANN H, BAUER U, HOLLINSHEAD M, OVITT C, LOBEL P, HOFACK B. Differential sorting of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient fibroblasts. *EMBO J* 1994; **13**: 1410–1437.
- [25] LUDWIG T, OVITT C, BAUER U, HOLLINSHEAD M, REMMLER J, LOBEL P, RÜTHER U, HOFACK B. Targeted disruption of the mouse cation-dependent mannose 6-phosphate receptor results in partial missorting of multiple lysosomal enzymes. *EMBO J* 1993; **12**: 5225–5235.
- [26] MAHURAN D, NOVAK A, LOWDEN JA. The lysosomal hexosaminidase isozymes. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 1985; **12**: 229–288.
- [27] MILLER DJ, GONG X, SHUR BD. Sperm require β -N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Dev* 1993; **118**: 1279–1289.
- [28] NAGDAS SK, WINFREY VP, OLSON GE. Identification of hydrolase binding activities of acrosomal matrix of hamster spermatozoa. *Biol Reprod* 1996; **55**: 1405–1414.
- [29] NIKOLAJCZYK BS, O'RAND MG. Characterization of rabbit testis β -galactosidase and arylsulfatase A: purification and localization in spermatozoa during the acrosome reaction. *Biol Reprod* 1992; **46**: 336–378.
- [30] SKUDLAREK MD, ORGEBIN-CRIST M-C. Glycosidases in cultured rat epididymal cells: enzyme activity, synthesis and secretion. *Biol Reprod* 1986; **35**: 167–178.
- [31] SKUDLAREK MD, TULSIANI DRP, NAGDAS SK, ORGEBIN-CRIST M-C. β -D-Galactosidase of rat spermatozoa: subcellular distribution, substrate specificity, and molecular changes during epididymal maturation. *Biol Reprod* 1993; **49**: 204–213.
- [32] SKUDLAREK MD, TULSIANI DRP, ORGEBIN-CRIST M-C. Rat epididymal luminal fluid acid β -D-galactosidase optimally hydrolyses glycoprotein substrate at neutral pH. *Biochem J* 1992; **286**: 907–914.
- [33] STRZEŻEK J. Fiziologia i biochemia struktury plemnika ssaków. [w] Łukaszyk A, Bilińska B, Kawiak J, Bielańska-Osuchowska Z. [red.] Ultrastruktura i funkcja komórki. T.7. Mechanizmy regulujące spermatogenezę. Warszawa: PWN 1998: 99–126.
- [34] TAKADA M, YONEZAWA N, YOSHIZAWA M, NOGUCHI S, HATANAKA Y, NAGAI T, KIKUCHI K, AOKI H, NAKANO M. pH-Sensitive dissociation and association of β -N-acetylhexosaminidase from boar sperm acrosome. *Biol Reprod* 1994; **50**: 860–868.
- [35] TOSHIMORI K. Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell Tissue Res* 1998; **293**: 177–187.
- [36] TULSIANI DRP. Structural analysis of the asparagine-linked glycan units of the ZP2 and ZP3 glycoproteins from mouse zona pellucida. *Arch Biochem Biophys* 2000; **382**: 275–283.

- [37] TULSIANI DRP, ABOU-HAÏLA A. Mammalian sperm molecules that are potentially important in interaction with female genital tract and egg vestments. *Zygote* 2001; **9**: 51–69.
- [38] TULSIANI DRP, ABOU-HAÏLA A, LOESER CR, PEREIRA BMJ. The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res* 1998; **240**: 151–164.
- [39] TULSIANI DRP, NAGDAS SK, SKUDLAREK MD, ORGEBIN-CRIST M-C. Rat sperm plasma membrane mannosidase: localization and evidence for proteolytic processing during epididymal maturation. *Dev Biol* 1995; **167**: 584–595.
- [40] TULSIANI DRP, SKUDLAREK MD, ARAKI Y, ORGEBIN-CRIST M-C. Purification and characterization of two forms of β -D-galactosidase from rat epididymal luminal fluid: evidence for their role in the modification of sperm plasma membrane glycoprotein(s). *Biochem J* 1995; **305**: 41–50.
- [41] TULSIANI DRP, SKUDLAREK MD, HOLLAND MK, ORGEBIN-CRIST M-C. Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biol Reprod* 1993; **48**: 417–428.
- [42] TULSIANI DRP, SKUDLAREK MD, NAGDAS SK, ORGEBIN-CRIST M-C. Purification and characterization of rat epididymal-fluid α -D-mannosidase: similarities to sperm plasma-membrane α -D-mannosidase. *Biochem J* 1993; **290**: 427–436.
- [43] TULSIANI DRP, SKUDLAREK MD, ORGEBIN-CRIST M-C. Novel α -D-mannosidase of rat sperm plasma membranes: characterization and potential role in sperm-egg interactions. *J Cell Biol* 1989; **109**: 1257–1267.
- [44] YANAGIMACHI R. Mammalian fertilization. [w] Knobil E, Neill JD [red.] *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press 1994: 189–317.

Adres autorów: 35-601 Rzeszów, ul. M. Œwiklińskiej 2,
e-mail: mdroba@ar.rzeszów.pl

ANALIZA EKSPRESJI GENU HORMONU WZROSTU W ZARODKACH BYDŁĘCYCH

ANALYSIS OF THE GROWTH HORMONE GENE EXPRESSION IN BOVINE EMBRYOS

Dorota LECHNIAK, Zofia MADEJA

Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego,
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, Poznań

Streszczenie: Wczesny rozwój zarodkowy jest kontrolowany zarówno przez genom matczyzny, jak i zarodkowy. Dojrzewanie oocytu, jego zapłodnienie oraz pierwsze podziały bruzdkowania charakteryzuje brak efektywnej transkrypcji, stąd procesy te są całkowicie kontrolowane przez czynniki pochodzenia matczynego. Trwałość matczynych transkryptów zależy od długości odcinka poli(A), który może podlegać wydłużaniu lub skracaniu. Uruchomienie genomu zarodka jest gatunkowo specyficzne i zachodzi po kilku podziałach bruzdkowania. Łączy się ono ze stopniowym zanikiem matczynego mRNA. Wykazano znaczne różnice pomiędzy profilem ekspresji genów w zarodkach wyprodukowanych *in vivo* oraz *in vitro*, co wiąże się z niedoskonałością warunków hodowli *in vitro*. Hormon wzrostu (*growth hormone*; GH), produkowany w przednim płacie przysadki mózgowej, stymuluje wzrost organizmu po urodzeniu. Funkcje GH w regulacji rozwoju zarodków ssaków nadal pozostają kontrowersyjne. Do tej pory wykazano, że gen GH podlega ekspresji w przedimplantacyjnych zarodkach myszy, szczura i bydła oraz oocytach bydłecych. Ponadto mRNA dla receptora GH zlokalizowano w jajniku, macicy i łożysku bydła oraz zarodkach bydła i myszy. Wykazano również obecność w zarodkach transkryptów (mRNA) dla czynników wzrostowych, np. IGF-I, IGF-II. Znany jest pozytywny wpływ egzogenego GH na potencjał rozwojowy oocytów bydła i myszy w warunkach *in vitro*. Przsadkowy czynnik transkrypcyjny (PIT-1) jest głównym czynnikiem regulującym proces transkrypcji genu GH. Najnowsze doniesienia wskazują na obecność transkryptu tego genu w oocytach, zygotach i zarodkach bydłecych do stadium 8bl. Wyniki te mogą dowodzić, że GH wykazuje działanie para- i autokrynowe również na tym etapie rozwoju osobniczego.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28 supl. 18: 123–135)

Słowa kluczowe: zarodek, GH, PIT-1, aktywacja genomu, regulacja ekspresji genów

Summary: Early embryonic development is controlled by both maternal and embryonic factors. Oocyte maturation, fertilisation and subsequent development are characterised by the lack of an effective transcription thus these processes are fully controlled by factors of maternal origin. The stability of

maternally derived transcripts depends on the length of the poly (A) tail that may be elongated or shortened. The embryonic genome activation is a species dependent phenomenon, it takes place after few blastomere divisions and is accompanied by gradual decrease of maternal RNA content. Several studies showed significant differences in gene expression profiles between *in vivo* and *in vitro* produced embryos. Growth hormone produced in the pituitary gland is known to stimulate postnatal growth. Its functions in reproduction and embryonic development are still not clear. It was shown that the GH gene is expressed in bovine oocytes and preimplantation bovine, murine and rat embryos. GH receptor mRNA was localised in cattle ovary, uterus and placenta as well as in bovine and murine embryos. Transcripts for several growth factors (eg. IGF-I, IGF-II) were also detected in embryos. A positive effect of the exogenous GH on bovine and murine oocytes matured *in vitro* was also shown. The expression of the GH is mainly regulated by the pituitary transcription factor PIT-1. The last findings demonstrated the presence of PIT-1 mRNA in bovine oocytes, zygotes and embryos up to the 8 cell stage. These results may suggest that growth hormone may act in a paracrine or autocrine way in early embryonic development.

(*Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18: 123–135*)

Key words: embryo, GH, PIT-1, genome activation, gene expression regulation

WSTĘP

W ostatnich 10 latach notowany jest intensywny rozwój badań z zakresu ekspresji genów w oocytach i zarodkach ssaków. Z jednej strony wpływa na to duże zainteresowanie produkcją zarodków w warunkach *in vitro* oraz oceną ich prawidłowości, z drugiej zaś strony szybki rozwój nowoczesnych metod molekularnych umożliwiających prowadzenie tych badań oraz zwiększających ich wiarygodność (RT-PCR). Hormon wzrostu (GH) oraz jego potencjalne funkcje w rozrodzie zwierząt i embriogenezie od kilku lat są przedmiotem zainteresowania wielu zespołów badawczych na świecie. Przez wiele lat uważano bowiem, że rozród ssaków pozostaje poza wpływem przysadkowego GH.

W niniejszym opracowaniu omówiono podstawowe zagadnienia związane z ekspresją genów w oocytach i zarodkach ssaków, podsumowano wyniki dotychczasowych badań dotyczących transkrypcji genu GH, jego receptora oraz genu PIT-1 w oocytach i zarodkach, a także hipotetyczne mechanizmy działania GH w tym okresie rozwoju osobniczego.

GROMADZENIE mRNA POCHODZENIA MATCZYNEGO W OOCYDZIE PODCZAS PROCESU OOGENEZY

Wczesny rozwój embrionalny jest kontrolowany zarówno przez genom matczyzny, jak i zarodkowy. Dojrzewanie oocyty, jego zapłodnienie oraz pierwsze podziały bruzdkowania charakteryzuje brak efektywnej transkrypcji, stąd procesy te są całkowicie kontrolowane przez czynniki pochodzenia matczynego. Podczas fazy wzrostu, w oocytach znajdujących się w stadium diktiotenu (stadium pęcherzyka zarodkowego, ang. *germinal vesicle* – GV) gromadzone są transkrypty (mRNA)

oraz białka. Są to m.in. substancje odżywcze, białka strukturalne (aktyna, tubulina, miozyna), białka niezbędne do replikacji DNA (histony, polimeraza DNA) oraz białka regulujące cykl komórkowy (cyklina A i B). Są one aktywowane podczas dojrzewania i zapłodnienia i podlegają translacji podczas pierwszych podziałów komórkowych zarodka. Wraz z postępującym procesem bruzdkowania poziom wielu mRNA oraz białek pochodzenia matczynego gwałtownie spada [13].

Wyniki badań na myszach oraz żabie szponiastej *Xenopus laevis* wykazały obecność dwóch kategorii mRNA:

1) mRNA mające krótką sekwencję poli (A), które występują w formie nieaktywnej (zamaskowanej, ang. *non-translatable*) w niedojrzałych oocytach (GV), ulegają poliadenylacji (proces dołączania grup adenylowych) podczas dojrzewania i wtedy podlegają translacji;

2) mRNA charakteryzujące się długim odcinkiem poli (A) podlegają translacji wyłącznie w niedojrzałych oocytach [5].

Analiza aktywności transkrypcyjnej w oocytach była wykazała 2-krotnie wyższą syntezę RNA w oocytach w stadium pęcherzyka zarodkowego (GV) niż w stadium metafazy drugiej (MII) [28].

TRWAŁOŚĆ MATCZYNEGO mRNA

Dynamika zmian matczynego mRNA w oocytach oraz związanych z nim białek kontrolujących została najlepiej poznana u żaby szponiastej *Xenopus laevis*. Informacja genetyczna zgromadzona w oocycie w formie nieaktywnej transkrypcyjnie może podlegać aktywacji poprzez poliadenylację. Metabolizm sekwencji poli (A) u tego gatunku znajduje się pod kontrolą odcinka zlokalizowanego w regionie 3' mRNA, który jest bogaty w zasady U. Odcinek ten nosi nazwę cytoplazmatycznego elementu poliadenylującego CPE (ang. *cytoplasmic polyadenylation element*). Informacyjny RNA, który nie ma odcinka CPE, podlegają deadenylacji (proces usuwania grup adenylowych) i degradacji podczas dojrzewania oocytu. Mechanizm aktywacji lub dezaktywacji procesu translacji poszczególnych mRNA jest złożony, tym bardziej że każdy rodzaj mRNA jest wyposażony w podobną sekwencję CPE [13].

Podobny mechanizm został opisany u myszy, gdzie omawiana sekwencja nosi nazwę elementu kontrolującego adenylację ACE (*adenylation control element*) [44]. Funkcja czynników CPE może ulegać zmianie podczas oogenezy; w okresie wzrostu oocytu mogą one służyć do skracania sekwencji poli (A) oraz dezaktywacji translacji stabilnych mRNA, natomiast podczas dojrzewania oocytu mogą być wykorzystywane do ponownej adenylacji (ang. *readenylation*) i aktywacji transkrypcji [34]. Długość sekwencji poli (A) wiąże się z trwałością i stabilnością mRNA. Ma to szczególne znaczenie w długotrwałym przechowywaniu transkryptów w oocycie. Dlatego kontrola procesu poliadenylacji mRNA gra podstawową rolę w regulacji ekspresji genów.

Brevini-Gandolfi i wsp. [5] wykazali, że w odniesieniu do większości transkryptów, odcinek poli (A) skraca się podczas dojrzewania oocytu. Ponadto, w oocytach o wysokim potencjale rozwojowym sekwencja ta była dłuższa niż w oocytach o niskim potencjale. Niniejszy model nie dotyczył dwóch genów: beta aktyny oraz dehydrogenazy fosfatazy pirogronianowej (PDP), w przypadku których długość odcinka poli (A) nie ulegała zmianie. Podobnie De Sousa i wsp. [8] scharakteryzowali zestaw 11 transkryptów typowych dla oocytów o wysokim potencjale rozwojowym.

Coraz więcej uwagi poświęca się szczegółowej analizie metabolizmu poszczególnych mRNA podczas wzrostu oocytów, ich dojrzewania i zapłodnienia u różnych gatunków zwierząt. Okazuje się, że losy każdego mRNA są unikalne. Wykazano, że w mysich oocytach, które zakończyły wzrost, transkrypt dla aktyny miał długi ogon poli (A) i podlegał intensywnej translacji, aby następnie ulec w dużej mierze deadenylacji podczas dojrzewania. Całkowity zanik mRNA dla tego genu stwierdzono w stadium 2 blastomerów. Wykazano także, że proces skracania sekwencji poli (A) jest stopniowy. Natomiast transkrypt dla enzymu HPRT (transferaza fosforybozylohipoksantynowa) nie podlegał translacji w niedojrzałych oocytach, po czym dochodziło do wydłużania sekwencji poli (A), intensywnej translacji podczas dojrzewania i zaniku w późnym stadium 2bl [33]. W powyższych badaniach sugeruje się, że długość ogona poli (A) jest bardziej skorelowana z aktywnością translacyjną mRNA niż jego stabilnością. Wydłużanie się tej sekwencji zwykle poprzedza wzrost translacji, podczas gdy jej skracanie oznacza zmniejszenie tempa translacji [33]. Niektóre mRNA obecne w oocytach, mimo braku ogona poli (A) mogą przetrwać w stanie niezmienionym i podlegać translacji w późniejszych stadiach. Deadenylacja transkryptów bez ich degradacji stanowi jeden z mechanizmów zachowywania informacji w oocytach w celu późniejszego ich wykorzystania. Natomiast w zarodkach, matczyne transkrypty pozbawione sekwencji poli (A) mogą być stosunkowo szybko degradowane [10]. W oocytach mysich i *Xenopus* podczas dojrzewania, około 50% matczynego mRNA podlega deadenylacji. Nie wyklucza się jednak ponownej adenylacji niektórych mRNA (np. aktyny) i ich translacji przed uruchomieniem genomu zarodka [za 33].

Temeles i wsp. [40] analizowali profil ekspresji wybranych genów w oocytach i przedimplantacyjnych zarodkach myszy. Efektem badań była identyfikacja trzech różnych profili ekspresji:

- 1) stopniowy spadek podczas dojrzewania i pierwszego podziału komórkowego, a następnie wzrost w stadium 8 bl lub blastocysty;
- 2) wysoki poziom ekspresji podczas dojrzewania i w stadium zygoty, nagły spadek między stadium 1 i 2 bl oraz wzrost w stadium 8 blastomerów lub blastocysty;
- 3) zanik ekspresji podczas dojrzewania, chwilowy wzrost w stadium zygoty z nieznacznym wzrostem w stadium 8 bl lub blastocysty.

Typ 1 i 2 odzwierciedlają proces degradacji matczynego mRNA w stadium 2 bl i jego zastępowania przez transkrypty pochodzenia zarodkowego. Ponadto

wysoki poziom ekspresji podczas dojrzewania (profil 2) może być spowodowany odzyskiwaniem (ang. *recruitment*) w drodze poliadenylacji matczynej informacji wykorzystywanej następnie w procesie translacji. Natomiast profil trzeci charakteryzuje geny zarodka, które podlegają ekspresji już w stadium zygoty, co potwierdza hipotezę dotyczącą aktywności transkrypcyjnej zygot tego gatunku [1]. Analiza profilu ekspresji genu Pit-1 w oocytach i zarodkach bydłych wykazała istnienie kolejnego profilu. Transkrypt dla tego genu został zidentyfikowany w niedojrzałych i dojrzałych oocytach oraz w zygotach i zarodkach do stadium 8 blastomerów. Ekspresji nie stwierdzono w stadiach od 8–16 blastomerów do wyklutej blastocysty [Lechniak i wsp. niepublikowane].

URUCHOMIENIE GENOMU ZARODKOWEGO

Moment uruchomienia własnego genomu zarodkowego zwykle ma miejsce po kilku pierwszych podziałach bruzdkowania i jest uzależniony od gatunku zwierząt. Ponadto zbiega się on w czasie z obserwowanym od wielu lat tzw. blokiem rozwojowym w warunkach *in vitro*, który u bydła i owiec występuje w stadium 8–16 komórek. Żaden z zarodków inkubowanych w pożywce zawierającej α -amanitynę (inhibitor polimerazy II RNA) nie rozwinął się powyżej 8 blastomerów, podczas gdy w grupie kontrolnej stadium 8–16 bl osiągnęto więcej niż 50% zarodków [7]. U myszy do aktywacji genomu dochodzi w stadium jednokomórkowym [1], u bydła – 4–8 blastomerów [3], u owcy – 8 blastomerów [7], u królika – 8 blastomerów [27], u świni – 4 blastomerów [22], a 4 blastomerów u człowieka [4].

Dokładna analiza tego procesu u bydła wykazała, że zarodki wykazują dużą aktywność transkrypcyjną już w stadium 2 blastomerów [28, 29, 45]. Transkrypcję wykryto w 70% zarodków 2-blastomerowych oraz 83% 4-blastomerowych [45]. Ponadto transkrypt dla genu białka szoku termicznego HSP70 pochodzenia zarodkowego także stwierdzono w stadium 4 blastomerów u bydła [9]. Memili i wsp. [28] wskazują na istnienie dwóch wyraźnych etapów we wczesnym rozwoju zarodkowym tego gatunku:

- 1) zapoczątkowanie procesu transkrypcji niezależnej od α -amanityny w stadium 2–4 blastomerów; w tych stadiach dochodzi do ekspresji genów kodujących tRNA i rRNA kontrolowanej przez polimerazę I i III RNA;
- 2) znaczny wzrost aktywności transkrypcyjnej w stadium 8–16 blastomerów określany jako przejście z kontroli matczynej na zarodkową MET (ang. *maternal-embryonic transition*), które jest hamowane przez α -amanitynę i ma zdecydowany wpływ na dalsze losy zarodka.

Zjawisku MET towarzyszy degradacja RNA pochodzenia matczynego i wzrost poziomu mRNA powstałego w wyniku transkrypcji DNA zarodka. Tempo degradacji matczynego RNA zależy od jego rodzaju, a także gatunku zwierząt. U myszy proces ten rozpoczyna się już podczas dojrzewania oocytu. Między zapłodnieniem a stadium

2-komórkowym 70% matczynej mRNA ulega rozpadowi, a poziom syntezy zarodkowego mRNA wzrasta 4-krotnie [za 39]. Proces rozpadu matczynej mRNA jest kontynuowany aż do stadium blastocysty. U bydła stopniowa degradacja matczynej mRNA również zachodzi aż do stadium 8 blastomerów, gdy notuje się znaczny wzrost aktywności transkrypcyjnej oraz syntezy białka [11]. Natomiast u owiec zaobserwowano gwałtowny rozpad matczynej mRNA w stadium 4–8 komórek, po czym dochodzi do gromadzenia informacji pochodzenia zarodkowego [7]. W przeciwieństwie do omówionych dotychczas gatunków zwierząt, w zarodkach królika nie stwierdzono *in vitro* zarówno widocznych zmian w syntezie RNA i białek, jak i bloku rozwojowego. Zaobserwowano natomiast wahania w syntezie białek w okresie od zapłodnienia do powstania blastocysty [43]. Dla tego gatunku sugeruje się stopniowy proces przechodzenia z kontroli matczynej na zarodkową w okresie przedimplantacyjnym.

Doświadczenia Barnes i wsp. [3] przeprowadzone na wczesnych zarodkach bydłęcych wykazały, że zarodki inkubowane w obecności α -amanityny szybciej osiągały stadium 8 blastomerów niż grupa kontrolna. Zjawisko to tłumaczy się stopniowym wydłużaniem cykli komórkowych w zarodkach hodowanych *in vitro*, a także zbyt wczesnym uruchomieniem genomu zarodkowego, co może być efektem niewłaściwych warunków hodowli. Wczesna ekspresja *in vitro* zarodkowego genomu wywiera negatywny wpływ na przeżywalność zarodków, które jak wiadomo charakteryzują się niższą jakością i potencjałem rozwojowym w porównaniu z zarodkami wyprodukowanymi *in vivo*.

WYKORZYSTANIE POLIMORFIZMU RFLP GENU GH W ANALIZIE ZAPOCZĄTKOWANIA PROCESU JEGO TRANSKRYPCJI

Mutacja punktowa, opisana w V eksonie bydłęcego genu GH przez Seavey i wsp. [37], określana mianem polimorfizmu typu leucyna/walina (Leu127Val), jest często przedmiotem analizy w badaniach genetycznych. Głównym obiektem zainteresowań jest potencjalny związek form genotypowych z wybranymi cechami produkcyjnymi (produkcja mleka, przyrosty masy ciała). W populacji bydła określono 2 allele: L (leucyna) i V (walina), przy czym forma L występuje głównie wśród bydła mlecznego, podczas gdy allele V – u bydła mięsnego [26]. Ze względu na zlokalizowanie mutacji w eksonie tego genu, istnieje możliwość wykrywania opisanych form polimorficznych zarówno na poziomie DNA, jak i mRNA, co jednocześnie umożliwia kontrolowanie pochodzenia transkryptów identyfikowanych w zarodkach. Jeżeli zarodek powstanie z oocyta pozyskanego od dawczyni o genotypie LL i plemnika wytworzonego przez buhaja o genotypie VV, to transkrypt własny zarodka o genotypie LV będzie występować w 2 wariantach – L i V.

Informacyjny RNA pochodzenia matczynego (wariant L) będzie występował do chwili uruchomienia genomu zarodka i pojawienia się nowego transkryptu będącego również produktem genu ojcowskiego V. Ze względu na większą frekwencję genotypu LL wśród krów ras mlecznych, które stanowią większość bydła ubijanego w rzeźniach, w niniejszych doświadczeniach założono, że oocyty będą pozyskiwane z jajników krów LL, a następnie inseminowane plemnikami buhaja o genotypie VV. Dodatkowym elementem utrudniającym wykonanie powyższego eksperymentu jest konieczność genotypowania dawczyń na podstawie komórek granulozy pozyskanych wraz z oocytami z ich jajników, a następnie wykorzystania tej informacji przy wyborze materiału do izolacji RNA oraz RT-PCR. Wstępne wyniki badań z wykorzystaniem powyższego układu dowodzą, że do stadium 8 blastomerów w zarodkach bydłęcych obecny jest wyłącznie transkrypt matczyny (L), a początek transkrypcji genu hormonu wzrostu zbiega się w czasie z ogólnym uruchomieniem genomu zarodkowego u bydła, który ma miejsce w stadium 8–16 blastomerów [Lechniak i wsp. niepublikowane].

CHARAKTERYSTYKA EKSPRESJI GENÓW W ZARODKACH WYPRODUKOWANYCH *IN VIVO* ORAZ *IN VITRO*

Pomimo ciągłego doskonalenia warunków produkcji zarodków bydłęcych *in vitro*, ich jakość nadal odbiega od zarodków wyprodukowanych *in vivo*. Obserwowane różnice dotyczą głównie cech morfologicznych (kolor, gęstość i ultrastruktura cytoplazmy), liczby i wielkości blastomerów, tempa rozwoju, wrażliwości na wahania temperatury, przydatności do mrożenia, a także skuteczności zacieleń po przeniesieniu zarodków [14]. Również badania z zakresu ekspresji genów potwierdziły wcześniejsze obserwacje i dodatkowo wykazały odmienny profil ekspresji wybranych genów w tych dwóch grupach zarodków. Niemann i wsp. [30] przeprowadzili porównawczą analizę wyników dotychczasowych badań nad ekspresją genów w zarodkach bydłęcych wyprodukowanych *in vivo* lub *in vitro*. Szacuje się, że do prawidłowego rozwoju przedimplantacyjnego zarodka, a później płodu, niezbędna jest ekspresja około 10 000 genów. Dotychczas scharakteryzowano przy pomocy techniki RT-PCR około 250 różnych genów w rozwoju zarodkowym myszy oraz 60–70 genów u bydła. Analiza porównawcza wykazała obecność genów, które podlegają ekspresji tylko w zarodkach pozyskanych *in vivo* (np. koneksyna 43 odpowiedzialna za proces kompaktacji) lub tylko *in vitro* (np. czynnik wzrostu LIF; ang. *leukemia inhibitory factor*). Poziom ekspresji genu białka szoku termicznego (HSP 70.1) wykazywał tendencję wzrostową *in vitro*, podczas gdy transkrypt dla genu transportera glukozy (Glut-1) występował w mniejszym stężeniu niż w zarodkach wyprodukowanych *in vivo*. Poza tym profil ekspresji okazał się zależny

od składu pożywki. Większość zarodków inkubowanych w obecności surowicy wykazywała wyższy poziom transkryptów w porównaniu z zarodkami hodowanymi bez surowicy. Sugeruje się także, że zmieniony profil i poziom ekspresji może mieć związek ze zjawiskiem syndromu dużego potomstwa (ang. *large offspring syndrom* – LOS) obserwowanego u około 30% cieląt urodzonych w następstwie przeniesienia zarodków wyprodukowanych *in vitro* [49]. Analiza profilu ekspresji genów w zarodkach uważana jest obecnie za podstawowy element oceny ich prawidłowości, a także jest pomocna w optymalizacji warunków prowadzenia hodowli *in vitro* [30].

Dużą różnorodność pod względem profilu ekspresji 4 wybranych genów regulujących metabolizm glukozy w zarodkach bydłowych wykazały badania Lequarre i wsp. [25]. Efektem analizy indywidualnych zarodków było wydzielenie 3 grup jakościowych:

- 1) zarodki pozytywne, w których stwierdzono transkrypty dla wszystkich analizowanych genów;
- 2) zarodki heterogeniczne wykazujące obecność mRNA tylko dla niektórych genów oraz
- 3) zarodki negatywne, w których nie stwierdzono żadnego transkryptu.

Dodatkowo wykazano, że udział zarodków z grupy 2 i 3 był wyższy w populacji zarodków opóźnionych w rozwoju. Stwierdzono istotny wzrost liczby zarodków pozytywnych w stadium powyżej 16 blastomerów, co może sugerować, że poziom mRNA jest skorelowany z ich potencjałem rozwojowym.

OBECNY STAN BADAŃ NAD EKSPRESJĄ GENÓW GH ORAZ PIT-I W OOCYTACH I ZARODKACH SSAKÓW

Dotychczasowe badania wykazały obecność transkryptu dla genu GH w zarodkach myszy w stadium moruli i blastocysty [32] oraz wszystkich stadiach przedimplantacyjnych zarodków bydłowych [23] i szczurzych [12]. Izadyar i wsp. [17] badając *in vitro* wpływ GH na proces dojrzewania oocytów bydła wykazali, że egzogeny GH polepsza dojrzewanie ooplazmy oraz przyspiesza dojrzewanie jądra komórkowego. Oocyty w stadium metafazy II (MII) dojrzewające w pożywce wzbogaconej GH charakteryzują się wyższym odsetkiem zapłodnień niż te dojrzewające bez dodatku GH. Obecność hormonu wzrostu w pożywce do hodowli *in vitro* o 13% zwiększyło odsetek wykluwających się blastocyst [18].

Analiza ekspresji genu receptora hormonu wzrostu GHR (*growth hormone receptor*) wykazała obecność transkryptu zarówno w drogach rodnych, tkankach płodowych, jak i w zarodkach ssaków. Informacyjny RNA (mRNA) dla GHR zidentyfikowano u ciężarnych krów w macicy i w łożysku [20] oraz w oocytach bydłowych [18]. GHR został wykryty na powierzchni wczesnych zarodków mysich

począwszy od stadium zygoty [31, 32, 41], a także we wszystkich stadiach rozwoju zarodkowego bydła [18, 21]. Ponadto, bydłecze kompleksy oocyt-kumulus pozyskiwane z małych i średnich pęcherzyków jajnikowych wykazują ekspresję genu GHR oraz pozytywnie reagują na egzogeny GH podawany podczas dojrzewania *in vitro*. Stwierdzono także obecność GHR na powierzchni pre-antralnych pęcherzyków szczura oraz dodatni wpływ GH na ich rozwój i morfologię w warunkach *in vitro* [52].

Czynnikiem transkrypcyjnym dla genu GH jest przysadkowy czynnik PIT-1 kodowany przez gen należący do dużej rodziny genów regulatorowych (POU) [42, 50]. Geny należące do tej rodziny mają fragment kodujący powstawanie domeny POU (rejonu wiązania DNA) [38]. Produkt białkowy genu PIT-1 jest niezbędny do ekspresji genu GH. Wykazano dużą konserwatywność sekwencji genu PIT-1. Sekwencja cDNA świńskiego genu PIT-1 jest w 95% identyczna z sekwencją genu PIT-1 szczura [za 42]. Transkrypt oraz białko specyficzne dla PIT-1 zidentyfikowano w łożysku człowieka i szczura [2, 24], w komórkach limfoidalnych [6] oraz w tkankach płodów bydłeczych (Lechniak i wsp., niepublikowane). Lee i wsp. [24] wykazali również, że czynnik PIT-1 może łączyć się z i aktywować łożyskowy wariant genu GH. U karłowatych gryzoni i ludzi wykryto mutacje w genie PIT-1 prowadzące do niedoboru różnych hormonów [50]. Najnowsze wyniki badań nad ekspresją genu PIT-1 w wyprodukowanych *in vitro* przedimplantacyjnych zarodkach bydłeczych wykazały obecność transkryptu dla tego genu w niedojrzałych i dojrzałych oocytach oraz zarodkach w stadium od 2 do 8 blastomerów [Lechniak i wsp. niepublikowane]. Informacyjnego RNA transkrybowanego na genie PIT-1 nie zidentyfikowano w zarodkach do dnia 9 po inseminacji, co może sugerować, że funkcje GH w omawianym okresie rozwoju zarodka u bydła są niezależne od zarodkowego genu PIT-1. Potwierdza to hipotezę Harvey i wsp. [15] sugerującą, że ekspresja GH w tkankach poza przysadką mózgową jest niezależna od PIT-1.

Głównym mediatorem aktywności GH jest insulinopodobny czynnik-I (IGF-I). Czynniki insulinopodobne (IGF-I i IGF-II) i insulina są grupą strukturalnie zbliżonych polipeptydów, które regulują wzrost wielu typów komórek u ssaków. IGF-I stymuluje w blastocystie wiele procesów, takich jak: przyspieszenie proliferacji komórek, formowanie blastocysty, synteza białek oraz transport glukozy. IGF-II prawdopodobnie wpływa na tempo wzrostu płodów [za 19]. Wykazano obecność mRNA dla genu kodującego receptor IGF-I i IGF-II w przedimplantacyjnych zarodkach szczura [51] oraz 8-blastomerowych zarodkach mysich [36]. Transkrypty dla genów IGF-I i IGF-II oraz ich receptorów zostały zidentyfikowane *in vitro* we wszystkich stadiach rozwoju przedimplantacyjnych zarodków bydłeczych [46; 47, 48], jak też dla IGF-II w zarodkach i jajowodach szczura [51]. Ponieważ pełna aktywacja genomu zarodka zachodzi u myszy w stadium dwóch, a u bydła w stadium ośmiu blastomerów, przypuszcza się, że transkrypty dla tych genów w zarodkach bydłeczych są po-

chodzenia matczynego i zarodkowego, a w mysich wyłącznie pochodzenia embrionalnego.

HIPOTETYCZNE MECHANIZMY ODDZIAŁYWANIA GH NA OOCYTY I ZARODKI

Hormon wzrostu jest podstawowym czynnikiem regulującym wzrost organizmu po urodzeniu. Jego funkcje w procesach rozrodczych ssaków, a także w rozwoju embrionalnym pozostają niewyjaśnione. Sugeruje się, że GH może być zaliczany zarówno do klasycznych hormonów białkowych rozprowadzanych przez krew do komórek organizmu, ale także może być produkowany lokalnie przez tkanki docelowe (np. w jajniku) i działać podobnie do czynników wzrostowych (ang. *growth factors*). Czynniki wzrostu oddziałują na komórki przez receptory błonowe. Polipeptyd produkowany przez daną komórkę może działać na jej własne receptory (działanie autokrynowe) albo na receptory innej komórki (działanie parakrynowe). Poza tym czynniki wzrostu charakteryzują się wzajemnymi interakcjami, stymulacją syntezy i mogą być produkowane przez różne typy komórek [35].

GH działa na komórki przez wiązanie się z własnym receptorem błonowym. Transkrypty dla genów GH oraz jego receptora (GHR) zostały zlokalizowane w drogach rodnych samicy, w jajniku, komórkach granulocyty, oocytach i zarodkach bydłecych. Należy tu zaznaczyć, że stwierdzenie obecności mRNA dla danego genu nie jest jednoznaczne z występowaniem biologicznie aktywnego białka. Kolle i wsp. [21] stwierdzili obecność transkryptu dla GHR już w 8-dniowych blastocystach bydłecych, podczas gdy białko pojawiło się dopiero 13 dnia po zapłodnieniu. Podobnie mRNA dla GHR wykryto we wszystkich stadiach przedimplantacyjnych zarodków myszy, a funkcjonalne receptory dopiero w blastocystach 4 dni po zapłodnieniu [32]. Opisany układ może wskazywać na aktywność biologiczną GH w procesach rozrodczych oraz rozwoju zarodka.

Jak dotąd nie wiadomo, czy GH działa bezpośrednio na zarodek, czy poprzez stymulację syntezy IGF-I. Badania wykazały szerokie spektrum działania IGF-I w rozwoju zarodka, takie jak: stymulacja podziałów komórkowych, syntezy białek, tworzenia się blastocysty, transportu glukozy itp. [za 32]. Bezpośrednie działanie GH nie jest jednak wykluczone, wykazano bowiem pozytywny wpływ dodatku egzogenego GH na proces dojrzewania oocytów oraz rozwoju zarodków bydłecych *in vitro* [17]. Sugeruje się, że działanie GH w przedimplantacyjnym okresie rozwoju zarodka stanowi kompleksowy i dynamiczny system, w którym uczestniczy GH produkowany zarówno w przysadce mózgowej, jak i w drogach rodnych samicy oraz w zarodku. Hull i Harvey [16] sugerują, że GH produkowany lokalnie w gonadach i drogach rodnych pełni funkcje wspomagające działanie przysadkowego hormonu w sytuacjach wymagających szybkiej reakcji komórkowej. Interakcje z

czynnikiem insulinopodobnym tworzą dodatkową sieć zależności. Wyniki te mogą dowodzić, że GH wykazuje działanie para- i autokrynowe również na tym etapie rozwoju osobniczego.

LITERATURA

- [1] AOKI F, WORRAD DM, SCHULTZ RM. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 1997; **181**: 296–307.
- [2] BAMBERGER AM, BAMBERGER CM, PU LP, PUY LA, LOH YP, ASA SL Expression of PIT-1 messenger ribonucleic acid and protein in the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**(7): 2021–2026.
- [3] BARNES FL, FIRST NL. Embryonic transcription in *in vitro* cultured bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1991; **29**: 117–123.
- [4] BRAUDE P, BOLTON V, MOORE S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stage of preimplantation development. *Nature* 1988; **332**: 459–461.
- [5] BREVINI-GANDOLFI TAL, FAVETTA LA, MAURI L, LUCIANO AM, CILIO F, GANDOLFI F. Changes in poly(A) tail length of maternal transcripts during *in vitro* maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. *Mol Reprod Dev* 1999; **52**: 427–433.
- [6] CHEN HT, SCHULER LA, SCHULTZ RD. Growth hormone and Pit-1 expression in bovine foetal lymphoid cells. *Domest Anim Endocrinol* 1997; **14**(6): 399–407.
- [7] CROSBY IM, GANDOLFI F, MOOR RM. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J Reprod Fertil* 1988; **82**: 769–775.
- [8] De SOUSA PA, WATSON AJ, SCHULTZ GA, BILODEAU-GOESEELS S. Oogenetic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review. *Mol Reprod Dev* 1998; **51**: 112–121.
- [9] EDWARDS JL, EALY AD, MONTERROSO VH, HANSEN PJ. Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1997; **48**: 25–33.
- [10] FLACH G, JOHNSON MH, BRAUDE PR, TAYLOR RAS, BOLTON VN. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J* 1982; **1**: 681–686.
- [11] FREI RE, SCHULTZ GA, CHURCH RB. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8–16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J Reprod Fertil* 1989; **86**: 637–641.
- [12] GARCIA-ARAGON J, LOBIE P, MUSCAT G, GOBIUS KS, NORSTEDT G, WATERS M. Prenatal expression of the growth hormone (GH) receptor/binding protein in the rat: a role for GH in embryonic and fetal development. *Development* 1992; **114**: 869–876.
- [13] GRAINGER JL. The unmasking of maternal mRNA during oocyte maturation and fertilization. [w] Setlow JK [ed] Genetic Engineering, New York, Plenum Press 1994: 229–239.
- [14] GREVE T, CALLESEN H, HYTTTEL P, AVERY B. From oocyte to calf: *in vivo* and *in vitro*. [w] GF Greppi i G Enne [red] Animal production and biotechnology. Paris, Elsevier Biofutur 1994: 71–97.
- [15] HARVEY S, AZUMAYA Y, HULL KL. Pituitary and extrapituitary growth hormone: Pit-1 dependence? *Can J Physiol Pharmacol* 2000; **78**: 1013–1028.
- [16] HULL KL, HARVEY S. Growth hormone: a reproductive endocrine-paracrine regulator? *Reviews of Reproduction* 2000; **5**: 175–182.
- [17] IZADYAR F, HAGE WJ, COLENBRANDER B, BEVERS MM. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. *Mol Reprod Dev* 1998; **49**: 444–453.

- [18] IZADYAR F, VAN TOL HT, HAGE WG, BEVERS MM. Preimplantation bovine embryos express mRNA of growth hormone receptor and respond to growth hormone addition during *in vitro* development. *Mol Reprod Dev* 2000; **57**(3): 247–255.
- [19] KANE MT, MORGAN PM, COONAN C. Peptide growth factors and preimplantation development. *Hum Reprod* 1997; **3**(2): 137–157.
- [20] KOLLE S, SINOWATZ F, BOIE G, LINCLON D, WATERS MJ. Differential expression of the growth hormone receptor and its transcript in bovine uterus and placenta. *Mol Cell Endocrinol* 1997; **131**: 127–136.
- [21] KOLLE S, SINOWATZ F, BOIE G, LINCOLN D, PALMA G, STOJKOVIC M, WOLF E. Topography of growth hormone receptor expression in the bovine embryo. *Histochem Cell Biol* 1998; **109**: 417–419.
- [22] KOPECNY V, FLECHON JE, CAMOUS S, FULKA J. High-resolution autoradiographic studies of comparative nucleogenesis and genome reactivation during embryogenesis in pig, man and cattle. *Reprod Nutr Dev* 1989; **29**: 589–600.
- [23] LECHNIAK D, BETTS DH, KAWARSKY SJ, KING WA. Growth hormone gene is expressed in preattachment bovine embryos. *J Reprod Fertil abstract series* 1999; **23**: 81.
- [24] LEE BJ, JEONG JK, KIM JH, KANG SG, KIM MO, CHOI WS. Local expression of POU family transcription factor, PIT-1, in the rat placenta. *Mol Cell Endocrinol* 1996; **19**: 118(1–2): 9–14.
- [25] LEQUARRE AS, GRISART B, MOREAU B, SCHUURBIERS N, MASSIP A, DESSY F. Glucose metabolism during bovine preimplantation development: analysis of gene expression in single oocytes and embryos. *Mol Reprod Dev* 1997; **48**: 216–226.
- [26] LUCY MC, HAUSER SD, EPPARD PJ, KRIVI GG, CLARK JH, BAUMAN DE, COLLIER RJ. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and milk production. *Domest Anim Endocrinol* 1993; **10**: 325–333.
- [27] MANES C. Nucleic acid synthesis in preimplantation rabbit embryos II: Delayed synthesis of ribosomal RNA. *J Exp Zool* 1971; **176**: 87–96.
- [28] MEMILI E, DOMINKO T, FIRST NL. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; **51**: 36–41.
- [29] MEMILI E, FIRST NL. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biol Reprod* 1999; **61**: 1198–1207.
- [30] NIEMANN H, WRENZYCKI C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology* 2000; **53**(1): 21–35.
- [31] OHLSSON C, LOVSTEDT K, HOLMES PV, NILSSON A, CARLSSON L, TOMELL J. Embryonic stem cells express growth hormone receptors: regulation by retinoic acid. *Endocrinology* 1993; **133** (6): 2897–2903.
- [32] PANTALEON M, WHITESIDE EJ, HARVEY MB, BARNARD RT, WATERS MJ, KAYE PL. Functional growth hormone (GH) receptors and GH are expressed by preimplantation mouse embryos: a role for GH in early development. *Proc Natl Acad Sci* 1997; **94**(10): 5125–5130.
- [33] PAYNTON BV, REMPEL R, BACHVAROVA R. Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Dev Biol* 1988; **129**: 304–314.
- [34] PAYNTON BV, BACHVAROVA R. Polyadenylation and deadenylation of maternal mRNAs during oocyte growth and maturation in mouse. *Mol Reprod Dev* 1994; **37**: 172–180.
- [35] RUTANEN EM. Cytokines in reproduction. *Annals of Medicine* 1993; **25**(4): 343–347.
- [36] SCHULTZ GA, HOGAN A, WATSON AJ, SMITH RM, HEYNER S. Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. *J Reprod Fertil* 1992; **4**: 361–171.

- [37] SEAVEY BK, SINGH RN, LEWIS UJ, GESCHWIND II. Bovine growth hormone : evidence for two allelic forms. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; **43**: 189–195.
- [38] SHEWCHUK B, ASA S, COOKE NE, LIEBHABER SA. PIT-1 binding sites at the somatotrope-specific DNase I hypersensitive sites I, II of the human growth hormone locus control region are essential for *in vivo* hGH-N gene activation. *J Biol Chem* 1999; **274(50)**: 35725–35733.
- [39] ELFORD NA, WATSON AJ, SCHULTZ GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990; **26**: 90–100.
- [40] TEMELES GL, RAM PT, ROTHSTEIN JL, SCHULTZ RM. Expression patterns of novel genes during mouse preimplantation embryogenesis. *Mol Reprod Dev* 1994; **37**: 121–129.
- [41] TERRADA Y, FUKAYA T, TAKAHASHI M, YAJIMA A. Expression of growth hormone in mouse preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod* 1996; **2(11)**: 879–881.
- [42] TUGGLE CK, YU TP, HELM J, ROTHSCHILD MF. Cloning and restriction fragment length polymorphism analysis of cDNA for swine PIT-1, a gene controlling growth hormone expression. *Anim Genet* 1993; **24**: 17–21.
- [43] VAN BLERKOM J, MANES C. Development of preimplantation rabbit embryos *in vivo* and *in vitro* II. A comparison of qualitative aspects of protein synthesis. *Dev Biol* 1974; **40**: 40–51.
- [44] VASSALI JD, HUARTE J, BELIN D, GUBLER P, VASSALI A, O'CONNELL ML, PARTON LA, RICKLERS RJ, STRICKLAND S. Regulated polyadenylation controls mRNA translation during meiotic maturation of mouse oocytes. *Genes Dev* 1989; **3**: 2163–2171.
- [45] VIUFF D, AVERY B, GREVE T, KING WA, HYTTEL P. Transcriptional activity in *in vitro* produced bovine two- and four-cell embryos. *Mol Reprod Dev* 1996; 171–179.
- [46] WATSON AJ, HOGAN A, HAHNEL A, WIEMER KE. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1992; **31**: 87–95.
- [47] WATSON AJ, WATSON PH, ARCELLANA-PANLILIO M, WARNES D, WALKER S, SCHULTZ G, ARMSTRONG DT, SEAMARK RF. A growth factor phenotype map of ovine preimplantation development. *Biol Reprod* 1994; **50**: 725–733.
- [48] YOSHIDA Y, MIYAMURA M, HAMANO S, YOSHIDA M. Expression of growth factor ligand and their receptor mRNA in bovine ova during *in vitro* maturation and after fertilization *in vitro*. *J Vet Med. Sci* 1998; **60**: 549–554.
- [49] YOUNG LE, SINCLAIR KD, WILMUT I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction* 1998; **3(3)**: 155–154.
- [50] YU TP, SCHMITZ CB, ROTHSCHILD MF, TUGGLE CK. Expression pattern, genomic cloning and RFLP analyses of the swine PIT-1 gene. *Anim Genet* 1994; **25**: 229–233.
- [51] ZHANG X, KIDDER MG, WATSON A J, SCHULTZ G A, ARMSTRONG DT. Possible roles of insulin and insulin-like growth factors in rat preimplantation development: investigation of gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Reprod Fertil* 1994; **100**: 375–380.
- [52] ZHAO J, VAN TOL HT, TAVERNE MA, VAN DER WEIJDEN GC, BEVERS MM, VAN DER HURK R. The effect of growth hormone on rat pre-antral follicles *in vitro*. *Zygote* 2000; **8(3)**: 275–283.

