

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

POLISH  
ANATOMICAL  
SOCIETY

POLISH SOCIETY  
FOR CELL  
BIOLOGY

VOL. 29, 2002

Suplement nr 20

**WYBRANE ZAGADNIENIA  
Z REGULACJI ROZRODU**

REPRODUCTION REGULATION — Some aspects

[www.pbkom.pl](http://www.pbkom.pl)

<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 BILIŃSKI – 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, e-mail: 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.



## ZNACZENIE JAJOWODÓW W ROZRODZIE

### THE ROLE OF OVIDUCT IN A REPRODUCTION

Andrzej STARCZEWSKI, Rafał KURZAWA, Iwona SZYDŁOWSKA

Klinika Rozrodczości i Ginekologii

Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie

**Streszczenie:** Jajowód jest środowiskiem, w którym następuje kapacytacja plemników, zapłodnienie, rozwój i transport zarodka. Jego ścianę budują: błona surowicza, mięśnie gładkie i błona śluzowa, pokryta nabłonkiem cylindrycznym. Wyróżniono w nim trzy typy komórek. Ich odsetek zmienia się w różnych częściach jajowodu. Pierwszy to komórki migawkowe, które warunkują między innymi przenoszenie gamet i zarodka w świetle jajowodu. Drugi typ to komórki wydzielnicze, produkujące i wydzielające specyficzne glikoproteiny. Trzecim są komórki przypodstawne. Błona śluzowa podlega cyklicznym przemianom, związanym ze zmianą stężenia steroidowych hormonów płciowych w przebiegu cyklu miesięcznego. W jej morfologii zidentyfikowano 8 faz: 1) preciliogenna, 2) ciliogenna, 3) urzęsienia z przewagą komórek urzęsiających się nad urzęsionymi, 4) urzęsienia z przewagą komórek urzęsionych nad urzęsiającymi się, 5) komórek urzęsionych z aktywnością wydzielniczą komórek sekrecyjnych, 6) wczesnej regresji, 7) późnej regresji, 8) całkowitej regresji. Ważnym dla prawidłowej czynności jajowodu w procesie rozrodu jest też płyn jajowodowy, składający się z wydzieliny komórek nabłonka jajowodu, płynu otrzewnowego i przesączu naczyń krwionośnych. Jego skład i ilość zależą od ilości hormonów płciowych. Błona śluzowa i mięśniowa odgrywają ważną rolę w transporcie komórki jajowej i zarodka. Poza urzęsieniem komórek migawkowych duże znaczenie mają skurcze mięśni gładkich jajowodu, które zależne są od pobudzenia receptorów  $\alpha$  i  $\beta$ , ich liczba natomiast od stężenia estrogenów i progesteronu. Znajomość roli jajowodu w procesie rozrodu, a także jego prawidłowej budowy anatomicznej, jest ważne w ocenie znaczenia stwierdzanych zmian morfologicznych przed planowanym leczeniem niepłodności pochodzenia jajowodowego.

**Słowa kluczowe:** jajowód, rozród.

**Summary:** Oviduct constitutes environment for sperm capacitation, fertilization, preimplantation embryo development, gamete and embryo transport. Its wall is built by serous membrane, smooth muscles and mucosa, covered with pseudostratified epithelium, with ciliated, secretory and basal cells. Ciliated cells enhance gamete and embryo transfer in the oviduct. Secretory cells produce and release specific glycoproteins. Basal cells continuously renew the population of epithelial cells. The mucous membrane is subject to cyclic transformations secondary to changes in hormonal profiles during menstrual cycle. Eight morphological phases were identified: 1) preciliogenic, 2) ciliogenic, 3) phase of

ciliation with majority of ciliating cells over ciliated, 4) phase of ciliation with majority of ciliated cells over ciliating, 5) phase of ciliated cells with secretory cells activity, 6) phase of early regression, 7) late regression, 8). complete regression. Important role in reproduction plays also oviductal fluid consisting of epithelial cells discharge, peritoneal fluid and blood vessels filtrate. Its composition and quantity is sex hormone dependent. Mucosa and muscles play role in transportation of gametes and embryo. The transport depends on ciliated cells and smooth muscle contractions secondary to stimulation of alpha and beta receptors. The quantity of the receptors depends on oestrogen and progesterone levels.

*Key words:* oviduct, reproduction.

Jajowód jest częścią układu rozrodczego kobiety. Tworzy środowisko dla kapacytacji plemników, zapłodnienia, rozwoju i transportu zarodka. Dzięki nowoczesnym technikom histologicznym, histochemicznym i badaniach w mikroskopie elektronowym transmisyjnym i skaningowym, a także rozwojowi biochemii i hodowli tkankowej coraz więcej wiemy na temat anatomii i czynności tego narządu [14, 20, 42].

W skład ściany jajowodu wchodzi: błona surowicza, mięśnie gładkie oraz błona śluzowa. Na całej długości jajowodu błona śluzowa tworzy fałdy. W cieśni są one nierozgałęzione, natomiast w bańce budują uwypuklenia drugo- i trzeciorzędowe. Dystalna część jajowodu zakończona jest strzępkami, które są przedłużeniem fałdów [17, 19].

## KOMÓRKI NABŁONKA JAJOWODU

Błonę śluzową pokrywa nabłonek cylindryczny. Jest on najniższy we wczesnej fazie pęcherzykowej, natomiast najwyższy w fazie okołowulacyjnej [9, 32]. Nowak i Everett już w 1928 roku [33] wykazali, że po miesiączce komórki nabłonka podwyższają się. Najwyższe są w środku cyklu, a następnie zmniejszają się osiągając najniższą wysokość w czasie miesiączki. Niskie są również w połogu [10]. Podobne wyniki uzyskali Verhage i wsp. [43]. Potwierdzili oni te badania pomiarami cytomorfometrycznymi. Wykazali, że opisane zmiany dotyczą zarówno strzępek, jak i bańki. Atrofia związana była z podwyższeniem poziomu progesteronu, a hipertrofia z niskim poziomem progesteronu i umiarkowanym estradiolu.

W nabłonku można wyróżnić komórki migawkowe i wydzielnicze oraz przypodstawne [9, 17, 19]. Stwierdzono wzrost odsetka komórek migawkowych wzdłuż jajowodu od cieśni do strzępek, natomiast najwięcej komórek wydzielniczych znajduje się w cieśni. We wczesnej fazie pęcherzykowej i późnej ciałka żółtego trudno odróżnić te dwa typy komórek. Urzęsienie komórek migawkowych zależy od stężenia estrogenów i progesteronu w surowicy krwi. Odor i wsp. [34] na podstawie badań ultrastrukturalnych wykazali, że komórki migawkowe mogą występować w czterech postaciach: jako urzęsiałe się, urzęsione, odrzęsiałe się i odrzęsione. Pod koniec fazy lutealnej występuje proces odrzęsiania się komórek. Jest on najsilniej wyrażony w strzępkach. Ponowne urzęsienie ma miejsce we wczesnej fazie folikularnej [34].

Urządzenie komórek migawkowych zależy od stężenia estrogenów i progesteronu w surowicy krwi. Szczególną rolę w ich odrządzeniu ma ten ostatni. Estrogeny zwiększają bowiem liczbę migawek, lecz tylko wtedy, gdy stężenie progesteronu jest bardzo niskie. Podwyższenie jego stężenia hamuje ciliogenezę, a w komórkach urzędzonych powoduje utratę rzęsek mimo wysokiego stężenia estrogenów. Proces taki zachodzi między innymi w ciąży lub podczas leczenia progestagenami [32]. Zmiany te są jeszcze bardziej nasilone w połogu [10] i po menopauzie. W tym przypadku ich przyczyną jest niskie stężenie estrogenów. Po okresie połogu estradiol indukuje ponowne urządzenie komórek migawkowych, podobnie jak estrogeny podawane po menopauzie. Obserwacje te potwierdzają badania z zastosowaniem hodowli *in vitro* komórek nabłonka jajowodu.

Rzęski komórek migawkowych mają typową dla rzęsek ultrastrukturę. W ich skład wchodzi: para centralnych i dziewięć par obwodowych mikrotubuli [4]. Budowa ta warunkuje ich prawidłowy ruch, niezbędny do przenoszenia gamet i zarodka w świetle jajowodu. Nieprawidłowości w tej strukturze w postaci braku centralnych mikrotubuli, dodatkowych mikrotubuli obwodowych i przemieszczenie ich bliżej środka oraz nieprawidłowo skonfigurowanych ciałek podstawowych rzęsek, czyli zespół Kartegenera [36] może zaburzać lub uniemożliwiać transport w świetle jajowodu i być przyczyną niepłodności [16]. W ostatnich latach dzięki wykorzystaniu do badań hodowli tkankowej stwierdzono istnienie dwóch populacji komórek rzęskowych. Jedna zawiera ziarnistości wydzielnicze i krople lipidów, druga ich nie ma. Ilość ziarnistości jest największa w czasie jajeczkowania i we wczesnej fazie ciała żółtego [14, 46]. Komórki te produkują i wydzielają między innymi: czynnik hamujący białaczkę (LIF), fibroblastyczny czynnik wzrostu (bFGF) oraz interleukiny 6 i 8 (IL 6 i IL 8) [4].