Adres autora: ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań,
email: lechniak@jay.au.poznan.pl

ROLA GENÓW HOMEOTYCZNYCH W ROZWOJU GRUCZOŁU MLECZNEGO

ROLE OF HOMEOTIC GENES IN THE DEVELOPMENT OF MAMMARY GLAND

Tadeusz MALEWSKI

Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt, PAN,
Jastrzębiec

Streszczenie: Gruczoł mleczny w trakcie swojego rozwoju przechodzi przez kilka stadiów, które są regulowane przez hormony, interakcję komórek nabłonka z tkanką łączną oraz przez czynniki pochodzące z substancji międzykomórkowej (*extracellular matrix*). Molekularne mechanizmy większości tych procesów są mało zbadane. Jedną z grup genów warunkujących interakcję nabłonek-mezenchyma w zarodku są geny homeotyczne należące do rodziny *Muscle-Segment Homeobox (Msx)*. Ekspresja genów *Msx* zachodzi w miejscach interakcji nabłonek-mezenchyma i jest istotna dla rozwoju kończyn, zębów i łożyska. Czynniki transkrypcji *Msx* regulują ekspresję genów bezpośrednio – przez wiązanie się ze specyficznymi sekwencjami DNA w promotorach i/lub enhancerach odpowiednich genów lub pośrednio – przez tworzenie kompleksów z innymi czynnikami transkrypcji, zwiększając lub zmniejszając powinowactwo *Msx2* do specyficznej sekwencji DNA. W gruczole mlecznym zachodzi ekspresja wszystkich genów, których produkty tworzą kompleks transkrypcji z *Msx2*, a poziom ich ekspresji jest ściśle skorelowany ze wzrostem i rozgałęzieniem przewodów mlecznych. Pozwala to wysunąć hipotezę, że czynniki transkrypcji *Msx* biorą udział w przekazywaniu sygnału od estrogenu i progesteronu do genów regulujących podział komórek w zawiązkach pęcherzyków mlecznych i rozgałęzianie się przewodów mlecznych.

(*Postępy Biologii Komórki 2001; 28 supl. 18: 137–142*)

Słowa kluczowe: gruczoł mleczny, geny homeotyczne, *Msx*.

Summary: The mammary gland in its development undergoes several stages and is regulated by hormones, interaction of epithelial cells with extracellular matrix and mesenchymal cells. Molecular mechanisms of most of these processes are poorly understood. Homeotic genes, particularly *Muscle-Segment Homeobox (Msx)* genes, regulate epithelial-mesenchymal interactions and are essential for development of limb, tooth and placenta. *Msx* transcription factors regulate gene expression directly by binding to their DNA-binding sites or indirectly – by protein-protein interactions with others transcription factors. Recently performed investigations showed that all proteins forming transcription complexes of

Msx2 are expressed in the mammary gland. Their expression is tightly correlated with growth and branching of the milk ducts. That allows suggesting that Msx participate in signal transduction from estrogen and progesterone to target genes controlling growth and branching of milk ducts. Recently, experiments aiming to identify these genes are in progress.

(*Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18 : 137–142*)

Key words: mammary gland, homeotic genes, Msx.

ROZWÓJ GRUCZOŁU MLECZNEGO

Rozwój gruczołu mlecznego u myszy rozpoczyna się w 10–11 dniu rozwoju płodu. W 12–14 dniu rozwoju, pod wpływem interakcji nabłonka z mezenchymą, następuje rozrost i inwaginacja nabłonka, co prowadzi do utworzenia wgłódek mlecznych, a po 17–18 dniach tworzą się wypustki przewodów mlecznych. W postnatalnym rozwoju gruczołu mlecznego myszy można wyróżnić trzy etapy. Podczas pierwszego etapu trwającego od urodzenia do osiągnięcia dojrzałości płciowej zachodzi izometryczny wzrost przewodów mlecznych. Po osiągnięciu dojrzałości płciowej następuje drugi etap szybkiego, allometrycznego wzrostu oraz rozgałęziania przewodów mlecznych zakończonych pęcherzykami wydzielniczymi (ang. *terminal bud ends*; TEB). We wczesnym okresie ciąży te procesy ulegają przyspieszeniu; gruczoł mleczy osiąga stadium rozwoju, w którym hormony laktogenne mogą indukować ekspresję genów białek mleka [1, 14, 16]. Po etapie rozwoju allometrycznego następuje trwający 2–3 miesiące etap równomiernego zwiększenia liczby trzeciorzędowych przewodów mlecznych [7].

Wzrost i morfogeneza gruczołu mlecznego są regulowane przez synergiczne działanie hormonów oraz czynników wzrostu, interakcje nabłonka z tkanką łączną i substancją międzykomórkową (ang. *extracellular matrix*, ECM). Wykazano, że jednymi z genów regulujących i koordynujących procesy rozwojowe, których ekspresja zależy od estrogeny, progesteronu oraz substancji międzykomórkowej, są geny homeotyczne.

ROLA GENÓW HOMEOTYCZNYCH WE WZROŚCIE I ROZGAŁĘZIANIU PRZEWODÓW MLECZNYCH

Poczynając od muszki owocowej aż do ssaków geny homeotyczne uczestniczą w determinacji losu komórek w czasie wzrostu i morfogenezy organizmu. Geny homeotyczne kodują czynniki transkrypcyjne oraz prawdopodobnie białka biorące udział w transdukcji sygnałów od czynników wzrostowych i hormonów do genów docelowych.

Klonowanie genów homeotycznych wykazało, że zawierają one bardzo konserwatywną sekwencję o długości 180 nukleotydów. Sekwencja ta została odkryta w roku 1984 i otrzymała nazwę homeoboksu (ang. *homeobox*). Homeoboks koduje domenę białkową, zwaną homeodomeną, o długości 60 aminokwasów, złożoną z trzech fragmentów α -helikalnych, tworzących strukturę typu heliks-skręt-heliks (ang. *helix-turn-helix*). Homeodomeny wiążą się ze specyficznymi sekwencjami DNA i mające je białka pełnią funkcję czynników transkrypcyjnych. Na podstawie struktury homeodomeny geny homeotyczne zostały podzielone na 18 grup [17].

Dotychczas zbadano wpływ na rozwój gruczołu mlecznego dwóch grup genów homeotycznych – *Hox* i *Muscle-Segment Homeobox – Msx*. Geny *Hox* są zgrupowane w czterech grupach sprzężeń – *HoxA*, *HoxB*, *HoxC* i *HoxD*. Badania ekspresji tych genów wykazały, że w gruczole mlecznym myszy dziewiczych zachodzi intensywne transkrypcja genów *Hoxa9*, *Hoxb9* i *Hoxd9*; podczas ciąży ich ekspresja zmniejsza się, a w laktacji zanika ekspresja genów *Hoxa9* i *Hoxb9*, chociaż ekspresja genu *Hoxd9* praktycznie się nie zmienia [3]. Inaktywacja (*knock-out*) genów *Hoxa9*, *Hoxb9* i *Hoxd9* nie wpływała na rozwój gruczołu mlecznego podczas embriogenezy, a także u dziewiczych myszy, natomiast podczas ciąży i po porodzie obserwowano niedorozwój (hipoplazję) gruczołu mlecznego. Podobnie jak *Hoxb9* zmienia się ekspresja genów *Hoxb7* [12] i *Hoxc6* [5]; intensywne transkrypcja w gruczole mlecznym dziewiczych myszy zmniejsza się podczas ciąży i laktacji i znowu wzrasta podczas inwolucji. Autorzy sugerują, że geny te odgrywają istotną rolę w rearanzacji gruczołu mlecznego podczas inwolucji [3]. Badania ekspresji genów homeotycznych w gruczole mlecznym wykazały, że jest ona regulowana przez hormony i substancję międzykomórkową. Ekspresja genu *Hoxc6* wzrastała po owariektomii myszy, co świadczy o negatywnej regulacji tego genu przez hormony sterydowe [5], z kolei gen *Hoxa5* reguluje ekspresję receptora progesteronu [10]. Ekspresja genów homeotycznych zależy również od substancji międzykomórkowej. Przeniesienie komórek nabłonka gruczołu mlecznego linii CID-9 i SCp2 hodowanych na plastiku na substancję międzykomórkową wydzieloną z mysiego mięsaka Engelbrecht-Holm-Swarm blokowało ekspresję genów *Hoxa1* i *Hoxb7* [14].

Druga grupa genów homeotycznych, która ma wpływ na rozwój gruczołu mlecznego, to *Muscle-Segment Homeobox (Msx)*. Ta rodzina składa się u ssaków z trzech genów – *Msx1*, *Msx2* i *Msx3*. Ekspresja genów *Msx* zachodzi w rozwoju prenatalnym w miejscach interakcji nabłonek-mezenchyma i jest istotna dla rozwoju kończyn, zębów i łożyska [4]. Dodanie glikokortykoidów do hodowanych *in vitro* zarodkowych gruczołów ślinowych indukowało ekspresję *Msx2* oraz stymulowało wzrost i rozgałęzianie przewodów ślinowych [8]. Inaktywacja (*knock-out*) genów *Msx1* i *Msx2* powodowała zatrzymanie rozwoju gruczołu mlecznego u myszy na etapie inwaginacji nabłonka. Po inaktywacji jednego genu – *Msx2* rozwój gruczołu mlecznego zatrzymuje się w stadium odpowiadającym 16-dniowemu zarodkowi [12]. Hormony sterydowe mają odwrotny wpływ na ekspresję genu *Msx2* niż na

ekspresję genu *Hoxc6*; owariektomia powodowała znaczne zmniejszenie ekspresji tego genu. Podskórne podanie myszom estrogenu przywracało ekspresję genu *Msx2* [6, 9]. Phippard i wsp. [9] sugerują, że ekspresja genu *Msx1* w gruczole mlecznym po urodzeniu utrzymuje komórki gruczołu mlecznego w stanie kompetencji do odpowiedzi na gwałtowne zmiany hormonalne oraz że we wczesnej ciąży wzrost ekspresji genów *Msx1* i *Msx2* może być związany z proliferacją komórek i zapobieganiem przedwczesnej laktacji.

Czynniki transkrypcyjne MSX regulują ekspresję genów bezpośrednio, przez wiązanie się ze specyficznymi sekwencjami DNA w promotorach i/lub enhancerach odpowiednich genów (gen osteogeniny [13], podjednostki α hormonów FSH, LH i TSH [11]) lub pośrednio – przez tworzenie kompleksów z innymi czynnikami transkrypcji (np. gen miogeniny [18], autoregulacja genu *Msx1* [15]). Białko kodowane przez gen *Msx1* może tworzyć kompleksy z czynnikami transkrypcji Sp1 i CBP/p300 [15] oraz Lhx2 [2], a białka kodowane przez *Msx2* – z C/EBP, Miz1 [19] i Dlx [20]. Interakcja białek Msx z innymi czynnikami transkrypcji może zwiększać powinowactwo Msx do DNA (*Msx2* - Miz1) lub też blokować wiązanie Msx do specyficznych sekwencji DNA (np. *Msx1* - Lhx2, *Msx2* - Dlx5).

Badania przeprowadzone przez autora wykazały, że w gruczole mlecznym zachodzi ekspresja genów *Msx1*, *Msx2*, Miz1 i Dlx5, a poziom ekspresji tych genów jest ściśle skorelowany ze wzrostem i rozgałęzianiem przewodów mlecznych. Pozwala to wysunąć hipotezę, że czynniki transkrypcji Msx biorą udział w przekazywaniu sygnału od estrogenu i progesteronu do genów regulujących podział komórek w zawiązkach pecherzyków mlecznych i wzrost przewodów mlecznych. W celu sprawdzenia tej hipotezy utworzono konstrukty DNA, w których ekspresja genów *Msx1* i *Msx2* jest kontrolowana przez promotor MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*). Promotor ten warunkuje ekspresję badanego genu w komórkach nabłonka gruczołu mlecznego oraz ma szereg sekwencji wiążących receptor glikokortykoidów (GRE), co pozwala zwiększyć intensywność transkrypcji genów *Msx1* lub *Msx2* przez podanie glikokortykoidów. Otrzymano stabilnie transfekowane konstruktem MMTV-*Msx2* linie komórek nabłonka gruczołu mlecznego NmuMG. Dodanie glikokortykoidów do tych komórek hodowanych w żelu kolagenowym prowadziło do znacznego zwiększenia liczby struktur podobnych do przewodów mlecznych. Obecnie trwają prace nad otrzymaniem myszy transgenicznych wyposażonych w konstrukty MMTV-*Msx1* i MMTV-*Msx2* oraz nad identyfikacją genów regulowanych przez czynniki transkrypcyjne *Msx1* i *Msx2*.

LITERATURA

- [1] ATWOOD CS, HOVEY RC, GLOVER JP, CHEPCO G, GINSBURG E, ROBINSON WG, VONDEHAAR BK. Progesterone induced side-branching of the ductal epithelium in the mammary gland of peripubertal mice. *J Endocrinol* 2000; **167**(1): 39–52.

- [2] BENDALL AJ, RINCON-LIMASE E, BOTAS J, ABATE-SHEN C. Protein complex formation between Msx1 and Lhx2 homeoproteins is incompatible with DNA binding activity. *Differentiation* 1998; **63**: 151–157.
- [3] CHEN F, CAPECCHI MP. Paralogous mouse Hox genes, Hoxa9, Hoxb9, and Hoxd9, function together to control development of the mammary gland in response to pregnancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 541–546.
- [4] DAVIDSON D. The function and evolution of *Msx* genes: pointers and paradoxes. *Trend Genet* 1995; **11**: 405–411.
- [5] FRIEDMAN Y, DANIEL CA, STRICKLAND P, DANIEL CW. *Hox* genes in normal and neoplastic mouse mammary gland. *Cancer Res* 1994; **54**: 5981–5985.
- [6] FRIEDMAN Y, DANIEL CA. Regulated expression of homeobox genes *Msx-1* and *Msx-2* in mouse mammary gland development suggests a role in hormone action and epithelial-stromal interactions. *Dev Biol* 1996; **177**: 347–355.
- [7] IMAGAWA W, BRANDYOPADHYAY GK, NANDI S. Regulation of mammary epithelial cell growth in mice and rats. *Endocrin Rev* 1990; **11**: 494–523.
- [8] JASKOLL T, LUO W, SNEAD ML. *Msx-2* expression and glucocorticoid-induced overexpression in embryonic mouse submandibular glands. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1998; **18**: 79–87.
- [9] PHIPPARD DJ, WEBER-HALL SJ, SHARPE PT, NAYLOR MS, JAYATALAKE H, MAAS R, WOO I, ROBERTS-CLARK D, FRANCIS-WEST PH, LIU Y-H, MAXSON R, HILL RE, DALE TC. Regulation of *Msx-1*, *Msx-2*, *Bmp-2* and *Bmp-4* during foetal and postnatal mammary gland development. *Development* 1996; **122**: 2729–2737.
- [10] RAMAN V, TAMORI A, VALI M, ZELLER K, KORZ D, SUKUMAR S. *Hoxa5* regulates expression of progesterone receptor. *J Biol Chem* 2000; **275**: 26551–26555.
- [11] SARAPURA VD, STROUGHT HL, GORDON DF, WOOD WM, RIDGWAY EC. *Msx1* is present in thyrotropic cells and binds to a consensus site on the glycoprotein hormone α -subunit promoter. *Mol Endocrinol* 1997; **11**: 1782–1794.
- [12] SATOKATA I, MA L, OHSHIMA H, BEI M, WOO I, NISHIZAWA K, MAEDA T, TAKANO Y, UCHIYAMA M, HEANEY S, PETERS H, TANG Z, MAXON R, MAAS R. *Msx2* deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 2000; **24**: 391–395.
- [13] SHETTY S, TAKAHASHI T, MATSUI H, AYENGAR R, RAGNOW R. Transcriptional autorepression of *Msx1* gene is mediated by interactions of *Msx1* protein with multi-protein transcriptional complex containing TATA-binding protein, Sp1 and cAMP-response-element-binding protein-binding protein (CBP/p300). *Biochem J* 1999; **339**: 571–578.
- [14] SREBROW A, FRIEGMANN Y, RAVANPAY A, DANIEL CW, BISSEL MJ. Expression of *Hoxa-1* and *Hoxb-7* is regulated by extracellular matrix-dependent signals in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 1998; **69**: 377–391.
- [15] TOWLER DA, RUTLEDGE SJ, RODAN GA. *Msx-2/Hox8.1*: a transcriptional regulator of the rat osteocalcin promoter. *Mol Endocrinol* 1994; **8**: 1484–1493.
- [16] VONDERHAAR B, PLAUT K. Interdependence of hormones and growth factors in lobulo-alveolar development of the mammary gland and in tumorigenesis. [w] Dogliotti L, Sapino A, Bussolati G. [red] Breast Cancer: Biological and Clinical Progress. Boston, Kluwer Academic Publishers 1992; 59–80.
- [17] WINGENDER E. Classification scheme of eucariotic transcription factors. *Mol Biol* 1997; **31**: 483–497.
- [18] WOLOSHIN P, SONG K, DEGNIN C, KILLERY A, GOLDHAMER DS, SASSOON D, THAYER MJ. *MSX1* inhibits *MyoD* expression in fibroblast x 10T1/2 cell hybrids. *Cell* 1995; **82**: 611–620.

- [19] WU L, WU H, SANGIORGI F, WU N, BELL JR, LYONS GE, MAXSON R. Miz1, a novel zinc finger transcription factor that interacts with Msx2 and enhances its affinity for DNA. *Mech Div* 1997; **65**: 3–17.
- [20] ZHANG H, HU G, WANG H, SCIAVOLINO P, ILER N, SHEN MM, ABATE-SHEN C. Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 2920–2932.

Adres autora: 05-552 Wólka Kosowska, Jastrzębiec

WYSOKO- I NISKOCZĄSTECZKOWE FOSFATAZY KWAŚNE MĘSKIEGO UKŁADU ROZRODCZEGO

HIGH AND LOW MOLECULAR WEIGHT ACID PHOSPHATASES OF THE MALE REPRODUCTIVE TRACT

Paweł WYSOCKI, Jerzy STRZEŻEK

Katedra Biochemii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Streszczenie: Wskazano na różnorodność form molekularnych fosfatyz kwaśnych występujących w tkankach i płynach męskiego układu rozrodczego. Podkreślono glikoproteinowy charakter enzymów, różniących się liczbą i strukturą jednostek oligosacharydowych, warunkujących ich mikroheterogenność oraz właściwości molekularne. Szczególną rolę zwrócono na grupę białkowych fosfatyz tyrozynowych oraz ich znaczenie diagnostyczne w patofizjologii dodatkowych gruczołów płciowych. Opierając się na badaniach własnych scharakteryzowano fosfatyz kwaśne układu rozrodczego knura.
(*Postępy Biologii Komórki 2001; 28 supl. 18: 143–153*)

Słowa kluczowe: fosfatyz kwaśne, białkowe fosfatyz tyrozynowe, samiec, układ rozrodczy, plazma nasienia

Summary: The different molecular forms of acid phosphatases occurring in the tissues and fluids of the male reproductive tract have been identified. The defined glycoprotein character of acid phosphatases, differing in the amount and structure of the oligosaccharide units, determine their microheterogeneity and molecular properties. The role of protein tyrosine phosphatases and their diagnostic significance in the pathophysiology of accessory sex glands have been defined. These studies have characterized acid phosphatases of boar reproductive system.
(*Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18: 143–153*)

Keywords: acid phosphatases, protein tyrosine phosphatases, male, reproductive tract, seminal plasma

1. WSTĘP

Fosfatyz kwaśne (fosfohydrolazy monoestrów fosforanowych, E.C. 3.1.3.2) stanowią liczną grupę enzymów, które ze względu na masę można podzielić na niskocząsteczkowe (13–16 kDa), średnicząsteczkowe (35–55 kDa) i wysokocząstecz-

kowe (pow. 100 kDa). Zwierzęce kwaśne fosfatazy różnią się lokalizacją wewnątrzkomórkową, właściwościami fizykochemicznymi, wrażliwością na inhibitory i specyficznością substratową [8]. Aktywność fosfataz kwaśnych zlokalizowana jest głównie w lizosomach i cytozolu, chociaż występuje także w mitochondriach, mikrosomach, jądrze komórkowym i błonach cytoplazmatycznych [27].

Fosfatazy kwaśne cechuje mała specyficzność w stosunku do substratów fosfomonoestrowych, natomiast wiele z nich przejawia *in vitro* aktywność fosfotransferazową, przenosząc reszty ortofosforanowe na akceptor, którym jest z reguły grupa hydroksylowa.

Enzymy zwierzęce, w odróżnieniu od roślinnych nie wykazują aktywności hydrolitycznej wobec pirofosforanu. Reakcje katalizowane przez fosfatazy kwaśne przebiegają z wytworzeniem kompleksów przejściowych, stabilizowanych przez reszty histydylowe. Niektóre jednak fosfatazy kwaśne wymagają do katalizy również innych reszt aminoacylowych [31].

Rola fizjologiczna fosfataz kwaśnych w organizmie nie została do tej pory jednoznacznie zdefiniowana. Spowodowane jest to nie tylko znaczną liczbą poznanych fosfataz kwaśnych, ale również szerokim spektrum hydrolizowanych przez nie substratów. Funkcje metaboliczne fosfataz kwaśnych związane są przede wszystkim z kontrolą stopnia ufosforylowania substratów oraz poziomu nieorganicznego fosforanu w komórce. Stanowi to zapewne bezpośrednią przyczynę obserwowanej wysokiej aktywności fosfataz kwaśnych w tkance nerkowej oraz komórkach związanych z sekrecją hormonów. Z kolei wysokie powinowactwo fosfataz kwaśnych do ufosforylowanych form pirydoksalu, pirydoksyny i pirydoksaminy wydaje się podkreślać ich rolę w mechanizmach regulujących aktywność enzymów zależnych od witaminy B₆. Należy zwrócić uwagę, że wykazywana przez fosfatazy kwaśne swoistość substratowa wobec fosforanów nukleozydów sugerować może ich udział w przemianach kwasów nukleinowych [8].

Szczególne miejsce w grupie fosfataz kwaśnych zajmują tzw. purpurowe fosfatazy kwaśne oraz niespecyficzne niskocząsteczkowe fosfatazy kwaśne. Purpurowe fosfatazy kwaśne, zaliczane do niskocząsteczkowych (30–40 kDa) glikoprotein z jednostkami wielomannozowymi, zawierających dodatkowo jony żelazowe [5]. Są to enzymy odporne na działanie kwasu winowego (ang. *tartrate resistant acid phosphatase*, TRAP). Rola fizjologiczna purpurowych fosfataz kwaśnych nie została jeszcze w pełni wyjaśniona. Niemniej występowanie omawianych enzymów w osteoklastach, makrofagach, granulocytach i leukocytach sugeruje ich udział w regulacji gospodarki mineralnej w tkance kostnej oraz mechanizmach odpornościowych [4]. Możliwa jest również rola związana z transportem jonów żelazowych. Podkreśla się znaczenie diagnostyczne purpurowych fosfataz kwaśnych, bowiem ich podwyższoną aktywność obserwuje się w przypadkach białaczek u ludzi [12].

Niskocząsteczkowe niespecyficzne fosfatazy kwaśne, ze względu na duże powinowactwo do reszt fosfotyrozylowych, zaliczane są do grupy białkowych fosfataz

tyrozynowych. W sekwencjach aminokwasowych centrum aktywnego enzymu niezbędne jest występowanie motywu (H/V)C(X₅)R(S/T), który jest charakterystyczny dla białkowych fosfataz tyrozynowych. Enzymy te nie są hamowane przez winian i fluorki, natomiast są wrażliwe na związki blokujące grupy SH. Najwyższą aktywność niespecyficycznych niskocząsteczkowych fosfataz kwaśnych wykazano w wątrobie, nerce, mózgu, sercu i łożysku [15].

2. FOSFATAZY KWAŚNE MĘSKIEGO UKŁADU ROZRODCZEGO

2.1. Tkanka jądrowa i plemniki

Zależna od androgenów aktywność fosfataz kwaśnych w tkance jądrowej związana jest z kolejnymi etapami wytwarzania plemników. W tkance jądrowej zlokalizowano 4 formy molekularne fosfatazy kwaśnej, różniące się właściwościami biochemicznymi. Formy E I i E II wydają się występować w lizosomach i/lub akrosomach, natomiast pozostałe dwie formy (E III-E IV) występują w stanie niezwiązanym. Enzymy lizosomowe tkanki jądrowej gryzoni hamowane są przez L-winian i fluorki, zaś jony Co²⁺ okazały się ich aktywatorami. Vanha-Perttula i wsp. [24] stwierdzili, że defosforylacja białek cytoplazmatycznych i błonowych w procesie spermatogenezy związana jest z procesami dojrzewania plemników. Omawiane zjawisko potwierdza fakt występowania wysokiej aktywności fosfatazy kwaśnej w kropli cytoplazmatycznej niedojrzałych plemników.

Fosfatazy kwaśne występują w formie związanej z plazmolemmą plemników wielu gatunków ssaków. W przypadku plemników człowieka wysoka aktywność enzymu koreluje z obniżoną ruchliwością komórek [16]. Z kolei plemniki królika mają 5 form molekularnych fosfatazy kwaśnej, spośród których dwie związane są akrosomem, a ich aktywność zlokalizowana jest w regionie równikowym i post-akrosomowym główki plemnika [6]. W przypadku plemników buhaja aktywność fosfatazy kwaśnej zlokalizowana jest w segmencie post-akrosomowym, zaś u myszy w wewnętrznej błonie akrosomowej [11].

2.2. Najądrza

Aktywność fosfatazy kwaśnej obecna jest w najądrzach wszystkich gatunków ssaków. Najwyższą aktywność wykazano w płynie najądrzy świnki morskiej i knura.

Najądrzowe fosfatazy kwaśne biorą udział w tworzeniu specyficznego środowiska dla dojrzewających plemników prawdopodobnie uczestnicząc w degradacji plemników nieprawidłowych lub starzejących się. Najądrza szczura charakteryzują się występowaniem trzech form molekularnych fosfatazy kwaśnej, spośród których

jedna jest pochodzenia lizosomowego. Enzym ten ma masę cząsteczkową 97 kDa, optimum pH 5,0 i jest wrażliwy na winian i fluorki [11].

2.3. Fosfatazy kwaśne dodatkowych gruczołów płciowych

Najwyższą aktywność fosfatazy kwaśnej ma płyn prostaty człowieka i małp człekokształtnych, niższą – psa, buhaja, świnki morskiej, kota, szczura i królika.

Enzym płynu prostaty szczura ma masę cząsteczkową 150 kDa. W elektroforezie denaturującej wykazano obecność heterogennych podjednostek o masach 46 i 48 kDa. Deglikozylacja enzymu przy użyciu N-glikozydazy powoduje obniżenie masy cząsteczkowej podjednostek do 41 kDa. Wskazywać to może, że enzym jest trimerem, którego podjednostki różnią się między sobą stopniem glikozylacji. Poznanie sekwencji aminokwasowej enzymu umożliwiło produkcję rekombinowanego białka o pełnej aktywności enzymatycznej. Rekombinowana fosfataza kwaśna prostaty szczura ma masę cząsteczkową 155 kDa i wykazuje powinowactwo do fosfotyrozyny. Enzym jest hamowany przez kwas L-winowy. Podjednostki omawianego enzymu wykazują tendencję do tworzenia form dimerowych o masie około 100 kDa, które jednak nie wykazują aktywności katalitycznej [26]. Wykazano 75% zgodność sekwencji aminokwasowej enzymu rekombinowanego z sekwencją ludzkiej prostaticznej fosfatazy kwaśnej. Valenzia i wsp. [23] wykazali, że fosfataza kwaśna nie jest jedynym enzymem mającym powinowactwo do fosfotyrozyny w prostacie szczura. Wykorzystując metodę chromatografii powinowactwa i ligand grupowy – konkanawalinę A autorzy wykazali aktywność dodatkowej formy fosfatazy tyrozynowej, nie wiążącą się jednak z zastosowanym ligandem.

W wydzielinie prostaty psa głównym enzymem jest esteraza argininowa, niemniej stwierdza się także aktywność fosfatazy kwaśnej. Enzym jest glikoproteiną o budowie podjednostkowej. Skład aminokwasowy jest bardzo podobny do form izolowanych z prostaty szczura i człowieka.

W przypadku homogenatu prostaty psa obserwuje się mikroheterogenność fosfatazy kwaśnej przejawiającą się występowaniem 6–8 form molekularnych o punktach izoelektrycznych zbliżonych do pH 5,0. Forma sekrecyjna występuje w postaci 4 form molekularnych o punktach izoelektrycznych mieszczących się w zakresie pH 4,2–4,8 i masach cząsteczkowych 80–100 kDa [3]. Według Aumüller i wsp. [2] dominująca forma molekularna charakteryzuje się masą cząsteczkową ok. 106 kDa. W elektroforezie denaturującej stwierdza się obecność jednego łańcucha polipeptydowego o masie ok. 30 kDa.

Źródłem fosfatazy kwaśnej plazmy nasienia człowieka jest prostata. Enzym charakteryzuje się podjednostkową budową, ma masę cząsteczkową ok. 100 kDa i wykazuje niektóre cechy katalityczne charakterystyczne dla białkowych fosfataz tyrozynowych. Obserwowana heterogenność form molekularnych uwarunkowana jest obecnością w cząsteczce enzymu jednostek oligosacharydowych, zawierających

kwasy sialowe. W zależności od składu jednostki oligosacharydowej enzym występuje w formach różniących się ruchliwością elektroforetyczną [14]. Yoshida i wsp. [29] wykorzystując lektyny wykazali, że enzym występujący w prostatie zmiennej nowotworowo, w porównaniu z przypadkami łagodnego przerostu omawianego gruczołu, wykazuje zwiększoną liczbę jednostek oligosacharydowych, nie zawierających jednak reszt fukozy. Wskazywać to może, że transformacja nowotworowa powoduje zmiany w mechanizmach potranslacyjnej glikozylacji enzymu.

Chromatografia jonowymienna umożliwia wyodrębnienie z homogenatu prostaty człowieka dwóch form molekularnych enzymu. Jedna, nazwana fosfatą kwaśną typu I, została oczyszczona i scharakteryzowana jako glikoproteina zawierająca w swojej cząsteczce około 20 reszt cukrów obojętnych, 10 reszt heksozamin i 7 reszt kwasu N-acetylneuraminowego [11]. W pH 5,5 masa cząsteczkowa omawianej formy wynosi 102 kDa. Jednak przy niższych i wyższych wartościach pH obserwuje się dysocjację enzymu, której towarzyszy agregacja większej liczby podjednostek. Analiza składu aminokwasowego wykazała stosunkowo dużą zawartość (15–18) reszt cysteiny, których obecność w niewielkim stopniu wpływa na aktywność enzymu. Enzym jest syntetyzowany w formie prekursorowej, zawierającej peptyd sygnałowy złożony z 31 aminokwasów. Ludzka prostatowa fosfataza kwaśna jest wydzielana przez komórki nabłonkowe do płynu prostatowego w formie bardzo skoncentrowanej (ok. 1 mg enzymu/ml wydzieliny), po czym następuje usunięcie peptydu sygnałowego. W taki sam sposób odbywa się sekrecja fosfatazy kwaśnej w prostatie szczura [26]. Aktywność prostatowych fosfatyz kwaśnych jest ważnym wyznacznikiem funkcji fizjologicznych tego gruczołu. Stwierdzono bowiem istnienie korelacji między zawartością cynku a aktywnością fosfatazy kwaśnej w plazmie nasienia mężczyzn z normospermią ($r=0,81$). Zależności te wskazywać mogą na prostatowe źródło zarówno jonów Zn^{2+} , jak i fosfatazy kwaśnej w nasieniu człowieka [25]. Niewykluczona jest również zdolność wiązania tych jonów przez cząsteczkę enzymu. Interesujące jest, że istnieje zależność między aktywnością fosfatazy kwaśnej, zawartością heterogennego białka prostatowego i kwasu cytrynowego. Należy podkreślić, że omawiane białko składa się z dwóch podjednostek: białka PSP-94 i specyficznego antygenu prostatowego (PSA). W przypadkach zapalenia prostaty (*prostatitis*) zawartość PSP-94 wyraźnie obniża się [28]. Z kolei łagodnym przerostom lub nowotworom prostaty towarzyszy znaczny wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej w surowicy krwi, co może być wywołane „wyciekaniem” enzymu na skutek uszkodzenia tkanek prostaty. W surowicy krwi pacjentów z podwyższoną aktywnością prostatowej fosfatazy kwaśnej stwierdzono wysokie powinowactwo enzymu do fosfotyrozyny [13]. Aktywność mierzona wobec fosfotyrozyny stanowiła bowiem 96% aktywności prostatowej fosfatazy kwaśnej. Wskazywać to może, że prostatowa fosfataza kwaśna, której aktywność zwiększa się w surowicy krwi pacjentów z nowotworami prostaty, może być zaliczona do białkowych fosfatyz tyrozynowych.

W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na wewnątrzkomórkowy enzym prostatowy (tzw. prostatowa fosfataza kwaśna typ II). Jako białkowa fosfataza tyrozynowa enzym wydaje się pełnić kluczową rolę w regulacji wzrostu komórek raka prostaty.

Ludzkie fosfatazy prostatowe zaliczane są tradycyjnie do grupy kwaśnych, ponieważ w warunkach *in vitro* hydrolizują syntetyczne substraty z maksymalną szybkością w pH zbliżonym do 5,0. Badania z wykorzystaniem ufosforylowanego nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF) jako substratu wskazują jednak, że wewnątrzkomórkowa forma enzymu hydrolizować może skutecznie ufosforylowane substraty białkowe w środowisku zbliżonym do obojętnego. Lin i Meng [10] podjęli próbę identyfikacji ufosforylowanych substratów białkowych dla enzymu syntetyzowanego w komórkach raka prostaty. Autorzy stwierdzili, że substratem takim może być białko o masie 185 kDa, którego stopień ufosforylowania jest ujemnie skorelowany z aktywnością enzymu. Z kolei Zhang i wsp. [30] wykazali, że w centrum aktywnym fosfatazy kwaśnej defosforylującej fosfotyrozynę niezbędna jest obecność histydyny w pozycji 12 i kwasu asparaginowego w pozycji 258. Autorzy wykluczyli obecność cysteiny w pozycjach 183 i 281, jako aminokwasu warunkującego przebieg reakcji hydrolizy fosfotyrozyny.

Prostatowa fosfataza kwaśna budzi coraz większe zainteresowanie ze względu na niewyjaśnione w pełni funkcje plazmowego enzymu, jego powinowactwo do fosfotyrozyny, jak również mechanizmy androgenowej kontroli jego syntezy [9].

2.4. Fosfatazy kwaśne układu rozrodczego knura – badania własne

Gatunkowo specyficzne cechy ejakulatu knura, uwarunkowane anatomicznie rozbudowanymi gruczołami pęcherzykowymi, które są miejscem syntezy i sekrecji szeregu białkowych i niebiałkowych składników plazmy nasienia [21], od wielu lat stanowią przedmiot zainteresowań naszego zespołu.

W przypadku nasilonej eksploatacji płciowej knurów wykazano naruszenie dobowej produkcji plemników oraz stopniowe zachwianie sprawności sekrecyjnych najądrzy i gruczołów pęcherzykowych. Dobrymi wyznacznikami biochemicznymi dysfunkcji wydzielniczych dodatkowych gruczołów płciowych okazały się fosfataza kwaśna i fosfataza alkaliczna, których aktywność obniżała się istotnie statystycznie [20].

W poszukiwaniu źródeł sekrecyjnych fosfatazy kwaśnej w plazmie nasienia knura, przez przecięcie nasieniowodów (wazektomia) wyłączono sekrecję górnych odcinków układu rozrodczego, głównie najądrzy. Stwierdzono zmiany w profilu chromatograficznym i elektroforetycznym białek plazmowych, wzrost ich aktywności supresyjnej oraz około 60% obniżenie aktywności fosfatazy kwaśnej. Omawianym zmianom towarzyszył zanik form najądrzowych enzymu, co wskazywać mogło

na wieloźródłowe pochodzenie fosfatazy kwaśnej w plazmie nasienia tego gatunku zwierząt [19].

Z kolei zastosowanie atropiny do częściowej blokady sekrecji dodatkowych gruczołów płciowych knura spowodowało zmiany ilościowe wydzielin najądrzowych i pęcherzykowych. Zjawisko to przejawiało się wzrostem aktywności fosfatazy kwaśnej oraz zakłóceniami zymogramu. Mianowicie, po początkowym obniżeniu aktywności formy pęcherzykowej enzymu, pojawiała się ona ponownie w ejakulatach uzyskanych po upływie 90 minut od iniekcji atropiny [17].

Długookresowa iniekcja (60 dni) niskich dawek syntetycznego antyandrogenu – octanu cyproteronu (CPA), obok zaburzeń wskaźników ilościowych i jakościowych nasienia, doprowadziła do zakłócenia sekrecji białkowych i niebiałkowych komponentów plazmy nasienia. Jednak w przypadku fosfatazy kwaśnej nie obserwowano zmiany aktywności właściwej enzymu. Istotne zaburzenia dotyczyły natomiast zymogramu. Stwierdzono bowiem spadek aktywności form najądrzowych przy jednoczesnym wzroście aktywności formy pęcherzykowej fosfatazy kwaśnej [18].

W plazmie nasienia knura zidentyfikowano 4 formy molekularne fosfatazy kwaśnej, wśród których zdecydowanie dominują formy najądrzowe. Aktywność form najądrzowych obejmowała ponad 90% całkowitej puli aktywności fosfatazy kwaśnej [22]. Biorąc pod uwagę rolę najądrzy w biochemicznym procesie dojrzewania plemników oraz degradacji plemników starzejących się, funkcja kwaśnej fosfatazy dotyczyć może wspomagania enzymów nukleolitycznych w omawianych procesach.

Zastosowanie technik chromatografii jonowymiennej i sączenia molekularnego pozwoliło na izolację z płynu gruczołów pęcherzykowych knura homogennej formy kwaśnej fosfatazy.

Monomeryczna struktura i niska masa cząsteczkowa (41 kDa) kwalifikowały wstępnie omawiany enzym do grupy cytoplazmatycznych form fosfataz fosfotyrozynowych (m. cz. 30–50 kDa) lub białkowych fosfataz fosfoseryno-fosfotreoninowych (m. cz. 42–44 kDa). Pęcherzykowa forma kwaśnej fosfatazy wykazuje szeroki zakres działania w pH 3,0–7,0 (optimum pH ok. 5,5). Niemniej jednak powyżej punktu izoelektrycznego enzymu ($pI=7,1$) następuje gwałtowny spadek aktywności enzymatycznej. Prezentowana cecha określa efektywny ładunek elektrostatyczny cząsteczki enzymu, co warunkować może jego powinowactwo do ufosforylowanych substratów. Do oryginalnych cech pęcherzykowej fosfatazy kwaśnej należy zaliczyć jej termostabilność. Dopiero po 30 minutach ogrzewania enzymu w obecności substratu w 80°C następowała kompletna inaktywacja enzymu. Należy podkreślić, że w temperaturze 4°C oraz przy pH 5,0 badany enzym zachowywał stosunkowo wysoką aktywność. Zastosowanie specyficznych substratów i inhibitorów, charakterystycznych dla różnych typów fosfataz, pozwoliło na określenie unikalnych właściwości katalitycznych enzymu izolowanego z płynu gruczołów pęcherzykowych knura. Wyznaczone parametry kinetyczne enzymu wskazały bowiem na duże powinowactwo do fosfotyrozyny oraz substratów oligopeptydowych

zawierających reszty fosfotyrozyny. Wartość K_m dla fosfotyrozyny była najmniejsza ($0,37 \times 10^{-3} M$) w porównaniu z syntetycznymi fosforanami p-nitrofenolu i fenolu (K_m odpowiednio: $0,87 \times 10^{-3} M$ i $1,62 \times 10^{-3} M$). Niemniej, substraty oligopeptydowe, tj. fragment 1–17 ludzkiej gastryny i C-końcowy odcinek hirudiny, zawierające fosfotyrozynę, okazały się substratami preferowanymi przez pęcherzykową formę kwaśnej fosfatazy. Wartości K_m były bowiem dla omawianych substratów ponad 100-krotnie niższe w porównaniu z wartościami wymienionymi uprzednio, chociaż obserwowano zróżnicowanie między badanymi peptydami.

Interesujących informacji dostarczyły badania nad wpływem specyficznych inhibitorów na aktywność badanego enzymu. Okazało się bowiem, że typowe dla białkowych fosfataz fosfotyrozynowych inhibitory, tj. jony wanadanowe, molibdenianowe oraz defostatyna, hamowały aktywność pęcherzykowej formy fosfatazy kwaśnej mierzonej wobec różnych substratów. W przypadku jonów wanadanowych i molibdenianowych efekt hamowania zależał od rodzaju substratu oraz stężenia inhibitora w mieszaninie inkubacyjnej. Stwierdzona wybiórczość substratowa działania inhibitorów potwierdziła nasze wcześniejsze sugestie, że izolowana forma pęcherzykowej fosfatazy kwaśnej wykazuje właściwości katalityczne charakterystyczne dla fosfataz białkowych, preferujących obecność fosfotyrozyny w strukturze cząsteczki białka lub peptydu. Biorąc pod uwagę fakt, że w hydrolizie monoestrów fosforanowych przez białka fosfatazowe dużą rolę pełnią jony metali, podjęto badania nad wpływem jonów Zn^{2+} na aktywność izolowanego preparatu kwaśnej fosfatazy. Nie stwierdzono jednak stymulującego wpływu różnych stężeń wymienionych jonów, jak również nie obserwowano zmian aktywności enzymu inkubowanego w obecności wersenianu disodowego, chelatora jonowego. Omawiana właściwość katalityczna pęcherzykowej kwaśnej fosfatazy wydaje się odróżniać ten enzym od wielu kwaśnych fosfataz tkankowych. Dla przykładu Agiolillo i Panara [1] wśród fosfataz zależnych od jonów cynkowych wyróżnili u człowieka dwie grupy enzymów, tj. niskocząsteczkowe Zn^{2+} -zależne kwaśne fosfatazy (m. cz. 60 kDa) występujące w mózgu, jądrach i prostaty oraz wysokocząsteczkowe (pow. 100 kDa) Zn^{2+} -zależne kwaśne fosfatazy charakterystyczne dla wątroby, nerek i jelit. Uzyskane rezultaty badań wskazują więc na to, że kwaśna fosfataza z gruczołów pęcherzykowych knura nie jest metaloproteina.

Według Zhang [31] w strategii katalitycznej fosfataz tyrozynowych cysteina pełni rolę cząsteczki nukleofilowej, tworząc tiofosforanowy kompleks przejściowy, w którego stabilizację zaangażowana jest arginina. Z kolei reszta kwasu asparaginowego inicjuje drugi etap reakcji, aktywując cząsteczkę wody, która powoduje rozpad (hydrolizę) tiofosforanowego kompleksu przejściowego. Zastosowanie w naszych badaniach jodoacetamidu, silnego blokera grup SH oraz obserwowane zdecydowane zahamowanie aktywności pęcherzykowej fosfatazy kwaśnej podkreśla znaczenie omawianych grup w funkcji katalitycznej badanego enzymu.

Przeprowadzane sekwencjonowanie N-końca izolowanego białka wykazało 92% homologię sekwencji trzynastu pierwszych aminokwasów z sekwencjami fosfataz kwaśnych prostaty człowieka i szczura. Należy nadmienić, że ostatnio podana została N-końcowa sekwencja aminokwasowa enzymu prostaty knura, która nie wykazuje jednak homologii z sekwencją uzyskaną w naszej pracowni dla enzymu izolowanego z płynu gruczołów pęcherzykowych. Nie stwierdzono również podobieństwa z wcześniejszymi sekwencjami enzymów prostaty człowieka i szczura. Enzym z płynu gruczołów pęcherzykowych knura charakteryzuje się odmiennymi właściwościami biochemicznymi w porównaniu z wymienionymi formami enzymów prostatowych. Przeprowadzone analizy wskazują, że jest on monomerem i nie jest wrażliwy na kwas winowy. Biorąc pod uwagę fakt, że w przypadku knura gruczoły pęcherzykowe spełniają wiodącą rolę sekrecyjną można przypuszczać, że główna funkcja wyizolowanej kwaśnej fosfatazy tyrozynowej dotyczy udziału w mechanizmach molekularnych kontrolujących stan fizjologiczny gruczołu.

W ostatnim okresie podjęto również próbę izolacji enzymu najądrzowego wykazującego ruchliwość elektroforetyczną do anody. Czteroetapowe postępowanie izolacyjne z zastosowaniem chromatografii jonowymiennej, chromatografii hydrofobowej, chromatografii powinowactwa oraz chromatogniskowania pozwoliło na bardzo duże oczyszczenie (55 000 razy) fosfatazy kwaśnej z ogólną wydajnością 55%. Homogenna elektroforetycznie forma AcP ma m. cz. ok. 50 kDa, zaś optimum pH wobec p-nitrofenylofosforanu wynosiło 4,3. Wartość stałej Michaelisa dla p-nitrofenylofosforanu określono na $0,63 \times 10^{-3}$ M, z kolei pI był około pH 7,0. Kwas L-winowy, wanadan sodowy i molibdenian amonowy hamowały aktywność AcP. Przy 5 mM stężeniu omawianych inhibitorów obserwowano obniżenie aktywności enzymu odpowiednio o 40, 35 i 75%. Wstępne wyniki badań wskazują na zróżnicowane właściwości katalityczne form molekularnych fosfataz kwaśnych, uwarunkowane tkankową sekrecją (najądrza, gruczoły pęcherzykowe). Enzym z najądrzy ma szereg właściwości odróżniających go od formy izolowanej z gruczołów pęcherzykowych, co prawdopodobnie związane jest z odrębnymi funkcjami fizjologicznymi w poszczególnych odcinkach układu rozrodczego i nasieniu knura. Stąd aktywność form molekularnych fosfatazy kwaśnej plazmy nasienia może być wykorzystana w diagnostyce funkcji fizjologicznych narządów układu rozrodczego knura.

LITERATURA

- [1] ANGIOLILLO A, PANARA F. Human liver high molecular weight zinc-dependent acid p-nitrophenylphosphatase. Purification and properties. *Biol Pharm Bull* 1997; **20**: (12): 1235–1239.
- [2] AUMÜLLER G, SEITZ J. Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int Rev Cyt* 1990; **121**: 127–231.

- [3] AUMÜLLER G, VEDDER H, ENDERLE-SCHMITT U, SEITZ J. Cytochemistry and biochemistry of acid phosphatases VII: Immunochemistry of canine prostatic acid phosphatase. *The Prostate* 1987; **11**: 1–15.
- [4] CHRISTENSON RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 1997; **30** (8): 573–593.
- [5] FLECKENSTEIN E, DREXLER HG. Tartrate-resistant acid phosphatase: gene structure and function. *Leukemia* 1997; **11**: 10–13.
- [6] GONZALES LW, MEIZEL S. Acid phosphatase of rabbit spermatozoa. Electrophoretic characterization of the multiple forms of acid phosphatase in rabbit spermatozoa and other semen constituents. *Biochim Biophys Acta* 1973; **320**: 166–179.
- [7] GUHA K, VANHA-PERTTULA T. Acid phosphatases in the mouse testis: activity changes during development. *Arch Androl* 1983; **10**: 7–16.
- [8] KUBICZ A. Kwaśne fosfatazy – heterogenność, budowa chemiczna oraz właściwości fizykochemiczne. *Post Bioch* 1973; **19**(1): 37–54.
- [9] LIN MF, MENG TC, RAO PS, CHANG C, SCHNTHAL AH, LIN FF. Expression of human prostatic acid phosphatase correlates with androgen-stimulated cell proliferation in prostate cancer cell lines. *J Biol Chem* 1998; **273**(10): 5939–5947.
- [10] LIN MF, MENG TC. Tyrosine phosphorylation of a 185 kDa phosphoprotein pp185 inversely correlates with the cellular activity of human prostatic acid phosphatase. *Bioch Biophys Res Commun* 1996; **226**: 206–213.
- [11] MANN T, LUTWAK-MANN C. Male reproductive function and semen. Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. Berlin; Springer Verlag 1981.
- [12] NAKANISHI M, YOH K, UCHIDA K, MARUO S, MATSUOKA A. Improved method for measuring tartrate-resistant acid phosphatase in serum. *Clin Chem* 1998; **44**(2): 221–225.
- [13] NGUYEN L, CHAPDELAIN A, CHEVALIER S. Prostatic acid phosphatase in serum of patients with prostatic cancer is a specific phosphotyrosine acid phosphatase. *Clin Chem* 1990; **36**: 1450–1455.
- [14] OSTROWSKI WS. Kwaśna fosfataza ludzkiego gruczołu krokowego. Ossolineum 1988.
- [15] RAMPONI G, STEFANI M. Structure and function of the low M_r phosphotyrosine protein phosphatases. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1341**: 137–156.
- [16] SINGER R, BARNET M, ALLALOUF D, SCHWARTZMAN S, SAGIV M, LANDAU B, SEGENREICH E, SERVADIO C. Some properties of acid and alkaline phosphatase in seminal fluid and isolated sperm. *Arch Androl* 1980; **5**: 195–199.
- [17] STRZEŻEK J, FRASER L, HOŁODY D, WYSOCKI P. Biochemical properties and usefulness of boar semen for liquid preservation following atropine administration. *J Vet Med* 1998; **45**: 459–470.
- [18] STRZEŻEK J, FRASER L, WYSOCKI P, KORDAN W, HOŁODY D, DOBRZYŃSKA B. Accessory sex glands for boar: inhibition of their activity by antiandrogen cyproterone acetate. *Fertilitât* 1998; **13**: 244–250.
- [19] STRZEŻEK J, HOŁODY D, TORSKA J, DEMIANOWICZ W, WYSOCKI P. Postvasectomy changes in biochemical composition of the boar seminal plasma. *Reprod Dom Anim* 1996; **31**(1): 247–248.
- [20] STRZEŻEK J, TORSKA J, BORKOWSKI K, GLOGOWSKI J, WYSOCKI P, HOŁODY D. The biochemical characteristics of boar seminal plasma during high ejaculation frequency. *Reprod Dom Anim* 1995; **30**: 77–84.
- [21] STRZEŻEK J. Nasienie i użytkowanie rozplodowe knura. [w] Wierzbowski S. [red.] Andrologia. Wydawnictwo PLATAN-Kryspinów 1996; 201–217.
- [22] WYSOCKI P, STRZEŻEK J. Molecular forms of acid phosphatase of boar seminal plasma. *Anim Sci Pap Rep* 2000; **18**(2): 99–106.

- [23] VALENCIA AM, OLIVA JL, BONDEGA G, CHILOECHES, LOPEZ-RUIZ P, PRIETO JC, SUSINI C, COLAS B. Identification of a protein-tyrosine phosphatase (SHP1) different from that associated with acid phosphatase in rat prostate. *FEBS Lett* 1997; **406**: 42–48.
- [24] VANHA-PERTTULA T, MATHER JP, BARDIN CW, MOSS SB, BELLVE AR. Acid phosphatases in germinal and somatic cells of the testes. *Biol Reprod* 1986; **35**: 1–9.
- [25] VAUBOURDOLLE M, CLAVEL JP, CYNOBER L, PITON A, GALLI A. Acid phosphatase and zinc in semen of subject with no clinical evidence of prostatic disease. *Clin Chem* 1985; **31(6)**: 878–880.
- [26] VIHKO P, KURKELA R, PORVARI K, HERRALA A, LINDFORS A, LINDQVIST Y, SCHNEIDER G. Rat acid phosphatase: overexpression of active, secreted enzyme by recombinant baculovirus-infected insect cells, molecular properties and crystallization. *Proc Natl Acad Sci* 1993; **19**: 799–803.
- [27] VINCENT JB, CROWDER MW. Phosphatases in cell metabolism and signal transduction: structure, function and mechanism of action. Heidelberg; Springer-Verlag 1995: Germany.
- [28] VON DER KAMMER H, SCHEIT KH, WEIDNER W, COOPER TG. The evaluation of markers of prostatic function. *Urol Res* 1991; **19**: 343–347.
- [29] YOSHIDA K, HONDA M, ARAI K, HOSOYA Y, MORIGUCHI H, SUMI S, UEDA Y, KITHARA S. Serial lectin affinity chromatography with concanavalin A and wheat germ agglutinin demonstrates altered asparagine-linked sugar chain structures of prostatic acid phosphatase in human prostate carcinoma. *J Chromatography* 1997; **695**: 439–443.
- [30] ZHANG XQ, LEE MS, ZELIVIANSKI S, LIN MF. Characterization of a prostate-specific tyrosine phosphatase by mutagenesis and expression in human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2001; **276(4)**: 2544–2550.
- [31] ZHANG ZY. Structure, mechanism and specificity of protein-tyrosine phosphatases. *Current Topics Cell Regul* 1997; **35**: 21–67.

Adres autora: 10-718 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 5
e-mail kbz@uwm.edu.pl

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

Sekcja
ROZRÓD ZWIERZĄT
ANIMAL REPRODUCTION

ROZBUDOWA ZWIĘKSZENIA

ANIMAL EXPERIMENTAL

PERSPEKTYWY KLONOWANIA SOMATYCZNEGO DLA HODOWLI, FARMACJI I MEDYCYNY ORAZ ZACHOWANIA GINĄCYCH RAS I GATUNKÓW SSAKÓW

SOMATIC CLONING: PERSPECTIVES FOR ANIMAL BREEDING,
PHARMACY, MEDICINE, AND FOR PRESERVATION
OF ENDANGERED MAMMALIAN BREEDS AND SPECIES

Jacek A. MODLIŃSKI, Jolanta KARASIEWICZ

Zakład Embriologii Doświadczalnej, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN,
Jastrzębiec

Streszczenie: Mimo że efektywność klonowania somatycznego nie przekracza 1–2% urodzonych zwierząt w stosunku do liczby zrekonstruowanych oocytów, to klonowanie wykorzystywane jest do powielania zwierząt o szczególnych wartościach hodowlanych lub odporności na choroby, a także do uzyskiwania zwierząt transgenicznych produkujących w mleku lub w moczu ludzkie białka terapeutyczne. Szczególnie szeroko omówiono zastosowanie klonowania somatycznego do ratowania ginących ras i gatunków ssaków, a nawet do restytucji gatunków już wymarłych. Przedyskutowano wyłaniające się w wyniku dotychczasowych doświadczeń wątpliwości dotyczące mechanizmów leżących u podstaw metodyki klonowania (aktywacja oocytu, wybór fazy G0/G1 cyklu komórkowego jądra) oraz przyczyn zaburzeń rozwojowych u klonowanych zwierząt i wieku sklonowanych osobników.

(Postępy Biologii Komórki 2001; 28 supl. 18: 157–176)

Słowa kluczowe: klonowanie somatyczne, cykl komórkowy, hodowla, rzadkie i zagrożone gatunki, anomalie rozwojowe

Summary: Although the efficiency of somatic cloning does not exceed 1–2% of born animals in relation to reconstituted oocytes, the cloning is being used to multiply animals of particularly high breeding value or immunological resistance, as well as to obtain transgenic animals producing human therapeutic proteins in milk or urine. An extensive overview has been presented of the possible role of somatic cloning in the rescue of endangered breeds and species of mammals, and in the restitution of already extinct ones. The doubts are discussed, which have emerged from up to now experiments and which concern the mechanisms underlying methods of cloning (oocyte activation, the choice of G0/G1 phase of the cell cycle of donor nucleus) and the causes of developmental abnormalities in cloned animals as well as the age of cloned specimen.

(Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18: 157–176)

Key words: somatic cloning, cell cycle, breeding, rare and endangered species, abnormalities

WSTĘP

Od momentu narodzin Dolly i Cumuliny [58,49], kiedy stało się wiadome, że możliwe jest uzyskanie ssaków w wyniku transplantacji do wyjądrzonych (enukleowanych) oocytów jąder pochodzących z komórek dorosłych zwierząt, **klonowanie somatyczne** wyodrębniło się jako nowy kierunek badań i wkrótce zostało jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się dziedzin biotechnologii rozrodu.

W ciągu czterech lat metodą klonowania somatycznego otrzymano bydło, owce, kozy, świnię, myszy, a ostatnio nawet gaura. Chociaż efektywność klonowania somatycznego jest ciągle bardzo niska i nie przekracza 1–2% urodzonych zwierząt w stosunku do liczby zrekonstruowanych oocytów i średnio 10% w stosunku do liczby rozwijających się zarodków przeszczepionych do biorczyń, to problematyka klonowania somatycznego wzbudza ogromne, i ciągle rosnące zainteresowanie. Przyczyny tego są wielorakie, zarówno poznawcze jak i czysto praktyczne. Analiza interakcji jądro-cytoplazmatycznych w hybrydowych komórkach uzyskanych w wyniku transplantacji jąder komórek zróżnicowanych do „niezróżnicowanej” cytoplazmy oocytu umożliwi z pewnością lepsze zrozumienie mechanizmów różnicowania komórkowego, jak również przyczyni się – być może – do pełniejszego poznania mechanizmów starzenia się komórek i organizmu. Dla hodowli klonowanie somatyczne stwarza możliwości powielania zwierząt o szczególnej wartości genetycznej i użytkowej. Dla farmacji stwarza ono realne perspektywy znacznie efektywniejszego, a co za tym idzie, znacznie tańszego uzyskiwania zwierząt transgenicznych produkujących w mleku lub w moczu cenne ludzkie białka terapeutyczne. Dla medycyny wreszcie klonowanie somatyczne otwiera drogę do uzyskania źródła narządów do ksenotransplantacji, jak również stwarza perspektywy komórkowej terapii wielu ciężkich chorób. Ostatnio zwraca się również coraz większą uwagę na możliwość wykorzystania metod embriologii doświadczalnej, w tym klonowania somatycznego, w ratowaniu ginących ras i gatunków ssaków [8], a nawet w restytucji gatunków już wymarłych.

METODYCZNE ASPEKTY KLONOWANIA SOMATYCZNEGO

W somatycznym klonowaniu ssaków, do enukleowanego oocytu wprowadzane jest drogą elektrofuzji, lub – coraz częściej – mikrochirurgicznie, jądro komórki somatycznej. Komórki-dawcy jąder pochodzą z tkanek płodowych, tkanek osobników dorosłych lub też hodowanych *in vitro* linii komórkowych. W przeciwieństwie do klonowania zarodkowego, w którym jądra wprowadzane są z reguły do uprzednio

aktywowanych oocytów (pre-aktywacja), w klonowaniu somatycznym jądra komórkowe wprowadzane są do nieaktywowanych oocytów metafazowych (oocyty MII). W oocytach takich pod wpływem MPF (ang. *maturation/meiosis/mitosis promoting factor*) dochodzi do zaniku otoczki jądrowej (NEBD; ang. *nuclear envelope break-down*), kondensacji chromatyny i wyróżnicowania się chromosomów (PCC; ang. *premature chromosome condensation*). Nie wiadomo – jak do tej pory – dlaczego NEBD i PCC, których zdecydowanie niekorzystny wpływ na rozwój rekonstruowanych zarodków stwierdzono w przypadku klonowania zarodkowego, sprzyjają przemodelowaniu i przeprogramowaniu jąder komórek somatycznych. Sądzić można jednak, że wystawienie „nagiej”, silnie skondensowanej – po zejściu PCC – chromatyny jąder somatycznych oraz białek jądrowych na długotrwałe działanie czynników operujących w cytoplazmie oocytów MII jest warunkiem koniecznym do tego, aby zaszło pełne przemodelowanie i przeprogramowanie jąder somatycznych, co z kolei jest *conditio sine qua non* prawidłowego rozwoju rekonstruowanych oocytów. Można również przypuszczać, że przemodelowanie wprowadzonych jąder somatycznych nie jest zjawiskiem jednorazowym, lecz ciągiem przemian zachodzących podczas kolejnych mitoz. Z tego względu dodatkowa runda NEBD i PCC, jakim ulegają jądra w cytoplazmie oocytów MII, może mieć korzystny wpływ na ich przemodelowanie. W kilka godzin po wprowadzeniu jądra oocyty są aktywowane (post-aktywacja). Dochodzi wtedy do dekondensacji chromatyny, odtworzenia otoczki jądrowej i utworzenia jądra interfazowego. Dotychczasowe badania wskazują również, że w przypadku klonowania somatycznego komórkodawcy jąder powinny być w fazie G0/G1 cyklu komórkowego. Osiągnąć to można bądź przez używanie komórek będących naturalnie w tej fazie cyklu (np. komórek nerwowych, komórek pęcherzykowych lub komórek Sertolego), przez hodowlę komórek w pożywce o drastycznie obniżonej zawartości surowicy lub też przez ich sortowanie w cytometrze przepływowym. Dokładny opis metodyki klonowania somatycznego zawarty jest w opublikowanych ostatnio artykułach Tsunody i Kato [43] oraz Modlińskiego i wsp. [26]

W badaniach nad klonowaniem somatycznym przetestowano w ostatnich miesiącach – jako dawców jąder – komórki pochodzące z kilkunastu rodzajów tkanek pobranych zarówno z płodów, jak i ze zwierząt dorosłych obojga płci będących w różnym wieku [19,51] (przegląd w [28]). Uzyskano sklonowane zwierzęta po transplantacji jąder komórek pobranych z wielu tkanek, narządów i części ciała (tab. 1), jednak tylko w kilku przypadkach ich fenotyp był łatwy do określenia (komórki pęcherzykowe, leukocyty, komórki nabłonka jajowodu i macicy oraz fibroblasty skóry). W większości przypadków, gdy komórki pobierane były z ucha, ogona, mięśni, gruczołu mlekowego, gonad i płuc płodowych, ich fenotyp był trudny do określenia. Przypuszczać jednak można, że we wszystkich tych przypadkach dawcami jąder były fibroblasty lub fibrocyty. Jądra innych komórek o określonym fenotypie, takich jak: neurony, komórki Sertolego dorosłych zwierząt czy też komórki

TABELA 1. Wykorzystanie jąder komórek dorosłych osobników w somatycznym klonowaniu ssaków

Gatunek	Typ komórek dawców jąder	Pochodzenie, płeć, szczerp (rasa)	Wyniki
Mysz	komórki pęcherzykowe	<i>cumulus oophorus</i> – warstwa ziarnista owulowanych oocytów, samice, B6D2F1, B6C3F1	myszysamice [49]
	komórki nerwowe	mózg, samice, B6D2F1	7 dn. płody/samice [49]
	komórki Sertoliego	jądra noworodków, samce, różne linie myszy F1	myszysamce [30]
	komórki ogona	koniec ogona, samce, B6C3F1	myszysamce [50]
Owca	nieznany	gruczoł mleczny, ciężarna 6-letnia samica, Finn Dorset	jagnię/samica [58]
Bydło	komórki pęcherzykowe	<i>cumulus oophorus</i> – warstwa ziarnista owulowanych oocytów, samice, Japońska czarna	cielęta/samice [18]*
	komórki nabłonkowe	jajowód, samice, Japońska czarna	cielęta/samice [18]*
	komórki pęcherzykowe	warstwa ziarnista pęcherzyka jajnikowego, samice, rasa nie podana	cielęta/samice [54]**
	fibroblasty	ucho, samce, Japońska czarna ucho, samice, Japońska czarna i Holstein	cielęta/samce cielęta/samice [19]
	komórki z mięśni (fibroblasty? fibrocyty?)	mięsień najdłuższy grzbietu, samce, Japońska czarna	cielęta/samce [41]
	leukocyty	krew obwodowa, samice, Brown Swiss	cielę/samiec [11]
	fibroblasty	skóra, samice, Japońska czarna skóra, noworodek samiec, Holstein skóra, noworodek samica, Holstein	cielę/samica cielę/samiec cielę/samica [19]
	komórki wątroby	wątroba, noworodek samiec, Holstein	cielę/samica [19]
	komórki nabłonkowe gruczołu mlecznego	siara, samica, Holstein	cielęta/samice [20]
Świnie	komórki pęcherzykowe	warstwa ziarnista pęcherzyka jajnikowego, samice, Large White x Landrace x Duroc	prosięta/samice [35]

*Urodzone cielęta (8 osobników) stanowiły klon, gdyż komórki pęcherzykowe i komórki nabłonka jajowodu pochodziły od jednej krowy.

**Uzyskano klon liczący 10 cieląt. Jest to najliczniejszy, jak do tej pory, klon uzyskany u bydła w wyniku klonowania somatycznego.

nerki, podtrzymywały rozwój rekonstruowanych zarodków tylko do wczesnego etapu ciąży (przegląd w [28,56]). Nie wiadomo jednak, czy różnice w potencjach rozwojowych zarodków rekonstruowanych w wyniku transplantacji jąder różnych rodzajów komórek wynikają z różnej podatności ich jąder na przemodelowanie i przeprogramowanie w cytoplazmie oocytów MII, czy też odgrywają tu rolę jakiegoś inne czynniki, takie jak na przykład niedoskonałości stosowanych obecnie metod wprowadzania jąder i metod aktywacji oocytów.

KLONOWANIE SOMATYCZNE A HODOWLA ZWIERZĄT

Powszechnie uważa się, że klonowanie somatyczne przyspieszyć może znacznie postęp hodowlany umożliwiając uzyskanie w krótkim czasie dużej liczby identycznych zwierząt o najbardziej wartościowych, ściśle określonych genotypach. Zapomina się jednak często o tym, że zwierzęta uzyskiwane w wyniku klonowania somatycznego są jedynie „kopiami genetycznymi” genomu zawartego w jądrze klonowanego osobnika, a nie jego wiernymi replikami. Pomija się bowiem wpływ na identyczność uzyskiwanych klonów takich czynników, jak: mutacje, mitochondrialny DNA oocytów czy też efekty matczyne spowodowane przez zastępcze matki. Nie bez znaczenia są również dotychczasowe koszty klonowania somatycznego, które w chwili obecnej są całkowicie nieopłacalne dla hodowców. Z niezwykle dokładnej analizy przeprowadzonej przez Van Vleeka [47] i dotyczącej możliwości praktycznego zastosowania klonowania w hodowli zwierząt gospodarskich wynika, że korzyści płynące ze stosowania tej metody nie są dla hodowli tak jednoznaczne, jak się powszechnie uważa.

Tym niemniej jednak, przeprowadzane są już obecnie w USA pierwsze próby klonowania u bydła szczególnie wartościowych osobników. Sklonowano dwie krowy rasy Brangus i Charolais, które na podstawie bardzo dokładnej oceny selekcyjnej uznano za *top performers*. Urodzone jałówki uzyskano jedynie po transferze jąder fibroblastów pochodzących ze skóry krowy rasy Charolais, natomiast wszystkie płody powstałe po transplantacji jąder fibroblastów krowy rasy Brangus obumarły w ciągu pierwszych 90 dni ciąży [56]. W ubiegłym roku dokonano również w Kanadzie udanej próby sklonowania jednego z najlepszych na świecie buhajów, buhaja Hanoverhill Starbuck, dwa lata po jego śmierci.

Oprócz możliwości powielania u zwierząt gospodarskich szczególnie cennych okazów ras mlecznych i mięsnych, duże znaczenie dla hodowli zwierząt miałyby uzyskanie klonów cechujących się dużą odpornością na choroby, w tym również na choroby pasożytnicze. Pierwszym krokiem, jaki zrobiono w tym kierunku, jest podjęta obecnie w USA próba sklonowania buhaja rasy Black Angus, u którego stwierdzono naturalną, genetycznie uwarunkowaną odporność na brucellozę. Po transferze do 20 biorczyń 39 blastocyst otrzymanych po wprowadzeniu do oocytów jąder fibroblastów uzyskano 10 ciąż, z których dwie mają szanse, aby były donoszone

do końca [56]. Rozważana jest również – jak na razie teoretycznie – możliwość zastosowania technik wspomaganego rozrodu (ART; ang. *assisted reproduction technologies*), w tym klonowania somatycznego, do uzyskania bawołów afrykańskich (*Syncerus caffer caffer*) wolnych od gruźlicy i brucellozy (bawoły te żyją na terenach endemicznego występowania tych chorób), a następnie wprowadzenia takich zwierząt na tereny, gdzie te choroby nie występują. Rosnącym zainteresowaniem cieszą się też rasy bydła i owiec pochodzące z izolowanych wysp nowozelandzkich, a także bardzo rzadka już dziś rasa owiec Gulf Coast Native, u których wytworzyła się duża, niespotykana u innych ras odporność na pasożyty zwierzęce.

Dla hodowli bardzo istotna jest obecnie możliwość uzyskania – drogą sterowanej mutagenyzy (ang. *gene targeting*) oraz klonowania somatycznego – zwierząt ze zinaktywowanym genem białka prionowego (PrP^{Sc}; ang. *proteinase-resistant protein*) odpowiedzialnego za powstawanie pasażowalnych encefalopatii gąbczastych (TSEs; ang. *transmissible spongiform encephalopathies*), zwłaszcza *scrapie* u owiec i BSE (ang. *bovine spongiform encephalopathy*) u bydła. Ma to o tyle istotne znaczenie, oprócz powodów czysto ekonomicznych, że istnieją uzasadnione podejrzenia o zoonotyczne powiązania pomiędzy BSE a nową odmianą choroby Creutzfeldta-Jakoba (nvCJD; ang. *new variant Creutzfeldt-Jakob Disease*) u ludzi, i której pierwszy przypadek opisano w 1996 r. [13,57]. Badania w tym kierunku rozpoczęto u myszy i wykazano, że inaktywacja tego genu nie wywołuje u nich żadnego szkodliwego efektu, a myszy z homozygotycznym nokautem PrP^{Sc} są odporne na *scrapie* po wprowadzeniu do ich organizmu prionów; myszy kontrolne umierały po 5–6 miesiącach [5,53]. Uzyskanie transgenicznych osobników u bydła i owiec odpornych na BSE i *scrapie* i ich powielenie metodą klonowania somatycznego jest o tyle istotne, że – jak tego dowodzą wieloletnie badania przeprowadzone w Wlk. Brytanii i USA na dużej liczbie zwierząt – encefalopatie te nie są przenoszone przez zarodki, nawet jeżeli zostały one przeszczepione do biorczyń, u których choroby te zostały później stwierdzone. Bardzo dokładne omówienie tego problemu zawarte jest w opublikowanej niedawno pracy Wrathalla [61].

ZASTOSOWANIE KLONOWANIA SOMATYCZNEGO W FARMACJI I MEDYCYNIE

Możliwości wykorzystania klonowania somatycznego w uzyskiwaniu i namnażaniu transgenicznych zwierząt wytwarzających ludzkie białka terapeutyczne, jak również będących źródłem narządów do ksenotransplantacji, zostały ostatnio szczegółowo omówione [28,29]

Najnowsze badania nad sterowaną mutagenezą u zwierząt gospodarskich [2,25] (komentarz w [7]) przyniosą niewątpliwe korzyści dla medycyny i farmacji. Być może stanie się możliwe uniczyńnienie antygenów transplantacyjnych przy kseno-

transplantacjach, inaktywacja genów odpowiedzialnych za powstawanie chorób neurodegeneracyjnych, a także precyzyjne wprowadzanie transgenów odpowiedzialnych za wytwarzanie u zwierząt transgenicznych ludzkich białek terapeutycznych. Sterowaną mutagenезę przeprowadzono wcześniej jedynie u myszy, przede wszystkim z tego powodu, że do niedawna nie udało się u innych gatunków ssaków uzyskać linii pierwotnych komórek zarodkowych. W tym kontekście celowane wprowadzenie genów do fibroblastów płodowych owcy należy uznać za osiągnięcie dużej rangi. Transgen AATC2 złożony z ludzkiego genu α -1-antytrypsyny i promotora, jakim był gen owczej β -laktoalbuminy zapewniający ekspresję w gruczole mlekowym wprowadzony został w *locus* owczego genu α 1(1)prokolagenu (COL1A1). Gen COL1A1 został wybrany z trzech powodów: po pierwsze przejawia wysoką ekspresję w fibroblastach, po drugie jest jednym z niewielu dobrze poznanych, scharakteryzowanych i sklonowanych owczych genów (jest poza tym wysoce konserwatywnym genem u wielu gatunków ssaków), a po trzecie mutacja tego genu może powodować u ludzi schorzenia tkanki łącznej, takie jak np. niewłaściwe kostnienie (*osteogenesis imperfecta*). Po przeszczepieniu do enukleowanych oocytów jąder tak genetycznie zmodyfikowanych fibroblastów i transferze rekonstruowanych zarodków do biorczyń, otrzymano jagnięta Kupida i Dianę, pierwsze – inne niż mysz – transgeniczne zwierzęta uzyskane w drodze sterowanej mutagenезy [25].

Klonowanie w odniesieniu do człowieka budzi największe kontrowersje. Różnić należy dwa możliwe rodzaje klonowania somatycznego u ludzi: klonowanie reprodukcyjne i klonowanie terapeutyczne. To ostatnie zostało wcześniej szczególnie omówione [17]. Jeśli chodzi natomiast o klonowanie reprodukcyjne, to rozważane jest w niektórych krajach dopuszczenie tego typu klonowania w terapii szczególnie uzasadnionych przypadków niepłodności. Dotyczyłoby to tylko tych przypadków, kiedy mężczyzna jest całkowicie niepłodny (np. na skutek wypadku) lub też kiedy zawodzą wszystkie inne metody wspomaganego zapłodnienia, w tym: IVF (ang. *in vitro fertilization*), ICSI (ang. *intracytoplasmic sperm injection*), ROSI (ang. *round spermatid injection*) i ELSI (ang. *elongated spermatid injection*), a nawet transplantacja jąder spermatocytów II rzędu. Należy dodać, że z biologicznego, jak i z metodycznego punktu widzenia zabieg ten jest całkowicie możliwy do przeprowadzenia, zwłaszcza w takich krajach, jak USA, w których istnieje legalny i dobrze rozwinięty rynek obrotu oocytami ludzkimi.

KLONOWANIE SOMATYCZNE A OCHRONA GINĄCYCH RAS I GATUNKÓW SSAKÓW

Według *World Watch List for Domestic Animal Diversity* (WWL-DAD) [60] spośród 2719 skatalogowanych ras zwierząt gospodarskich (bydło, bawoły, świnie, owce, kozy, konie i osły) liczebność populacji jest znana w 1433 rasach. Z tej

liczby, 390 ras (27%) jest obecnie zagrożonych wyginieciem. Ze względu jednak na to, że uzyskanie dokładnych informacji z wielu rejonów świata jest bardzo trudne lub wręcz niemożliwe, uważa się – na podstawie pośrednich informacji – że ogólna liczba ras zwierząt gospodarskich żyjących na świecie (wliczając w tę liczbę rasy udomowionego ptactwa) jest znacznie większa i wynosi około 4 000. Przyjmując, że – podobnie jak w przypadku ras o znanej liczebności – 27% z nich osiągnęło stan krytyczny lub stan zagrożenia, otrzymujemy liczbę ponad tysiąca ras, które w najbliższym czasie mogą zniknąć z powierzchni Ziemi. Jeżeli – jak się uważa – około 5% z tych ras znika w ciągu roku, oznacza to, że przeciętnie **co tydzień ginie na świecie jedna rasa zwierząt gospodarskich**. Według danych z połowy lat dziewięćdziesiątych w okresie ostatnich kilkadziesiątu lat na świecie wyginęło już około 620 ras, głównie w Europie i na terenach byłego ZSRR.

Dramatyczna jest również sytuacja wielu dziko żyjących gatunków ssaków. Ze względu na częsty brak danych dotyczących liczebności i składu populacji, nie można w odniesieniu do dziko żyjących zwierząt stosować tych norm kwalifikacji zagrożenia gatunku, jakie są stosowane do ras gatunków udomowionych. Nie sposób jest oczywiście wymienić wszystkich gatunków ssaków zagrożonych wyginieciem, wystarczy jednak wspomnieć, że wśród około 25 dzikich gatunków i podgatunków bydła, bawołów i bizonów (krętorogie – *Bovidae*, podrodzina *Bovinae*) oraz 36 gatunków dzikich kotowatych (*Felidae*), większość uznana jest przez *World Conservation Union* (IUNC) *Red List* za gatunki zagrożone wyginieciem, a stan niektórych z nich określany jest jako krytyczny, a nawet skrajnie krytyczny. Dotyczy to, między innymi, seladanga (*Bos gaurus hubbacki*), którego populacja wynosi ok. 500 osobników i ulega gwałtownemu spadkowi, kupreja (*Bos suaveli*) – dzikiego gatunku bydła odkrytego w Indochinach dopiero w 1937 r. – najrzadszego prawdopodobnie gatunku dużego ssaka [52] oraz tamarawa (*Bubulus mindorensis*), którego liczebność spadła w ostatnim dziesięcioleciu z 10 000 do 250 sztuk i wykazuje dalszą tendencją spadkową. W ubiegłym roku wyginął bucardo (*Capra pyrenaica pyrenaica*), nominotypowy podgatunek koziorożca pirenejskiego. Wysoce krytyczna jest również sytuacja górskiego podgatunku antylopy bongo (*Boocercus eurycercus*); na wolności żyje nie więcej niż 50 zwierząt zamieszkujących niewielki górski rejon w Kenii.

Konieczność ochrony gatunków ginących nie ulega wątpliwości. Dlatego też, obok konwencjonalnych metod zwiększania liczebności ich populacji, takich jak rozmnażanie zwierząt w ogrodach zoologicznych i specjalnych fermach hodowlanych, czy też tworzenie rezerwatów i parków narodowych, coraz większą uwagę poświęca się technikom wspomaganego rozrodu (ART), zwłaszcza w odniesieniu do gatunków blisko spokrewnionych z tymi gatunkami udomowionymi, u których techniki te są już praktycznie stosowane. ART obejmują zarówno metody superowulacji, kriokonserwacji nasienia, zapłodnienia *in vitro*, przenoszenia zarodków, jak ich obecnie najwyższą formę, jaką jest klonowanie somatyczne.

Pierwszym przykładem zastosowania klonowania somatycznego do ratowania, a właściwie już restytucji, jednej ze skrajnie zagrożonych ras bydła było pomyślne sklonowanie ostatniej żyjącej krowy rasy Enderby Island [55]. Rasa ta wywodzi się z bydła typu shorthorn, sprowadzonego ok. 1800 r. przez wielorybników na należącą obecnie do Nowej Zelandii subantarktyczną wyspę Enderby Island. Z rasy tej, w 1996 roku pozostała już tylko jedna krowa. Z jej pęcherzyków jajnikowych pobrane zostały metodą OPU (*ovum pick-up*) komórki warstwy ziarnistej, których jądra wprowadzono do enukleowanych oocytów uzyskanych z jajników bydła rzeźnego. Z 22 blastocyst otrzymanych po hodowli *in vitro* rekonstruowanych oocytów i przeszczepionych do biorczyń popularnych ras bydła uzyskano dwa urodzone cielęta. Jedno z cieląt wykazywało wiele anomalii rozwojowych i zostało po dwóch dniach uśpione. Drugie było całkowicie normalne, a jego fenotyp, jak również analiza mikrosatelitarnego DNA, potwierdzają, że jest to cielę rasy Enderby Island. Obecnie prowadzone są próby uzyskania kolejnych sklonowanych cieląt. Przeprowadzono również pomyślne sklonowanie krowy pochodzącej z prymitywnej, rodzimej koreańskiej rasy HanWoo [15]. Jako dawców jąder użyto komórek pęcherzykowych oraz komórek nabłonka macicy.

O ile somatyczne klonowanie zagrożonych wyginięciem ras zwierząt gospodarskich napotyka jedynie na ogólnie znane trudności związane ze stosowaniem tej metody, to klonowanie zagrożonych dzikich gatunków ssaków stwarza dodatkowe problemy. U zwierząt gospodarskich, oocyty i komórki-dawcy jąder są jednogatunkowe; tego samego gatunku są również biorczyń, do których przeszczepiane są rekonstruowane zarodki. Natomiast w przypadku ginących gatunków dzikich zwierząt nie wchodzi w rachubę – w większości przypadków – pozyskiwanie oocytów od samic, a także przeszczepianie do nich rekonstruowanych zarodków. Powodem tego jest z jednej strony bardzo słabo poznana u wielu gatunków zarówno fizjologia rozrodu, jak i biologia rozwoju, z drugiej zaś zrozumiałe sprzeciw organizacji ochrony przyrody odnośnie stosowania ART u szczególnie rzadkich gatunków. Dlatego też, jedynym rozwiązaniem, które może być – przynajmniej obecnie – stosowane w praktyce, jest międzygatunkowe klonowanie somatyczne (ang. *interspecies somatic cloning*). W tym typie klonowania somatycznego, jądra komórek somatycznych (głównie fibroblastów skóry) pobranych metodą biopsji od zwierzęcia dzikiego gatunku przeszczepiane są do enukleowanych oocytów uzyskiwanych od samic blisko spokrewnionego gatunku udomowionego lub też od samic spokrewnionego, powszechnie występującego gatunku dzikiego, którego rozród jest względnie dobrze poznany i u którego ART są już stosowane. Do samic tych gatunków przeszczepiane powinny być też rekonstruowane oocyty. Badania Dominko i wsp. [9] wykazały, że jądra fibroblastów wielu gatunków ssaków mogą – po ich przeszczepieniu do enukleowanych oocytów bydłych – pokierować rozwojem rekonstruowanych oocytów przynajmniej do stadium blastocysty. Wiadomo również, dzięki pionierskim badaniom Allena i Rowsona [1] nad międzygatunkowym prze-

noszeniem zarodków (ang. *interspecies embryo transfer*), że u niektórych gatunków możliwe jest uzyskanie tą drogą zwierząt urodzonych z obcogatunkowych matek zastępczych. Przykładem tego są, między innymi, urodzenia źrebiąt licznych gatunków koniowatych po transferze zarodków tych gatunków do klaczy konia domowego (*Equus caballus*), cieląt antylopy bongo po transferze jej zarodków do antylopy eland (*Taurotragus oryx*), kociąt po transferze zarodków azjatyckiego kota stepowego (*Felis lybica ornata*) i kota nubijskiego (*Felis sylvestris lybica*) do samic kota domowego (*Felis catus*), a także cieląt po transferze zarodków gaura (*Bos gaurus*) i bantenga (*Bos javanicus*) do krów rasy Holstein.

Obserwacje te pozwoliły na przeprowadzenie pierwszej udanej próby sklonowania dorosłego osobnika z gatunku zagrożonego wyginięciem, a mianowicie gaura [23]. Z 692 rekonstruowanych oocytów uzyskano 81 blastocyst, z których 42 przeszczepiono do 42 krów-biorczyń. Osiem z nich zaszło w ciążę. Z dwóch ciężarnych krów pobrano płody w celu przeprowadzenia ich dokładnej analizy, cztery biorczynie poroniły w drugim i trzecim miesiącu ciąży, jedna biorczynie poroniła trzy miesiące później. Tylko jedna biorczynie donosiła ciążę do końca. Urodzone cielę, nazwane Noe, żyło tylko kilka dni. Przypuszczalną przyczyną jego śmierci nie były jednak – jak sądzą autorzy – czynniki związane z procedurą międzygatunkowego klonowania somatycznego (wstępne badania anatomo- i morfopatologiczne nie wykazały żadnych anomalii), lecz poważna infekcja, której nabawiła się zaraz po urodzeniu [48]. Nie można jednak wykluczyć, że samice zebru (*Bos indicus*) – gatunku, który pochodzi z tego samego rejonu co gaur – mogą okazać się lepszymi biorczyniami niż samice bydła domowego.

Noe jest (a raczej był) dowodem, że międzygatunkowe klonowanie somatyczne może być stosowane w ratowaniu ginących gatunków ssaków. W przypadku dzikich gatunków z rodzaju *Bos* mogą być używane – jako komórki-biorcy – enukleowane oocyty bydłce, a jako biorczynie krowy wielu ras bydła domowego. W przypadku innych gatunków z rodziny *Bovidae* sprawa nie jest jasna. Chociaż bizona i niektóre gatunki bawołów krzyżują się stosunkowo łatwo z bydlęciem domowym, dając często wartościowe użytkowo mieszańce (żubr x bydło – żubronie i żubrokrowy [12,21]; bizon preriowy x bydło – Beefalo [32], to międzyrodzajowe przeszczepianie zarodków bizonów amerykańskich, jak również zarodków niektórych gatunków bawołów (np. bawoła domowego i bawoła afrykańskiego do samic bydła domowego) kończy się zawsze niepowodzeniem. Płody obumierają (lub dochodzi do spontanicznych poronień) prawdopodobnie na skutek zarówno nieprawidłowych interakcji pomiędzy zarodkową częścią łożyska a śluzówką macicy, jak i immunologicznej reakcji biorczynie na obcorodzajowy płód. Dobór gatunku, którego samice będą dawczyniami oocytów, jak również biorczyniami rekonstruowanych zarodków, jest więc sprawą kluczową. Przypuszczalne modele międzygatunkowego klonowania somatycznego zagrożonych gatunków krętorogich przedstawione są w tabeli 2. W tabeli tej podane są też przeprowadzone do tej pory próby zastosowania technik

wspomagane go rozrodu (ART) u tych gatunków. W ostatnich latach prowadzonych jest jednak coraz więcej badań pozwalających – przy użyciu metod biologii molekularnej – na znacznie dokładniejsze ustalenie filogenetycznego pokrewieństwa dzikich gatunków *Bovidae* [4,39,42,44]. Badania te pozwolą, być może, na znacznie lepszy niż dotychczas, dobór gatunków, których samice byłyby dawczyniami oocytów oraz biorczyniami zarodków.

Obecnie zostały podjęte próby sklonowania górskiej odmiany antylopy bongo. Badania prowadzi *Audubon Institute Center for Research of Endangered Species* (AIRCRES) we współpracy z *Advanced Cell Technology* (ACT); według niepotwierdzonych informacji uzyskano już kilkunastokomórkowe zarodki po transferze jąder fibroblastów bongo do oocytów antylopy eland. ACT wraz z naukowcami z *Agriculture Research Service* w Saragossie przygotowują projekt zmierzający do odtworzenia bucardo. Ponieważ zostały zamrożone wycinki kilku rodzajów tkanek ostatniej samicy bucardo, a także uzyskano koźlęta po transferze do kozy domowej zarodków innego, spokrewnionego z bucardo podgatunku koziorożca pirenejskiego, istnieje szansa, że bucardo zostanie odtworzony.

Drugą rodziną ssaków, która jest – obok krętorogich – przedmiotem zainteresowania naukowców zajmujących się problematyką klonowania, są kotowate. Rozród wielu dzikich gatunków kotowatych został w ostatnich latach dość dobrze poznany. U wielu z nich stosowane są też techniki wspomaganego rozrodu. U 13 gatunków kotowatych zastosowano z powodzeniem hormonalną stymulację owulacji, jak również zapłodnienie *in vitro* (IVF) owulowanych oocytów. Efektywność IVF jest różna u różnych gatunków: od 0% u kota czarnotapego (*Felis nigripens*) i jaguara (*Panthera onca*), 20–30% u taraja (*Prionailurus viverrinus*), kota błotnego (chausa – *Felis chaus*), geparda (*Aciononyx jubatus*), lamparta (*Panthera pardus*), 50–80% u pumy (*Felis concolor*), karakala (*Lynx caracal*), jaguarundi (*Felis eyra*), tygrysa (*Panthera tigris*), lwa (*Panthera leo*) do ponad 80% u pantery mglistej (*Neofelis nebulosa*). U pumy, lwa i jaguara uzyskano rozwój *in vitro* zarodków po IVF do stadium powyżej 8 komórek [16], a u kota nubijskiego do stadium moruli [36]. Znacznie mniej danych jest odnośnie przenoszenia zarodków u dzikich kotowatych. Oprócz wspomnianych już wyżej międzygatunkowych transferów zarodków, próby przenoszenia zarodków u innych kotowatych zakończyły się pomyślnie jedynie u tygrysa [10].

W przypadku klonowania somatycznego małych, dziko żyjących kotowatych jądra komórkowe wprowadzane będą zapewne do oocytów kota domowego, którego samice byłyby również biorczyniami. Kot domowy stał się w ostatnich latach gatunkiem, u którego z powodzeniem stosuje się wiele metod wspomaganego rozrodu, w tym hormonalną stymulację owulacji, dojrzewanie i zapłodnienie oocytów *in vitro*, hodowlę zarodków *in vitro*, mrożenie zarodków, a także przenoszenie do biorczyń zarówno zarodków świeżych, jak i zamrożonych (przegląd w [36]). Ostatnio uzyskano również urodzone kocięta po ICSI [37], co wprowadza kota domowego

TABELA 2. Zastosowanie technik wspomaganego rozrodu (ART) – w tym międzygatunkowego klonowania somatycznego – w ochronie dzikich gatunków krętorogich (*Bovidae*)

Gatunek	Aktualny stan badań	Potencjalne dawczynie oocytów – biorczyńce zarodków
Gaur (<i>Bos gaurus</i>)	SC, SO, AI, IVF, ET, IET, ISC	bydło (<i>Bos taurus</i>), (<i>Bos indicus</i>)
Mithan (<i>Bos gaurus frontalis</i>)	SO, SC	bydło, zebru (?)
Seladeng (<i>Bos gaurus hubbaldi</i>)	SC, SO	bydło, zebru (?)
Banteng (<i>Bos javanicus</i>)	SC, SO, AI, ET, IET	bydło, zebru (?)
Kuprej (<i>Bos suaveli</i>)	nie są prowadzone	bydło (?), zebru (?)
Jak (<i>Bos mutus</i>)*	SO, ET	bydło (?), jak (forma udomowiona)
Tamaraw (<i>Bubalus mindorensis</i>)	badania są rozpoczęte, brak jednak dokładnych danych	bawół domowy (<i>Bubalus bubalis</i>) (?), arni (<i>Bubalus arnee</i>)(?)
Anoa nizinny (<i>Bubalus depressicornis</i>)	SO	bawół domowy, arni (?)
Anoa górski (<i>Bubalus quarlesi</i>)	SO	bawół domowy, arni (?)
Bizon leśny (<i>Bison bison athabascaae</i>)	SC, SO, IVF	bizon preriowy (<i>Bison bison</i>)
Żubr (<i>Bison bonassus</i>)		bydło (?)
Bawół afrykański (<i>Syncerus caffer caffer</i>)	SC, SO, IVF	bawół domowy (?)
Bawół afrykański karłowaty (<i>Syncerus caffer nanus</i>)	brak danych	bawół domowy (?)
Antylopa bongo – podgatunek górski (<i>Boocercus euryceros</i>)	SO, ET, IET	antylopa eland (<i>Taurotragus oryx</i>)
Bucardo (<i>Capra pyrenaica pyrenaica</i>) #	ISC (planowany)	koza domowa (<i>Capra hircus</i>)

Objaśnienia: AI – sztuczna inseminacja, ET – przenieszenie zarodków, IET – międzygatunkowe przenieszenie zarodków, ISC – międzygatunkowe klonowanie somatyczne, IVF – zapłodnienie *in vitro*, SC – kriokonserwacja nasienia, SO – superowulacja;

*Badania prowadzone są na jaku udomowionym celem ochrony malejącej populacji jaka dzikiego.

podgatunek wymarły; (?) gatunki, co do których istnieją jedynie przypuszczenia, głównie na podstawie pokrewieństwa filogenetycznego, że ich samice mogą być one dawczyniami oocytów i biorczyńcami.

do tej nielicznej grupy ssaków, w których mikrochirurgiczne zapłodnienie oocytów jest z powodzeniem stosowane (mysz, królik, bydło i człowiek). Dodanie cysteiny do pożywki, w której dojrzewają oocyty kocie, przy jednoczesnej redukcji poziomu tlenu w mieszaninie gazowej, pozwoliło – po ich zapłodnieniu *in vitro* – na zwiększenie odsetka zarodków rozwijających się do stadium blastocysty do ponad 50% [38]. Jest to wynik lepszy niż wyniki uzyskiwane u myszy, i porównywalny z najlepszymi wynikami uzyskiwanymi u bydła. W kilku laboratoriach na świecie

regularnie uzyskuje się kocięta po transferze zarodków rozwijających się z zapłodnionych *in vitro* oocytów. W ACT uzyskano również zarodki po transferze jąder komórek somatycznych do enukleowanych oocytów kocich [24] jednak – jak do tej pory – żadna z biorczyń nie donosiła ciąży do końca. Wszystko wskazuje jednak na to, że w niedługim czasie można spodziewać się narodzin pierwszych klonów kocich, a być może również sklonowania któregoś z dziko żyjących gatunków kotów, w następstwie międzygatunkowego klonowania somatycznego. Dowodem na to, jest opublikowane ostatnio doniesienie o próbie sklonowania zagrożonego wyginięciem koreańskiego podgatunku tygrysa (*Panthera tigris altaica*). Jądra fibroblastów pobranych z ucha dorosłej tygrysy wprowadzone zostały (po procedurze „głodzenia”) do enukleowanych oocytów kocich i bydlęcych. W obu przypadkach uzyskano rozwój do stadium moruli/blastocysty, chociaż w przypadku użycia, jako biorców jąder, oocytów kocich rozwój był zdecydowanie lepszy (8,8% vs 1,8). Sto sześćdziesiąt rekonstruowanych zarodków, zostało po osiągnięciu stadium 2–4-komórkowego przeszczepionych do 1 tygrysy i do 2 lwic. Autorzy nie podają jednak, czy były to zarodki powstałe wyłącznie ze rekonstruowanych oocytów kocich, czy też kocich i bydlęcych. Do momentu ukazania się doniesienia (styczeń 2001) wszystkie biorczyń utrzymywały ciążę [14].

Gatunkiem, do którego sklonowania utworzony został specjalny program finansowany przez ACT i rząd chiński, jest panda wielka (*Ailuropoda melanoleuca*). We wstępnym etapie badań jako biorców jąder użyto enukleowanych oocytów króliczych i uzyskano około 10% rekonstruowanych zarodków rozwijających się do stadium blastocysty [6]. W następnym etapie badań w celu zwiększenia odsetka zarodków rozwijających się do stadium blastocysty zastosowano metodę wielokrotnego klonowania zarodków królika opracowaną w naszym Zakładzie [34]. W II rundzie klonowania uzyskano ponad 19% re-klonowanych zarodków rozwijających się do stadium blastocysty [Liu i wsp., niepublikowane]. Docelowo planowane jest wykorzystanie, jako dawczyń oocytów, samic baribala, czyli czarnego niedźwiedzia amerykańskiego (*Ursus americanus*). Samice baribala byłyby również biorczyńiami rekonstruowanych zarodków. Wybór baribala spowodowany był kilkoma względami. Po pierwsze, baribal spokrewniony jest prawdopodobnie z pandą wielką, której stanowisko systematyczne nie jest do końca wyjaśnione. Według jednych systematyków panda należy do rodziny szopowatych (*Procyonidae*), spokrewnionej z niedźwiedziami (*Ursidae*), według innych należy – podobnie jak baribal – do *Ursidae*. Po drugie, łatwo jest uzyskać u baribala dużą liczbę jajników od samic zabijanych corocznie w czasie jesiennych polowań w USA i Kanadzie. Po trzecie, w 1999 r. uzyskano u baribala urodzenie młodych po transferze zarodków do niedźwiedzic.

Na zakończenie warto wspomnieć o prowadzonych w Australii próbach sklonowania jednego z trzech żyjących tam gatunków wombatów. *Northern hairy-nosed wombat* (*Lasiorhinus krefftii*) jest gatunkiem torbacza, którego stan ocenia się jako

skrajnie krytyczny. Na wolności żyje nie więcej niż 85 tych zwierząt. Od możliwie największej liczby tych zwierząt pobierane są wycinki skóry, z których wyprowadzane są linie fibroblastów. Ma to na celu utworzenie rezerwy genetycznej tego gatunku, reprezentującej jednocześnie jak największą różnorodność. Jądra komórkowe wprowadzane będą do oocytów dwóch pozostałych, dość powszechnie występujących, gatunków wombatów [59]. Istotnym *novum* jest to, że skrawki jajników uzyskiwanych z tych gatunków wombatów, których samice wykorzystane byłyby jako dawczynie oocytów, umieszczane są, celem ukończenia procesów wzrostu pęcherzyków jajnikowych i dojrzewania oocytów, pod torebkę nerkową szczurów *Nude*. Podobne próby dojrzewania, ale w warunkach *in vitro*, pre-antaraalnych pęcherzyków bydłych przedstawione zostały na II Konferencji TBR przez Katską i współpracowników. Transfer rekonstruowanych zarodków nie powinien stanowić problemu, ponieważ przenoszenie pre-implantacyjnych zarodków, opracowane przez Tyndale-Biscoe'go u kuoki (*Setonyx brachyurus*) i walabi damy (*Wallabia (Macropus) eugenii*) [45,46], jest z powodzeniem stosowane również u innych gatunków torbaczy.

Klonowanie zagrożonych ras i gatunków ssaków budzi zarówno nadzieje, jak i wzbudza kontrowersje. Wielu naukowców uważa, że ograniczy ono w istotny sposób zmniejszoną już genetyczną różnorodność tych ras i gatunków. Jednak zapoczątkowany przed kilkoma laty przez AICRES i *Center for Reproduction of Endangered Species* (CRES) ogrodu zoologicznego w San Diego program gromadzenia zamrożonych wycinków tkanek z możliwie największej liczby osobników zagrożonych gatunków pozwala na stworzenie genetycznej rezerwy tych gatunków umożliwiającej w przyszłości rekonstrukcję całych nawet populacji. Klonowanie nie stanowi panaceum dla ochrony gatunków, odgrywać może jednak istotną rolę w programach ich ratowania. Zakład Embriologii Doświadczalnej IGiHZ PAN rozpoczął już w 1999 roku, zgodnie z zaleceniami CRES, tworzenie kolekcji linii komórkowych wyprowadzonych z tkanek zagrożonych gatunków *Bovidae* i *Cervidae*, jak również z tkanek rodzimych ras zwierząt gospodarskich, które znajdujących się na liście WWL-DAD.

PROBLEMY ZWIĄZANE Z SOMATYCZNYM KLONOWANIEM SSAKÓW

Somatyczne klonowanie ssaków, chociaż zaowocowało uzyskaniem wielu zwierząt wielu gatunków gospodarskich powstałych w wyniku transplantacji jąder komórek somatycznych różnych rodzajów tkanek pobranych od osobników obu płci będących w różnym wieku (tab. 1, przegląd w [28]), jest nadal *terra incognita*, jeżeli chodzi o zrozumienie biologicznych aspektów warunkujących przeprogramowanie jąder komórek zróżnicowanych, a co za tym idzie warunkujących również

efektywność klonowania somatycznego. Nie wiemy, przede wszystkim, dlaczego jądra będące w fazie G0/G1 są najbardziej kompetentne, jeżeli chodzi o ich prze-programowanie w cytoplazmatycznym *milieu* oocytu. Proponowane wyjaśnienia są czysto hipotetyczne i ogólnikowe. Nie wiemy także, jakie metody aktywacji rekonstruowanych oocytów są najskuteczniejsze. Aktywacja rekonstruowanych oocytów wydaje się być, w tej chwili – obok odpowiedniego doboru faz cyklu komórkowego komórek dawców i biorców jąder – podstawowym czynnikiem warunkującym ich dalszy rozwój. Obecnie stosowane są dwie metody aktywacji rekonstruowanych oocytów: aktywacja impulsami prądu stałego oraz aktywacja jonomycyną (lub jonoforem wapnia A23187); w tym ostatnim wariantcie aktywacja rekonstruowanych oocytów jest związana z ich kilkugodzinną hodowlą (po aktywacji) w pożywkach zawierających inhibitory MPF/MAP kinazy, takich jak: 6-dimetyloaminopuryna (6-DMAP) lub cykloheksamid. Aktywacja oocytów musi powodować oscylacyjny sposób uwalniania jonów wapniowych z depozytów wewnątrzkomórkowych z tego względu, że jony te są toksyczne dla komórki, jeżeli ich poziom utrzymuje się przez dłuższy czas. Dlatego też pulsacyjne uwalnianie jonów wapniowych, wywołane działaniem jonomycyny, jest korzystne dla oocytu z dwóch powodów: z jednej strony umożliwia powstanie silnego sygnału jonowego aktywującego oocyt, z drugiej zaś chroni komórkę przed szkodliwymi efektami związanymi z utrzymującym się przez dłuższy czas wysokim stężeniem jonów wapniowych w cytoplazmie. Ten sposób aktywacji nie jest jednak prawdopodobnie uniwersalny w odniesieniu do oocytów wszystkich gatunków ssaków. Na przykład, w klonowaniu somatycznym myszy lepsze wyniki uzyskuje się stosując – jako czynnik aktywujący – jony strontu. U innych z kolei gatunków, takich jak świnia, sztuczna aktywacja rekonstruowanych oocytów daje – w przeciwieństwie do innych gatunków zwierząt gospodarskich – bardzo mierne wyniki. Dlatego też, u świni stosowana jest procedura re-klonowania połączona z wymianą przedjądrzy [35] (omówienie w [26]). Sądzymy, że również u innych gatunków post-aktywacja I generacji klonowanych zarodków połączona z procesem wymiany przedjądrzy w następnej generacji przynieść może istotne zwiększenie efektywności klonowania somatycznego.

Niewyjaśnionym do tej pory problemem są różnego rodzaju anomalie rozwojowe obserwowane u zwierząt powstałych w drodze klonowania somatycznego (omówienie w [27]). Trudno w tej chwili jednoznacznie określić, czy są one wynikiem nieprawidłowego przeprogramowania jąder somatycznych w następstwie nieodpowiednich procedur wprowadzania jąder i aktywacji oocytów, warunków hodowli *in vitro* rekonstruowanych zarodków, czy odgrywają tu rolę jakieś inne jeszcze, nieznanne czynniki. Zastanawiające jest, że w surowicy wielu sklonowanych cieląt wykazujących anomalie rozwojowe, znajdowano przeciwciała na wirusa Akabane, który powoduje u bydła powstawanie podobnego typu anomalii. Wysuwane są również sugestie, że przyczyną anomalii rozwojowych oraz spontanicznych, przed-

wczesnych poronień mogą być uszkodzenia DNA w komórkach ucha i skóry wywołane przez promieniowanie ultrafioletowe światła słonecznego [3]. Komórki z tych części ciała są najczęściej (obok komórek pęcherzykowych) używane jako dawcy jąder. W komórkach skóry dorosłych zwierząt uszkodzenia te są maskowane lub naprawiane i nie wywołują widocznych efektów. Jeżeli jednak uszkodzeniu uległyby geny odpowiedzialne za morfogenezę, to miałyby to z pewnością zdecydowanie negatywny wpływ na rozwój rekonstruowanych zarodków. Ostatnio stwierdzono, że hodowla komórek somatycznych w pożywce o obniżonej zawartości surowicy, co jest procedurą powszechnie stosowaną w celu wprowadzenia ich w stan G0, powoduje poważne uszkodzenia DNA [33]. Nie wiadomo, czy uszkodzenia te są naprawiane; jeżeli nie, to również może mieć to poważne konsekwencje odnośnie rozwoju rekonstruowanych zarodków.

Odrębnym – i nie wyjaśnionym – zagadnieniem jest sprawa statusu wiekowego osobników uzyskanych w wyniku klonowania somatycznego. Wiadomo, że u wielu gatunków ssaków wraz z liczbą replikacji DNA, a więc również z liczbą przebytych przez komórki cykli komórkowych, dochodzi do skracania telomerów, co uważane jest za jeden z przejawów starzenia się zarówno tej linii komórkowej, jak i całego organizmu. Jeżeli zjawisko to jest nieodwracalne, to komórki-dawcy jąder pochodzące od dorosłych zwierząt byłyby już wyjściowo komórkami starymi, co mogłoby wywierać niekorzystny wpływ zarówno na prenatalny rozwój sklonowanych osobników, jak również, być może, ograniczać długość ich życia. Badania przeprowadzone na chromosomach Dolly, gdy miała ona trzy lata wykazały, że długość telomerów jej chromosomów była znacznie mniejsza niż u owiec kontrolnych będących w tym samym wieku, a zbliżona do długości telomerów jej „matki”, która miała 6 lat, gdy pobrano od niej komórki gruczołu mlekowego użyte później jako dawcy jąder [40]. Szybkiemu skróceniu ulegają również telomery chromosomów owczych fibroblastów hodowanych *in vitro*. Po czterech pasażach, a więc zaledwie po kilku tygodniach hodowli, długość telomerów ich chromosomów odpowiadała długości telomerów chromosomów owcy w wieku 1 roku [40]. Z kolei Lanza i wsp. [22] wykazali, że u bydła, po wprowadzeniu do oocytów jąder fibroblastów, w których – w wyniku długotrwałej hodowli – doszło do niemal całkowitego zaniku telomerów, dochodzi w czasie rozwoju rekonstruowanych zarodków do odtworzenia normalnej (a nawet czasami ponadnormalnej) długości telomerowych odcinków DNA. Wyniki przeprowadzonych ostatnio przez Kato i wsp. [19] badań porównawczych na cielętach urodzonych w wyniku transplantacji do enukleowanych oocytów jąder wielu rodzajów komórek somatycznych pochodzących z tkanek płodowych, nowonarodzonych cieląt oraz osobników dorosłych są równie zaskakujące. U cieląt uzyskanych po transplantacji jąder komórek ucha 10-letniego buhaja, długość telomerowych odcinków DNA w komórkach ucha była taka sama jak w komórkach ucha dawcy jąder, natomiast w białych ciałkach krwi była ona znacznie mniejsza; odpowiadała jednak długości telomerów w białych ciałkach krwi u buhajków kontrolnych będących

w tym samym wieku. Wszystkie te obserwacje sugerują, że oprócz różnic międzygatunkowych, istnieją również (przynajmniej u bydła) różne wzorce skracania się telomerów w różnych tkankach. Kato i wsp. [19] stwierdzili również znacznie więcej przypadków spontanicznych poronień oraz większą liczbę różnego typu anomalii rozwojowych u płodów i urodzonych cieląt rozwijających się po transplantacji jąder komórek dorosłych osobników niż po transferze jąder komórek płodowych i komórek pochodzących z cieląt nowonarodzonych. Nie wiadomo oczywiście, czy ma to jakikolwiek związek ze skracaniem się telomerów. Oikawa i wsp. [31] uzyskali cielęta po transferze jąder komórek pęcherzykowych pobranych z jajników 20-letniej krowy, a więc osobnika bardzo już starego, u którego zakończył się okres zdolności do rozrodu. Świadczy to o tym, że wiek komórek nie ma prawdopodobnie decydującego wpływu na potencje rozwojowe ich jąder. Z drugiej jednak strony Kato i wsp. [19] zaobserwowali, że wiele cieląt urodzonych po transferze jąder komórek pochodzących od 10-letniego (a więc znacznie młodszego) buhaja miało, już w momencie narodzin, wiele cech fenotypowych charakterystycznych dla dorosłych osobników. Oczywiście nie wiadomo znowu, czy ma to związek ze skracaniem się telomerów, czy też jest wynikiem mutacji, kumulujących się wraz z wiekiem, w komórkach-dawcach jąder.

Klonowanie somatyczne, mimo wielu spektakularnych osiągnięć, rodzi coraz więcej pytań, które pozostają – jak na razie – bez odpowiedzi. Nie ulega wątpliwości, że techniczne możliwości tej dziedziny biotechnologii rozrodu są ogromne, lecz obecnie wyprzedziły one znacznie zrozumienie biologicznych uwarunkowań tej metodyki.

Zakończenie tego artykułu stanowić może cytat z publikacji Westhusina i wsp. [56].

„A number of adjectives might be used to describe the future of cloning ranging from 'phenomenal' and 'exciting', to 'outright scary'. Certainly 'interesting' and 'amazing' will be amongst these as the efficiencies improve and technologies can be applied. At this point it is very difficult to predict the limit or extent of cloning specific genotypes... This is not to mention the request for cloning animals that have been buried or stored in a freezer for a number of years, animal parts or simply hair from animals. Perhaps our adjectives are too 'mundane'”.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALLEN WR, ROWSON LEA. Transfer of ova between horses and donkeys. VII Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. (Munich) 1972; 1: 483–488.
- [2] AYARES D. Gene targeting in livestock. Transgenic Research Conf., Tahoe City 1999; 20.
- [3] BERNSTEIN EF, CHEN YQ, KOPP JB, FISHER L, BROWN DB, HAHN PJ, ROBEY FA, LAKKAKORPI J, UITTO J. Long-term sun exposure alters the collagen of the papillary dermis. *J Am Acad Derm* 1996; 34: 209–218.
- [4] BRADLEY DG, MacHUGH DE, CUNNINGHAM P, LOFTUS RT. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5131–5135.

- [5] BUELER H, AGUZZI A, SAILER A, GREINER RA, AUTENRIED P, AUGET M, WEISSMANN C. Mice devoid of PrP are resistant to *scrapie*. *Cell* 1993; **73**: 1339–1347.
- [6] CHEN DY, SUN QY, LIU JL, LI GP, LIAN L, WANG MK, HAN ZM, SONG XF, LI JS, SUN Q, CHEN YC, ZHANG YP, DING B. The giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) somatic nucleus can differentiate in rabbit ooplasm and support early development of the reconstructed egg. *Science in China (Series C)* 1999; **42**: 346–353.
- [7] CLARK AJ, BURL S, DENNING C, DICKINSON P. Gene targeting in livestock: a preview. *Transgenic Res* 2000; **9**: 263–275.
- [8] CORLEY-SMITH GE, BRANDHORST BP. Preservation of endangered species and populations: A role of for genome banking, somatic cloning and androgenesis. *Mol Reprod Dev* 1999; **53**: 363–367.
- [9] DOMINKO T, MITALIPOVA M, HALEY B, BEYHAN Z, MEMILI E, McKUSICK B. Bovine oocyte cytoplasm support development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol. Reprod* 1999; **60**: 1496–1502.
- [10] DONOGHUE AM, JOHNSTON LA, SEAL US, ARMSTRONG DL, TILSON RL, WOLF P, PETRINI K., SIMMONS LG, GROSS T, WILDT DE. *In vitro* fertilization and embryo development *in vitro* and *in vivo* in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol Reprod* 1990; **46**: 733–744.
- [11] GALLI C, DUCHI R, MOOR RM, LAZZARI G. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. *Cloning* 1999; **1**(3): 161–170.
- [12] GOSZCZYŃSKI J, REKLEWSKI Z, GIŻEJEWSKI Z. Wydajność mięsna hybrydów żubra z bydłem opasany do masy 450 kg. *Zesz Probl Post Nauk Roln* 1988; **333**: 107–112.
- [13] HILL AF, ZEIDLER M, IRONSIDE J, COLLINGE J. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 1997; **349**: 99–100.
- [14] HWANG W, KIM K, KIM G, JIN Y, KIM Y, CHUNG H, YOON T, HAN C, EO Y, LEE B. Interspecies somatic cell nuclear transfer for the production of endangered Korean Tiger (*Panthera tigris altaica*). *Theriogenology* 2001; **55**: 271, abstr.
- [15] HWANG WS, PARK JI, CHO JK, SHIN SJ, KIM KY, SHIN T, ROH S, LEE ES, LEE BC. Cloning of HanWoo (Korean Native Cattle) by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology* 2000; **53**: 220, abstr.
- [16] JEWGENOW K, BLOTTNER S, LENGWINAT T, MEYER HHD. New methods for gamete rescue from gonad of nondomestic felids. *J Reprod Fert* 1997; Suppl. **51**: 33–39.
- [17] KARASIEWICZ J, MODLIŃSKI JA. Komórki macierzyste ssaków: potencjalne źródło zróżnicowanych komórek do transplantacji. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 219–242.
- [18] KATO Y, TANI T, SOTOMARU Y, KUROKAWA K, KATO J, DOGUCHI H, YASUE H, TSUNODA Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998; **282**: 2095–2098.
- [19] KATO Y, TANI T, TSUNODA Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fert* 2000; **2**: 321–237.
- [20] KISHI M, ITAKAGI Y, TAKAKURA R, IMAMURA M, SUDO T, YOSHINARI M, TANIMOTO M, YASUE H, KASHIMA N. Nuclear transfer in cattle using colostrum-derived mammary gland epithelial cells and ear-derived fibroblast cells. *Theriogenology* 2000; **54**: 675–684.
- [21] KRASIŃSKA M. Hybridization of European bison with domestic cattle. *Acta Theriol* 1971; **16**: 413–422.
- [22] LANZA RP, CIBELLI JB, BLAKWELL C, CRISTOFALO VJ, FRANCIS MK, BAERLOCHER GM, MAK J, SCHERTZER M, CHAVEZ EA, SAWYER N, LANDSDORP, PM, WEST MD. Extension of cell-life span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 2000; **288**: 665–669.

- [23] LANZA RP, CIBELLI JB, DIAZ F, MORAES CT, FARIN PW, FARIN CE, HAMMER CJ, WEST MD, DAMIANI P. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) by interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2000; **2**: 79–90.
- [24] LANZA RP, DRESSER BL, DAMIANI P. Cloning Noah's Ark. *Scientific American* 2000; **11**: 66–71.
- [25] MCCREATH KJ, HOWCROFT J, CAMPBELL KHS, COLMAN A., SCHNIEKE AE, KIND AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 2000; **405**: 1066–1067.
- [26] MODLIŃSKI JA, GRABAREK J, PŁUSA B, KARASIEWICZ J. The possible role of cell cycle stage in mammalian cloning. *J Appl Gen* 2001; **42**(2): 153–176.
- [27] MODLIŃSKI JA, KARASIEWICZ J. Wykorzystanie komórek somatycznych w klonowaniu ssaków. *Post Biol Kom* 1999; **26** (Suppl.12): 9–16.
- [28] MODLIŃSKI JA, KARASIEWICZ J. Biotechnologia rozrodu na przełomie wieków. *Zesz Nauk P Hod* 2001; **56**: 17–26.
- [29] MODLIŃSKI JA, KARASIEWICZ J. Somatyczne klonowanie ssaków. *Med Wieku Rozw* 2001; **V** (Suppl. I do nr 1): 9–25.
- [30] OGURA A, INOUE K, Ogonuki N, NOGUCHI A, TAKANO K, NAGANO R, SUZUKI O, LEE J, ISHINO F, MATSUDA J. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biol Reprod* 2000; **62**: 1579–1584
- [31] OIKAWA T, NUMABE T, KIKUCHI T, TAKADA N, IZAIKE Y. Production of somatic cell clone calves from cumulus cells of a 20 years old Japanese Black cow. *Theriogenology* 2000; **53**: 236, abstr.
- [32] Oklahoma State University, website on rare breeds of livestock (<http://pc2000.anmsci.okstate.edu/BREEDS/>), Oklahoma State University Board of Regents 1998.
- [33] PEURA TT. Serum starvation can cause excessive DNA damage in sheep fetal fibroblasts. *Theriogenology* 2001; **55**: 285, abstr.
- [34] PIOTROWSKA K, MODLIŃSKI JA, KORWIN-KOSSAKOWSKI M, KARASIEWICZ J. Effects of preactivation of ooplasts or synchronization of blastomere nucle in G1 on preimplantation development of rabbit serial nuclear transfer embryos. *Biol Reprod* 2000; **63**: 677–682.
- [35] POLEJAEVA IA, CHEN S-H, VAUGHT TD, PAGE RL, MULLINS J, BALL S, BOONE J, WALKER S, AYARES DL, COLMAN A, CAMPBELL KHS. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000; **406**: 505–508.
- [36] POPE CE. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology* 2000; **53**: 163–174.
- [37] POPE CE, JOHNSON CA, McRAE MA, KELLER GL, DRESSER BL. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim Reprod Sci* 1998; **53**: 221–236.
- [38] POPE CE, SCHMID R, DRESSER BL. *In vitro* development of cat embryos produced by *in vitro* fertilization is enhanced by addition of cysteine to the maturation medium and a reduced O₂ atmosphere. *Theriogenology* 1999; **51**: 291 abstr.
- [39] SCHREIBER A, SEIBOLD I. Cytochrome b gene haplotypes characterize chromosomal lineages of Anoa, the Sulawesi dwarf buffalo. *J Heredity* 1999; **1**: 165–177.
- [40] SHIELS PG, KIND AJ, CAMPBELL KHS, WADDINGTON D, WILMUT I, COLMAN A, SCHNIEKE AE. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature* 1999; **399**: 316–317.
- [41] SHIGA K, FUJITA T, HIROSE K, SASAE Y, NAGAI T. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. *Theriogenology* 1999; **52**: 527–535.
- [42] TANAKA K, MATSUDA Y. Cytogenetic analysis of the tamaraw (*Bubalus mindorensis*). A comparison of R-banded karyotype and chromosomal distribution of centromeric satellite DNAs, telomeric sequence and 18S-28SrRNA genes. *J Heredity* 2000; **2**: 117–122.

- [43] TSUNODA Y, KATO Y. The recent progress on nuclear transfer in mammals. *Zool Sci* 2000; **17**: 1177–1184.
- [44] TURNER CL, GRANT A, BAILEY JE, DOVER GA, BARKER GWA. Patterns of genetic diversity in extant and extinct cattle populations: evidence from sequence analysis of mitochondrial coding regions. *Ancient Biomolecules* 1998; **2/3**: 235–250.
- [45] TYNDALE-BISCOE CH. Blastocyst transfer in the marsupial, *Setonix brachyurus*. *J Reprod Fert* 1963; **6**: 41–48.
- [46] TYNDALE-BISCOE CH. Resumption of development by quiescent blastocysts transferred to primed, ovariectomised recipients in the marsupial, *Macropus eugenii*. *J Reprod Fert* 1970; **23**: 25–32.
- [47] VAN VLECK LD. Implications of cloning for breed improvement strategies: are traditional methods of animal improvement obsolete? *J Anim Sci* 77, Suppl.2/ *J Dairy Sci* 1998; **82**, Suppl. 2: 111–121.
- [48] VOGEL G. Cloned gaur a short-lived success. *Science* 2001; **291**: 409.
- [49] WAKAYAMA T, PERRY ACF, ZUCOTTI M, JOHNSON KR, YANAGIMACHI R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cells nuclei. *Nature* 1998; **394**: 369–374.
- [50] WAKAYAMA T, YANAGIMACHI R. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nature Genetics* 1999; **22**: 127–128.
- [51] WAKAYAMA T, YANAGIMACHI R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev* 2001; **58**: 376–383.
- [52] WCU's Species Survival Commission surveys future of the kouprey. *International Wildlife* 1992; **5**: 32–38.
- [53] WEISSMANN C, FISHER M, RAEBER A, BUELER H, SAILER A, SHMERLING D, RULICKE T, BRADNER S, AGUZZI A. The use of transgenic mice in the investigation of transmissible spongiform encephalopathies. *Rev Sci Tech* 1998; **17**(1): 278–290.
- [54] WELLS DN, MISICA PM, TERVIT HR. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* 1999; **60**: 996–1005.
- [55] WELLS DN, MISICA PM, FORSYTH JT, BERG MC, LANGE JM, TERVITT HR, VIVANCO WH. The use of adult somatic cells nuclear transfer to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Theriogenology* 1999; **51**: 217 abst.
- [56] WESTHUSIN ME, LONG CR, SHINT T, HILL JR, LOONEY CR, PRYOR JH, PIEDRAHITA JA. Cloning to reproduce desired genotypes. *Theriogenology* 2001; **55**: 35–49.
- [57] WILL RG, IRONSIDE JW, ZEIDLER M, COUSENS SN, ESTINBEIRO K, ALPEROVITCH A., POSER S, POCCHIARI M, HOFFMAN A, SMITH PG. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996; **347**: 921–925.
- [58] WILMUT I, SCHNIEKE A, McWHIR J, CAMPBELL KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; **385**: 810–813.
- [59] WOLVENKAMP MCJ, MacCALLUM C, CLEARY M, SHAW J, COX S, JENKIN G, TROUNSON AO. Novel approach to save the critically endangered Northern Hairy-nosed Wombat (*Lasiorhinus krefftii*). *Theriogenology* 2000; **53**: 345 abst.
- [60] World Watch List for Domestic Animal Diversity (wyd. R. Loftus i B. Scherf), Rome 1993.
- [61] WRATHALL AE. Risk of transmission of spongiform encephalopathies by reproductive technologies in domesticated ruminants. *Livestock Prod Sci* 2000; **62**: 287–316.

Adres autora: Jastrzębiec, 05-552 Wólka Kosowska

MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA POTENCJAŁU GAMETOTWÓRCZEGO SSAKÓW PRZEZ HODOWLĘ *IN VITRO* PRZEDANTRALNYCH I WCZESNOANTRALNYCH PĘCHERZYKÓW JAJNIKOWYCH

IMPROVEMENT OF REPRODUCTIVE POTENTIAL BY *IN VITRO* CULTURE OF PREANTRAL AND EARLY ANTRAL OVARIAN FOLLICLES IN MAMMALS

Lucyna KĄTSKA

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki Balice koło Krakowa

Streszczenie: Jajnik ssaka zawiera tysiące oocytów zawartych w przedantralnych pęcherzykach jajnikowych. Ogromna większość tych pęcherzyków ginie w wyniku atrezji. I tak, np. u bydła ulega atrezji ponad 99,9% populacji pęcherzyków. Możliwość wykorzystania pęcherzyków poprzez ich uzyskiwanie w bardzo wczesnych stadiach rozwojowych i długotrwałą hodowlę *in vitro* otworzyłaby wprost nieograniczone źródło gamet żeńskich, a potencjał gametotwórczy jajnika byłby maksymalnie wykorzystany. Pierwsze prace nad uzyskaniem i hodowlą pęcherzyków przedantralnych przeprowadzono na myszach i szczurach, a pionierska publikacja z tego zakresu została opublikowana przez Groba w 1964 r. U myszy, badania nad izolacją i hodowlą pęcherzyków przedantralnych doprowadziły do opracowania metod wzrostu i dojrzewania pęcherzyków, ich owulacji *in vitro*, a także do uzyskania potomstwa po zapłodnieniu *in vitro* oocytów otrzymanych z hodowanych pęcherzyków przedantralnych, a nawet pierwotnych. Te pozytywne rezultaty uzyskane u myszy zachęcają do prowadzenia badań nad opracowaniem metod hodowli pęcherzyków przedantralnych z jajników zwierząt gospodarskich. W referacie przedstawiono techniki pozyskiwania pęcherzyków, stosowane systemy ich hodowli *in vitro*, metody oceny oocytów hodowanych w pęcherzykach i osiągnięty stopień zaawansowania tych prac u zwierząt gospodarskich. (*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28 supl. 18: 177–187)

Słowa kluczowe: jajnik, pęcherzyki, długotrwała hodowla, wzrost i kompetencja oocytu

Summary: The ovary of mammals contains thousands of oocytes which are enclosed in the preantral follicles. Since >99.9% of ovarian oocytes undergo atresia, it would be of great practical benefit if these follicles, destined to become atretic, could be rescued by a long-term *in vitro* culture leading to provide

an abundant source of gametes and allowing for maximal improvement of the reproductive potential of female. The first studies on preantral follicles were performed in mice and rats, and the pioneer article was published by Grob in 1964. In the mouse, research on the isolated preantral follicles has led to follicle growth and antrum formation, ovulation *in vitro* and even to a few live young after *in vitro* maturation and fertilization of the oocytes recovered from *in vitro* cultured preantral and even primordial follicles. The successful results obtained in mouse are encouraging for development of methods for culture of preantral follicles in farm animals. In the article are discussed techniques of follicle recovery, *in vitro* culture systems, methods for evaluation of oocyte growth and competence for maturity and the recent progress in development of methods in farm animals.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28 suppl. 18: 177–187)

Key words: ovary, follicles, long-term culture, oocyte growth and competence

WPROWADZENIE

Jajnik ssaka zawiera tysiące czy setki tysięcy pęcherzyków w różnych stadiach rozwoju. Ponad 95% populacji pęcherzyków jajnikowych stanowią pęcherzyki pierwotne i przedantralne [42]. U większości gatunków ssaków pula pęcherzyków jajnikowych powstaje już w jajnikach płodu, a u gryzoni u noworodków, wkrótce po urodzeniu [20]. W ciągu życia osobnika pęcherzyki pierwotne podlegają nieustannej rekrutacji do puli pęcherzyków rosnących. Konsekwencją tego procesu jest stopniowa redukcja liczby pęcherzyków. W związku z tym najbogatszym źródłem pęcherzyków są jajniki młodych zwierząt. Istnieje jednakże olbrzymia zmienność międzygatunkowa, a także międzyosobnicza w obrębie gatunku dotycząca liczby pęcherzyków. I tak, np. w bydłych jajnikach płodowych liczba pęcherzyków waha się od 18 000 do 200 000, u nowonarodzonego cielęcia wynosi średnio 235 000, jednakże w grupie 69 zwierząt obserwowano wahania od 0 do 724 000 [13], natomiast u krów 4-letnich średnio od około 77 000 [33] do 130 000 [13].

W warunkach *in vivo* ogromna większość pęcherzyków jajnikowych (99,9%) ginie w wyniku atrezji w różnych stadiach rozwoju [31,32], a tylko 0,05% dojrzewa do owulacji [4,42]. Możliwość wykorzystania pęcherzyków bardzo wczesnych stadiów rozwojowych poprzez ich uzyskiwanie, a następnie długotrwałą hodowlę *in vitro* otworzyłaby ogromne źródło gamet żeńskich, a potencjał gametotwórczy jajnika byłby maksymalnie wykorzystany.

Pierwsze prace nad uzyskiwaniem i hodowlą pęcherzyków przedantralnych przeprowadzono na myszach i szczurach, a pionierska publikacja z tego zakresu została opublikowana przez Groba w 1964 r. [17]. U myszy, badania nad izolacją i hodowlą pęcherzyków przedantralnych doprowadziły do opracowania metod wzrostu i dojrzewania pęcherzyków, ich owulacji *in vitro*, do uzyskania potomstwa po zapłodnieniu *in vitro* oocytów uzyskiwanych z hodowanych pęcherzyków przedantralnych [11], a także pierwotnych [10]. Te pozytywne rezultaty uzyskane u myszy zachęcają do prowadzenia badań nad hodowlą pęcherzyków przedantralnych pozyskiwanych z jajników zwierząt gospodarskich.

UZYSKIWANIE PĘCHERZYKÓW PRZEDANTRALNYCH

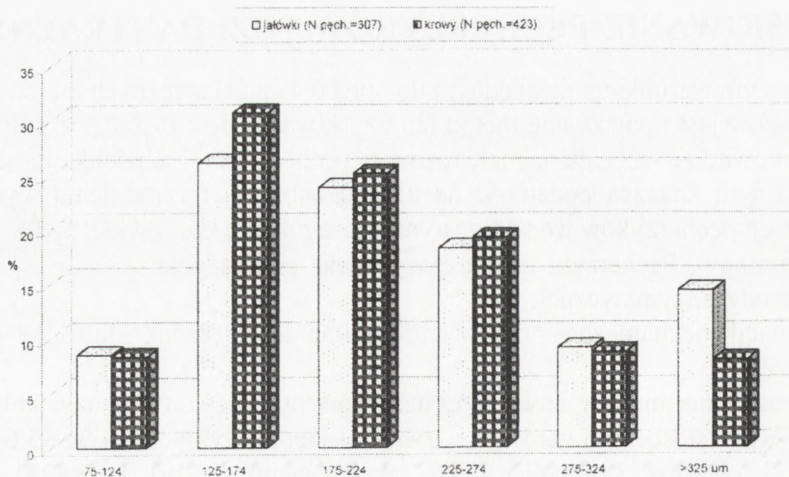
Pierwszym warunkiem niezbędnym do opracowania skutecznych metod hodowli pęcherzyków jest opanowanie metod ich uzyskiwania. Jest to zadanie stosunkowo trudne zarówno ze względu na małe rozmiary pęcherzyków i ich delikatną strukturę, a tym samym znaczną podatność na uszkodzenia, jak i utrudnienia wynikające z lokalizacji pęcherzyków we włóknistym (szczególnie u kóz, owiec, bydła i klaczy) zrębie jajników. Pęcherzyki można pozyskiwać przy użyciu:

- 1) metody enzymatycznej;
- 2) izolacji mechanicznej przy użyciu rozdrabniacza tkanek i/lub igieł preparacyjnych.

Enzymatyczne metody izolacji pęcherzyków przy użyciu pronazy, kolagenazy i/lub trypsyny stosowano zarówno u zwierząt laboratoryjnych (mysz [5,6,8,9,44], sznur [7], chomik [38], królik [34]), jak i u świni [18,19], kota [23], płodów bydłych [3], a także u ludzi [40]. Metody te są dosyć wydajne, jednakże faktycznie prowadzą do uzyskania nie pęcherzyków, a oocytów otoczonych komórkami ziarnistymi lub komórkami wzgórka jajonośnego, ponieważ większość komórek osłonki pęcherzyka i błona podstawna ulega degradacji pod działaniem enzymów.

Mechaniczna metoda izolacji pęcherzyków z kory jajnika przy użyciu specjalnie skonstruowanego ostrza tnącego [22] lub rozdrabniacza tkanek, tzw. *tissue chopper*, tnącego tkankę na fragmenty pożądanej wielkości [12,14,15,21], prowadzi do uzyskania mieszanej populacji pęcherzyków, o średnicy od 30 do 100 μm . Do istotnych mankamentów tej metody zaliczyć należy niemożność uzyskania większych pęcherzyków przedantralnych (o średnicy $>100 \mu\text{m}$) czy wczesnoantralnych. Ponadto badania ultrastuktury wykonane w mikroskopie elektronowym wykazały obecność znacznych uszkodzeń oocytów uzyskanych przy użyciu tej techniki [43].

Izolacji większych pęcherzyków przedantralnych czy też wczesnoantralnych można dokonać jedynie za pomocą mikrodysekcji, tzn. izolacji pęcherzyków przez ich wyłuskiwanie ze zrębu jajnika przy użyciu cienkich igieł preparacyjnych, pod kontrolą w mikroskopie stereoskopowym. W przypadku małych jajników, o luźniejszej strukturze, np. myszy, dysekcję przeprowadza się na całym jajniku [16], w przypadku większych i bardziej włóknistych jajników, np. bydłych, sporządza się cienkie skrawki warstwy korowej, z których następnie wypreparowuje się pęcherzyki za pomocą cienkich igieł [24,25,26,27,36,37]. Mikrodysekcja nie wymaga stosowania enzymów, jej wydajność zależy oczywiście od sprawności manualnych wykonującego. Doświadczony operator może wyizolować w ciągu 2–3 godz. około 50 pęcherzyków [26]. Najmniejsze pęcherzyki, które udaje się uzyskać przy użyciu mikrodysekcji, mają średnicę ok. 100 μm [24,25,26]. Najczęściej izoluje się tym sposobem pęcherzyki o średnicy 125 do 274 μm , które stanowią ok. 70% całkowitej populacji małych pęcherzyków uzyskanych z jajników bydłych (ryc. 1).



RYCINA 1. Rozkład liczbowy pęcherzyków przedantralnych i wczesnoantralnych u bydła

HODOWLA PĘCHERZYKÓW

Pęcherzyki mogą być hodowane w różnych systemach hodowli, a mianowicie:

1) w systemie trójwymiarowym, po zatopieniu w kropli agaru lub kolagenu [4,15,21,38,39,45];

2) w systemie dwuwymiarowym, tj. na specjalnych membranach czy w naczynekach pokrytych warstwą substratu np. żelu kolagenowego, fibronektyny, lamininy lub agaru [11,12,15,21,36,37];

3) bez substratu, w mikroplach pożywki, w V-oczkach płytek 96-oczkowych [1,24,25,26] lub na szalkach Petriego [27];

4) w hodowli tkankowej cienkich skrawków warstwy korowej – technika zastosowana w hodowli pęcherzyków pierwotnych [46].

W systemie 1, 2 i 4 stosuje się większe objętości pożywki, którą wymienia się co 3–4 dni, hodowla w mikroplach wymaga częstszej wymiany pożywki, by zapobiec gromadzeniu się metabolitów, szczególnie jonów amonowych, które mogłyby toksycznie oddziaływać na rosnące pęcherzyki. Substraty stosowane w hodowli pęcherzyków, tj. kolagen i fibronektyna, to główne komponenty pozakomórkowej tkanki łącznej [28], natomiast laminina jest glikoproteidem obecnym w błonach podstawnych [29]. Spełniają one rolę białek wiążących, których zadaniem jest zabezpieczenie przed utratą pęcherzyków z hodowli (np. w czasie wymiany pożywki), zachowanie trójwymiarowości komórek, a tym samym integralności pęcherzyka, wspomaganie procesów metabolicznych, tj. dostępności związków odżywczych z pożywki i wymiany gazowej. Mankamentem hodowli z użyciem białek

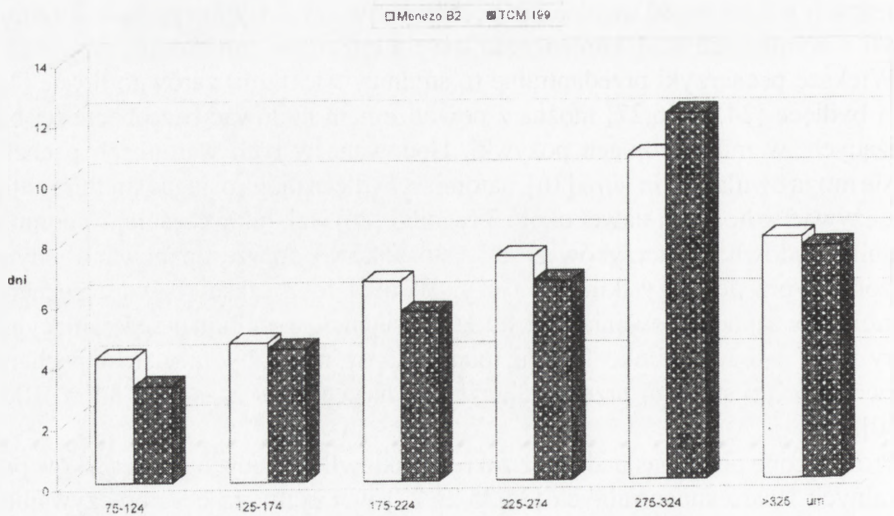
wiązających jest trudność uwolnienia pęcherzyków czy oocytów po zakończeniu hodowli i wynikająca stąd konieczność użycia enzymów, np. kolagenazy.

Większe pęcherzyki przedantralne (o średnicy $>150 \mu\text{m}$) zarówno mysie [1,16], jak i bydłęce [24,25,26,27] można z powodzeniem hodować bez obecności białek wiążących, w mikrokroplach pożywki. Hodowane w tych warunkach pęcherzyki mysie mogą owulować *in vitro* [16], natomiast bydłęce mogą osiągać stadium antralne i przeżywać w hodowli nawet około 3 tygodni [26]. Jak już wcześniej wspomniano, techniki hodowli pęcherzyków zostały stosunkowo dobrze opanowane jedynie u gryzoni, a przede wszystkim u myszy. Wynika to z czasu rozwoju pęcherzyka od momentu zapoczątkowania wzrostu aż do osiągnięcia stadium przedowulacyjnego, który trwa u tego gatunku 21 dni, podczas gdy np. u bydła wzrost pęcherzyka pierwotnego do stadium przedowulacyjnego następuje w czasie od 80 do 100 dni [2,30].

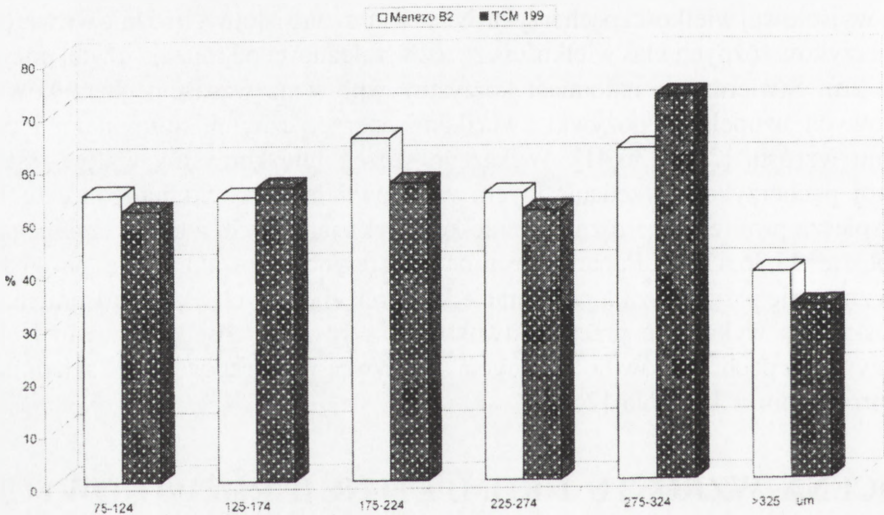
Prowadzone przez nas badania z zakresu hodowli bydłęcych pęcherzyków przedantralnych i wczesnoantralnych [24,25,26,27] wykazały, że czas przeżywania pęcherzyków *in vitro* zależy od ich wyjściowej wielkości. Najdłuższy okres wzrostu wykazywały pęcherzyki o średnicy 275 do 324 μm (ryc. 2a). Wzrost średnicy pęcherzyka w efekcie hodowli, niezależnie od rodzaju użytej pożywki, nie przekraczał 73% wyjściowej wielkości pęcherzyka. Nie stwierdzono istotnych różnic we wzroście pęcherzyków różnych klas wielkości czy też w zależności od rodzaju użytej pożywki (ryc. 2b). Stwierdzono natomiast korzystny wpływ na wzrost pęcherzyków dodatkowych uzupełnień pożywki związkami energetycznymi, hormonami i czynnikami wzrostu [26,35,36,41]. Wykazano szczególnie korzystny wpływ FSH na rozwój pęcherzyków przedantralnych w hodowli *in vitro*. Stwierdzono, że FSH przyspiesza proliferację i różnicowanie komórek ziarnistych, a także zapobiega ich apoptozie [35,36,41,47]. Ponadto, insulina, transferyna, selen, glutamina i pirogronian sodu znacznie przyspieszają proliferację komórek ziarnistych. Potwierdzeniem tego wniosku jest wykazanie przeszło dwukrotnie wyższego odsetka wzrostu i czasu przeżywania pęcherzyków hodowanych w pożywce wzbogaconej tymi składnikami w porównaniu z kontrolą [26].

OCENA WZROSTU I KOMPETENCJI ROZWOJOWYCH OOCYTÓW

Średnica zarówno pęcherzyka, jak i oocytu bydłęcego wzrasta stopniowo w miarę przedłużania czasu hodowli (ryc. 3). Najistotniejszym kryterium oceny hodowanych *in vitro* pęcherzyków przedantralnych i/lub wczesnoantralnych jest stan morfologiczny oocytów izolowanych z nich po ukończeniu hodowli, a także kompetencje rozwojowe tych oocytów. Wandji i wsp. [46] obserwowali występowanie masowej degeneracji oocytów w bydłęcych pęcherzykach przedantralnych hodowanych 5

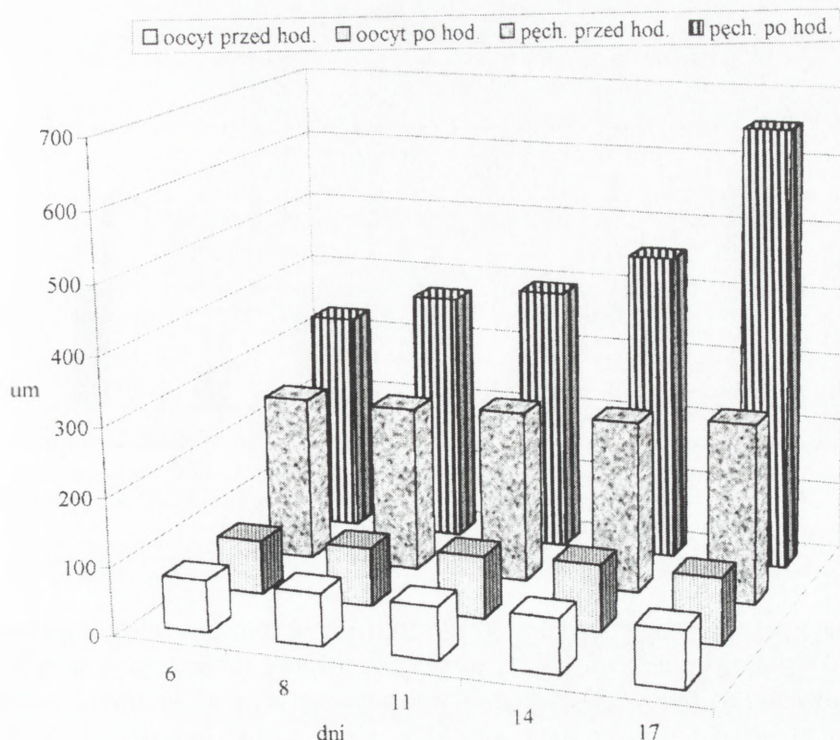


RYCINA 2a. Wpływ wielkości pęcherzyka i rodzaju użytej pożywki na czas przeżywania pęcherzyka w hodowli



RYCINA 2b. Wpływ wielkości pęcherzyka i rodzaju użytej pożywki na wzrost pęcherzyka *in vitro*

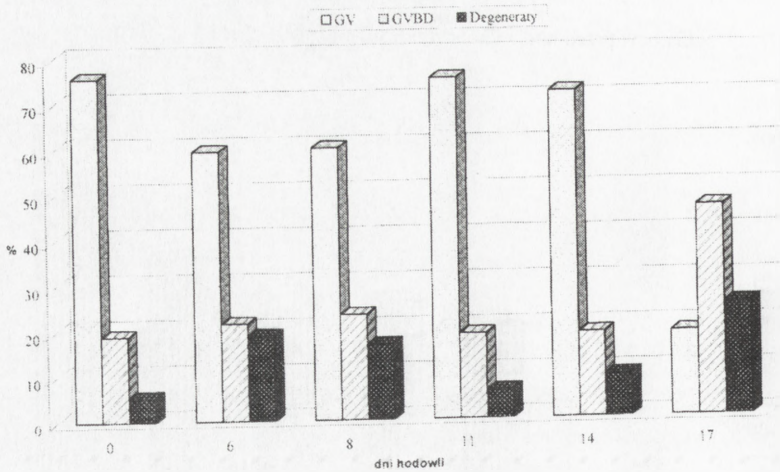
do 6 dni, mimo że stwierdzano w tych pęcherzykach proliferację komórek ziarnistych i aktywność sekrecyjną. Przeprowadzone przez nas badania [27] konfiguracji chromatyny jądrowej oocytów uzyskanych ze świeżych i hodowanych *in vitro* przedantralnych i wczesnoantralnych bydłeczych pęcherzyków jajnikowych wykazały że w hodowli pęcherzyków trwającej do 14 dni większość zawartych w nich oocytów



RYCINA 3. Wpływ czasu hodowli *in vitro* na wzrost pęcherzyka i oocytu

pozostaje w stadium pęcherzyka zarodkowego – GV. Nie obserwowano istotnych różnic w częstotliwości występowania oocytów w stadium GV, gdy oceniano je bezpośrednio po uzyskaniu (69,4%) lub po hodowli trwającej 6, 8, 11 i 14 dni (odpowiednio 54,3; 56,4; 65,9 i 70,5%). Natomiast przedłużenie okresu hodowli do 17 dni powodowało spadek odsetka oocytów w stadium GV (do 25,6%), wzrost odsetka oocytów wykazujących przedwczesne zapoczątkowanie mejozy (stadium rozpadu pęcherzyka zarodkowego – GVBD; 39,5 %) i degenerację (37,2%) (ryc. 4). Kolejnym kryterium oceny jakości oocytów jest ich zdolność do osiągnięcia dojrzałości po ukończeniu okresu wzrostu w pęcherzyku. Wstępne wyniki dotychczasowych doświadczeń (Kątska i Alm, dane nieopublikowane) wskazują, że tylko nieliczne oocyty uzyskane z pęcherzyków o wyjściowej wielkości nie przekraczającej 400 μm mogą uzyskać zdolność do dojrzewania *in vitro*. Można to osiągnąć hodując pęcherzyki przez 14 dni, a następnie izolowane z tych pęcherzyków oocyty hodować w pożywce do dojrzewania przez kolejne 24 godz.

Nieco bardziej obiecująca okazała się 14-dniowa hodowla kompleksów oocyt + komórki wzgórka jajonośnego wraz ze ściennymi komórkami ziarnistymi, które



RYCINA 4. Konfiguracja chromatinu jądrowej oocytów uzyskanych ze świeżych i hodowanych *in vitro* przedantralnych i wczesnoantralnych bydłych pęcherzyków jajnikowych

pobierano z pęcherzyków o średnicy 500 do 700 μm i zatapiało w żelu kolagenowym [47]. Po 14-dniowej hodowli oocyty uwalniano z żelu i umieszczano w pożywce do dojrzewania na okres ok. 24 godz., następnie zapładniano *in vitro* i uzyskane zarodki hodowano aż do stadium blastocysty [47]. Technika ta wymaga niezwykle starannej selekcji kompleksów przeznaczonych do hodowli, a co się z tym wiąże, dużego doświadczenia operatora. W efekcie zastosowania tej procedury Yamamoto i wsp. uzyskali w 1999 r. [47] pierwsze cielę, które rozwinęło się z tak uzyskanego zarodka. Chociaż efektywność metody wynosiła zaledwie ok. 2 do 4% są to obiecujące rezultaty. Zachęcają one do kontynuacji badań, mimo że droga do opanowania metody wydaje się jeszcze bardzo odległa i skomplikowana. Metoda hodowli pęcherzyków wczesnych stadiów rozwojowych w połączeniu z technikami już stosunkowo dobrze opanowanymi, tj. kompleksową metodą pozaustrojowej produkcji zarodków, pozwalałaby na dużo większe niż obecnie wykorzystanie potencjału gametotwórczego jajników stając się źródłem dużej liczby gamet czy zarodków. Jest to istotne zarówno dla praktyki hodowlanej, jak też dla rozwoju biotechnologii rozrodu zwierząt.

LITERATURA

- [1] BOLAND NI, HUMPHERSON PG, LEESE HJ, GOSDEN RG. Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles *in vitro*. *Biol Reprod* 1993; **48**: 798–806.
- [2] BRITT JH. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. *Bovine Prac* 1991; **24**: 39–43.

- [3] CARAMBULA SF, GONALVES PBD, FIGUEIREDO JR, NEVES JP, E COSTA LFS. Dissociação mecânica e enzimática de ovários de fetos bovinos para o isolamento de folículos pré-antrais. *Arq Fac Vet UFRGS*, Porto Alegre 1996; 24 supl: 235.
- [4] CARROLL J, WHITTINGHAM DG, WOOD MJ, TELFER E, GOSDEN RG. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J Reprod Fert* 1990; 90: 321–327.
- [5] CARROLL J, WHITTINGHAM DG, WOOD MJ. Effect of dibutyl cyclic adenosine monophosphate on granulosa cell proliferation, oocyte growth and meiotic maturation in isolated mouse primary ovarian follicles cultured in collagen gels. *J Reprod Fert* 1991; 92: 197–207.
- [6] CARROLL J, WHITTINGHAM DG, WOOD MJ. Effect of gonadotrophin environment on growth and development of isolated mouse primary ovarian follicles. *J Reprod Fert* 1991; 93: 71–79.
- [7] DANIEL AJ, ARMSTRONG DT, GORE-LANGTON RE. Growth and development of rat oocyte *in vitro*. *Gamete Res* 1989; 24: 109–121.
- [8] EPPIG JJ. Analysis of mouse oogenesis *in vitro*. Oocyte isolation and the utilization of exogenous energy sources by growing oocytes. *J Exp Zool* 1976; 198: 375–382.
- [9] EPPIG JJ. Mouse oocyte development *in vitro* with various culture systems. *Dev Biol* 1977; 60: 371–378.
- [10] EPPIG JJ, O'BRIEN MJ. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 1996; 54: 197–207.
- [11] EPPIG JJ, SCHOEDER AC. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. *Biol Reprod* 1989; 41: 268–276.
- [12] EPPIG JJ, TELFER E. Isolation and culture of oocytes. *Methods in Enzymology* 1993; 225: 77–84.
- [13] ERICKSON BH. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci* 1966; 25: 800–805.
- [14] FIGUEIREDO JR, HULSHOF SCJ, Van den HURK R, ECTORS FJ, FONTES RJ, NUSGENS B, BEVERS MM, BECKERS JF. Development of a new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. *Theriogenology* 1993; 40: 789–799.
- [15] FIGUEIREDO JR, HULSHOF SCJ, THIRY M, Van den HURK R, BEVERS MM, NUSGENS B, BECKERS JF. Extracellular matrix proteins and basement membrane: identification in bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles. *Theriogenology* 1995; 43: 845–858.
- [16] GOSDEN RG, BOLAND NI, SPEARS N, MURRAY AA, CHAPMAN M, WADE JC, ZHODY N, BROWN N. The biology and technology of follicular oocyte development *in vitro*. *Reprod Med Rev* 1993; 2: 129–152.
- [17] GROB HS. Enzymatic dissection of the mammalian ovary. *Science* 1964; 146: 73–74.
- [18] GREENWALD GS, MOOR RM. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *J Reprod Fert* 1989; 87: 561–571.
- [19] HIRAO Y, MIYANO T, KATO S. *In vitro* growth of porcine oocytes. *Proc. 12th Int Cong Anim Reprod* 1992; 1: 333–335.
- [20] HIRSHFIELD AN. Development of follicles in mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124: 43–101.
- [21] HULSHOF SCJ. Bovine preantral follicles and their development *in vitro*. PhD thesis, University of Utrecht, 1995.
- [22] JEWGENOW K, PITRA C. Die Isolierung von Präantralfollikeln aus Eierstöcken des Rindes. *Reprod Dom Anim* 1991; 26: 281–289.

- [23] JEWGENOW K, PITRA C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. *Theriogenology* 1993; **39**: 527–535.
- [24] KAŤSKA L, RYŃSKA B. Preliminary investigation on isolation and *in vitro* culture of bovine preantral follicles. *Proc 12th Meeting of European Embryo Transfer Association* 1996: p.150.
- [25] KAŤSKA L, RYŃSKA B. Isolation and *in vitro* culture of ovarian preantral and early antral follicles in cattle. *Folia Histochem Cytobiol* 1997; **35** suppl 2: 35 abstr.
- [26] KAŤSKA L, RYŃSKA B. The isolation and *in vitro* culture of bovine preantral and early antral follicles of different size classes. *Theriogenology* 1998; **50**: 213–222.
- [27] KAŤSKA L, ALM H, RYŃSKA B. Nuclear configuration of bovine oocytes derived from fresh and *in vitro*-cultured preantral and early antral ovarian follicles. *Theriogenology* 2000; **54**: 247–260.
- [28] KLEINMAN HK, KLEBE RJ, MARTIN GR. Role of collagen matrices in the adhesion and growth of cells. *J Cell Biol* 1981; **88**: 473–485.
- [29] KLEINMAN HK, CANNON FB, LAURLE GW, HASSELL JR, AUMAILLEY M, TERRANOVA VP, MARTIN GR, DUBOLS-DALCQ M. Biological activities of laminin. *J Cell Biochem* 1985; **27**: 317–325.
- [30] LUSSIER JP, MATTON P, DUFOUR JJ. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fert* 1987; **81**: 301–307.
- [31] MARIANA JC, NGUYEN HUY N. Folliculogénèse chez la vache. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* 1973; **13**: 211–221.
- [32] MARION GB, GIER HB, CHOUDARY JB. Micromorphology of the bovine ovarian follicular system. *J Anim Sci* 1968; **27**: 451–465.
- [33] MIYAMURA M, KUWAYAMA M, HAMAWAKIA, EGUCHIL Y. Total number of follicles in the ovaries of Japanese black cattle. *Theriogenology* 1996; **45**: 300 abstr.
- [34] NICOSIA SV, EVANGELISTA I, BATTÀ SK. Rabbit ovarian follicles. Isolation technique and characterization at different stages of development. *Biol Reprod* 1975; **13**: 423–447.
- [35] PÖÖEHLAND R, STENZEL V, ALM H, KAŤSKA L. The influence of FSH on viability, growth and steroid synthesis of bovine preantral follicles in different stages of differentiation *in vitro*. *J Reprod Fert* 1998: Abstr. Series No. **21**: 8, abstr. 1.
- [36] RALPH JH, WILMUT J, TELFER EE. *In vitro* growth of bovine preantral follicles and the influence of FSH on follicular and oocyte diameters. *J Reprod Fert* 1995: 15 (Abstr. Series): 6 abstr.
- [37] RALPH JH, WILMUT J, TELFER EE. The effects of FSH on bovine preantral to early antral ovarian follicle growth *in vitro*. *Biol Reprod* 1996; **54** (suppl. 1): 5 abstr.
- [38] ROY SK, GREENWALD GS. An enzymatic method for dissociation of intact follicles from the hamster ovary: histological and quantitative aspects. *Biol Reprod* 1985; **32**: 203–215.
- [39] ROY SK, GREENWALD GS. Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. *J Reprod Fert* 1989; **87**: 103–114.
- [40] ROY SK, TREACY BJ. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril* 1993; **59**: 783–790.
- [41] SAHA S, SHIMIZU M, GESHI M, IZAIKE Y. *In vitro* culture of bovine preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 2000; **63**: 27–39.
- [42] SAUMANDE J. La folliculogénèse chez les ruminants. *Rec Vét* 1991; **167**: 205–218.
- [43] SCHOTANUS K, HAGE WJ, SPEK ER, BEVERIS MM, Van den HURK R. Viability aspects of isolated bovine preantral follicles. *Proc 13th ICAR* 1996: P7-27 abstr.
- [44] TELFER EE, TORRANCE C, GOSDEN RG. Morphological study of cultured preantral follicles of mice after transplantation under the kidney capsule. *J Reprod Fert* 1990; **89**: 555–561.
- [45] TORRANCE C, TELFER EE, GOSDEN RG. Quantitative study of the development of isolated mouse pre-antral follicles in collagen gel culture. *J Reprod Fert* 1989; **87**: 367–374.

- [46] WANDJI SA, SRŠEŇ V, VOSS AK, EPPIG JJ, FORTUNE JE. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod* 1996; **55**: 942–948.
- [47] WANDJI SA, EPPIG JJ, FORTUNE JE. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology* 1996; **45**: 817–832.
- [48] YAMAMOTO K, OTOI T, KOYAMA N, HORIKITA N, TACHIKAWA S, MIYANO T. Development to live young from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization *in vitro*. *Theriogenology* 1999; **52**: 81–89.

Adres autora: Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, IZ
32-083 Balice k/Krakowa
e-mail: lkatska@izoo.krakow.pl

The first step in the process of creating a new business is to identify a market opportunity. This involves conducting market research to determine the size and growth potential of the market, as well as the needs and preferences of potential customers. Once a market opportunity has been identified, the next step is to develop a business plan that outlines the company's goals, strategies, and financial projections.

After the business plan has been developed, the entrepreneur must secure the necessary funding to start the business. This can be done through a variety of sources, including personal savings, family and friends, bank loans, and venture capital. Once the funding has been secured, the entrepreneur can begin to set up the business and hire employees.

Finally, the entrepreneur must focus on marketing and sales to attract customers and generate revenue. This involves developing a marketing strategy that identifies the target market and the most effective ways to reach them. Once the marketing strategy has been implemented, the entrepreneur must focus on providing excellent customer service to build a loyal customer base.

In conclusion, creating a new business is a complex and challenging process that requires careful planning and execution. By following the steps outlined above, entrepreneurs can increase their chances of success and build a profitable and sustainable business.

The second step in the process of creating a new business is to develop a business plan. This document serves as a roadmap for the entrepreneur, outlining the company's goals, strategies, and financial projections. It is a critical tool for securing funding and guiding the business's growth.

When developing a business plan, the entrepreneur should start by identifying the market opportunity and conducting market research. This will help to determine the size and growth potential of the market, as well as the needs and preferences of potential customers. The business plan should then outline the company's goals and strategies for achieving them.

Next, the entrepreneur should develop a financial plan that outlines the company's expected revenue and expenses. This will help to determine the amount of funding needed to start the business and the timeline for when the business will become profitable. The financial plan should also include a break-even analysis to determine the point at which the business will start to generate a profit.

Finally, the entrepreneur should develop a marketing and sales plan that outlines the most effective ways to reach the target market and generate revenue. This plan should include a list of marketing channels, such as social media, email, and direct mail, and a budget for each channel. It should also include a sales strategy that identifies the most effective ways to convert leads into customers.

In conclusion, developing a business plan is a critical step in the process of creating a new business. It provides a clear roadmap for the entrepreneur and helps to secure the necessary funding to get the business started. By following the steps outlined above, entrepreneurs can develop a business plan that sets them up for success.

The third step in the process of creating a new business is to secure the necessary funding. This can be a challenging task, as many entrepreneurs do not have the financial resources to start their own business. However, there are a variety of sources of funding available, including personal savings, family and friends, bank loans, and venture capital.

When seeking funding, the entrepreneur should start by reaching out to family and friends to see if they are willing to invest in the business. This can be a good option, as these individuals are often more likely to understand the entrepreneur's vision and provide the necessary support. If this option is not available, the entrepreneur should consider applying for a bank loan or seeking venture capital funding.

NAJNOWSZE OSIĄGNIĘCIA W KRIOKONSERWACJI OOCYTÓW SSAKÓW ORAZ PERSPEKTYWY ICH WYKORZYSTANIA W MEDYCYNIE I WETERYNARII

RECENT ADVANCES IN MAMMALIAN OOCYTE CRYOPRESERVATION AND PERSPECTIVES OF THEIR APPLICATION IN MEDICINE AND VETERINARY

Krzysztof PAPIS

Zakład Embriologii Doświadczalnej Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN,
Jastrzębiec, oraz Prywatna Przychodnia Leczenia Niepłodności „nOvum”,
Warszawa

Streszczenie: Bardzo szerokie potencjalne możliwości zastosowania kriokonserwowanych oocytów w medycynie (leczenie niepłodności małżeńskiej, donacja oocytów itp.), w weterynarii i hodowli zwierząt (rozszerzenie wykorzystania potencjału genetycznego samic), ekologii (tworzenie banków oocytów gatunków zwierząt zagrożonych wyginięciem) czy wreszcie w doświadczałnictwie (np. wykorzystanie oocytów czy cytoplazm przy klonowaniu) ograniczane były do niedawna niską skutecznością metod kriokonserwacji. Metody kriokonserwacji, stosowane dość skutecznie wobec oocytów myszy, królika i do pewnego stopnia wobec oocytów ludzkich, okazały się mało przydatne do kriokonserwacji oocytów zwierząt gospodarskich. Szczególnie intensywnym badaniom poddawano przez ostatnie kilkanaście lat oocyty bydła. Jednak bez względu na stosowane środki kriochronne i metody kriokonserwacji (zamrażanie lub witrifikacja) w najlepszym razie tylko kilka procent oocytów tego gatunku rozwijało się po zapłodnieniu *in vitro* do stadium blastocysty (przy rozwoju oocytów kontrolnych sięgających ostatnio nawet 35–50%). Pomimo więc narodzin kilku cieląt (począwszy od roku 1992 – początkowo wyłącznie w Japonii), trudno było stosowane metody kriokonserwacji oocytów bydła uznawać za skuteczne. Przełom w kriokonserwacji oocytów ssaków przyniosły metody określane jako witrifikacja w próbkach o minimalnej objętości (minimum *sample size*) lub prościej – jako otwarte metody witrifikacji. Metody te, stosowane już dzisiaj w kilku wariantach, przyniosły zdecydowaną poprawę przeżywalności oocytów i wczesnych zarodków bydła, zarodków świni i chomika, a wreszcie – zaczynają znajdować zastosowanie do kriokonserwacji oocytów i zarodków człowieka.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28 supl. 18: 189–200)

Słowa kluczowe: witrifikacja, oocyt, pre-ekwilibracja, bydło, człowiek

Summary. There are many possible practical applications of mammalian oocyte cryopreservation, providing the methods are efficient. Of practitioners interest is organizing banks of oocytes in order to conserve genetic resources, and to increase an impact of female genetic potential in animal breeding. Human medicine needs an established technology of oocyte cryopreservation, to improve moral and logistic circumstances of artificial (*in vitro*) infertility treatment. Experiments on cloning of animals needs a great number of cytoplasts, which might be easier prepared if sufficient number of oocytes is collected. However, many years of experiments on mammalian oocyte cryopreservation gave acceptable results only in the case of mouse, rabbit and (to some extent) human. Even considering limited ratio of bovine embryos that developed after *in vitro* fertilization of frozen or vitrified oocytes and some few calves born (primarily in Japan) it was difficult until recently to treat the general efficiency of bovine oocyte cryopreservation as satisfactory. A real breakthrough in bovine oocyte survival was achieved when minimum sample size vitrification methods was introduced. These methods which are referred in his paper to as an „open” vitrification system, gave high survival rate of fragile embryos (pig, hamster, cleavage stage bovine embryos) and especially, when combined with a gentle pre-equilibration of cells, gave a high survival rate of vitrified bovine oocytes.

(*Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18 :189–200*)

Key words: vitrification, minimum sample size, oocyte, pre-equilibration, bovine, human

WSTĘP

Bardzo szerokie potencjalne możliwości zastosowania kriokonserwowanych oocytów w medycynie (leczenie niepłodności małżeńskiej, donacja oocytów itp.), w weterynarii i hodowli zwierząt (rozszerzenie wykorzystania potencjału genetycznego samic), ekologii (tworzenie banków oocytów gatunków zwierząt zagrożonych wyginięciem) czy wreszcie w doświadczałnictwie (np. wykorzystanie oocytów czy cytoplastów przy klonowaniu) ograniczane były do niedawna niską skutecznością dostępnych metod kriokonserwacji.

Badania nad kriokonserwacją oocytów, prowadzoną początkowo metodami tradycyjnego zamrażania, pierwsze pozytywne efekty przyniosły jeszcze w latach siedemdziesiątych [66]. Oocyty myszy i królika okazały się stosunkowo odporne na stress związany z metodą, toteż wkrótce uzyskano potomstwo z zamrożonych oocytów tych gatunków ssaków (przegląd piśmiennictwa w [40,59]). Jednak skuteczności ówczesnych metod zamrażania nie udało się potwierdzić w stosunku do oocytów zwierząt gospodarskich [13,14]. Szczególnie intensywnie badano możliwość kriokonserwacji oocytów bydła, gatunku bardzo istotnego z praktycznego (hodowlanego) punktu widzenia. Stosując metody tradycyjnego zamrażania, jak również metodę witrifikacji, już na początku lat dziewięćdziesiątych uzyskano w Japonii pierwsze cielęta z kriokonserwowanych oocytów [9,12]. Jednak pobieżna choćby analiza rezultatów licznych publikowanych wówczas badań wskazuje na niską efektywność stosowanych metod. Najwyższy odsetek zarodków (w stadium blastocysty) uzyskiwanych *in vitro* z kriokonserwowanych oocytów nie przekraczał 10% w

stosunku do wyjściowej liczby oocytów poddanych kriokonserwacji [12,19,-23,37,38,61]

Nieco lepiej przedstawia się skuteczność kriokonserwacji oocytów ludzkich. W drugiej połowie lat osiemdziesiątych urodziły się pierwsze dzieci po zapłodnieniu pozaustrojowym zamrożonych oocytów [5]. Jednak wkrótce potem odnotowano doniesienia wskazujące na podstawie badań oocytów myszy na istotne ryzyko wiążące się z wykorzystywaniem w rozrodzie kriokonserwowanych komórek jajowych. Z tego powodu kolejne prace dotyczące kriokonserwacji oocytów człowieka pojawiły się po kilkuletniej przerwie – na początku lat dziewięćdziesiątych. Zanotowany wówczas wzrost odsetka zarodków uzyskiwanych po zapłodnieniu zamrażanych oocytów wiązał się jednak raczej z wprowadzeniem metody docytoplazmatycznej iniekcji plemnika (ICSI) przynoszącej wyższy odsetek zapłodnionych komórek jajowych niż z postęпами kriokonserwacji [32,51,52].

Pomimo więc formułowanych opinii o względnej odporności oocytów ludzkich na zamrażanie [10] uzyskiwanie tylko nieco ponad 60% oocytów przeżywających zamrażanie, przy jednoczesnym, już choćby nieznacznym obniżeniu odsetka oocytów dających się zapłodnić metodą ICSI sprawia, że niemal połowa oocytów poddanych kriokonserwacji staje się nieużyteczna do rozrodu.

WRAŻLIWOŚĆ OOCYTÓW A METODY KRIOKONSERWACJI

Powstaje pytanie o to, gdzie leżą przyczyny tak znacznej wrażliwości oocytów na kriokonserwację? Ogólnie mówiąc, przyczyn trudności w opracowaniu skutecznej metody kriokonserwacji oocytów szukać można zarówno po stronie samych komórek, jak i po stronie czynników zewnętrznych oddziałujących na oocyt przed i w trakcie kriokonserwacji.

Oocyty ssaków są wysoko wyspecjalizowanymi komórkami o unikalnej budowie i funkcji. Nawet nieznaczne zaburzenie struktur morfologicznych czy procesów molekularnych może uniemożliwić prawidłową realizację funkcji biologicznej oocytu. Tymczasem opisano już wiele niekorzystnych efektów (tab. 1) obserwowanych głównie w oocytach królika, myszy, bydła i człowieka, powodowanych przez środki kriochronne czy też powstających na skutek ekspozycji oocytów na niską temperaturę [49,50,54,55,65], przegląd piśmiennictwa w [28,32,57]. Stwierdzono ponadto znaczne różnice w odporności na kriokonserwację oocytów różnych gatunków ssaków.

W ciągu ostatnich kilku lat podejmowano wiele prób zdefiniowania i rozwiązania zarysowanych powyżej problemów. Poszukiwania metod podnoszących skuteczność kriokonserwacji oocytów posuwały się zwykle w dwóch kierunkach.

TABELA 1. Niektóre z niekorzystnych efektów wywieranych na oocyty przez środki osłaniające i/lub niską temperaturę

Obserwowane zaburzenie	Obserwowany i/lub przewidywany skutek biologiczny
Zaburzenia równowagi między aktywną włókienkową F a globularną G	– zaburzenia rotacji wrzeciona podziałowego, – zaburzenia formowania ciała kierunkowego, – zaburzenia migracji przedjądrzy w kierunku centrum jaja
Demontaż wrzeciona podziałowego	– zaburzenia dystrybucji chromatyd (w konsekwencji np. aneuploidia)
Przedwczesna egzocytoza ziaren korowych	– utrudnienie zapłodnienia, – zaburzenia bloku przeciwko polispermii
Twardnienie osłonki przejrzystej	– utrudnienie przenikania plemników przez osłonę

Pierwszy z nich koncentrował się na zmniejszeniu ryzyka uszkodzeń struktury oocytu przez wybór najbardziej odpornego stadium dojrzałości mejotycznej komórki. Tak więc, oprócz badań nad oocytami dojrzałymi (zahamowanymi w stadium drugiej metafazy) wykonano liczne prace nad kriokonserwacją niedojrzałych (tzn. znajdujących się w stadium pęcherzyka zarodkowego) oocytów myszy [m.in. 20,34], bydła [m.in. 15,19,23,27,29,38,61], świni [21], kota [30,31] czy wreszcie człowieka [11,18,32,62]. Pracom tym przyświecała nadzieja na uniknięcie destrukcji chromatyny czy elementów cytoszkieletu komórki – znajdujących się w niedojrzałych oocytach stanie de kondensacji czy depolimeryzacji. Podobny cel stawiali sobie i badacze poddający kriokonserwacji oocyty w pośrednich stadiach mejozy, tzn. poddane uprzednio tylko kilku- czy kilkunastogodzinemu dojrzewaniu *in vitro* [15,19,63]. Jakkolwiek powyższe podejście wydaje się bardzo obiecujące, jednak jak na razie nie przyniosło samo przez się istotnego zwiększenia odsetka oocytów przeżywających proces kriokonserwacji. Bardzo ciekawe próby „farmakologicznej” ochrony pewnych struktur komórkowych (np. niektórych elementów cytoszkieletu) za pomocą cyochalazyny, składników żółtka jaja czy EGTA [20,21,27,35], czy też wpływań na fizyko-chemiczne parametry błon komórkowych również nie przyniosły spodziewanych rezultatów [68,69]. Obniżeniu toksyczności roztworów podczas wolnego schładzania komórek służą natomiast próby zastąpienia niektórych składników tych roztworów (chodzi głównie o NaCl) przez związki osmotycznie obojętne, takie jak np. cholina [11,60]

Drugi kierunek badań koncentrował się na doskonaleniu kriobiologicznej strony zagadnienia. Jeśli bowiem stwierdzono negatywny wpływ środków osłaniających i obniżonej temperatury na losy oocytów poddawanych kriokonserwacji, należało poszukiwać takich procedur, które minimalizowały udział obu tych czynników. O ile jednak toksyczność środków osłaniających w stosunku do zamrażanych zarodków udawało się w niektórych przypadkach ograniczyć dzięki stosowaniu eis-

pozycji w obniżonej temperaturze (np. do +4C), to w stosunku do oocytów, szczególnie gatunków wyjątkowo wrażliwych na niższe temperatury (bydło, świnia), takie postępowanie nie wchodziło zazwyczaj w grę.

WITRYFIKACJA – ALTERNATYWNA METODA KRIOKONSERWACJI

Pierwszym możliwym do zastosowania rozwiązaniem było wprowadzenie do kriokonserwacji oocytów metody witrifikacji. Witrifikacja (zeszklenie) jest procesem fizycznym prowadzącym do przejścia cieczy w ciało stałe, dzięki zwiększeniu lepkości cieczy w warunkach gwałtownego spadku temperatury. W procesie witrifikacji nie powstają kryształy lodu, które są jednym z podstawowych czynników uszkadzających komórki podczas tradycyjnego zamrażania. Pomimo konieczności zastosowania w tym procesie wysoko stężonych (a więc w konsekwencji – groźniejszych dla oocytów) roztworów środków osłaniających, wykryto możliwość bardzo krótkiej (10–20 s) ekspozycji tych komórek na działanie roztworów witrifikacyjnych [12,36]. Z drugiej strony, bardzo wysokie tempo schładzania, niezbędne dla prawidłowego przebiegu witrifikacji sprzyja skróceniu ekspozycji oocytów na zakres temperatur potencjalnie szkodliwych.

Jakkolwiek stosowano witrifikację oocytów myszy [36], konia [16] i świni [21] oraz wielokrotnie oocytów bydła, zarówno niedojrzałych [23,27], dojrzałych [27, 39,44], jak i w stadiach pośrednich mejozy [15], wymierne sukcesy dotyczyły w zasadzie tylko oocytów myszy. Po zapłodnieniu *in vitro* oocytów bydła udało się co prawda uzyskać kilka cieląt, jednak odsetek komórek przeżywających kriokonserwację był nadal rozczarowująco niski [23,27,39,44]. Również najnowsze rezultaty witrifikacji oocytów ludzkich [6] nie dają podstaw do szczególnego optymizmu. Udało się co prawda uzyskać w tym przypadku dość wysoki odsetek dzielących się zarodków, jednak ani jeden z nich nie rozwinął się do stadium blastocysty.

OTWARTE METODY WITRYFIKACJI – ZNAMIONA PRZEŁOMU

Przełom w kriokonserwacji oocytów ssaków przyniosły dopiero metody określane jako witrifikacja w próbkach o minimalnej objętości (*minimum sample size*) lub prościej – jako otwarte metody witrifikacji [43,64]. Metody te, stosowane już dzisiaj w kilku wariantach, przyniosły zdecydowaną poprawę przeżywalności oocytów i wczesnych zarodków bydła [2,33,46,47,48,63], zarodków świni [17] i chomika [25],

a wreszcie zaczynają znajdować zastosowanie do kriokonserwacji oocytów [7,18,24,67] i zarodków człowieka [26]. Przynajmniej dziesięciokrotne obniżenie objętości płynu, wityfikowanego wraz z zawieszonymi w nim komórkami skutkuje znakomitym przyspieszeniem tempa schładzania (a następnie – ogrzewania) próbki umieszczonej w ciekłym azocie. Wykazano, że schładzanie zawartości słomki inseminacyjnej (objętość całkowita – 0,25 ml) przebiega z szybkością ok. 2000°C/min. Natomiast schładzanie oocytów osadzonych w płynie o objętości 2 µl na siateczce do mikroskopu elektronowego [2,7,18,33,67] zachodzi z szybkością mieszczącą się w granicach 10–40 000°C/min [33,64]. Z podobną szybkością zachodzi schładzanie w wąskiej, wyciągniętej słonce (metoda OPS – *Open Pulled Straw*, [24,63,64]), nylonowej mini pętlice (metoda *cryo-loop* [25,26]) czy wreszcie nieznacznie tylko wolniej w kropelkach roztworu wityfikacyjnego wkraplanych wraz z oocytami bezpośrednio do ciekłego azotu [43,47,48]. W warunkach ultraszybkiego schładzania ułatwiony jest proces wityfikacji i jeszcze szybsze jest przejście komórek przez krytyczny zakres temperatur. Ponadto, metody otwarte umożliwiają znacznie sprawniejsze prowadzenie ekwilibracji komórek przed schładzaniem oraz usuwania środków osłaniających po ogrzaniu [43].

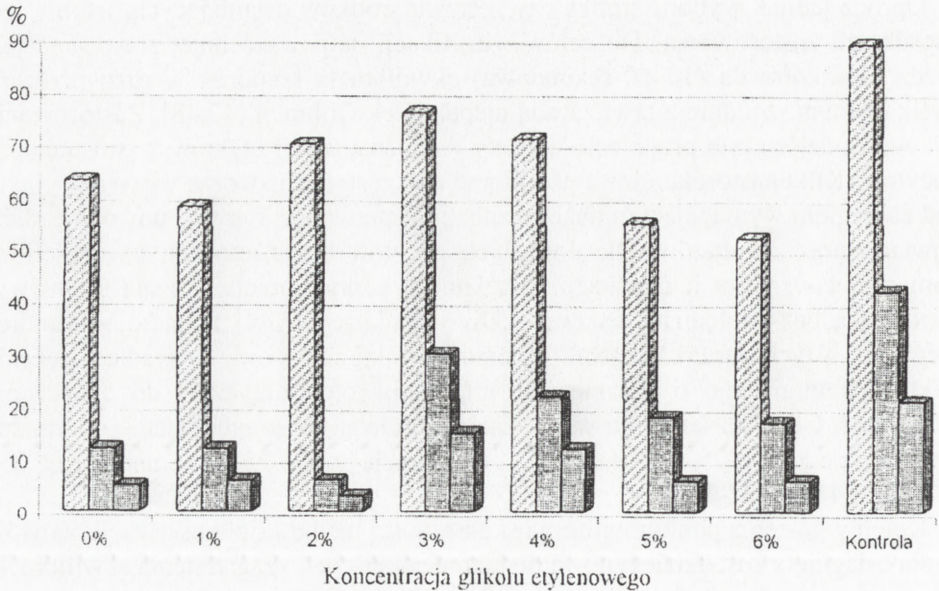
Wprowadzenie otwartych metod wityfikacji przyniosło zdecydowany wzrost odsetka oocytów bydła przeżywających kriokonserwację. Vajta i wsp. [63] uzyskali nawet 25% blastocyst po zapłodnieniu *in vitro* oocytów umieszczonych w ciekłym azocie za pośrednictwem metody OPS. Był to zdecydowany postęp, nawet gdy weźmiemy pod uwagę, że odsetek blastocyst uzyskiwany w tym laboratorium po zapłodnieniu kontrolnych, niewityfikowanych oocytów był blisko dwukrotnie wyższy.

PRE-EKWILIBRACJA OOCYTÓW – KOLEJNY KROK NAPRZÓD

Istotnym elementem kriokonserwacji, który przez wiele lat zachował praktycznie niezmienną postać, jest ekwilibracja komórek w środkach osłaniających. Oprócz skuteczności w ochronie przed krystalizacją podczas zamrażania, czy skłonności do ulegania zeszkleniu, środki osłaniające muszą być względnie nietoksyczne dla komórek. Testowaniu pod takim kątem poddano bardzo liczne środki osłaniające, występujące pojedynczo lub w zestawach [1,19,42,43,44,56]. Do celów wityfikacji stosuje się najczęściej [42,43] kompozycje określane jako VS1, VS3 [53], EFS [22], VS14 [1,7,18,33,44,48,67] oraz glikol etylenowy w połączeniu z dwumetylosulfotlenkiem (DMSO) [4,17,63,64]. Do wityfikacji oocytów używa się obecnie głównie dwóch ostatnich roztworów.

Oprócz jednak wyboru środka czy zestawu środków osłaniających, istotny jest sposób ich zastosowania. Do celów witrifikacji najpowszechniej stosowana jest bardzo krótkotrwała (10–60-sekundowa) ekwilibracja komórek w roztworze witrifikacyjnym, zgodnie z tzw. zasadą niepełnej ekwilibracji [42,43]. Zastosowanie takiego podejścia nie przyniosło niestety jednoznacznych efektów w stosunku do oocytów. Kilkunastosekundowa ekwilibracja w gęstym roztworze witrifikacyjnym jest zabiegiem wymagającym dużej manualnej sprawności i często powoduje słabą powtarzalność rezultatów. Dla dojrzałych oocytów była, otoczonych częściowo komórkami wzgórka jajonośnego 15-sekundowa ekwilibracja okazała się niewystarczająca, bez względu na zestaw środków osłaniających [44]. Ponadto, w komórce ulegającej w tych warunkach gwałtownemu odwodnieniu tworzy się gradient stężenia środka osłaniającego o parametrach niemożliwych praktycznie do oznaczenia [42,43,48]. Od kilku lat przed witrifikacją stosuje się więc najczęściej, optymalną przy tym podejściu 25–30-sekundową ekwilibrację oocytów w temperaturze 35–37°C [33,41,44,63].

Kolejny postępowanie z punktu widzenia skuteczności metod kriokonserwacji oocytów była osiągnięty został dzięki nowatorskiemu podejściu do zagadnienia ekwilibracji, czy raczej pre-ekwilibracji komórek [28,46,47,48,63]. Zastosowanie w tym przypadku dodatkowego, dłuższego okresu (12–15 min) pre-ekwilibracji oocytów w rozcieńczonym (a więc nieszkodliwym) roztworze glikolu etylenowego, przeprowadzanej już standardowo w temperaturze prawie fizjologicznej (35–37°C) pozwoliło na całkowite wysycenie środkiem osłaniającym. Stosowana następnie, typowa, 30-sekundowa ekwilibracja poprzedzała umieszczenie komórek wraz z kroplką roztworu witrifikacyjnego bezpośrednio w ciekłym azocie. Zgodnie z hipotezą badaną w opisanym tu doświadczeniu [45,47,48], krótkotrwała ekwilibracja w wysoko stężonym roztworze witrifikacyjnym (VS14), poprzez wywołanie gwałtownego odwodnienia komórki powodowała chwilowy, wielokrotny wzrost stężenia glikolu etylenowego (EG) wchłoniętego przez komórkę w czasie pre-ekwilibracji. Jakkolwiek, jak już wspomniano, bardzo trudno jest ustalić faktyczne stężenie wewnątrzkomórkowego EG w tak dynamicznie zmieniających się warunkach [42], można określić optymalne wyjściowe stężenie tego środka osłaniającego w roztworze pre-ekwilibracyjnym. Rezultaty przeprowadzonego eksperymentu (ryc. 1) wykazały, że trzyprocentowe stężenie EG było najodpowiedniejsze z punktu widzenia rezultatów witrifikacji oocytów przeprowadzanej metodą otwartą (w kroplach) [46,48]. Różnica pomiędzy odsetkiem blastocyst wyhodowanych w grupach doświadczalnej (3% EG, 16/54, 29,6%) i kontrolnej (oocyty niewitrifikowane – 22/53, 41,5%) okazała się nieistotna statystycznie [46,48]. Urodzenie w lutym 1999 r. buhajka rasy czarnej japońskiej po transferze 4 zarodków otrzymanych *in vitro* z witrifikowanych oocytów, potwierdziło możliwość kompletnego rozwoju prenatalnego uzyskiwanych zarodków [48].



- ▨ Odsetek zarodków dzielących się
- Odsetek zarodków rozwiniętych do stadium blastocysty
- ▤ Odsetek zarodków rozwiniętych do stadium wylężonej blastocysty

RYCINA 1. Odsetek zarodków rozwiniętych po zapłodnieniu *in vitro* oocytów bydła wtryfikowanych w VS14, po pre-ekwilibracji w różnych stężeniach glikolu etylenowego (wg Papis i wsp. [46,48])

Jakkolwiek trudno jest dzisiaj wyrokować o rzeczywistym, praktycznym znaczeniu metody pre-ekwilibracji dla rozwoju powszechnie dostępnych metod kriokonserwacji oocytów (czy szerzej – także zarodków) pierwsze zastosowania już się pojawiły. Dinnyesh i wsp. [8] uzyskali klonowane zarodki bydła stosując do produkcji cytoplastów (czyli oocytów pozbawionych własnego jądra) oocyty wtryfikowane wg powyższego schematu. Wcześniej, uzyskiwano już cytoplasty z oocytów wtryfikowanych metodą OPS [4]. System pre-ekwilibracji sprawdził się również w stosunku do młodych dwu- i trzydniowych zarodków bydła [43,47]. Nie był on jak dotychczas testowany w odniesieniu do oocytów człowieka. Dalszych badań wymaga z kolei zastosowanie metody pre-ekwilibracji do wtryfikacji niedojrzałych oocytów bydła, których występowanie w funkcjonalnym kompleksie z komórkami ziarnistymi pęcherzyka jajnikowego poważnie komplikuje skuteczną kriokonserwację [41,45].

PODSUMOWANIE

Wydaje się, że w chwili obecnej można już wyrazić uzasadnioną nadzieję, że rezultaty badań przeprowadzonych w ostatnich kilku latach stanowią wystarczający materiał dla opracowania wysoko wydajnych, użytecznych praktycznie procedur kriokonserwacji oocytów, łączących zalety poszczególnych wariantów metodycznych, które przynajmniej w odniesieniu do oocytów ludzkich i bydłych pozwolą na uruchomienie oczekiwanych od dawna banków tych komórek. Można też np. zaryzykować tezę, że połączenie pre-ekwilibracji oocytów w optymalnym stadium mejozy, z ochronnym efektem cytochalazyny oraz witrifikacją metodą ultraszybka (choć niekoniecznie metodą otwartą [3,43], będzie taką „receptą” spełniającą nasze oczekiwania. Zresztą pewne próby połączenia rozmaitych wariantów metodycznych już trwają [3,58].

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALIJ, SHELTON JN. Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1993; **98**: 459–465.
- [2] ARAV A, ZERON Y. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology* 1997; **47**: 341.
- [3] ARAV A, ZERON Y, OCHERETNY A. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology* 2000; **53**: 248 (abstr.).
- [4] BOOTH PJ, VAJTA G, HØI A, HOLM P, JACOBSEN H, GREVE T, CALLESEN H. Full-term development of nuclear transfer calves produced from open-pulled straw (OPS) vitrified cytoplasts: work in progress. *Theriogenology* 1999; **51**: 999–1006.
- [5] CHEN C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1989; **1**: 884–886.
- [6] CHEN SU, LIEN YR, CHAO KH, LU HF, HO HN, YANG YS. Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. *Fertil Steril* 2000; **74**: 804–808.
- [7] CHUNG HM, HONG SW, LIM JM, LEE SH, CHA WT, KO JJ, HAN SY, CHOI DH, CHA KY. *In vitro* blastocyst formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages. *Fertil Steril* 2000; **73**: 545–551.
- [8] DINNYES A, DAI Y, JIANG S, YANG X. Somatic cell nuclear transfer with vitrified recipient oocytes in cattle. *Theriogenology* 2000; **53**: 215 (abstr.).
- [9] FUKU E, KOJIMA T, SHIOYA Y, MARCUS GJ, DOWNEY BR. *In vitro* fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology* 1992; **29**: 485–492.
- [10] GOOK D, EDGAR DH. Cryopreservation of the human female gamete: current and future issues. *Hum Reprod* 1999; **14**: 2938–2940.
- [11] GOUND A, GOUND P, QIAN C, Van der ELST J, Van MAELE G, DHONT M. Cryopreservation of human germinal vesicle stage and *in vitro* matured M II oocytes: influence of cryopreservation media on the survival, fertilization, and early cleavage divisions. *Fertil Steril* 2000; **74**: 487–494.

- [12] HAMANO S, KOIKEDA A, KUWAYAMA M, NAGAI T. Full-term development of *in vitro*-matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 1992; **38**: 1085–1090.
- [13] HEYMAN Y, SMORAG Z, KAŤSKA L, VINCENT L. Influence of carbohydrates, cooling and rapid freezing on viability of bovine non-matured oocytes or 1-cell fertilized eggs. *Cryo-lett* 1986; **7**: 170–183.
- [14] HOCHI S, FUJIMOTO T, CHOI HY, BRAUN J, OGURI N. Cryopreservation of equine oocytes by 2-step freezing. *Theriogenology* 1994; **42**: 1085–1094.
- [15] HOCHI S., ITO K, HIRABAYASHI M, UEDA M., KIMURA K., HANADA A. Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. *Theriogenology* 1998; **49**: 787–796.
- [16] HOCHI S, KOZAWA M, FUJIMOTO T, HONDO E, YAMADA J, OGURI N. *In vitro* maturation and transmission electron microscopic observation of horse oocytes after vitrification. *Cryobiology* 1996; **33**: 300–310.
- [17] HOLM P, VAJTA G, BOOTH P, CALLESEN H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification of porcine blastocysts: simple procedure yielding excellent *in vitro* survival but so far no piglets following transfer. *Cryo-Lett* 1999; **20**: 315–319.
- [18] HONG SW, CHUNG HM, LIM JM, KO JJ, YOO TK, YEE B, CHA KY. Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil Steril* 1999; **72**: 142–146.
- [19] IM KS, KANG JK, KIM HS. Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine oocytes. *Theriogenology* 1997; **47**: 881–891.
- [20] ISACHENKO EF, NAYUDU PL. Vitrification of mouse germinal vesicle oocytes: effect of treatment temperature and egg yolk on chromatin and spindle normality and cumulus integrity. *Hum Reprod* 1999; **14**: 400–408.
- [21] ISACHENKO V, SOLER C, ISACHENKO E, PEREZ-SANCHEZ F, GRISCHENKO V. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* 1998; **36**: 250–253.
- [22] KASAIM, KOMI JH, TAKAKAMO A, TSUDERA H, SAKURAI T., MACHIDA T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 1990, **89**: 90–97.
- [23] KÜCHENMEISTER U, KUWAYAMA M. *In vitro* blastocyst formation after vitrification of immature bovine oocytes. *Theriogenology* 1997; **47**: 297.
- [24] KULESHOVA L, GIANAROLI L, MAGLI C, FERRARETTI A, TROUNSON A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes. *Hum Reprod* 1999; **14**: 3077–3079.
- [25] LANE M, FOREST KT, LYONS EA, BAVISTER BD. Live birth following vitrification of hamster embryos using a novel containerless technique. *Theriogenology* 1999; **51**: 167 (abstr.).
- [26] LANE M, SCHOOLCRAFT WB, GARDNER DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 1999; **72**: 1073–1078.
- [27] Le GAL F, MASSIP A. Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. *Cryobiology* 1999; **38**: 290–300.
- [28] LEDDA S, LEONI G, BOGLIOLO L, NAITANA S. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. *Theriogenology* 2001; **55**: 1299–1371.
- [29] LIM JM, FUKUI Y, ONO H. Developmental competence of bovine oocytes at various maturation stages followed by *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology* 1992; **37**: 351–362.
- [30] LUVONI GC, PELLIZZARI P, BATTOCCHIO M. Effects of slow and ultrarapid freezing on morphology and resumption of meiosis in immature cat oocytes. *J Reprod Fertil* 2001; **51**: 93–98.
- [31] LUVONI GC, PELLIZZARI P. Embryo development *in vitro* of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. *Theriogenology* 2000; **53**: 1529–1540.

- [32] MANDELBAUM J, BELAISCH-ALLART J, JUNCA AM, ANTOINE JM, PLACHOT M, ALVAREZ S, ALNOT MO, SALAT-BAROUX J. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *Hum Reprod* 1999; **13** (Suppl. 3): 161–177.
- [33] MARTINO A, SONGSASEN N, LEIBO SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996; **54**: 1059–1069.
- [34] MIYAKE T, KASAI M, ZHU SE, SAKURAI T, MACHIDA T. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology* 1993; **40**: 121–134.
- [35] MOGAS T, KESKINTEPE L, YOUNIS AI, BRACKETT BG. Effects of EGTA and slow freezing of bovine oocytes on post-thaw development *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1999; **52**: 86–98.
- [36] NAKAGATA N. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J Reprod Fert* 1989; **87**: 479–483.
- [37] OTOIT, TACHIKAWA S, KONDO S, SUZUKI T. Developmental capacity of bovine oocytes cryopreserved after maturation *in vitro* and of frozen-thawed bovine embryos derived from frozen mature oocytes. *Theriogenology* 1992; **38**: 711–719.
- [38] OTOI T, YAMAMOTO K, KOYAMA N, SUZUKI T. *In vitro* fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. *Cryobiology* 1995; **32**: 455–460.
- [39] OTOI T, YAMAMOTO K, KOYAMA N, TACHIKAWA S, SUZUKI T. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. *Cryobiology* 1998; **37**: 77–85.
- [40] PALASZ AT, MAPLETOFT RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol Adv* 1996; **14**: 127–149.
- [41] PAPIS K. The effect of cumulus cells on survival of vitrified bovine *in vitro* matured oocytes (abstr). *13th Int. Congress on Anim Reprod* Sydney 1996, Proceedings, vol 3: P15–17.
- [42] PAPIS K. Metody kriokonserwacji zarodków ssaków. [w] Zwierzchowski L, Jaszczak K, Modliński M. [red] *Biotechnologia Zwierząt*, PWN Warszawa 1997; 472–499.
- [43] PAPIS K. Otwarte metody witrifikacji i ich zastosowanie w kriokonserwacji oocytów i zarodków ssaków. *Medycyna Weterynaryjna* 2001; **57**: 547–551.
- [44] PAPIS K, AVERY P, HOLM P, CALLESEN H, GREVE T. The effect of vitrification solution, equilibration time and direct dilution method on survivability of equilibrated or vitrified bovine *in vitro* matured oocytes. *Theriogenology* 1995; **43**: 293 (abstr.).
- [45] PAPIS, K., SHIMIZU, M., IZAIKE Y.: Preliminary results of vitrification of bovine immature oocytes. *Anim Sci Pap Rep* 1998; **16** (Suppl. 1): 63–65.
- [46] PAPIS K, SHIMIZU M, IZAIKE Y. The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine *in vitro* matured oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 1999; **51**: 173 (abstr.)
- [47] PAPIS K, SHIMIZU M, IZAIKE Y. A highly efficient modified vitrification method for Day 3 *in vitro* produced bovine embryos. *Cryo-Lett* 1999; **20**: 203–206.
- [48] PAPIS K, SHIMIZU M, IZAIKE Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 2000; **54**: 651–658.
- [49] PARKS JE, RUFFING NA. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology* 1992; **37**: 59–73.
- [50] PICKERING SJ, BRAUDE PR, JOHNSON MH, CANT A, CURRIE J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fert Steril* 1990; **54**: 102–108.
- [51] POLAK de FRIED E, NORCA J, RUBINSTEIN M, MARAZZI A, GOMEZ GONZALES M. Pregnancy after human donor oocyte cryopreservation and thawing in association with intracytoplasmic sperm injection in a patient with ovarian failure. *Fertil Steril* 1998; **69**: 555–557.

- [52] PORCU E, FABBRI R, SERACCHIOLI R, CIOTTI PM, MAGRINI O, FLAMIGNI C. Birth of healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997; **68**: 724–726.
- [53] RALL WF, FAHY GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; **313**: 573–575.
- [54] SAUNDERS KM, PARKS JE. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Biol Reprod* 1999; **61**: 178–187.
- [55] SCHALKOFF ME, OSKOWITZ SP, POWERS RD. Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryopreservatives. *Biol Reprod* 1989; **40**: 379–383.
- [56] SCHELLANDER K, PELI J, SCHMOLL F, BREM G. Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of mature and immature bovine oocytes. *Theriogenology* 1994; **42**: 909–915.
- [57] SHAW JM, ORANRATNACHAI A, TROUNSON AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 2000; **53**: 59–72.
- [58] SHIMIZU M, SAHA S, GESHI M. Effect of cytochalasin D on vitrification of bovine *in vitro* matured oocytes in microdroplets. *14th International Congress on Animal Reproduction* Stockholm 2000; Abstracts, vol 2, p. 150.
- [59] SMORAĞ Z, GAJDA B. Cryopreservation of mammalian ova and embryos by vitrification. *Biotechnol Adv* 1994; **12**: 449–465.
- [60] STACHECKI JJ, COHEN J, WILLADSEN S. Detrimental effects of sodium during mouse cryopreservation. *Biol Reprod* 1998; **59**: 395–400.
- [61] SUZUKI, T, BOEDIONO A, TAKAGI M, SAHA S, SUMANTRI C. Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by one-step dilution method *in vitro*. *Cryobiology* 1996; **33**: 515–524.
- [62] TOTH TL, BAKA SG, VEEK LL, JONES HW, MUASHER S, LANZENDORF SE. Fertilization and *in vitro* development of cryopreserved human prophase I oocytes. *Fertil Steril* 1994; **61**: 891–894.
- [63] VAJTA G, HOLMP, KUWAYAMA M, BOOTH PJ, JACOBSEN H, GREVE T, CALLESEN H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; **51**: 53–58.
- [64] VAJTA G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci* 2000; **60–61**: 357–364.
- [65] VINCENT C, GARNIER V, HEYMAN Y, RENARD JP. Solvent affects on cytoskeletal organization and *in vivo* survival after freezing of rabbit oocytes. *J Reprod Fertil* 1989; **87**: 809–820.
- [66] WHITTINGHAM DG. Fertilization *in vitro* and development to term of unfertilised mouse oocytes previously stored at -198°C . *J Reprod Fertil* 1977; **49**: 89–94.
- [67] WU J, ZHANG L, WANG X. *In vitro* maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *J Reprod Fertil* 2001; **121**: 389–393.
- [68] ZERON Y, ARAV A, CROWE JH. The effect of Butylated Hydroxytoluene (BHT) in the lipid phase transition in immature bovine oocytes. *Theriogenology* 1997; **47**: 362 (abstr.)
- [69] ZERON Y, TOMCZAK M, CROWE J, ARAV A. Electrofusion of bovine oocytes with different liposome changes the membrane thermobehaviour and reduces chilling sensitivity. *Theriogenology* 2000; **53**: 267 (abstr.)

Adres autora: Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN
Jastrzębiec, 05-552 Wólka Kosowska

Część II
TRANSPLANTACJA KOMÓREK

CELL TRANSPLANTATION
29 Konferencja szkoleniowa z biologii komórki

Redaktorzy: Jerzy Kawiak i Zofia Osuchowska

The first part of the paper is devoted to the study of the
 properties of the solutions of the problem. It is shown that
 the solutions are unique and depend continuously on the data.
 In the second part, the numerical solution of the problem is
 considered. The finite element method is used for the spatial
 discretization, and the Runge-Kutta method is used for the
 time discretization. The stability and convergence of the
 numerical scheme are studied. The results of numerical
 experiments are presented.

REFERENCES

1. J. L. Lions, *Quelques problèmes de mathématiques appliquées*,
 Dunod, Paris, 1969.
 2. R. Temam, *Navier-Stokes equations*, North-Holland,
 Amsterdam, 1979.
 3. S. G. Krein, *Linear differential equations in Banach spaces*,
 Nauka, Moscow, 1971.
 4. A. N. Tikhonov, *Mathematical methods of nonlinear mechanics*,
 Nauka, Moscow, 1976.
 5. J. G. Heywood, *Nonlinear evolution equations in Banach spaces*,
 Lecture Notes in Math., vol. 1041, Springer-Verlag, Berlin,
 1984.
 6. J. G. Heywood, *Nonlinear evolution equations in Banach spaces*,
 Lecture Notes in Math., vol. 1041, Springer-Verlag, Berlin,
 1984.
 7. J. G. Heywood, *Nonlinear evolution equations in Banach spaces*,
 Lecture Notes in Math., vol. 1041, Springer-Verlag, Berlin,
 1984.

PRZESZCZEPIANIE KOMÓREK W TERAPII NOWOTWORÓW

TRANSPLANTATION OF CELLS IN TUMOR THERAPY

Marek JAKÓBISIAK

Instytut Immunologii, Biostruktury, AM, Warszawa

Summary: One of the promising treatment modalities is to use tumor cells as a form of tumor vaccine. Isolated tumor cells are usually transfected with genes encoding antigen presenting MHC molecules, costimulatory CD80/CD86 and/or cytokines stimulating the immune response. Dendritic cells fed with tumor antigens are also being used for vaccination. Another therapeutic regimen is based on application of T cytotoxic cells able to kill tumor cells.

(*Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18: 203–204*)

W terapii nowotworów komórki przeszczepia się najczęściej w dwóch różnych schematach. Pacjentowi podaje się komórki efektorowe układu odpornościowego po to, żeby bezpośrednio mogły one wywierać swój efekt przeciwnowotworowy albo podaje mu się w formie szczepionki komórki zawierające antygeny nowotworowe po to, żeby pobudzić odpowiedź przeciwnowotworową. Jeżeli chodzi o terapię z użyciem komórek efektorowych układu odpornościowego, to początkowo zainteresowano się tak zwanymi komórkami LAK (*lymphokine activated killers*). Są to limfocyty od chorego na nowotwór, poddane *in vitro* aktywacji interleukiną 2, dzięki czemu nabywają one zdolność zabijania komórek nowotworowych. Zastosowano je w leczeniu czerniaka i raka nerki u ludzi, ale wyniki tych prób okazały się mało zachęcające. Następne próby dotyczyły izolacji z usuniętego operacyjnie guza naciekających go limfocytów T. Limfocyty te nazwano TIL (*tumor infiltrating lymphocytes*). Po inkubacji *in vitro* z interleukiną 2 podaje się je osobnikowi, od którego je wyizolowano, z nadzieją, że będą one naciekały nowotwór i zabijały komórki nowotworowe. Komórki TIL dały w badaniu na zwierzętach znacznie silniejszy efekt przeciwnowotworowy w porównaniu z komórkami LAK. Zasto-

sowano je w próbach klinicznych, lecz ich efektywność terapeutyczna okazała się mniejsza, niż wynikałoby to z doświadczeń na zwierzętach. Aby zwiększyć ich działanie przeciwnowotworowe, próbuje się wprowadzać do komórek TIL geny dla takich cytokin, jak interleukina 2 lub czynnik martwicy nowotworu. Interesujący wynik z użyciem limfocytów uzyskano przeszczepiając szpik allogeniczny pacjentom z przewlekłą białaczką szpikową. Pacjentom, u których po przeszczepieniu szpiku allogenicznego dochodzi do wznowy białaczki, podaje się limfocyty od dawcy szpiku. Przeszczepione limfocyty rozwijają tak zwaną reakcję przeszczepu przeciw białaczce, co prowadzi do bardzo dobrego wyniku terapeutycznego. Podjęto również próby podawania pacjentom z nowotworem limfocytów allogenicznych pobudzonych („uczulonych”) przed przeszczepieniem antygenami nowotworowymi. Podawanie odpowiednio przygotowanych komórek nowotworowych jako szczepionki w celu leczenia nowotworów ma swą długą historię, ale metoda ta przez długie lata nie dawała zachęcających wyników. Wiadomo, że komórki nowotworowe same przez się są mało immunogenne i nie indukują efektywnej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Obecnie próbuje się rozwiązać te trudności wprowadzając do tych komórek odpowiednie geny, aby zwiększyć ich zdolność do indukowania odpowiedzi przeciw antygenom nowotworowym. W tym celu wprowadza się do komórek nowotworowych między innymi geny kodujące:

- a) cząsteczki MHC, które mogłyby zaprezentować limfocytom T antygeny nowotworowe,
- b) cząsteczki kostymulujące CD80/CD86, żeby zwiększyć efektywność tej prezentacji, a także
- c) cytokiny zdolne do pobudzenia odpowiedzi przeciwnowotworowej.

Poznano już metody izolacji i hodowli komórek dendrytycznych, które są profesjonalnymi komórkami prezentującymi antygeny limfocytom T. Komórki te też stosuje się jako szczepionki przeciwnowotworowe. W przeciwieństwie do komórek nowotworowych mają zarówno cząsteczki MHC, jak i cząsteczki kostymulujące. Przed użyciem ich jako szczepionki trzeba do nich tylko wprowadzić antygeny nowotworowe lub kodujące je geny. Po otrzymaniu zachęcających wyników w badaniach na zwierzętach, w szczepionkach opartych na modyfikowanych genetycznie komórkach nowotworowych lub komórkach dendrytycznych pokłada się obecnie duże nadzieje w immunoterapii nowotworów.

PRZESZCZEPIANIE CHONDROCYTÓW

TRANSPLANTATION OF CHONDROCYTES

Stanisław MOSKALEWSKI, Anna OSIECKA-IWAN, Anna HYC

Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: Chondrocyty wykazują ekspresję cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy I i II oraz prawdopodobnie antygenów tkankowo swoistego(ych). Przeszczepy izolowanych syngenicnych chondrocytów pochodzących z chrząstki szklistej lub sprężystej odtwarzają chrząstkę podobną do tkanki, z której pochodzą, choć z mniej regularnym rozmieszczeniem komórek. Chondrocyty allogeniczne również odtwarzają chrząstkę, jest ona jednak otaczana przez limfocyty i makrofagi i stopniowo resorbowana. Ponadto wywołują one uogólnioną reakcję biorcy zarówno typu komórkowego, jak i humoralnego. Autogenne chondrocyty pobrane z mało obciążanej okolicy chrząstki stawowej stosuje się do leczenia ubytków w chrząstce stawowej, a autogenne chondrocyty z chrząstki sprężystej do odtwarzania chrząstki małżowiny usznej u dzieci w przypadku jej niedorozwoju.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28 supl. 18: 205–220)

Słowa kluczowe: chrząstka szklista, chrząstka sprężysta, przeszczepianie chondrocytów.

Summary: Chondrocytes express molecules of the major histocompatibility complex class I and II and probably also tissue specific antigen(s). Transplants of isolated syngenic chondrocytes originating from hyaline or elastic cartilage produce cartilage similar to that from which they originate, but with less regular distribution of cells. Allogeneic chondrocytes also produce cartilage which is infiltrated by lymphocytes and macrophages and gradually resorbed. Furthermore, they cause both cellular and humoral systemic response of recipients. Autogeneic chondrocytes taken from no-weight-bearing areas of articular cartilage are recently used for the treatment of localized articular cartilage defects. Autogeneic elastic chondrocytes found clinical application in reconstruction of auricular cartilage in children with poorly developed external ear.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28 suppl. 18 : 205–220)

Key words: hyaline cartilage, elastic cartilage, chondrocyte transplantation.

WPROWADZENIE

Badania nad przeszczepianiem chondrocytów rozwijały się w dwóch kierunkach mających na celu wyjaśnienie niektórych zagadnień dotyczących morfogenezy chrząstki i wprowadzenie takich przeszczepów do praktyki klinicznej. Pierwsze prace dotyczące przeszczepiania chondrocytów ukazały się już w 1965 roku [60,44], jednakże zainteresowanie tą problematyką nasiliło się dopiero w ostatnim dziesięcioleciu, po opublikowaniu informacji o zastosowaniu chondrocytów autogennych do leczenia ubytków powierzchni chrząstki stawowej [5,56]. Celem tego artykułu jest przedstawienie wyników uzyskanych zarówno w pracach mających obecnie tylko znaczenie teoretyczne, jak i osiągnięć klinicznych. Po omówieniu ogólnych problemów związanych z izolacją i przeszczepianiem chondrocytów oraz ich właściwościami antygenowymi zostanie przedstawione odtwarzanie różnych rodzajów chrząstki ze szczególnym uwzględnieniem doświadczalnego odtwarzania chrząstki stawowej przez syngeniczne i allogeniczne chondrocyty. Badania te były bardzo istotne, gdyż stworzyły podstawę dla późniejszych zastosowań klinicznych. Przedstawimy również niektóre informacje sugerujące, że chondrocyty wykazują ekspresję swoistego antygeny. Ostatnia część pracy zostanie poświęcona omówieniu leczenia ubytków w chrząstce stawowej i uzyskiwanych wyników klinicznych.

INFORMACJE OGÓLNE DOTYCZĄCE PRZESZCZEPIANIA CHONDROCYTÓW

Do izolacji chondrocytów używa się preparatów kolagenazy z *Cl. histolyticum* [67,44,41]. Preparat kolagenazy zawiera m.in. klostripainę, która uszkadza komórki. Z tego względu celowe jest dodawanie do roztworu kolagenazy inhibitora klostripainy, TLCK (keton $N\alpha$ -p-tosylo-l-lizynochlorometylu) [18], co poprawia wydajność izolacji. Ponadto do mieszaniny enzymów dodaje się DNazę w celu strawienia DNA uwalnianego z martwych komórek i tworzącego galaretowaty materiał utrudniający izolację [62]. Chondrocyty można izolować z chrząstek osobników w różnym wieku, ale najefektywniej z chrząstki płodowej, w której jest najkorzystniejszy stosunek liczby komórek do ilości macierzy.

W pracach eksperymentalnych chondrocyty najczęściej były przeszczepiane domięśniowo lub do sztucznie wytworzonych ubytków w chrząstce stawowej. Chondrocyty autogeniczne lub syngeniczne odtwarzają chrząstkę w przybliżeniu podobną do tej, z której zostały pobrane. Chondrocyty allogeniczne odtwarzają chrząstkę tak samo jak syngeniczne, ale po upływie kilku dni od daty przeszczepienia zaczyna gromadzić się wokół niej naciek i dochodzi do jej stopniowej resorpcji [45]. W procesie tym biorą udział głównie limfocyty T i monocyty/makrofagi [59].

W przeciwieństwie do chrząstki utworzonej przez allogeniczne chondrocyty, przeszczepy allogenicznych fragmentów chrząstki przeżywają przez długi okres [9,17] dzięki obecności macierzy, która chroni je od kontaktu z układem immunologicznym gospodarza [1]. Wydaje się zatem, że wkrótce po przeszczepieniu allogenicznych chondrocytów, gdy nie są one dostatecznie chronione przez macierz, dochodzi do uczulenia gospodarza i w konsekwencji do odrzucania przeszczepu [45,23].

ANTYGENY CHONDROCYTÓW

Chondrocyty mają na swojej powierzchni, podobnie jak inne rodzaje komórek, cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej klasy I [23,33]. Ponadto chondrocyty niektórych gatunków, np. królika lub szczura, wykazują również konstytutywną ekspresję cząsteczek klasy II [66,32,38], a u innych, w tym u człowieka, można ją wywołać stymulując chondrocyty za pomocą np. interfejonu γ [7,28,33]. Daje to chondrocytom możliwość prezentowania egzogennych antygenów, co udowodniono na przykładzie ovalbuminy [66] i toksoidu tężca [7].

MORFOLOGIA CHRZĄSTKI ODTWARZANEJ PRZEZ CHONDROCYTY O RÓŻNYM POCHODZENIU

Podobieństwo utworzonej w przeszczepie chrząstki do chrząstki, z której uzyskano chondrocyty, wykazano w przypadku chrząstki tworzącej przegrodę nosową [44], chrzęstnego modelu kości [65,31,36], chrząstki żebrowej [30,37], chrząstki małżowiny usznej [29,48] oraz chrząstki stawowej [27,42,50,58,68].

Chrząstka przegrody nosowej królika

Chrząstka ta ma mało charakterystyczny wygląd, zawiera kilka warstw spłaszczonej komórki na obwodzie i zaokrąglone, wypełnione kroplami lipidów chondrocyty w części środkowej. Przeszczepione chondrocyty wytwarzają wysepki chrząstki, w których już po 7 dniach wyraźnie widać macierz, a po 28 dniach przypominają wyglądem chrząstkę nosową *in situ*. Ponadto, dzięki obecności w chondrocytach samicy królika wyraźnej chromatyny płciowej można było stosując ten znacznik wykazać, że chrząstka jest rzeczywiście odtwarzana przez przeszczepione komórki, a nie w drodze procesu indukcyjnego [44].

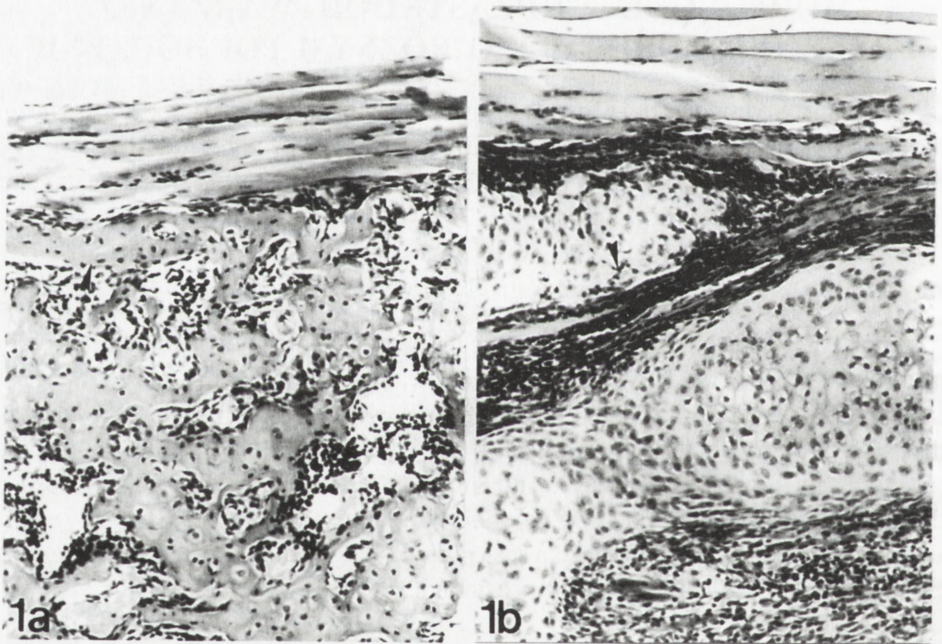
Chrząstka żebrowa

Chrząstka żebrowa niektórych gryzoni (mysz, szczur) jest zwapniała w środkowej części. Jeżeli ją przeciąć i wszczepić domięśniowo, to w miejscach, w których część zwapniała zostanie obnażona, dochodzi do indukcji kości, w wyniku kontaktu

z nieodróżnicowanymi komórkami tkanki łącznej. Przeszczepione chondrocyty żebrowe tworzą wysepki, w których w środkowej części już po kilkunastu dniach pojawia się zwapnienie, podobnie jak to ma miejsce w prawidłowej chrząstce żebrowej [30,37].

Chrząstka nasadowa

Syngeniczne chondrocyty uwolnione z kompleksu stawowo-nasadowego tworzącego nasady chrząstne w okresie wczesnego rozwoju kości [67] po przeszczepieniu do mięśni wytwarzają wysepki chrząstki, w których dochodzi, podobnie jak w przebiegu kostnienia śródchrzęstnego, do przerostu chondrocytów, wapnienia nacierzy, wrastania naczyń i nieodróżnicowanych komórek i wreszcie do odkładania się beleczek kostnych na beleczkach zwapniałej macierzy. W odróżnieniu jednak od kostnienia śródchrzęstnego *in situ*, chondrocyty ulegają hipertrofii w różnych miejscach odtworzonej chrząstki i w efekcie kość powstaje dosyć bezładnie (ryc. 1a) [65,31,36]. W podobny sposób dochodzi również do indukcji kości po przeszczepieniu chondrocytów z chrząstki nasadowej królika nagim myszom, u których nie zachodzi odrzucanie przeszczepów allo- i ksenogenicznych [69]. Również alo-



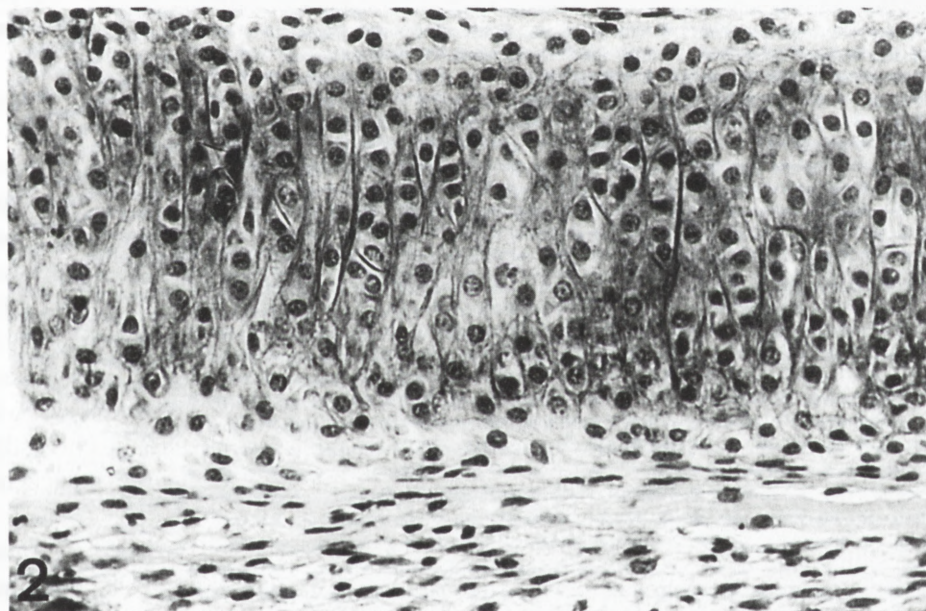
RYCINA 1. Domięśniowy przeszczep chondrocytów z chrzęstnych nasad kości długich myszy, pobrany po 3 tygodniach: a – Przeszczep syngeniczny. W obrębie odtworzonej chrząstki zachodzi kostnienie śródchrzęstne. Strzałka pokazuje beleczki kostne. b – Przeszczep allogeniczny. Wokół chrząstki widać komórki nacieku, w niektórych miejscach (strzałka) wnikające w obręb macierzy. W chrząstce nie dochodzi do tworzenia kości (H.E. x 240)

geniczne chondrocyty nasadowe po przeszczepieniu do mięśni odtwarzają chrząstkę, ale zostaje ona otoczona przez naciek i nie dochodzi do kostnienia (ryc. 1b).

Chrzątka małżowiny usznej

Wygląd chrząstki odtwarzanej przez chondrocyty z chrząstki małżowiny usznej królika zależy od wieku dawcy. Chrzątka ta u 7–14-dniowych królików zawiera niewielkie komórki wytwarzające znaczną liczbę włókien sprężystych. U starszych królików w środkowej części chrząstki pojawiają się duże, dwujądrowe chondrocyty. Chondrocyty pochodzące z młodej chrząstki po przeszczepieniu obficie wytwarzają włókna sprężyste (ryc. 2), natomiast chondrocyty z chrząstki dwumiesięcznych lub dorosłych zwierząt prawie nie syntetyzują elastyny [29,35,48].

Przedstawione powyżej obserwacje doprowadziły do wprowadzenia efektywnego sposobu leczenia niedorozwoju małżowiny usznej (mikrotia) u dzieci [8]. Zespół prof. Aleksandra Hinka opracował w Kanadzie metodę hodowli chondrocytów sprężystych z chrząstki małżowiny usznej świni i człowieka. Te ostatnie izolowano z fragmentów chrząstki pobieranych w czasie operacji odtwórczych. Chondrocyty zagregowane w hodowli wprowadzano następnie do konstrukcji składającej się z alginianu i kolagenu typu I przeważnie z dodatkiem κ elastyny jako czynnika stymulującego powstawanie włókien sprężystych. Konstrukcje takie wszczepiane nagim



RYCINA 2. Chrzątka sprężysta utworzona w pobranym po 14 dniach domięśniowym przeszczepie chondrocytów uzyskanych z chrząstki małżowiny usznej tygodniowego królika (hematoksylina-orceina, x 240)

myszom, po okresie 4 tygodni upodabniały się do chrząstki sprężystej, a alginian prawie całkowicie ulegał resorpcji. Obecnie autologiczne chondrocyty sprężyste wprowadzone do alginianowego szkieletu przypominającego chrząstkę małżowiny usznej są z powodzeniem stosowane w Toronto do rekonstruowania ucha u dzieci z wrodzonym niedorozwojem ucha zewnętrznego [24].

Chrząstka stawowa

Do odtwarzania chrząstki stawowej w ubytkach powierzchni stawowej używa się chondrocytów pochodzących z chrząstki stawowej, z kompleksu stawowo-nasadowego [67] lub z chrząstki nasadowej. Ze względów technicznych przeszczepy takie zazwyczaj dochodzą do podchrzęstnej warstwy kości i są w kontakcie ze szpikiem biorcy. Odtworzenie chrząstki można uzyskać niezależnie od użytego materiału, ale jeżeli przeszczep zawiera chondrocyty nasadowe, to w części odtworzonej chrząstki leżącej w pobliżu jamy szpikowej dochodzi do śródchrzęstnego tworzenia kości [2,3,27,42,57,58]. Niemniej jednak te same przeszczepy od strony jamy stawowej zawierają spłaszczone chondrocyty charakterystyczne dla chrząstki stawowej i w warstwie odpowiadającej szerokości prawidłowej chrząstki stawowej nie dochodzi do przerostu chondrocytów i kostnienia śródchrzęstnego [27,2,42]. Nie wiadomo, czy w obrębie przeszczepu zachodzi segregacja chondrocytów pochodzących z kompleksu stawowo-nasadowego, czy też pod wpływem warunków panujących w obrębie jamy stawowej przerost leżących w jej pobliżu chondrocytów ulega zahamowaniu.

Ze względu na duże zainteresowanie rekonstrukcją chrząstki stawowej za pomocą przeszczepianych chondrocytów w ostatnich latach pojawiły się liczne prace, w których chondrocyty bezpośrednio po izolacji albo po okresie hodowli wprowadzano do podtrzymującego rusztowania i następnie, razem z nim wszczepiano do ubytku w chrząstce stawowej. Jako szkieletu używano alginianu [13], polilaktydu [22], włóknistego kwasu poliglikolowego (*polyglycolic acid*) [14], włókien węglowych [4], żelu fibrynowego utworzonego w obrębie polimeru kwasu poliglikolowego i kwasu mlekowego [55], dwuwarstwowej matrycy kolagenowej [15] lub spolimeryzowanego hialuronianu [61]. Dokładniejsze dane na temat bioinżynierii chrząstki można znaleźć w ostatnio opublikowanym artykule przeglądowym [64]. Na ogół chondrocyty w obrębie takich rusztowań dobrze odtwarzają chrząstkę, ale często powstają trudności z umocowaniem jej w ubytku i utworzeniem połączenia pomiędzy wszczepem i chrząstką otaczającą ubytek.

W celu oceny wartości przeszczepu opracowano szereg precyzyjnych kryteriów. Na przykład w pracy Solchagi i wsp. [61] zawarta jest 29-punktowa skala, będąca modyfikacją 24-punktowej skali O'Driscolla i wsp. [52]. W skali ocenia się m.in., jaką część pola przekroju przeszczepu stanowi chrząstka szklista, regularność powierzchni chrząstki, występowanie zmian degeneracyjnych, grubość utworzonej

chrząstki w odniesieniu do prawidłowej chrząstki stawowej, obecność zmian zwyrodnieniowych w chrząstce stawowej wokół przeszczepu oraz integrację powierzchni bocznych i podstawy przeszczepu z otaczającymi tkankami. Ocena taka jest oczywiście możliwa tylko w przypadku badań doświadczalnych.

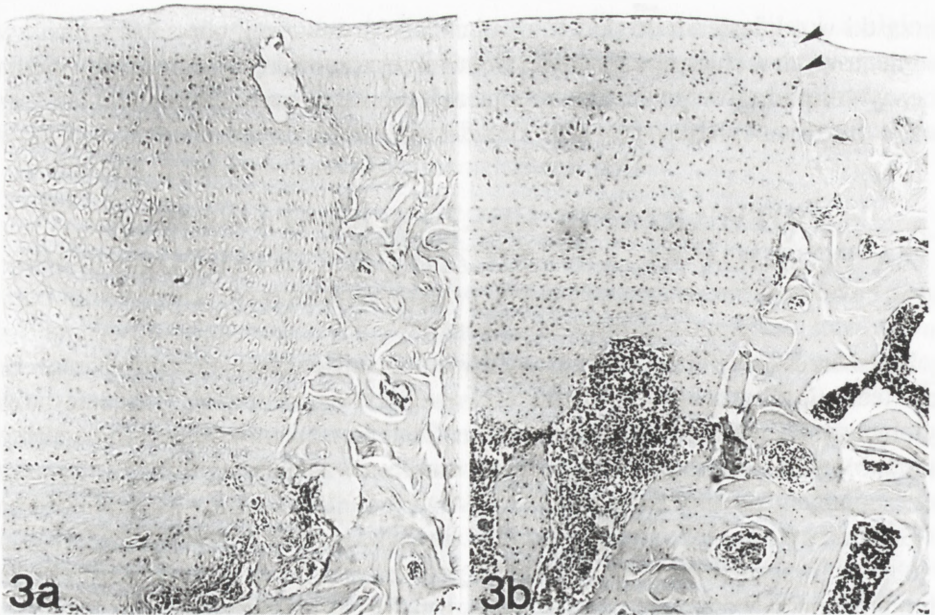
ODTWARZANIE CHRZĄSTKI STAWOWEJ ZA POMOCĄ ALLOGENICZNYCH CHONDROCYTÓW U ZWIERZĄT WSOBNYCH

Uzyskanie dużej liczby chondrocytów autogennych (por. następny paragraf) w celu leczenia ubytków w chrząstce stawowej jest dosyć trudne. Znacznie łatwiej byłoby uzyskać chondrocyty allogeniczne. Dlatego też istotne zagadnienie stanowi immunologiczna odpowiedź biorcy w stosunku do chondrocytów allogenicznych wszczepianych do ubytku w chrząstce stawowej.

Badania cytowane powyżej były głównie wykonywane z użyciem zwierząt nie-wsobnych, przeważnie królików lub kur, przy czym autorzy na ogół nie stwierdzali immunologicznej odpowiedzi biorcy w stosunku do przeszczepu. Przyczyny tego braku odpowiedzi są niejasne [43]. W celu prawidłowej oceny zjawisk immunologicznych zachodzących przy przeszczepianiu chondrocytów do ubytku w chrząstce stawowej rozpoczęliśmy wykonywanie takich przeszczepów z użyciem dwóch szczepów szczurów wsobnych różniących się w zakresie głównych antygenów zgodności tkankowej. Ubytek w powierzchni stawowej obejmujący chrząstkę stawową, leżącą poniżej kość i sięgający do jamy szpikowej wykonywaliśmy za pomocą wiertła elektrycznego, a chondrocyty wszczepialiśmy po zawieszeniu ich w kwasie hialuronowym o wysokiej masie cząsteczkowej [58]. Chrząstka odtworzona przez chondrocyty syngeniczne nie wywoływała powstawania nacieków (ryc. 3a). Natomiast w pobliżu chrząstki utworzonej przez chondrocyty allogeniczne, od strony jamy szpikowej pojawiał się naciek złożony głównie z limfocytów, które wnikały w głąb macierzy i powodowały resorpcję chrząstki (ryc. 3b). Badaliśmy również, za pomocą testu stymulacji splenocytów, uogólnioną odpowiedź komórkową biorcy na przeszczep. W teście tym miesza się syngeniczne lub allogeniczne splenocyty z chondrocytami i hoduje się je w studzienkach płytek do hodowli przez 96 godzin. Osiemnaście godzin przed zakończeniem testu dodaje się [³H]TdR i następnie mierzy średnią liczbę zliczeń na minutę (cpm – *counts per minute*) z trzech powtórzeń. Jako kontrola spontanicznego wbudowywania [³H]TdR służą studzienki z samymi chondrocytami lub splenocytami. Indeks stymulacji splenocytów (IS) oblicza się według wzoru:

$$IS = \frac{\text{splenocyty z chondrocytami (cpm)} - \text{chondrocyty (cpm)}}{\text{splenocyty (cpm)}}$$

Test ten wykazał wyraźną stymulację wbudowywania [³H]TdR do splenocytów biorców allogenicznych przeszczepów [26].

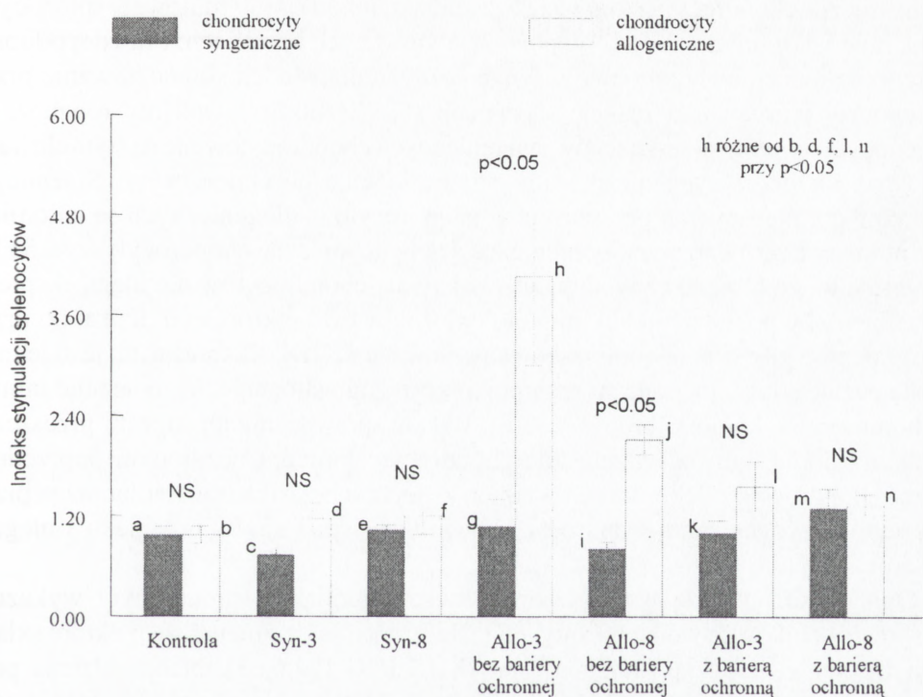


RYCINA 3. Chrzątka odtworzona przez chondrocyty w obrębie ubytku w kości stawowej w 8 tygodni od zabiegu: a – Przeszczep syngeniczny. Widać dobrze odtworzoną powierzchnię stawową i brak nacieku. b – Przeszczep allogeniczny. Na pograniczu chrząstki i jamy szpikowej widać komórki nacieku, natomiast nie ma ich na powierzchni chrząstki zwróconej do jamy stawowej. Strzałki pokazują miejsce styku odtworzonej chrząstki z chrząstką stawową. W tej ostatniej części chondrocytów jest martwa, zapewne na skutek uszkodzenia w czasie wykonywania zabiegu (H.E. x 100)

Badając allogeniczne domięśniowe przeszczepy chondrocytów u myszy, wykazaliśmy poprzednio, że zastosowanie krótkotrwałej, silnej immunosupresji (prokarbazyna + surowica antytymocytarna) zapobiegało uczuleniu biorcy i pozwalało chondrocytom odtworzyć wystarczająco dużą ilość macierzy, aby po zaprzestaniu podawania leków nowoutworzona chrząstka nie była odrzucana, czyli aby zachowywała się jak przeszczep fragmentu chrząstki [36,37]. Sprawdzaliśmy również, czy można w ten sposób zapobiec odrzucaniu przeszczepów allogenicznych chondrocytów do mięśni i do ubytków w chrząstce stawowej szczurów. Jako środki immunosupresyjne zastosowaliśmy cyklosporynę A i 2-chlorodeoksyadenozynę, preparaty zapobiegające odrzucaniu allogenicznych przeszczepów serca [49] i jelita cienkiego [51]. Oba leki stosowane łącznie zapobiegły odrzucaniu przeszczepów domięśniowych i wystąpieniu uogólnionej reakcji immunologicznej, natomiast od strony jamy szpikowej przy chrząstce odtworzonej w obrębie chrząstki stawowej gromadziły się komórki nacieku i nowoutworzona chrząstka była resorbowana (ryc. 3b).

Inny sposób zapobiegania odrzucaniu chrząstki odtworzonej przez allogeniczne chondrocyty nasunęła nam obserwacja, że komórki nacieku nigdy nie pojawiają

się na powierzchni chrząstki zwróconej do jamy stawowej. Sugerowało to, że uczulenie biorcy zachodzi poprzez kontakt przeszczepu z komórkami obecnymi w jamie szpikowej. Ponieważ chrząstka stawowa jest odżywiana wyłącznie przez płyn stawowy [25,39,40], wydawało się, że odseparowanie przeszczepu od jamy szpikowej powinno zapobiec uczuleniu biorcy. Dlatego też najpierw wypełnialiśmy ubytek w chrząstce stawowej cementem używanym do mocowania protez stawowych, a następnie wprowadzaliśmy chondrocyty do jamy wywierconej w cemencie. Chrząstka utworzona w obrębie cementu nie powodowała ani tworzenia nacieku, ani reakcji systemowej (ryc. 4) [46]. Być może stosując jakąś właściwie dobraną barierę mechaniczną można będzie bezpiecznie stosować przeszczepy allogenicnych chondrocytów do leczenia ubytków w chrząstce stawowej u ludzi.



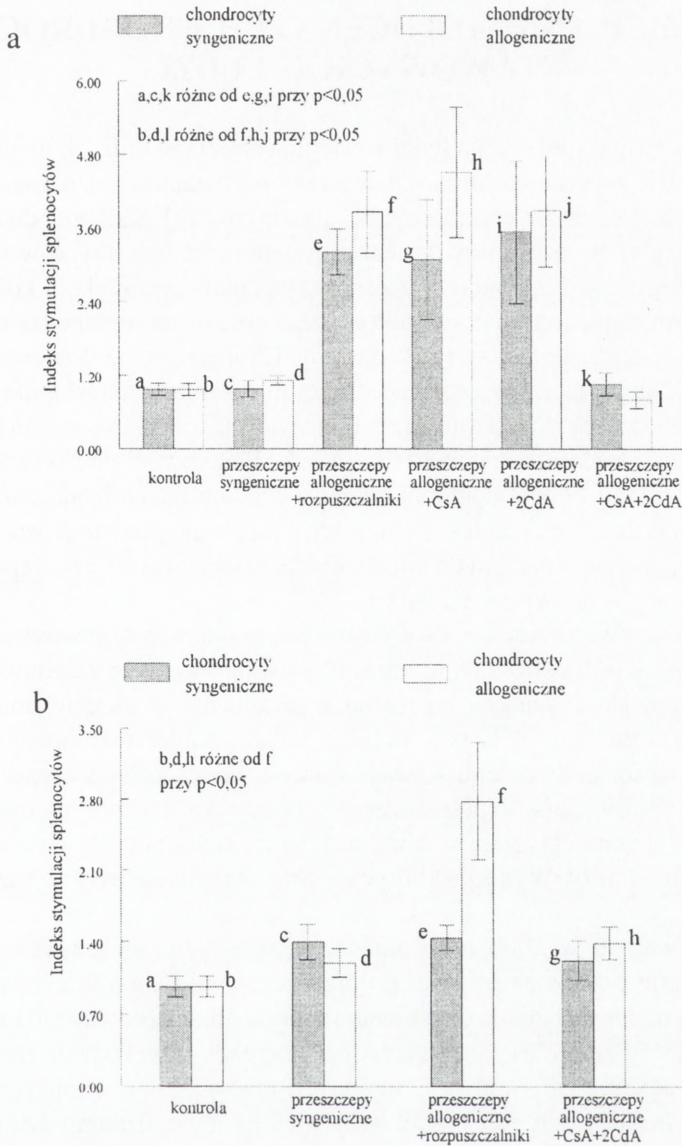
RYCINA 4. Stymulacja splenocytów przez syngeniczne i allogeniczne chondrocyty w mieszanej hodowli. Splenocyty były izolowane z naiwnych zwierząt, biorców przeszczepów syngenicznych chondrocytów i biorców przeszczepów allogenicznych chondrocytów z barierą ochronną lub bez niej. Stymulację splenocytów oceniano przez wbudowywanie [3 H]TdR. Średnie wbudowywanie [3 H]TdR przez chondrocyty i splenocyty mieściło się odpowiednio w zakresie 200–800 i 200–1200 cpm. W każdej grupie $n = 6$. Każdy słupek przedstawia średnią \pm SE. Różnice w stymulacji splenocytów przez syngeniczne i allogeniczne chondrocyty w poszczególnych grupach były znamienne statystycznie, zgodnie z testem Wilcoxon dla par, tylko w przypadku biorców allogenicznych przeszczepów bez bariery ochronnej. Różnice w stymulacji splenocytów naiwnych zwierząt i biorców przeszczepów oceniano testem Manna-Whitney'a. Stymulacja splenocytów biorców allogenicznych przeszczepów z barierą ochronną nie różniła się od stymulacji splenocytów zwierząt naiwnych i biorców przeszczepów syngenicznych (Przedruk z pracy [46] opublikowanej w *Cell Transplantation*, za zgodą wydawnictwa)

CZY CHONDROCYTY ZAWIERAJĄ SWOISTY TKANKOWO ANTYGEN?

Na podstawie testów, w których zarówno syngeniczne, jak i allogeniczne chondrocyty stymulowały *in vitro* limfocyty, postulowano również istnienie swoistego antygeny chondrocytów [16,19,34]. Nie został on jednak wyodrębniony i niektórzy badacze powątpiewają nawet w jego istnienie [12].

W stosowanym przez nas teście syngeniczne chondrocyty pochodzące z naiwnych zwierząt, wbrew doniesieniom poprzednich badaczy, nie stymulowały splenocytów. Wykazaliśmy, że jest to spowodowane obecnością w roztworze kolagenazy używanej do trawienia chrząstki inhibitora klostripainy, enzymu silnie uszkadzającego komórki. Syngeniczne chondrocyty izolowane bez dodatku inhibitora stymulowały splenocyty, podobnie jak to miało miejsce w powyżej cytowanych badaniach. Prawdopodobnie zatem uszkodzenie chondrocytów syngenicznych ułatwia ich sfagocytowanie przez splenocyty i uruchamia reakcję stymulacji [53]. Zaobserwowaliśmy również że splenocyty biorców przeszczepów syngenicznych chondrocytów nie są stymulowane *in vitro* ani przez syngeniczne, ani przez allogeniczne chondrocyty. Splenocyty biorców domięśniowych przeszczepów chondrocytów allogenicznych są natomiast stymulowane zarówno przez syngeniczne, jak i allogeniczne chondrocyty (ryc. 5a,b). Sugeruje to, że hipotetyczny antygen swoisty dla chondrocytów nie ulega ekspresji tak silnej, aby pobudzić układ immunologiczny w czasie krótkiego okresu po przeszczepieniu, gdy nie jest zamaskowany przez macierz. Ekspresja ta jest jednak dostatecznie silna, aby podczas resorpcji przeszczepu allogenicznego uczulić immunokompetentne komórki biorcy [53,46]. W celu sprawdzenia tej sugestii przeszczepialiśmy domięśniowo syngeniczne chondrocyty biorcom uczulonym poprzednio przez chondrocyty allogeniczne. U takich zwierząt chrząstka utworzona przez przeszczepione syngeniczne chondrocyty wywoływała powstawanie nacieku i ulegała resorpcji [17].

Opisywane powyżej wyniki niewątpliwie sugerują, że chondrocyty wykazują ekspresję tkankowo swoistego antygeny. Należy jednak pamiętać, że niektóre składniki macierzy, takie jak kolagen typu II, IX i XI [54,6,63], białko rdzenia proteoglikanów [10,20,21] lub białka łączące [11], również mają właściwości antygenowe. Istnieje zatem możliwość, że jeden lub kilka tych antygenów związanych z powierzchnią chondrocytów odpowiada za stymulację splenocytów przez syngeniczne chondrocyty. Dlatego też istnienie swoistego tkankowo antygeny chondrocytów będzie można udowodnić tylko poprzez jego wyodrębnienie i ustalenie budowy chemicznej.



RYCINA 5. Stymulacja splenocytów przez syngeniczne i allogeniczne chondrocyty w mieszanej hodowli: a – Przeszczepy domięśniowe, b – przeszczepy dostawowe. Splenocyty były izolowane ze zwierząt naiwnych i biorców syngenicznych lub allogenicznych przeszczepów chondrocytów. Stymulację splenocytów oceniano przez wbudowywanie [3 H]TdR. Średnie wbudowywanie [3 H]TdR przez chondrocyty i splenocyty mieściło się odpowiednio w zakresie 200–1200 i 400–1800 cpm. W każdej grupie $n = 6$. Każdy słupek przedstawia średnią \pm SE. Różnice w stymulacji splenocytów przez syngeniczne i allogeniczne chondrocyty w poszczególnych grupach nie były znamienne statystycznie, zgodnie z testem Wilcoxon'a dla par, w obu typach przeszczepów. Różnice w stymulacji splenocytów naiwnych zwierząt i biorców przeszczepów oceniano testem Manna-Whitney'a. Przedruk z pracy [53] opublikowanej w *Cell Transplantation*, za zgodą wydawnictwa

PRZESZCZEPIANIE AUTOGENNYCH CHONDROCYTÓW STAWOWYCH U LUDZI

Ubytki w chrząstce stawowej u ludzi występują często po urazach mechanicznych i mogą prowadzić do osteoarthritis. Dlatego też po badaniach nad zastosowaniem autogennych przeszczepów chondrocytów u królików [4] podjęto odważną próbę zastosowania podobnej procedury do leczenia ograniczonych ubytków w chrząstce stawu kolanowego u ludzi. Z górnej części przyśrodkowego kłykcia kości udowej, czyli okolicy chrząstki mało obciążanej w czasie ruchu, pobierano za pomocą artroskopu skrawki chrząstki o masie 300–500 mg. Chondrocyty izolowano za pomocą kolagenazy i DNazy przez 16 godzin ze stałym mieszaniem, a następnie hodowano w pożywce zawierającej 15% autologicznej surowicy. Chondrocyty namnażano przez okres 14–21 dni uzyskując $2,5\text{--}5 \times 10^6$ komórek. Przeszczepianie wykonywano w ogólnym znieczuleniu. Po otwarciu stawu wycinano uszkodzoną chrząstkę, nie dochodząc jednak do kości. Ubytek w chrząstce pokrywano płatem okostnej pobranej z kości udowej, przyszywając go do chrząstki otaczającej ubytek i następnie wstrzykiwano chondrocyty do wnętrza ubytku.

Ocenę powodzenia zabiegu wykonywano na podstawie objawów klinicznych (obecność lub brak bólu, obrzmienie lub zablokowanie stawu) i za pomocą badania artroskopowego wykonywanego po trzech miesiącach i w okresie pomiędzy 12. i 46. miesiącem po zabiegu. W czasie drugiego badania pobierano biopsyjnie materiał ze środkowej części przeszczepu i badano, czy zawiera kolagen typu II i glikozaminoglikany. W dwa lata po przeszczepie u 14 spośród 16 chorych operowanych z powodu uszkodzenia chrząstki w obrębie kłykcia kości udowej wynik kliniczny był dobry lub znakomity. Wyniki u chorych z chondromalacją były wyraźnie gorsze [5].

W opublikowanym w 2000 roku podsumowaniu wyników uzyskanych u 101 chorych w okresie od dwóch do 9 lat po przeszczepieniu chondrocytów podobnie stwierdzono, że najlepsze wyniki uzyskiwano w przypadku izolowanego uszkodzenia kłykcia kości udowej (92%), a najgorsze w przypadku uszkodzeń rzepki (65%) [56]. Obecnie leczenie za pomocą autogennych przeszczepów chondrocytów prowadzą liczne ośrodki kliniczne, często przy współpracy z firmami komercyjnymi przeprowadzającymi izolację i hodowlę chondrocytów.

LITERATURA

- [1] BACSICH P, WYBURN M. The significance of the mucoprotein content on the survival of homografts of cartilage and cornea. *Proc R Soc Edin Sect B* 1947; **62**: 321–327.

- [2] BENTLEY G, GREER RB III. Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular chondrocytes into joint surfaces of rabbits. *Nature* 1971; **230**: 385–388.
- [3] BENTLEY G, SMITH AU, MUKERJHEE R. Isolated epiphyseal chondrocyte allografts into joint surfaces. *Ann Rheum Dis* 1978; **37**: 449–458.
- [4] BRITTBERG M, NILSSON A, LINDAHL A, OHLSSON C, PETERSON L. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop Rel Res* 1996; **326**: 270–283.
- [5] BRITTBERG M, LINDAHL A, NILSSON A, OHLSSON C, ISAKSSON O, PETERSON L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; **331**: 889–895.
- [6] BUJIA J, ALSALAMEH S, NAUMANN A, WILMES E, SITTINGER M, BURMESTER GR. Humoral immune response against minor collagens type IX and XI in patients with cartilage graft resorption after reconstructive surgery. *Ann Rheum Dis* 1994; **53**: 229–234.
- [7] BUJIA J, ALSALAMEH S, SITTINGER M, HAMMER C, WILMES E, BURMESTER GR. Antigen presenting cell function of class II positive human nasal chondrocytes. *Acta Otolaryngol* 1994; **114**: 75–79.
- [8] CHALAIN DE T, PHILLIPS JH, HINEK A. Bioengineering of elastic cartilage with aggregated porcine and human auricular chondrocytes and hydrogels containing alginate, collagen and κ -elastin. *J Biomed Mater Res* 1999; **44**: 280–288.
- [9] CRAIGMYLE MBL. An autoradiographic and histochemical study of long-term cartilage grafts in the rabbit. *J Anat* 1958; **92**: 467–471.
- [10] DAYER E, MATHAI L, GLANN TT, MIKECZ K, POOLE AR. Cartilage-proteoglycan induced arthritis in BALB/c mice. Antibodies that recognize human and mouse cartilage proteoglycan and can cause depletion of cartilage proteoglycan with little or no synovitis. *Arthritis Rheum* 1990; **33**: 1394–1405.
- [11] DORAN MC, GOODSTONE NJ, HOBBS RN, ASHTON BA. Cellular immunity to cartilage link protein in patients with inflammatory arthritis and non-arthritic controls. *Ann Rheum Dis* 1995; **54**: 466–470.
- [12] ELVES MW. Immunology of cartilage. [w] Hall BK [red.] Cartilage. New York Academic Press 1983; **3**: 229–265.
- [13] FRAGONAS E, VALENTE M, POZZI-MUCELLI M, TOFFANIN R, RIZZOR, SILVESTRI F, VITTUR F. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogeneic chondrocytes in alginate. *Biomaterials* 2000; **21**: 795–801.
- [14] FREED LE, GRANDE DA, LINGBIN Z, EMMANUAL J, MARQUIS JC, LANGER R. Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mat Res* 1994; **28**: 891–899.
- [15] FRENKEL SR, TOOLAN B, MENCHE D, PITMAN MI, PACHENCE JM. Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone Joint Surg* 1997; **79-B**: 831–836.
- [16] GERTZBEIN SD, TAIT JH, DEVLIN SR, ARGUE S. The antigenicity of chondrocytes. *Immunol* 1977; **33**: 141–145.
- [17] GIBSON T, DAVIS W B, CURRAN RC. The long-term survival of cartilage homografts in man. *Brit J Pl Surg* 1958; **11**: 177–187.
- [18] GLADE MJ, KANWARE YS, HEFLEY TJ. Enzymatic isolation of chondrocytes from immature rabbit articular cartilage and maintenance of phenotypic expression in culture. *J Bone Miner Res* 1991; **6**: 217–226.
- [19] GLANT T, MIKECZ K. Antigenic profiles of human, bovine and canine articular chondrocytes. *Cell Tissue Res* 1986; **244**: 359–369.
- [20] GLANT TT, BUZAS EI., FINNEGAN A, NEGROIU G, CS-SZABO G, MIKECZ K. Critical roles of glycosaminoglycan side chains of cartilage proteoglycan (aggrecan) in antigen recognition and presentation. *J Immunol* 1998; **169**: 3812–3819.

- [21] GOODSTONE NJ, DORAN MC, HOBBS RN, BUTLER RC, DIXEY JJ, ASHTON BA. Cellular immunity to cartilage aggrecan core protein in patients with rheumatoid arthritis and non-arthritic controls. *Ann Rheum Dis* 1996; **55**: 40–46.
- [22] GUGALA Z, GOGOLEWSKI S. *In vitro* growth and activity of primary chondrocytes on a resorbable polylactide three-dimensional scaffold. *J Biomed Mater Res* 2000; **49**: 183–191.
- [23] HEYNER S. The significance of the intercellular matrix in the survival of cartilage allografts. *Transplantation* 1969; **8**: 666–677.
- [24] HINEK A. Doniesienie ustne.
- [25] HONNER R, THOMPSON RC. The nutritional pathways of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1969; **51-B**: 140–152.
- [26] HYC A, MALEJCZYK J, OSIECKA A, MOSKALEWSKI S. Immunological response against allogeneic chondrocytes transplanted into joint surface defects in rats. *Cell Transplant* 1997; **6**: 119–124.
- [27] ITAY S, ABRAMOVICI A, NEVO Z. Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. *Clin Orthop Rel Res* 1986; **220**: 284–303.
- [28] JAHN B, BURMESTER GR, SCHMID H, WESELOH G, ROWHER P, KALDEN JR. Changes in cell surface antigen expression on human articular chondrocytes induced by gamma-interferon. Induction of Ia antigens. *Arthritis Rheum* 1987; **30**: 64–74.
- [29] KAWIAK J, MOSKALEWSKI S, HINEK A. Reconstruction of the elastic cartilage by isolated chondrocytes in autogeneic transplants. *Acta Anat (Basel)* 1970; **76**: 53–554.
- [30] KSIAZEK T. Bone induction by calcified cartilage transplants. *Clin Orthop Rel Res* 1983; **172**: 243–250.
- [31] KSIAZEK T, MOSKALEWSKI S. Studies on bone formation by cartilage reconstructed by isolated epiphyseal chondrocytes transplanted syngeneically or across known histocompatibility barriers in mice. *Clin Orthop Rel Res* 1983; **172**: 233–242.
- [32] LANCE EM. Immunological reactivity towards chondrocytes in rat and man: relevance to autoimmune arthritis. *Immunol Letters* 1989; **21**: 63–73.
- [33] LANCE EM, KIMURA LH, MANIBOG CN. The expression of major histocompatibility antigens on human articular chondrocytes. *Clin Orthop Rel Res* 1993; **291**: 266–282.
- [34] LANGER F, GROSS AE, GREAVES MF. The auto-immunity of articular cartilage. *Clin Exp Immunol* 1972; **12**: 31–37.
- [35] MADSEN K, MOSKALEWSKI S, VON DER MARK K, FRIBERG U. Synthesis of proteoglycans, collagen, and elastin by cultures of rabbit auricular chondrocytes – relation to age of the donor. *Dev Biol* 1983; **96**: 63–73.
- [36] MALEJCZYK J, MOSKALEWSKI S. Effect of immunosuppression of survival and growth of cartilage produced by transplanted allogeneic epiphyseal chondrocytes. *Clin Orthop Rel Res* 1988; **232**: 292–303.
- [37] MALEJCZYK J, OSIECKA A, HYC A, MOSKALEWSKI S. Effect of immunosuppression on rejection of cartilage formed by transplanted allogeneic rib chondrocytes in mice. *Clin Orthop Rel Res* 1991; **269**: 266–273.
- [38] MALEJCZYK J, ROMANIUK A. Reactivity of normal rat epiphyseal chondrocytes with monoclonal antibodies recognizing different leukocyte markers. *Clin Exp Immunol* 1989; **75**: 477–480.
- [39] MAROUDAS A. Transport of solutes through cartilage: permeability to large molecules. *J Anat* 1976; **122**: 335–347.
- [40] MAROUDAS A, BULLOUGH B, SWANSON SAV, FREEMAN, MAR. The permeability of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1968; **50-B**: 166–177.
- [41] MOSKALEWSKI S. Chondrocytes. [w] Lanza RP, Chick WL [red.] Yearbook of Cell and Tissue Transplantation 1996/1997. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers 1996: 41–51.

- [42] MOSKALEWSKI S, HYC A, GRZELA T, MALEJCZYK J. Differences in cartilage formed intramuscularly or in joint surface defects by syngeneic rat chondrocytes isolated from the articular-epiphyseal cartilage complex. *Cell Transplant* 1993; **2**: 467–473.
- [43] MOSKALEWSKI S, HYC A, OSIECKA-IWAN A. Immune Response by Host after Allogeneic Chondrocyte Transplant to the Cartilage. *Micr Res Tech* 2001, w druku.
- [44] MOSKALEWSKI S, KAWIAK J. Cartilage formation after transplantation of isolated chondrocytes. *Transplantation* 1965; **3**: 737–747.
- [45] MOSKALEWSKI S, KAWIAK J, RYMASZEWSKA T. Local cellular response evoked by cartilage formed after auto- and allogeneic transplantation of isolated chondrocytes. *Transplantation* 1966; **4**: 572–581.
- [46] MOSKALEWSKI S, OSIECKA-IWAN A, HYC A. Mechanical barrier as a protection against rejection of allogeneic cartilage formed in joint surface defects in rats. *Cell Transplant* 2000; **9**: 349–357.
- [47] MOSKALEWSKI S, OSIECKA-IWAN A, HYC A. Cartilage produced after transplantation of syngeneic chondrocytes is rejected in rats presensitized with allogeneic chondrocytes. *Cell Transplant* 2001; w druku.
- [48] MOSKALEWSKI S, RYBICKA E. The influence of the degree of maturation of donor tissue on the reconstruction of elastic cartilage by isolated chondrocytes. *Acta Anat (Basel)* 1977; **97**: 231–240.
- [49] NAWROCKI G, GRIEB P, GÓRSKI A, DANIELEWICZ R, ROWIŃSKI W. Prolongation of cardiac allograft survival in rats following combination treatment with 2-chloro-2' deoxyadenosine and cyclosporine: A novel immunosuppressive strategy. *Transpl Proc* 1996; **28**: 3538–3539.
- [50] NOGUCHI T, OKA M, FUJINO M, NEO M, YAMAMURO T. Repair of osteochondral defects with grafts of cultured chondrocytes. Comparison of allografts and isografts. *Clin Orthop Rel Res* 1994; **302**: 251–258.
- [51] OBERHUBER G, SCHMID T, THALER W, KALTENBACHER A, SCHIRMER M, LILJEMARK J, HERBST P, GEISEN F, MARGREITER R, KONWALINKA G. Evidence that chlorodeoxyadenosine in combination with cyclosporine prevents rejection after allogeneic small bowel transplantation. *Transplantation* 1994; **58**: 743–745.
- [52] ODRISCOLL SW, KEELEY FW, SALTER RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion: an experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg [Am]* 1986; **68**: 1017–1035.
- [53] OSIECKA-IWAN A, HYC A, MOSKALEWSKI S. Immunosuppression and rejection of cartilage formed by allogeneic chondrocytes in rats. *Cell Transplant* 1999; **8**: 627–636.
- [54] PAROCZAI C, NEMETH-CSOKA M. Estimation of serum anticollagen antibodies and antibodies against chondrocyte membrane fraction: their clinical and diagnostic significance in osteoarthritis. *Clin Biochem* 1988; **21**: 117–121.
- [55] PERKA C, SITTINGER M, SCHULTZ O, SPITZER R-S, SCHLENZKA D, BURMESTER GR. Tissue engineered cartilage repair using cryopreserved and noncryopreserved chondrocytes. *Clin Orthop Rel Res* 2000; **378**: 245–254.
- [56] PETERSON L, MINAS T, BRITTBERG M, NILSSON A, SJÖGREN-JANSSON, LINDAHL A. Two-to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Rel Res* 2000; **374**: 212–234.
- [57] ROBINSON D, HALPERIN N, NEVO Z. Fate of allogeneic embryonal chick chondrocytes implanted orthotopically, as determined by the host's age. *Mech Age Devel* 1989; **50**: 71–80.
- [58] ROBINSON D, HALPERIN N, NEVO Z. Regenerating hyaline cartilage in articular defects of old chicken using implants of embryonal chick chondrocytes embedded in a natural delivery substance. *Calcif Tissue Int* 1990; **46**: 246–253.

- [59] ROMANIUK A, MALEJCZYK J, KUBICKA U, HYC A, OLSZEWSKI W, MOSKALEWSKI S. Rejection of cartilage formed by transplanted allogeneic chondrocytes: evaluation with monoclonal antibodies. *Transpl Immunol* 1995; **3**: 251–257.
- [60] SMITH AV. Survival of frozen chondrocytes isolated from cartilage of adult mammals. *Nature* 1965; **205**: 782–784.
- [61] SOLCHAGA LA, YOO JU, LUNDBERG M, DENNIS JE, HUIBREGTSE BA, GOLDBERG VM, CAPLAN AL. Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects. *J Orthop Res* 2000; **18**: 773–780.
- [62] STEINBERG MS. „EMC”: its nature, origin and function in cell aggregation. *Exptl CellRes* 1963; **30**: 257–279.
- [63] TAKAGI T, JASIN HE. Interactions between anticollagen antibodies and chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1992; **35**: 224–230.
- [64] TEMENOFF JS, MIKOS AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 2000; **21**: 431–440.
- [65] THYBERG J, MOSKALEWSKI S. Bone formation in cartilage produced by transplanted epiphyseal chondrocytes. *Cell Tissue Res* 1979; **204**: 77–94.
- [66] TIKU ML, LIU SW, WEAVER CW, TEODORESCU M, SKOSEY JL. Class II histocompatibility antigen-mediated immunologic function of normal articular chondrocytes. *J Immunol* 1985; **135**: 2923–2928.
- [67] VAN SICKLE DC, KINCAID SA. The articular-epiphyseal cartilage complex. *Proc Am Assoc Vet Anat* 1983; **120**: 114.
- [68] WAKITANI S, KIMURA T, HIROOKA A, OCHI T, YONEDA M, YASUI N, OWAK H, ONO K. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg* 1989; **71-B**: 74–80.
- [69] WRIGHT GC JR, MILLER F, SOKOLOFF L. Induction of bone by xenografts of rabbit growth plate chondrocytes in the nude mouse. *Calcif Tissue Int* 1985; **37**: 250–256.

Adres autora: ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

NOWE ASPEKTY TRANSPLANTOLOGICZNE LUDZKICH KRWIOTWÓRCZYCH KOMÓREK HEMATOPOETYCZNYCH

NEW TRANSPLANTOLOGICAL ASPECTS OF EARLY HUMAN HEMATOPOIETIC CELLS

Marcin MAJKA, Krystyna KUBICZEK, Małgorzata STEC, Danuta JAROCHA,
Mariusz Z. RATAJCZAK

Zakład Transplantologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM) są w stanie odnowić po przeszczepieniu układ krwiotwórczy pacjenta. Odnowa poprzedzona jest ich zagnieżdżeniem (ang. *homing*) w mikrośrodowisku krwiotwórczym szpiku kostnego. Mechanizmy regulujące zagnieżdżenie komórek w szpiku kostnym są więc jednym z zagadnień, na którym ogniskują się badania hematologów klinicznych, jak i eksperymentalnych. Identyfikowane są molekuly adhezyjne, enzymy proteolityczne oraz czynniki chemotaktyczne biorące udział w zagnieżdżaniu komórek po przeszczepie. Wiadomo np., że komórki uzyskane z mobilizowanej krwi obwodowej ulegają szybciej wszczepieniu niż komórki izolowane ze szpiku kostnego. Z badań naszego zespołu wynika, że istotną rolę w procesie zagnieżdżania wczesnych komórek hematopoetycznych znajdujących się w mobilizowanej krwi obwodowej, w szpiku kostnym mogą mieć pochodzące z płytek krwi tzw. mikrofragmenty błonowe, które przyłączają się do powierzchni komórek CD34⁺ i zwiększają ich przyleganie do śródbłonna naczyń włosowatych szpiku kostnego.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28 supl. 18: 221–229)

Słowa kluczowe: Komórki CD34⁺, przeszczep krwiotwórcze, mikrofragmenty błonowe, płytki krwi.

Summary: Hematopoietic Stem Cells (HSC) are able to reconstitute hematopoiesis after transplantation. The first step in hematopoietic reconstitution is a homing of early hematopoietic cells to the bone marrow microenvironment. The mechanisms which regulate homing of hematopoietic stem cells after transplantation involve orchestrated action of several adhesion molecules, proteolytic enzymes and chemotactic factors. For example, it is well known that early hematopoietic cells isolated from mobilized peripheral blood engraft faster after transplantation if compared to cells harvested directly from the bone marrow. We explain this observation by the fact that mobilized peripheral blood-derived early hematopoietic cells are highly covered with platelet-derived microparticles, which enhance both adhesion and homing of

transplanted HSC into bone marrow.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28 suppl. 18 : 221–229)

Key words: CD34⁺ cells, hematopoietic transplants, microparticles, peripheral blood platelets.

Objaśnienia skrótów: **CXCR4** – receptor chemokinowy wiążący SDF-1, **HUVEC** (ang. *human umbilical vein endothelial cells*) – komórki śródbłonna izolowane z żył pępowinowych, **KKM** – krwiotwórcze komórki macierzyste, **PMP** (ang. *platelet-derived microparticles*) – mikrofragmenty błonowe pochodzenia płytkowego, **SDF-1** (ang. *stromal derived factor-1*) – czynnik wzrostowy pochodzenia stromalnego.

WSTĘP

Przyjmuje się, że tylko jedna komórka na 10^5 – 2×10^5 komórek jednojądrowych występujących w szpiku kostnym jest krwiotwórczą komórką macierzystą (KKM), tzn. komórką, która może dać początek komórkom ukierunkowanym wszystkich linii hemato/limfopoetycznych. Powoli poznajemy właściwości biologiczne tej komórki, geny, które regulują jej samoodnawianie i różnicowanie oraz identyfikujemy markery powierzchniowe ułatwiające jej izolację za pomocą sorterów komórkowych lub kolumn magnetycznych [16]. Odkrycie tzw. plastyczności komórek macierzystych dostarcza dowodów, że w pewnych sytuacjach komórki macierzyste różnych narządów mogą się odróżnicowywać dając początek komórkom innych linii [4]. Tak więc komórki macierzyste układu krwiotwórczego mogą np. różnicować się w komórki macierzyste wątroby, komórki macierzyste mięśni dawać początek komórkom krwiotwórczym itp. [4]. Plastyczność komórek macierzystych otwiera nowe perspektywy dla ich potencjalnego wykorzystania terapeutycznego.

Z punktu widzenia transplantologii hematologicznej interesującym zjawiskiem są nadal mechanizmy regulujące wszczepianie KKM po przeszczepie do szpiku kostnego. Przetoczone dożylnie podczas przeszczepu krwiotwórczego komórki krążą bowiem w strumieniu krwi, aby następnie w sposób niezwykle precyzyjny i zorganizowany przedostać się z krążenia do mikrośrodowiska krwiotwórczego. Po drodze do mikrośrodowiska szpiku kostnego muszą one pokonać barierę śródbłonna naczyń włosowatych szpiku kostnego [1, 8, 13–15]. W mikrośrodowisku szpiku kostnego zaczną się dopiero samoodnawiać bądź różnicować w komórki ukierunkowane różnych linii hemato/limfopoetycznych. Komórki ukierunkowane proliferują z kolei i tworzą klony dojrzałych komórek, które opuszczają szpik kostny i dostają się do krwi obwodowej.

ZAGNIEŹDŻANIE SIĘ PRZESZCZEPIONYCH WCZESNYCH KOMÓREK HEMATOPOETYCZNYCH W SZPIKU KOSTNYM

Proces zagnieżdżania się KKM w szpiku kostnym jest precyzyjnie regulowany. Bierze w nim ważny udział interakcja molekuł adhezyjnych występujących na powierzchni KKM z ligandami obecnymi na komórkach śródbłonka naczyń szpikowych oraz niektóre enzymy proteolityczne (np. metaloproteinazy) wydzielane przez KKM umożliwiające tym komórkom pokonanie bariery błony podstawnej naczyń [1, 8, 13–15]. Uważa się, że ważną rolę w ukierunkowanej migracji KKM do szpiku mają czynniki chemotaktyczne, z których najważniejszy jest tzw. czynnik wzrostowy pochodzący z podścieliska, czyli tzw. SDF-1 (ang. *stromal derived factor-1*). Należy tutaj nadmienić, że KKM mają na swej powierzchni swoisty receptor chemokinowy wiążący SDF-1, jakim jest receptor CXCR4. Tak więc oś CXCR4-SDF-1 pełni ważną rolę w zagnieżdżaniu KKM do szpiku kostnego [13–15]. Potwierdzeniem tej hipotezy są obserwacje poczynione u myszy z indukowaną za pomocą tzw. homologicznej rekombinacji delecją receptora CXCR4 lub jego ligandu – chemokiny SDF-1. Myszy te giną wewnątrzmacicznie i wykazują defekt w zasiedlaniu szpiku kostnego przez komórki hematopoetyczne [12, 17]. Uważa się, że SDF-1, który wydzielany jest przez fibroblasty szpikowe oraz osteoblasty beleczek kostnych wyścielających jamy szpikowe, działa chemotaktycznie na przeszczepione krążące w naczyniach włosowatych szpiku kostnego wczesne komórki krwiotwórcze. Komórki te pod wpływem gradientu SDF-1 migrują do szpiku. SDF-1 wydzielany przez mikrośrodowisko szpiku kostnego łączy się poza tym z powierzchnią naczyniową komórek śródbłonka i może tym samym brać pewien udział w przyleganiu CXCR4-dodatnich KKM do śródbłonek szpikowych. SDF-1 poza działaniem jako śródbłonkowa „molekuła adhezyjna” oraz jako wydzielany przez podścielisko czynnik chemotaktyczny stymuluje w komórkach CD34⁺ ekspresję metaloproteinazy-9 [8, 9, 10], ważnej w pokonywaniu bariery śródbłonkowej, a tym samym ułatwiającej ukierunkowaną migrację tych komórek do szpiku kostnego [11].

Dla lekarza-transplantologa niezwykle ważne jest poznanie i zrozumienie mechanizmów, które biorą udział w szybkim i efektywnym przyjęciu się przeszczepianych KKM. Z wyników uzyskanych na podstawie prób klinicznych z wykorzystaniem komórek macierzystych ze szpiku kostnego lub z mobilizowanej krwi obwodowej, wynika, że u pacjentów, u których przeszczepia się KKM izolowane z tzw. mobilizowanej krwi, odnowa hematopoetyczna jest znacząco szybsza [5], pomimo tego iż KKM szpiku charakteryzują się większym potencjałem proliferacyjnym i klonogennym. Fakt szybszego wszczepiania się komórek izolowanych z tzw. mobilizowanej krwi obwodowej próbowano tłumaczyć tym, że mobilizowana krew obwodowa zawiera więcej zróżnicowanych już komórek progenitorowych, które szybciej zaczynają proliferować po przeszczepieniu [5].

WCZESNE KOMÓRKI HEMATOPOETYCZNE IZOLOWANE Z KRWI OBWODOWEJ SĄ OPŁASZCZONE MIROFRAGMENTAMI BŁONOWYMI POCHODZĄCYMI Z AKTYWOWANYCH PŁYTEK KRWI

Szukając odpowiedzi na pytanie, dlaczego komórki CD34⁺ izolowane z mobilizowanej krwi obwodowej w porównaniu z komórkami izolowanymi ze szpiku kostnego szybciej wszczepiają się w szpiku kostnym i powodują szybszą odnowę hematopoezy po przeszczepieniu, postanowiliśmy porównać ekspresję różnych receptorów powierzchniowych (głównie molekuł adhezyjnych) na tych komórkach. Różnice w ekspresji tych receptorów mogłyby bowiem potencjalnie tłumaczyć różnice w kinetyce wszczepienia komórek mobilizowanej krwi obwodowej i szpiku kostnego.

W czasie porównywania fenotypu komórek CD34⁺ ze szpiku i krwi mobilizowanej okazało się, że dużo większy procent komórek CD34⁺ z krwi obwodowej miało na powierzchni markery megakariocytowo-płytkowe, jakimi są antygen CD41 i CD61. Zgodnie z powyższym aż 83+/-18 komórek CD34⁺ w mobilizowanej krwi obwodowej wykazywało ekspresję antygeny CD41 (integryna α IIB/ β 3) na powierzchni [7, 9]. Ekspresja ta na komórkach izolowanych ze szpiku kostnego była znacznie niższa i wynosiła tylko 19+/-4%.

Obecność antygenów płytkowych na izolowanych z krwi obwodowej komórkach CD34⁺ mogłaby wskazywać na obecność płytek krwi na powierzchni tych komórek. Za pomocą mikroskopu elektronowego nie udało się jednak wykazać obecności płytek krwi na powierzchni komórek CD34⁺.

Chcąc jednak wytłumaczyć obecność antygeny CD41 na powierzchni tych komórek założyliśmy, że za ekspresję tę mogą być odpowiedzialne mikrofragmenty błonowe pochodzenia płytkowego, tzw. PMP (ang. *platelet derived microparticles*), które przylegają do powierzchni komórek CD34⁺. PMP powstają w normalnych warunkach podczas aktywacji i degranulacji płytek krwi [2, 3, 6, 7]. Ponieważ zarówno podczas zabiegu mobilizacji komórek CD34⁺ ze szpiku do krwi obwodowej, jak i samej leukoforezy komórek jednojądrowych mobilizowanej krwi obwodowej dochodzi do aktywacji płytek krwi, obecność antygeny CD41 na komórkach CD34⁺ może wynikać z przyłączenia PMP krążących w preparowanej krwi. Możliwość przyłączania PMP do powierzchni komórek CD34 udokumentowaliśmy następnie doświadczalnie inkubując komórki CD34⁺ z uzyskanymi z aktywowanych płytek PMP [9]. Po inkubacji z PMP komórki CD34⁺ wykazywały wysoką ekspresję CD41.

Pod względem budowy molekularnej PMP są kulistymi fragmentami błonowymi przypominającymi liposomy. PMP zawierają na swojej powierzchni szereg receptorów pochodzenia płytkowego, takich jak: antygen CD41 (integryna α IIB/ β 3), CD61, CD62, receptor PAR-1, receptor CXCR4 itp. Jak wspomniano, komórki CD34⁺

po inkubacji z PMP wykazywały zwiększoną ekspresję wszystkich wymienionych receptorów. Oznacza to, że PMP mogą przenosić na ich powierzchnie powyższe molekuly. Podobnie jak w przypadku ludzkich komórek CD34⁺ stwierdziliśmy, że również mysie wczesne komórki hematopoetyczne mające ekspresję antygenu Sca-1 oplaszczają się PMP pochodzącymi z aktywowanych mysich płytek krwi [9].

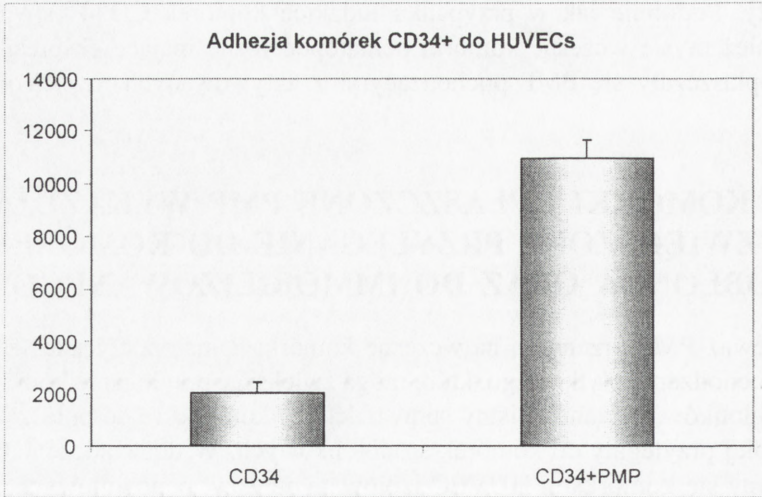
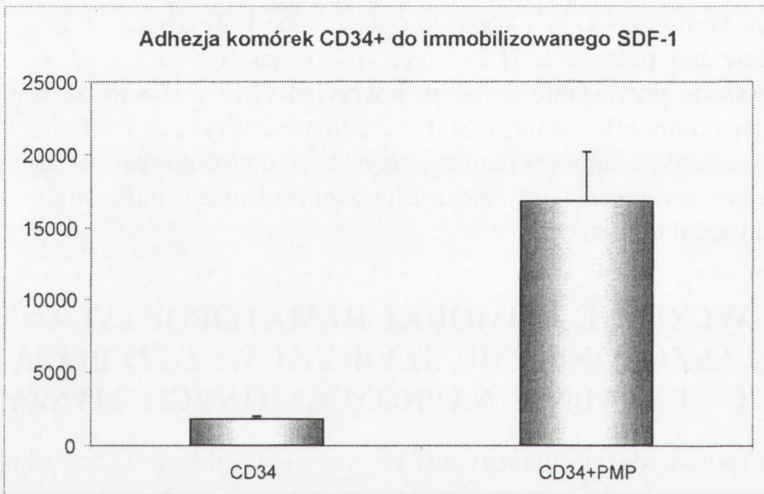
KOMÓRKI OPLASZCZONE PMP WYKAZUJĄ ZWIĘKSZONE PRZYLEGANIE DO KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA ORAZ DO IMMOBILIZOWANEGO SDF-1

Ponieważ PMP przenoszą na wczesne komórki hematopoetyczne szereg receptorów pochodzenia płytkowego, które mogą zwiększać przyleganie komórek CD34⁺ do śródbłonnków, postanowiliśmy sprawdzić, czy komórki te po oplaszczeniu PMP będą lepiej przylegały do komórek śródbłonkowych. W doświadczeniach tych posłużyliśmy się komórkami HUVEC izolowanymi z żył pępowinowych. Jak przedstawiono na rycinie 1 – panel A, komórki CD34⁺ mające na powierzchni PMP przylegały znacznie silniej do komórek śródbłonka izolowanych z żył pępowinowych niż komórki nieoplaszczone. Podobnie, ponieważ PMP przenoszą płytkowy CXCR4 i tym samym zwiększają dodatkowo endogenną ekspresję tego receptora na powierzchni komórek CD34⁺, komórki oplaszczone PMP znacznie lepiej przylegały do powierzchni pokrytych SDF-1 (ryc. 1 – panel B).

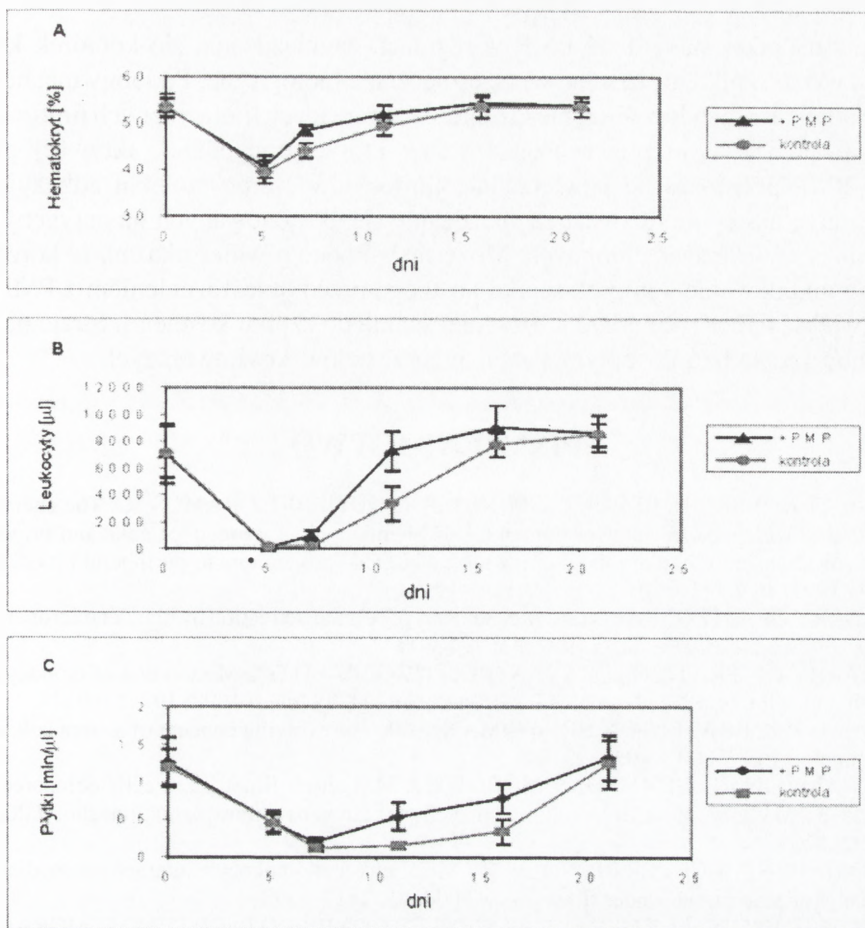
Zwiększone przyleganie komórek pokrytych PMP zarówno do komórek śródbłonka, jak i immobilizowanego SDF-1 przemawia za tym, że PMP mogą zwiększać adhezję wczesnych komórek hematopoetycznych do śródbłonnków w szpiku kostnym, a tym samym zwiększać i przyspieszać ich zagnieżdżanie w mikrośrodowisku krwiotwórczym szpiku kostnego.

WCZESNE KOMÓRKI HEMATOPOETYCZNE OPLASZCZONE PMP SZYBCIEJ WSZCZEPIAJĄ SIĘ U LETALNIE NAPROMIENIONYCH MYSZY

W celu potwierdzenia hipotezy, że PMP mogą przyspieszać wszczepienie komórek po przeszczepie, letalnie napromienionym myszom przeszczepiano komórki szpiku kostnego pokryte lub niepokryte PMP. Następnie w obydwu grupach zwierząt ocenialiśmy odnowę układu krwiotwórczego [9]. Jak uwidoczniło na rycinie 2, myszy, które otrzymały przeszczepy komórek szpiku, które zostały pokryte PMP, wykazywały ~ 2–5 dni szybszą odnowę wartości hematokrytu, krwinek białych i krwinek płytkowych. U zwierząt, którym przeszczepiano komórki szpiku pokryte PMP, stwierdzano równocześnie wcześniejsze tworzenie się kolonii śledzionowych [9] oraz

A**B**

RYCINA 1. Komórki CD34⁺ opłaszczane PMP wykazują zwiększone przyleganie do HUVEC i immobilizowanego SDF-1. Panel A – adhezja komórek CD34⁺ do HUVEC. Panel B – adhezja do immobilizowanego SDF-1. Komórki były opłaszczane lub nieopłaszczane przez PMP (kontrola)



RYCINA 2. Odnowa hematopoetyczna u myszy napromienionych śmiertelną dawką promieniowania gamma, którym przeszczepiano komórki szpiku kostnego opłaszczane lub nieopłaszczane przez PMP: Panel A – wartości hematokrytu (%), panel B – liczba leukocytów, panel C – liczba płytek krwi

obserwowano zwiększony chimeryzm poprzszczepowy (obecność komórek dawcy w szpiku kostnym i śledzionie biocy) [9]. Uważamy więc, że PMP w istotny sposób przyspieszają odnowę układu krwiotwórczego po przeszczepie. Ponieważ, jak wykazaliśmy, komórki CD34⁺ izolowane z mobilizowanej krwi obwodowej są silnie opłaszczane PMP, fakt ten może tłumaczyć szybsze ich wszczepianie po przeszczepie w porównaniu z komórkami CD34⁺ izolowanymi ze szpiku kostnego.

IMPLIKACJE PRAKTYCZNE

Opisany przez nas udział PMP w regulacji zagnieżdżania się komórek krwiotwórczych w szpiku może mieć szersze znaczenie biologiczne. Podobny mechanizm może bowiem powodować zagnieżdżanie się w narządach limfatycznych limfocytów. Można założyć, że w ogniskach zapalnych, w których dochodzi do aktywacji płytek krwi, PMP przenoszą na powierzchnię limfocytów szereg molekuł adhezyjnych, które mogą następnie ułatwiać zagnieżdżanie się eksponowanych na antygeny limfocytów np. w węzłach chłonnych. Może się w końcu również okazać, że korzystne byłoby inkubowanie komórek szpiku kostnego przed przeszczepieniem z PMP tak, aby zwiększyć i przyspieszyć ich zagnieżdżanie do szpiku kostnego. Strategia taka mogłaby prowadzić do optymalizacji przeszczepów krwiotwórczych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AIUTI A, WEBB IJ, BLEUL C, SPRINGER T, GUTIERREZ-RAMOS JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34⁺ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 1997; **185**: 111–120.
- [2] BARRY OP, FITZGERALD GA. Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; **82**: 794–800.
- [3] BARRY OP, PRATICO D, SAVANI RC, FITZGERALD GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interaction by platelet microparticles. *J Clin Invest* 1998; **102**: 136–144.
- [4] BLAU HM, BRAZELTON HR, WEIMANN JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001; **105**: 829–841.
- [5] CHAMPLIN RE, SCHMITZ N, HOROWITZ MM, et al. Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. *Blood* 2000; **5**: 3702–3709.
- [6] FORLOW SB, MCEVER RP, NOLLERT MU. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood* 2000; **95**: 1317–1323.
- [7] GOMEZ-ESPUCH J, CORRAL J, GONZALEZ-CONEJERO R, ORTUNO F, MORALEDA JM, VICENTE V. Glycoprotein IIb/IIIa expression on hematopoietic stem cells: constitutive expression or platelet adhesion? *Blood* 1999; **94**: 3271–3273.
- [8] JANOWSKA-WIECZOREK A, MARQUEZ LA, NABHOLTZ J-M, CABUHAT ML, MONTANO J, CHANG H, ROZMUS J, RUSSEL JA, EDWARDS DR, TURNER AR. Growth factors and cytokines upregulate gelatinase expression in bone marrow CD34⁺ cells and their transmigration through reconstituted basement membrane. *Blood* 1999; **93**: 3379–3390.
- [9] JANOWSKA-WIECZOREK A, MAJKA M, KIJOWSKI J, BAJ-KRZYWORZEKA M, RECA R, TURNER AR, RATAJCZAK J, KOWALSKA MA, RATAJCZAK MZ. Platelet-derived microparticles (PMPs) bind to hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC) and enhance their engraftment. *Blood* 2001 (w druku).
- [10] KOWALSKA MA, RATAJCZAK J, HOXIE J, BRASS LF, GEWIRTZ AM, PONCZ M, RATAJCZAK MZ. Megakaryocyte precursors, megakaryocytes and platelets express the HIV co-receptor CXCR4 on their surface: determination of response to stromal derived factor-1 by megakaryocytes and platelets. *Brit J Haematol* 1999; **104**: 220–229.

- [11] MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK J, KOWALSKA MA, VILAIRE G, PAN ZK, HONCZARENKO M, MARQUEZ LA, PONCZ M, RATAJCZAK MZ. Stromal derived factor-1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis. *Blood* 2000; **96**: 4142–4151.
- [12] NAGASAWA T, HIROTA S, TACHIBANA K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996; **382**: 635–638.
- [13] PELED A, GRABOVSKY V, HABLER L, SANDBANK J, ARENZA-SEISDEDOS F, PETIT I, BENHUR H, LAPIDOT T, ALON R. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34⁺ cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest* 1999; **104**: 1199–1211.
- [14] PELED A, KOLLET O, PONOMARYOV T, et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4 and VLA-5 on immature human CD34⁺ cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 2000; **95**: 3289–3296.
- [15] PONOMARYOV T, PELED A, PETIT I, et al. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 2000; **106**: 1331–1339.
- [16] RATAJCZAK MZ, GEWIRTZ AM. The biology of hemopoietic stem cells. *Semin Oncol* 1995; **22**: 210–217.
- [17] ZOU Y, KOTTMAN AH, KURODA M, TANIUCHI I, LITTMAN DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998; **393**: 595–599.

Adres autorów: Zakład Transplantologii USD CMUJ, ul. Wielicka 265, Kraków.

WYKORZYSTANIE HODOWANYCH *IN VITRO* KERATYNOCYTÓW W TRANSPLANTOLOGII (streszczenie referatu)

THE USE OF *IN VITRO* CULTURED KERATINOCYTES FOR TRANSPLANTATION

Justyna DRUKAŁA*, Kazimierz CIEŚLIK**

*Pracownia Inżynierii Komórkowej i Tkankowej Instytutu Biologii Molekularnej
im. Jana Zurzyckiego Uniwersytetu Jagiellońskiego;

** Oddział Leczenia Oparzeń i Chirurgii Plastycznej Wojewódzkiego Szpitala
Specjalistycznego im. Ludwika Rydygiera, Kraków

Summary: Conventional methods of skin wound healing are not sufficiently efficient and there is a need to construct skin equivalents. The ability of carrying out large-scale cultures from small human tissue biopsies leads to the practical use of these achievements in medicine. Our experience in this field concerns the use of cultured autologous keratinocytes for healing of burns and trophic leg ulcers. Keratinocytes seeded on fibrin glue induced efficiently wound closure and healing.

(*Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18 : 231–234*)

Konwencjonalne metody leczenia ubytków skóry nie zawsze są możliwe do zastosowania i nie zawsze dają satysfakcjonujące rezultaty. Stąd zrodziła się potrzeba konstruowania substytutów skóry hodowanych *in vitro* i wykorzystywanych w klinikach [1,8,10].

Skóra, największy pod względem zajmowanego obszaru organ ustroju, narażona jest na wiele urazów. Rozległe oparzenia mogą obejmować kilkadziesiąt procent powierzchni skóry, a u wielu starszych ludzi występują niegojące się, przewlekłe rany troficzne. Ludzie, którzy ulegając tragicznym wypadkom tracą duży procent powierzchni skóry, są ciężko chorzy z powodu infekcji, utraty elektrolitów i hypermetabolizmu zależnego do rozległości oparzenia. Gojenie ran to złożony proces polegający na odpowiedzi organizmu na uszkodzenie tkanki i utratę jej integralności.

Obejmuje on współdziałanie układu odpornościowego, tkanki łącznej i systemów naczyniowego i nerwowego. Procesy związane z gojeniem ran przebiegają z udziałem macierzy międzykomórkowej będącej rezerwuarem cytokin i czynników wzrostu.

Wiele czynników ma wpływ na proces gojenia ran, ale najistotniejsze jest zamknięcie ich zewnętrznej powierzchni. Możliwość hodowli *in vitro* komórek skóry ludzkiej sprawiła, że w ostatnich latach opracowano metody wytwarzania substytutów skóry ludzkiej. Wykorzystywane są one do przeszczepów w przypadku leczenia rozległych ran oparzeniowych, gdy obszar uszkodzonej powierzchni jest zbyt duży, aby doszło do spontanicznego zagojenia ran lub zastosowania klasycznego auto-przeszczepu. Pośredniej grubości autoprzyszczepki siatkowe są jednak wciąż najczęściej stosowaną, konwencjonalną metodą gojenia ran.

Era wykorzystania hodowanych *in vitro* komórek skóry ludzkiej rozpoczęła się wraz z opracowaniem metody izolacji i hodowli komórek naskórka przez Greena i ich pierwszym wykorzystaniem w 1981 r. przez O'Conner i Gallico [6,7,11]. Dr Carolyn Compton z Bostonu w swoich badaniach histologicznych przeszczepianych, hodowanych keratynocytów wykazała, że hodowany naskórek ostatecznie różnicuje w wyniku „remodelingu” i staje się normalnym naskórkiem z błoną podstawną ściśle łączącą go ze skórą właściwą [3].

Naskórek jest wielowarstwowym epitelium przeżywającym dzięki procesom samoodnawiania się. Keratynocyty warstwy bazalnej mają aktywność proliferacyjną, regularnie przechodzą podziały mitotyczne, różnicują i migrują w kierunku zewnętrznych warstw skóry, zastępując terminalnie zróżnicowane, zrogowaciałe i złuszczone martwe korneocyty. Naskórek ludzki jest całkowicie odnawiany co 4 tygodnie, a więc muszą być w nim obecne komórki macierzyste, które podczas podziałów zachowują stałą liczbę i dają początek populacji przejściowo namnażających się komórek. Charakteryzują się one wysokim potencjałem proliferacyjnym tylko przez ograniczony okres, po którym ostatecznie różnicują [12, 13]. Obie populacje zlokalizowane są w warstwie bazalnej i w mieszkach włosowych. Populacja przejściowo namnażających się komórek ma decydujące znaczenie w procesie gojenia się ran, jest zatem oczywiste, że aby móc wykorzystywać keratynocyty hodowane *in vitro*, należy przede wszystkim stworzyć środowisko hodowlane pozwalające utrzymać w hodowli komórki macierzyste.

Pojedyncze keratynocyty warstwy bazalnej dają początek klonom, co umożliwia określenie ich potencjału proliferacyjnego. Dzięki zastosowaniu analizy klonalnej wyizolowano z naskórka ludzkiego trzy typy keratynocytów, charakteryzujące się różnym potencjałem proliferacyjnym: holoklony, meroklony i paraklony [9]. Przy niezachowaniu właściwych warunków hodowlanych proces starzenia się keratynocytów przebiega znacznie szybciej. Zatem w przypadku hodowli keratynocytów do autologicznego przeszczepiania w celu zamknięcia rany niezmiernie ważne jest stałe monitorowanie jakości hodowli ze szczególnym zwróceniem uwagi na parametry świadczące o obecności holoklonów w hodowli, okresowa analiza klonalna

pod kątem potencjału klonogennego i proliferacyjnego oraz określenie procentu nierozwiniętych kolonii w czasie hodowli.

Hodowla i przeszczepianie autologicznych komórek naskórka stały się niezwykle skuteczną metodą stosowaną w gojeniu ran z dobrze rozwiniętą tkanką ziarninową.

DOŚWIADCZENIA WŁASNE

W Pracowni Inżynierii Komórkowej i Tkankowej Zakładu Biologii Komórki Instytutu Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym im. Ludwika Rydygiera prowadzone są hodowle keratynocytów izolowanych z naskórka ludzkiego [2, 4]. Komórki te wykorzystywane są w leczeniu trudno gojących się, troficznych ran podudzi. Hodowle prowadzi się w pożywkach bezsurowiczych i utrzymuje się do 3 pasażu.

Zawiesinę autologicznych komórek w kleju fibrynowym (ok. 3 mln/ml) wylewa się na odpowiednio przygotowaną tkankę ziarninową, nakłada tłusty opatrunek antybiotykowy. Pierwszej zmiany opatrunku dokonuje się po pięciu dniach. Obserwuje się już wtedy wysepki nabłonka, które w kolejnych etapach gojenia zlewają się tworząc ciągłą warstwę naskórka.

W kilka tygodni po zabiegu rany są całkowicie zamknięte, goją się bez blizn.

Zawiesinę komórek w kleju fibrynowym wykorzystano także do leczenia oparzeń u dzieci we współpracy z Instytutem Pediatrii Collegium Medicum UJ. Obserwowano znacznie szybszy proces odtwarzania ciągłości naskórka niż w przypadku troficznych owrzodzeń.

W przypadku ran głębokich stosowanie naskórka hodowanego *in vitro* do zamykania ran nie dawało zadowalających rezultatów. Konsekwencją tych niepowodzeń stało się skonstruowanie bardziej złożonych substytutów skórnych będących połączeniem hodowanego naskórka i substytutu skóry właściwej w celu poprawienia „wgajania się” naskórka, jego stabilności we wczesnych etapach leczenia, funkcjonalności i ostatecznego efektu kosmetycznego [5]. Ekwiwalenty skóry właściwej to biopolimery składające się najczęściej z białek naturalnie występujących w skórze właściwej i zapewniającej jej własności, kolageny, glikozaminoglikany, chitosan, poliuretan, poliglikol, kwas mlekowy i inne [15,16]. Zasiedla się je fibroblastami. Biodegradowalne ekwiwalenty skóry właściwej działają czasowo i są zastępowane przez formującą się *de novo* skórę właściwą (*neodermis*) [14].

W ostatnich latach ukazały się dostępne już na rynku pierwsze produkty inżynierii tkankowej stosowane w klinice. W 1997 roku zatwierdzony został przez FDA „Transcyte”, a w 1998 r. „Dermagraft”. Pełnej grubości ekwiwalent skóry „Apligraf”, zatwierdzony w 1998 r., to pierwsza sztucznie skonstruowana skóra ludzka, świeży produkt o okresie trwałości 5 dni w temperaturze pokojowej.

Obecnie w nielicznych pracowniach na świecie wprowadza się do leczenia ekwiwalent pełnej grubości skóry.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BOYCE ST. Cultured skin for wound closure. [w] Rouabhia M [red.] Skin substitute production by tissue engineering: clinical and fundamental applications. Austin: Landes Bio-science 1997: 75–102.
- [2] CIEŚLIK K, DRUKAŁA J, ŻABIŃSKA E, KOROHODA W. Zastosowanie hodowanych *in vitro* keratynocytów w leczeniu trudno gojących się ran podudzia. *Przegl dermatol* 1998; **5**: 353–359.
- [3] COMPTON CC. Cultured epithelial autografts for burn wound resurfacing: review of observations from an 11-year biopsy study. *Wounds* 1996; **8**: 125–133.
- [3a] DRUKAŁA J. Kokultury komórkowe w rekonstrukcji skóry w zastosowaniu klinicznym. *Post Biol Kom* 2001; **28** supl. 16: 97–110.
- [4] DRUKAŁA J, CIEŚLIK K, BANDURA L, KOROHODA W. Locomotion of human skin keratinocytes on polystyrene, fibrin, and collagen substrata and its modification by cell-to-cell contacts. *Cell Transplantation* 2001; in press
- [5] HANSBROUGH JF, MORGAN J, GREENLEAF G, PARIKH M, NOLTE C, WILKINS L. Evaluation of Graftskin* composite grafts on full-thickness wounds on athymic mice. *J Burn Care Rehabil* 1994; **15**: 346–353.
- [6] MYERS S, NAVSARIA H, SANDERS R, GREEN C, LEIGH I. Transplantation of keratinocytes in the treatment of wounds. *Am J Surg* 1995; **170**: 75–83.
- [7] NAVSARIA HA, MYERS SR, LEIGH IM, MCKAY IA. Culturing skin *in vitro* for wound therapy. *Trends in Biotechnology* 1995; **13**: 91–100.
- [8] PARENTEAU NL, BILBO P, NOLTE CJM, VALERIE S, ROSENBERG M, ROSENBERG M. The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. *Cytotechnology* 1992; **9**: 163–171.
- [9] PELLEGRINI G, BONDANZA S, GUERRA L, DE LUCA M. Cultivation of human keratinocyte stem cells: current and future clinical applications. *Med Biol Eng Comput* 1998; **36**: 778–790.
- [10] PHILLIPS TJ. New Skin for Old. Developments in Biological Skin Substitutes. *Arch Dermatol* 1998; **134**: 344–349.
- [11] PHILLIPS TJ. Keratinocyte Grafts for Wound Healing. *Clin Dermatol* 1994; **12**: 171–181.
- [12] SLACK JMW. Stem cells in epithelial tissues. *Science* 2000; **287** (5457): 1431–1433.
- [13] SMITH GH, CHEPKO G. Mammary epithelial stem cells. *Microsc Res Tech* 2001; **52**: 190–203.
- [14] WILKINS LM, WATSON SR, PROSKYSJ, MEUNIER SF, PARENTEAU NL. Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. *Biotechnol Bioeng* 1994; **43**: 747–756.
- [15] YANNAS IV, BURKE JF. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res* 1980; **14**: 65–81.
- [16] YANNAS IV, BURKE JF, GORDON PL, RUBENSTEIN RH. Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *J Biomed Mater Res* 1980; **14**: 107–131.

Adres autora: Os. Złotej Jesieni 1, 31-826 Kraków

WYBRANE ZASTOSOWANIA KOMÓREK W BIOTECHNOLOGII*

SOME APPLICATIONS OF CELLS IN BIOTECHNOLOGY

Ludomira GRANICKA, Jerzy KAWIAK

Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN
i Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, Warszawa

Streszczenie: Biotechnologia zajmuje się wykorzystaniem biologicznych układów do produkcji substancji biologicznie czynnych bądź modyfikacjami produktów komórkowych. Obok wielu różnych zastosowań jest wykorzystywana przy opracowywaniu sztucznych narządów i układów dozowania leków, które poniżej opisano, uwzględniając materiały stosowane do tych celów.

(*Postępy Biologii Komórki 2001; 28 supl. 18: 235–244*)

Słowa kluczowe: mikroenkapsulacja komórek, enkapsulacja w kapilarach polimerowych.

Summary: In biotechnology, biological systems are used for production of substances biologically active as well as for construction of modified cell products. In the article are presented some examples of artificial organs and drug delivery systems as well as materials used in those applications.

(*Advances in Cell Biology 2001; 28 suppl. 18 : 235–244*)

Key words: microencapsulation of cells, hollow fiber encapsulation.

WSTĘP

Biotechnologia zajmuje się wykorzystaniem biologicznych układów do produkcji substancji czynnych bądź modyfikacjami produktów komórkowych. Biotechnologia znajduje zastosowanie w produkcji substancji biologicznie czynnych (np. hormonów, przeciwciał [6], czynników wzrostu) i dostarczaniu tych substancji do wybranych miejsc w organizmie biorcy. W jednej z wersji łączy ona materiał biologiczny

*Praca finansowana częściowo z grantu 501-2-1-03-10/01.

– żywe komórki lub tkankę – z tworzywem sztucznym, w którym materiał biologiczny zostaje wprowadzony do organizmu chorego.

Materiałem biologicznym używanym w biotechnologii mogą być dzielące się komórki ludzkie lub zwierzęce, linie modyfikowanych genetycznie komórek albo dzielące się, „nieśmiertelne” linie komórkowe wywodzące się z ludzkich bądź zwierzęcych nowotworów.

Główna zasada izolacji komórek od płynów ustrojowych lub środowiska hodowlanego przez otoczenie membraną z polimeru jest prosta: żywe komórki zostają otoczone półprzepuszczalną przegrodą, przez którą mogą dyfundować niezbędne do przeżycia cząsteczki, a przenikają do otoczenia bioaktywne wydzieliny komórek. Zamknięcie komórek wewnątrz półprzepuszczalnej membrany polimerowej przed transplantacją, pozwala na funkcjonowanie komórek wyłącznie wewnątrz błony półprzepuszczalnej, umożliwiając jednocześnie wymianę cząsteczek między tkanką gospodarza a zamkniętymi komórkami. Kształt membrany może być różny: mogą to być komory dyfuzyjne składające się z połączonych ze sobą membran płaskich, kapilary bądź mikrokapsuły.

NARZĄDY BIOSZTUCZNE W ZASTĘPOWANIU FUNKCJI ENDOKRYNNYCH

Narządy biosztuczne są urządzeniami medycznymi, w których żywe komórki lub tkanka otoczone bezpośrednio półprzepuszczalną błoną lub wcześniej zawieszona w matrycy hydrożelowej i potem otoczone błoną, produkują i dostarczają czynniki terapeutyczne do wybranych miejsc ciała gospodarza.

Opracowano technologię wielu gotowych sztucznych implantów stosowanych dla dostarczenia miejscowego swoistych czynników neurotroficznych do wybranych miejsc w obrębie centralnego układu nerwowego [34,29,35,15,32]. Rozwijanie tego kierunku badań może zatem w przyszłości mieć zastosowania kliniczne, szczególnie tam, gdzie jak dotąd podawanie leków jest ograniczone przez barierę krew-mózg.

Jednym z pierwszych obiektów zainteresowania była sztuczna trzustka. Technikę izolowania wysp Langerhansa i ich przeszczepiania zapoczątkował Moskalewski [37]. Już w latach siedemdziesiątych czyniono próby leczenia królików diabetycznych przeszczepami wysp Langerhansa zamkniętymi wewnątrz syntetycznej membrany. Lanza i wsp. [25–28] opisywali opłaszczanie cielęcych oraz świńskich wysp w membranach kapilarnych z kopolimeru akrylu. Opłaszczone wyspy były wszczepiane dootrzewnowo diabetycznym szczurom bez stosowania immunosupresji [40,49,54]. Poziom glukozy biorców spadał po przeszczepie prawie 6-krotnie i utrzymywał się na tym poziomie przez okres około 1 miesiąca [27]. Ten sam autor wraz ze współpracownikami, w dalszych eksperymentach stwierdził podtrzymywanie funkcji przez opłaszczone wyspy przez ok. 138 ± 16 dni [26]. Inni [40] zamykali wyspy

trzustkowe szczurów w poliakrylonitrylowych membranach (AN69) i wszczepiali je diabetycznym szczurom. Wyspy były uprzednio otaczane agarozą (10000 wysp/ml), a całość była wszczepiana dootrzewnowo. U szczurów, którym wszczepiono wolne wyspy, otrzymano glikemię poniżej 250 mg/dl podczas 22 dni od implantacji, podczas gdy u zwierząt z przeszczepem wysp opłaszczonych błonami taki stan utrzymywał się przez 70 dni. Prace nad ulepszeniem sztucznej trzustki są kontynuowane do dzisiaj.

Obecnie prowadzi się prace nad hybrydowymi implantami zmierzające do leczenia także innych zaburzeń. Stosuje się implanty hepatocytów zamknięte membranami w leczeniu schorzeń wątroby i niedoborów enzymów [7,16,23,38,46,55], komórki modyfikowane genetycznie do produkcji IX czynnika krzepnięcia w leczeniu hemofilii [31], komórki produkujące czynnik wzrostu w leczeniu karłowatości [8], komórki produkujące erytropoetynę w anemii [24], komórki tarczycy w leczeniu niedoczynności tarczycy [10], komórki przytarczyc w leczeniu niedoczynności przytarczyc [14,18,19,20], komórki produkujące neurotransmitery w leczeniu chorób: Parkinsona [2,13,17,47,50,51], epilepsji i choroby Huntingtona [49] oraz komórki adrenalinotwórcze w uśmierzaniu chronicznego bólu.

Czynnik wzrostu nerwów (NGF) jest produkowany przez fibroblasty genetycznie modyfikowane. Fibroblasty zamknięte w kapilarach z polimeru wydzielają w hodowli NGF do środowiska [21]. Dorosłe szczury, którym chirurgicznie usunięto jednostronnie część fornixa, a potem wszczepiono dokomorowo modyfikowane fibroblasty w kapilarach, produkowały miejscowo NGF w wystarczającej ilości, aby zapobiec zmniejszeniu produkcji acetylotransferazy cholinowej spowodowanemu zabiegiem chirurgicznym. Enkapsulowane komórki przeżywały co najmniej 2 tygodnie, a zwierzęta nie wykazywały zaburzeń spowodowanemu zabiegiem. Autorzy sądzą, że podobne modyfikowane genetycznie komórki zamknięte w kapilarach polimerowych będą mogły być stosowane w celu miejscowego dostarczenia czynników neurotroficznych w chorobach neurodegeneracyjnych (Alzheimer).

Yang i wsp. [55] opisali enkapsulację hepatocytów izolowanych z wątroby szczurów w kapilarach z regenerowanej celulozy. Na modelach zwierzęcych, Sagen i wsp. [41,42] przeprowadzili badania nad leczeniem chronicznego bólu u gryzoni. Zastosowali oni adrenalinotwórcze komórki królików uwalniające katecholaminy i metenkefaliny do płynu rdzeniowo-mózgowego. Komórki były opłaszczane w kapilarach z chlorku winylu poliakrylonitrylowego i zachowywały w ciągu trzech miesięcy od implantacji swą farmakologiczną funkcję.

Aebisher i wsp. [3-5] zastosowali komórki adrenalinotwórcze cieląt, opłaszczone w mikrokapsułach poli-(L)-lizynowych albo w kapilarach lub mikrokapsułach z poliakrylonitrylu chlorku winylu do leczenia choroby Parkinsona u szczurów. W tym samym celu Date i wsp. [13] umieszczali szczurze komórki PC12, produkujące dopaminę, w mikrokapsułach z mieszaniny agarozy i kwasu polistyrenowosulfonowego i wszczepiali je w striatum mózgu świnkom morskim na 1 miesiąc bez immu-

nosupresji. Podobnie Christianson i wsp. [11] oraz Tresco i wsp. [47,48] przeprowadzili z sukcesem na modelu króliczym leczenie choroby Parkinsona przez implantację kapsułek zawierających komórki PC-12.

Porównywano przydatność dwu sposobów otaczania komórek wszczepianych: kolagenem albo zamknięciem w kapilarach z polietyleno-tereftalatu (PET) pokrytych kolagenem [30]. Oddzielone komórki były mioblastami C2C12 zmienionymi genetycznie, produkującymi czynnik neurotropowy (*ciliary neurotropic factor* – CNTF). Komórki w kapilarach dobrze przeżywały i po 4 tygodniach było ich 9-krotnie więcej niż po otoczeniu samym kolagenem oraz wydzielały 4-krotnie więcej CNTF.

W doświadczeniach *in vitro* oraz *in vivo*, których celem jest zbadanie wzajemnego wpływu różnych grup komórek wykorzystuje się rekonstruowaną substancję międzykomórkową, tzw. matrigel. W skład matrigelu wchodzi kolagen i inne składniki błon podstawnych. Grupa komórek otoczona matrygelem wszczepiona zwierzęciu bądź umieszczona w hodowli może wpływać swoimi produktami dyfundującymi przez matrigel na otoczenie. W ten sposób wykryto, że tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMP) hamują inwazję trofoblastu w macicy oraz inwazję i przerzuty nowotworów. Komórki linii ludzkiego trofoblastu HTR-8/SV oraz komórki raka sutka MDA-MB-231 zmieniają wydzielanie TIMP zależnie od dostępności tlenu, co wiąże się z ich zdolnością naciekania matrigelu [9]. Sugerowano, że test ten dobrze opisuje właściwości inwazyjne badanych komórek.

Komórki raka sutka, bezpośrednio pobrane od chorych, tworzą kolonie w matrygelu [52]. Kolonie, w których komórki mają ekspresję keratyny-19, okazują się mniej agresywne jako nowotwory u chorych niż te z ekspresją wimentyny. Takie badanie może mieć znaczenie prognostyczne dla pacjentek. Komórki przewlekłej białaczki szpikowej (CML) człowieka mające najczęściej ekspresję genu *bcr-abl*, otoczone matrygelem i implantowane zwierzęciu stymulują angiogenezę [33]. Przypuszcza się, że takie oddziaływanie komórek białaczkowych na komórki śródbłonna może wpływać na rozsiewanie się komórek białaczki w organizmie. Opisano również, że komórki śródbłonna, zamknięte w matrygelu bogatym w lamininy, różnicują się w struktury podobne do naczyń kapilarnych. Zbadano około 20 angiogennych domen w lamininie-1 ($\alpha1\beta1\gamma1$) i stwierdzono, że syntetyczny peptyd C16 najsilniej blokuje adhezję komórek śródbłonna zależną od tej lamininy [39]. Blokowanie to zależy od wiązania peptydu C16 z powierzchniowymi receptorami komórek śródbłonna, którymi są integryny. Wyrażono przypuszczenie, że pewna forma peptydu C16 mogłaby służyć jako lek hamujący angiogenezę, co mogłoby mieć znaczenie w leczeniu guzów nowotworowych.

UKŁAD DOZOWANIA LEKÓW

Zamknięte w membranach i implantowane zwierzętom komórki mogą stanowić układ do badania aktywności czynników antynowotworowych lub antywirusowych.

Linie komórkowe wywodzące się z nowotworów prostaty, nerek, płuc, centralnego układu nerwowego lub melanoma zamykano w kapilarach z fluorku poliwinilidenu, o punkcie odcięcia 500 kDa [22]. Punktem odcięcia nazywamy maksymalną masę cząsteczek, które mogą jeszcze przenikać przez błonę, w tym przypadku są to cząsteczki o masie 500 kDa oraz mniejszej. Opłaszczony komórki były wszczepiane dootrzewnowo myszom, w celu zbadania wpływu różnych leków przeciwnowotworowych na żywotność tych komórek *in vivo*. Leki były podawane zwierzęciu różnymi drogami, a dawka leku musiała być tolerowana przez organizm. Taki sposób badania wpływu leku umożliwia użycie nielicznych zwierząt oraz bardzo małych ilości badanej substancji dla określenia wpływu nowego leku. Xu i inni [53] zamykali w podobnych kapilarach (śr. wew. 1 mm, punkt odcięcia 500 kDa) komórki linii CEM-SS zainfekowane szczepem wirusa HIV-1 i wszczepiali je podskórnio lub dootrzewnowo myszom. Zwierzętom podawano następnie leki w celu zbadania ich wpływu na zainfekowane wirusem komórki. Stwierdzono, że nowy lek, calanolid A, wykazuje znaczną antywirusową aktywność. Replikacja wirusa została powstrzymana podobnie w przypadku szczepu zarówno podskórnego, jak i dootrzewnowego. Lek działał więc podobnie na zakażone komórki w różnych miejscach organizmu. Taki sposób badania wpływu leków *in vivo* na określone komórki może zastąpić podobne badania prowadzone ma myszach szczepu SCID bądź myszach nagich, których utrzymanie jest trudne.

MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA KLINICZNEGO NARZĄDÓW I KOMÓREK OTOCZONYCH SZTUCZNYMI BŁONAMI

Jak już wspomniano, sztuczna trzustka była pierwszym obiektem zainteresowania i jej stosowanie stało się obecnie rutynowe w modelu zwierzęcym. Rozpoczęto badania kliniczne, w których małe dawki wysp były implantowane na krótkie okresy chorym na cukrzycę typu I [44]. Pomyślne wykorzystanie hybrydowej sztucznej trzustki do leczenia cukrzycy u ludzi, przy użyciu wysp nie pochodzących od człowieka, stanowi obecnie jeden z ważniejszych problemów inżynierii biomedycznej. Na ogół, leczenie pozostałych chorób nie wyszło jeszcze poza model zwierzęcy. Są jedynie wstępne próby leczenia choroby Parkinsona lub zmniejszania chronicznego bólu oraz leczenia niedoczynności przytarczyc.

Scharp i wsp. [44] dokonali allotransplantacji ludzkich wysp trzustkowych, opłaszczonych w membranach kapilarnych z kopolimeru akrylu o śr. wewn. 0,8 mm, grubości ścianki 0,1 mm, punkcie odcięcia 65 kDa. Pacjentom wszczepiono podskórnio 150–200 wysp (liczbę niedostateczną do utrzymania normoglikemii) w trzech kapilarach o długości 1,5 cm każda na okres 2 tygodni. Po eksplantacji kapilar stwierdzono, że komórki opłaszczonych wysp przeżyły w 90% oraz pro-

dukowały insulinę w odpowiedzi na zmienny poziom glukozy w przeprowadzonym po eksplantacji eksperymencie *in vitro*.

W celu złagodzenia bólu, wszczepiano pacjentom, nadnerczowe komórki adrenalinotwórcze pobrane od 2-tygodniowych cieląt [1]. Komórki były zawieszane w matrycy alginianowej i opłaszczane w kapilarach z modyfikowanego akrylu o punkcie odcięcia 50 kDa. Leczeni byli pacjenci w ostatnim stadium choroby nowotworowej odczuwający ból niemożliwy do usunięcia przy użyciu terapii narkotykowej. Kapilary wszczepiono 3 pacjentom (po jednej kapilarze) na okres 43, 55 i 42 dni, poprzez cewnik do obszaru pajęczynówki lędźwiowej przy miejscowym znieczuleniu. Każda kapilara była zaopatrzona w chwytak umiejscowiony w tkance podskórnej, mający na celu ułatwienie jej wyjęcia. U 2 pacjentów zapotrzebowanie na narkotyki i środki przeciwbólowe gwałtownie spadło. Zamknięte w kapilarach komórki dobrze przeżywały.

URZĄDZENIA I MATERIAŁY DO IZOLACJI KOMÓREK

Forma kapilar jest bardziej atrakcyjna niż mikrokapsuły przy zastosowaniu w przeszczepach. Kapilary produkuje się z dala od materiału biologicznego, można je dokładnie odpłukać od rozpuszczalników organicznych, pokryć ich powierzchnię dodatkowymi warstwami materiału biologicznie zgodnego. Mikrokapsuły są kulistymi tworami z zamkniętymi w nich komórkami. Przygotowywanie mikrokapsuł odbywa się jednocześnie z opłaszczaniem w nich komórek, a zatem bardzo istotny jest dobór nietoksycznego dla komórek rozpuszczalnika [36]. Kapilary podobnie jak mikrokapsuły zapewniają dużą powierzchnię efektywną, ułatwiającą dostarczenie składników odżywczych niezbędnych do życia opłaszczonych komórek, a także usuwanie produktów metabolizmu komórkowego. Cechy strukturalne kapilar zapewniają również możliwość wzrostu opłaszczonych komórek w trzech wymiarach, co w niektórych zastosowaniach zwiększa stabilność hodowli i pozwala na ich długotrwały wzrost. Doborem odpowiedniej wielkości porów ściany kapilar można wpływać na transport dyfuzyjny różnych cząstek poprzez ścianę kapilary. Kapilary zapewniają też lepszą powtarzalność struktury, gładkość powierzchni i wytrzymałość zmęczeniową niż mikrokapsuły. Ponadto nie stwarzają problemów z usuwaniem materiału membrany z organizmu biorcy. Kapilary są łatwo usuwalne z miejsca wszczepu, podczas gdy mikrokapsuły rozsypują się w różne okolice, często z dala od miejsca przeszczepu.

Materiałem, używanym jako błona oddzielająca żywe komórki od organizmu biorcy, jest w przypadku mikrokapsuł głównie polilizyna. Czasem komórki nie są bezpośrednio umieszczane wewnątrz membrany, tylko zawieszane w matrycy, w celu uniknięcia zlepiania się komórek i zapewnienia im lepszego dostępu substancji

odżywczych. Matryce do zawieszania komórek wykonane są z alginianu, chitosanu albo matrigelu.

Stosowane do izolacji komórek membrany płaskie oraz membrany kapilarne wykonywane są z kopolimeru akrylu, np. chlorku poliakrylonitrylowinyłu, fluorku poliwinylowego, polisulfonu, regenerowanej celulozy. Punkty odcięcia membran zawierają się w granicach 12–500 kDa. Ważnymi kryteriami przydatności membran w izolacji komórek wydają się być ich biostabilność oraz możliwość analizy histologicznej otaczającej je tkanki.

Bardzo istotne jest oddziaływanie otoczenia fizjologicznego na membranę oraz membrany na otoczenie [45]. Membrana musi być odporna na działanie płynów fizjologicznych, stanowiąc jednocześnie immunologiczną barierę. Wiele membran do zastosowań biomedycznych było badanych według wymienionych kryteriów. Przykładowo stwierdzono, że membrany mikrofiltracyjne z polisulfonu o wielkości porów 0,2 lub 0,65 μm oraz z 2,5-octanu celulozy używane do mikrodializy (odcięcie 68 kDa) nie nadają się na wszczepy [12]. Z kolei membrany polisulfonowe Millipore Amicon (odcięcie 10 kDa), membrany z estrów celulozy oraz regenerowanej celulozy zachowują integralność przez 12 tygodni od czasu implantacji oraz na podstawie analizy histologicznej wykazują przydatność do wszczepów. Podobnie zachowują się membrany z poliakrylonitrylo chlorku winyłu, które wykazują fizyczną i chemiczną stabilność charakteryzowaną pomiarem wytrzymałości na rozciąganie oraz niezmienną masą cząsteczkową przed implantacją i po eksplantacji.

Podsumowując, wykorzystanie sztucznie otrzymanych błon do oddzielenia komórek może być użyte w badaniach *in vitro*, jak też *in vivo* do wszczepiania do organizmu zwierzęcia i człowieka. Sporo jest doświadczeń wykonanych na zwierzętach, co zachęca lekarzy do czynienia prób wykorzystania takich układów w leczeniu chorych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AEBISCHER P, BUCHSER E, JOSEPH JM, FAVREJ, TRIBOLET N, LYSAGHT M, RUDNICK S, GODDARD M. Transplantation in humans of encapsulated xenogenic cells without immunosuppression. *Transplantation* 1994; **58**: 1275–1277.
- [2] AEBISCHER P, GODDARD M, SIGNORE AP, TIMPSON RL. Functional recovery in hemiparkinson primates transplanted with polymer encapsulated PC12 cells. *Exp Neurol* 1994; **126**: 151–158.
- [3] AEBISCHER P, TRESKO PA, SAGEN J, WINN SR. Transplantation of microencapsulated bovine chromaffin cells reduces lesion induced rotational asymmetry in rats. *Brain Res* 1991; **560**: 43–49.
- [4] AEBISCHER P, TRESKO PA, WINN SR, GREENE LA, JAEGER CB. Long term cross species brain transplantation of a polymer encapsulated dopamine secreting cell line. *Exp Neurol* 1991; **111**: 269–275.
- [5] AEBISCHER P, WAHLBERG L, TRESKO PA, WINN SR. Macroencapsulation of dopamine secreting cells by coextrusion with an organic polymer solution. *Biomaterials* 1991; **12**: 50–60.

- [6] BARON D. Industrial production of monoclonal antibodies. *Naturwissenschaften* 1990; **77**: 465–471.
- [7] CAI ZH, SHI ZQ, SCHERMAN M, SUN AM. Development and evaluation of system of microencapsulation of primary rat hepatocytes. *Hepatology* 1989; **10**: 855–860.
- [8] CHANG PL, SHEN N, WESTCOTT AJ. Delivery of recombinant gene products with microencapsulated cells *in vivo*. *Hum Gene Ther* 1993; **4**: 433–440.
- [9] CANNING MT, POSTOVIT LM, CLARKE SH, GRAHAM CH. Oxygen-mediated regulation of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 expression by invasive cells. *Exper Cell Res* 2001; **267**: 88–94.
- [10] CHEN G, PENG Y, LOU P, LIU J. Bioartificial thyroid; the *in vitro* culture of microencapsulated rabbit thyroid tissue. *ASAIO Transactions* 1991; **37**: M439–M440.
- [11] CHRISTENSON L, EMERICH DF, SANBERG PR. Encapsulated cell implantation for Parkinson's disease. *Mov Disord* 1992; **7**: 185–187.
- [12] CLARK H, BARBARI TA, STUMP K, RAO G. Histologic evaluation of the inflammatory responses around implanted hollow fiber membranes. *J Biomed Mater Res* 2000; **52**(1): 183–192.
- [13] DATE I, MIYOSHI Y, ONO T, IMAKA T, FURUTA T, ASARI S, OHMOTO T, IWATA H. Preliminary report of polymer encapsulated dopamine secreting cell grafting into the brain. *Cell Transplantation* 1996; **5**: S17–S19.
- [14] FU XW, SUN AM. Microencapsulated parathyroid cells as bioartificial parathyroid: *in vivo* studies. *Transplantation* 1989; **47**: 432–435.
- [15] GALLETI PM, AEBISCHER P, LYSAGHT J. The dawn of biotechnology in artificial organs. *ASAIO J* 1995; **41**: 49–57.
- [16] GERLACH J. Special issue: hybrid liver support. *Int J Artif Organs* 1996; **19**: 001–002.
- [17] GOETZ CG, OLANOW CW, KOLLER WC, PENN RD, CAHILL D, MORANTZ R, STEBBINS G et al. Multicenter study of autologous adrenal medullary transplantation to the corpus striatum in patients with advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 1989; **320**: 337–341.
- [18] GRANICKA LH, MIGAJ M, WOŹNIEWICZ B, ZAWITKOWSKA T, TOŁŁOCZKO T, WERYŃSKI A, KAWIAK J. Encapsulation of parathyroid cells in hollow fibers: a preliminary report. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2000; **38**: 129–131.
- [19] HASSE C, KLOCK G, SCHLOSSER A, ZIMMERMANN U, ROTHMUND M. Parathyroid allotransplantation without immunosuppression. *The Lancet* 1997; **350**: 1296–1297.
- [20] HASSE C, KLOCK G, ZIELKE A, SCHLOSSER A, BARTH P, ZIMMERMANN U, ROTHMUND M. Transplantation of parathyroid tissue in experimental hypoparathyroidism: *in vitro* and *in vivo* function of parathyroid tissue microencapsulated with a novel amiotogenic alginate. *Int J Artif Organs* 1996; **19**: 735–741.
- [21] HOFFMAN D, BREAKEFIELD XO, SHORT MP et al. Transplantation of a polymer encapsulated cell line genetically engineered to release NGF. *Exp Neurol* 1993; **122**: 100–106.
- [22] HOLLINGSHEAD MG, ALLEY MC, CAMALIER RF, ABBOT BJ, MAYO JG, MALSPEIS L, GREVER MR. *In vivo* cultivation of tumor cells in hollow fibers. *Life Sciences* 1995; **57**: 131–141.
- [23] JAUREGUI H, ROY CHOWDHURY N, ROY CHOWDHURY J. Use of mammalian liver cells for artificial liver support. *Cell Transplantation* 1996; **5**: 353–367.
- [24] KOO J, CHANG TM. Secretion of erythropoietin from microencapsulated rat kidney cells: Preliminary results. *Int J Artif Organs* 1993; **16**: 557–560.
- [25] LACY PE, HEGRE OD, GERASIMIDI-VAZEOU A, GENTILE FT, DIONNE K. Maintenance of normoglycemia in diabetic mice by subcutaneous xenografts of encapsulated islets. *Science* 1991; **254**: 1782–1784.
- [26] LANZA RP, BEYER AM, STARUK JE, CHICK W. Biohybrid artificial pancreas. *Transplantation* 1993; **56**: 1067–1072.

- [27] LANZA RP, BUTLER DH, BORLAND KM et al. Xenotransplantation of canine, bovine, and porcine islets in diabetic rats without immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 11100–11104.
- [28] LANZA RP, CHICK WL. Transplantation of encapsulated cells and tissues. *Surgery* 1997; **121**: 1–9.
- [29] LANZA RP, COOPER DK, CHICK W. Xenotransplantation. *Scientific American* 1997; July: 40–45.
- [30] LI RH, WILLIAMS S, BURKSTRAND M, ROOS E. Encapsulation matrices for neurotrophic factor – secreting myoblast cells. *Tissue Engineering* 2000; **6**(2): 151–163.
- [31] LIU HW, OFOSU FA, CHANG PL. Expression of human factor by microencapsulated recombinant fibroblasts. *Hum Gene Ther* 1993; **4**: 291–301.
- [32] LYSAGHT MJ. Recent progress in the research and development of immunoprotected cell therapy. *Cell Transplantation* 1996; **5**: S3–S4.
- [33] MAJKA M, KOWALCZYK D, GEE M, WERTHEIM J, MARQUEZ LA, PEAR W, GERWITZ AM, JANOWSKA-WIECZOREK A, EMERSON SG, RATAJCZAK M. Evidence that both human and murine bcr-abl+ cells stimulate vasculogenesis *in vivo* in matrigel implants: potential therapeutic implications. *Blood* 1999; **94**, suppl.1, 100a.
- [34] MITKA M. Tissue engineering approaches, utility. *Medical News & Perspectives, JAMA*, 2000; **284**: 2582–2583.
- [35] MONAKO AP, MAKI T. Islet transplantation using immunoeclusion methods. *Transplant Proc* 1996; **28**: 2042–2045.
- [36] MORIKAWA N, IWATA H, MATSUDA S, MIYAZAKI JI, IKADA Y. Encapsulation of mammalian cells into synthetic polymer membranes using least toxic solvents. *J Biomaterials Science* 1997; **8**: 575–586.
- [37] MOSKALEWSKI S. Studies on the culture and transplantation of isolated islets of Langerhans of the guinea pig. *Proc Conned Acad Wet* 1969; **72**: 157.
- [38] NYBERG SL, PLATT JL, SHIRABE K, PAYNE WD, HU WS, CERRA FB. Immunoprotection of xenocytes in hollow fiber bioartificial liver. *ASAIO J* 1992; **38**: M463–467.
- [39] PONCE ML, NOMIZU M, KLEINMAN HK. A angiogenic laminin site and its antagonist bind through the alpha(v)beta3 and alpha5beta1 integrins. *FASEB J* 2001; **15**: 1389–1397.
- [40] PREVOST P, FLORI S, COLLIER C, MUSCAT E, ROLLAND E. Application of AN69 hydrogel to islet encapsulation. *Ann N Y Acad Sci* 1997; **831**: 344–349.
- [41] SAGEN J. Chromaffin cell transplants for alleviation of chronic pain. *ASAIO* 1992; **38**: 24–28.
- [42] SAGEN J, WANG H, TRESKO PA, AEBISCHER P. Transplants of immunologically isolated xenogenic chromaffin cells provide a long term source of neuroactive substances. *J Neurosci* 1993; **13**: 2415–2423.
- [43] SCHREZENMEIR J, FAUST P, LAUE C, KIRCHGESSNER J, STALLMACH T, MUNTEFERING H, BEYER J. Immunoprotection by biocompatible membranes permits transplantation of piscine islets to rats. *Transplant Proc* 1989; **21**: 2730–2735.
- [44] SHARP DW, SWANSON CJ, OLACK BJ et al. Protection of encapsulated human islets implanted without immunosuppression in patients with type I or type II diabetes and in nondiabetic control subjects. *Diabetes* 1994; **43**: 1167.
- [45] SOON-SHIONG P, OTTERLIE M, SKJAK-BRAEK G, SMIDSRØD G, HEINTZ O, LANZA RP, ESPEVIK T. An immunologic basis for the fibrotic reaction to implanted microcapsules. *Transplant Proc* 1991; **23**: 758–759.
- [46] STANGE J, MITZNER S. Hepatocyte encapsulation – initial intentions and new aspects for its use in bioartificial liver support. *Int J Artif Organs* 1996; **19**: 045–048.
- [47] TRESKO PA, WINN SR, AEBISCHER P. Polymer encapsulated neurotransmitter secreting cells. Potential treatment for Parkinson's disease. *ASAIO J* 1992; **38**: 17–23.

- [48] TRESKO PA, WINN SR, TANN S, JAEGER CB, GREENE LA, AEBISCHER P. Polymer encapsulated PC12 cells: Long term survival and associated reduction in lesion induced rotational behavior. *Transplantation* 1992; **1**: 255–264.
- [49] WINN SR, HAMMANG JP, EMERICH DF et al. Polymer encapsulated cells genetically modified to secrete human growth factor promote the survival of axotomized septal cholinergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2324–2328.
- [50] WINN SR, TRESKO PA, ZIELIŃSKI B, GREEN LA, JAEGER CB, AEBISCHER P. Behavioral recovery following intrastriatal implantation of microencapsulated PC12 cells. *Exp Neurol* 1991; **113**: 322–329.
- [51] WINN SR, WAHLENBERG L, TRESKO PA, AEBISCHER P. An encapsulated dopamine releasing polymer alleviates experimental parkinsonism in rats. *Exp Neurol* 1989; **105**: 244–250.
- [52] ZAJCHOWSKI DA, BARTHOLDI MF, GONG Y, WEBSTER L, LIU HL, MUNISHKIN A, BEAUHEIM C, HARVEY S, ETHIER SP, JOHNSON PH. Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behaviour of breast cancer cells. *Cancer Res* 2001; **61**: 5168–5178.
- [53] XU ZQ, HOLLINGSHEAD MG, BORGEL S, ELDER C, KHILEVICH A, FLAVIN MT. *In vivo* anti-HIV activity of (+)-calanolide A in the hollow fiber mouse model. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1999; **9**: 133–138.
- [54] YANG H, IWATA H, SHIMIZU H, TAKAGI T, TSUJI T, ITO F. Comparative studies of *in vitro* and *in vivo* function of three different shaped bioartificial pancreas made of agarose hydrogel. *Biomaterials* 1994; **15**: 113–120.
- [55] YANG MD, VACANTI JP, INGBER DE. Hollow fibers for hepatocyte encapsulation and transplantation: studies of survival and function in rats. *Cell Transplantation* 1994; **3**: 373–385.

Adres autorów: I. Trojdena 4, 02-097 Warszawa

TREŚĆ cd. – CONTENTS continued

Sekcja: ROZRÓD ZWIERZĄT – ANIMAL REPRODUCTION	155
MODLIŃSKI J. A., KARASIEWICZ J.: Perspektywy klonowania somatycznego dla hodowli, farmacji i medycyny oraz zachowania ginących ras i gatunków ssaków Somatic cloning: Perspectives for animal breeding, pharmacy, medicine, and for preservation of endangered mammalian breeds and species	157
KĄTSKA L.: Możliwości wykorzystania potencjału gametotwórczego ssaków przez hodowlę <i>in vitro</i> przedantralnych i wczesnoantralnych pęcherzyków jajnikowych Improvement of reproductive potential by <i>in vitro</i> culture of preantral and early antral ovarian follicles in mammals	177
PAPIS K.: Najnowsze osiągnięcia w kriokonserwacji oocytów ssaków oraz perspektywy ich wykorzystania w medycynie i weterynarii Recent advances in mammalian oocyte cryopreservation and perspectives of their application in medicine and veterinary	189
Część druga: TRANSPLANTACJA KOMÓREK – CELL TRANSPLANTATION	201
JAKÓBISIAK M.: Przeszczepianie komórek w terapii nowotworów (streszczenie) Transplantation of cells in tumor therapy	203
MOSKALEWSKI S., OSIECKA-IWA A., HYC A.: Przeszczepianie chondrocytów – Transplantation of chondrocytes	205
MAJKA M., KUBICZEK K., STEC M., JAROCHA D., RATAJCZAK M. Z.: Nowe aspekty transplantologiczne ludzkich krwiotwórczych komórek hematopoetycznych New transplantological aspects of early human hematopoietic cells	221
DRUKAŁA J., CIEŚLIK K.: Wykorzystanie hodowanych <i>in vitro</i> keratynocytów w transplantologii (streszczenie) The use of <i>in vitro</i> cultured keratinocytes for transplantation	231
GRANICKA L., KAWIAK J.: Wybrane zastosowania komórek w biotechnologii Some applications of cells in biotechnology	235

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata na rok 2002

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2002 pod adresem:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl

na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,

ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,

IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001. Cena prenumeraty rocznika na rok 2002:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 90 zł, a dla odbiorców indywidualnych 30 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2002 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland,

tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl:

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,

ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa,

No 12401053-40006576-2700-401112-001. Price per year 20 dollars USA.

TREŚĆ – CONTENTS

Wstęp – Introduction	1
Część pierwsza: ZAGADNIENIA ROZRODU CZŁOWIEKA I ZWIERZĄT 2 – ASPECTS OF REPRODUCTION IN HUMAN AND ANIMALS 2	2
Sekcja: ROZRÓD CZŁOWIEKA – HUMAN REPRODUCTION	2
KURPISZ M., SZCZYGIEŁ M., WILAND E.: Genetyczne aspekty rozrodu człowieka Genetic aspects of male infertility	3
MARIANOWSKI L., GRZECHOCIŃSKA B.: Wpływ otyłości i wieku na wyniki stymulacji owulacji – Effects of obesity and age on the results of ovulation induction	9
WOŁCZYŃSKI S.: Ocena jakości ludzkich zarodków w programie leczenia niepłodności metodą pozaustrojowego zapłodnienia – Assessment of human embryos quality in ivf-et programme	17
JAKOWICKI J. A.: Genetyczne przyczyny utraty wczesnej ciąży – Genetic aspects of early pregnancy loss	25
Sekcja: FIZJOLOGIA ROZRODU, MECHANIZMY NEUROHORMONALNE – PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION, NEUROHORMONAL MECHANISMS	33
GAJEWSKA A., KOCHMAN K.: Zależna od gonadoliberyny regulacja aktywności transkrypcyjnej genów kodujących podjednostki hormonu luteinizującego w przysadce mózgowej Gonadoliberin-dependent transcription activity of genes encoding luteinizing hormone subunits in the pituitary gland	35
OKRASA S., KAMIŃSKI T., PRZAŁA J., BOGACKA I., SIAWRYS G.: Rola opioidów w lokalnej regulacji funkcji sekretorycznych przysadki i jajnika u świń – Role of opioids in the local regulation of secretory functions of the porcine pituitary and ovary	47
CIERESZKO R.: Mechanizm działania prolaktyny w układzie rozrodczym samicy Mechanism of prolactin action in female reproductive tract	57
KOTWICHA J., BOGACKI M., RĘKAWIECKI R.: Udział układu noradrenergicznego w regulacji czynności ciała żółtego – Involvement of noradrenergic system in the <i>corpus luteum</i> function	69
WALCZEWSKA A.: Leptyna a rozród – Leptin and reproduction	77
TOMASZEWSKA-ZAREMBA D., PRZEKOP F.: Rola receptorów GABA _A w neuralnej regulacji uwalniania gonadoliberyny z podwzgórza u anestralnych owiec – The involvement of GABA _A receptors in the control of gonadoliberin release in anestrus ewes	89
KOTARSKI J.: Molekularne podstawy krwawienia miesiączkowego Molecular pathways involved in human menstruation	95
Sekcja: BIOCHEMICZNE I MOLEKULARNE MECHANIZMY ROZRODU BIOCHEMICAL AND MOLECULAR MECHANISMS OF REPRODUCTION	101
STĘPIŃSKA U., OLSZAŃSKA B.: Polispermiczne zapłodnienie u ptaków – Rola DNaz w degradacji nadliczbowych plemników – Polispermic fertilization in birds – The role of DNases in degradation of supernumerary spermatozoa	103
DROBA M., DROBA B.: Rola kwaśnych glikozydaz w procesie zapłodnienia Role of acid glycosidases in the fertilization process	111
LECHNIAK D., MADEJA Z.: Analiza ekspresji genu hormonu wzrostu w zarodkach bydłych Analysis of the growth hormone gene expression in bovine embryos	123
MALEWSKI T.: Rola genów homeotycznych w rozwoju gruczołu mlekowego Role of homeotic genes in the development of mammary gland	137
WYSOCKI P., STRZEŻEK J.: Wysoko- i niskocząsteczkowe fosfatazy kwaśne męskiego układu rozrodczego – High and low molecular weight acid phosphatases of the male reproductive tract	143

ciąg dalszy Spisu treści na odwrocie – Contents continued on preceding page

ISSN 0324-833X