Struktura komórek sekrecyjnych w trakcie cyklu miesięczkowego zmienia się podobnie jak komórek migawkowych. We wczesnej fazie pęcherzykowej mają one niskie mikrokosmki, zawierają mało glikogenu, a szorstka siateczka śródplazmatyczna i aparat Golgiego są słabo rozwinięte. Ziarnistości widoczne są głównie u ich postawy. Pod wpływem estradiolu dochodzi do zmian w ultrastrukturze siateczki śródplazmatycznej oraz aparatu Golgiego i spostrzega się tworzenie i rozwój ziarnistości. W późnej fazie pęcherzykowej i w czasie jajeczkowania w świetle komórek występuje glikogen, krople tłuszczu i liczne ziarnistości wydzielnicze o różnym wymiarze i gęstości. Są one PAS-dodatnie i odporne na działanie diastazy. Pojawiają się także duże ziarnistości lamellarne składające się z lamelli w części korowej i bezpostaciowego rdzenia. W fazie okołooowulacyjnej stwierdza się największą aktywność sekrecyjną nabłonka. Występuje wydzielanie apokrynowe i drogą egzocytozy [9,47]. W późnej fazie ciała żółtego komórki wydzielnicze ponownie mają niskie mikrokosmki i zawierają niewiele ziaren wydzielniczych, lipidów i glikogenu [14, 28]. Stwierdzono różnice w ultrastrukturze tych komórek w strzępkach, bańce i cieśni. Różnice te dotyczą kształtu i wysokości mikrokosmków oraz struktury i cyklicznych zmian ziarnistości w przebiegu cyklu [7]. W strzępkach komórki wydzielnicze zawierają małe ziarnistości sekrecyjne o umiarkowanej gęstości elektronowej i wiele dużych ziaren przypominających krople lipidów. W komórkach bańki małe ziarnistości z umiarkowaną gęstością elektronową stwierdza się w szczytowej części cytoplazmy komórek. W cieśni komórki wydzielnicze

zawierają duże ziarnistości sekrecyjne o umiarkowanej gęstości elektronowej, a często również ziarnistości gęste elektronowo oraz pierwotne i wtórne ciała lizosomalne. W cieśni też stwierdzono najdłuższe mikrokosmki w tych komórkach. Badania immunohistochemiczne z zastosowaniem monoklonalnych przeciwciał wykazały, że komórki wydzielnicze regionalnie produkują i wydzielają specyficzne glikoproteiny [1].

W nabłonku jajowodu przy błonie podstawnej występuje także trzeci typ komórek, których morfologia i rola nie jest do końca wyjaśniona.

## FAZY MORFOLOGII NABŁONKA JAJOWODU

W błonie śluzowej jajowodu ma miejsce aktywność mitotyczna i śmierć komórek, czego dowodem są cechy ich apoptozy w postaci wewnątrzkomórkowych ciał apoptycznych i obecność makrofagów (wewnątrz nabłonka i pod nim) wypełnionych jądrami i innymi fragmentami komórek. Największa aktywność mitotyczna występuje podczas fazy folikularnej, kiedy stężenie progesteronu jest niskie, natomiast wzrost jego stężenia w fazie lutealnej prowadzi do zahamowania aktywności mitotycznej oraz pojawienia się apoptozy i inwazji makrofagów w nabłonku jajowodu [9]. Jak wspomniano wcześniej, nabłonek jajowodu podlega cyklicznym zmianom w cyklu miesięczkowym. Zidentyfikowano 8 specyficznych faz w morfologii nabłonka bańki i strzępków jajowodu [9]. Fazy te zostały opisane w następujący sposób:

- I. Faza preciliogenna – jądra komórek nabłonkowych powiększają się, kontury komórek wygładzają się, powiększa się cała komórka, pojawia się aktywność mitotyczna.
- II. Faza cilliogenna – nasilenie aktywności mitotycznej, jądra są okrągłe i wyraźne, komórki nabłonka dzielą się na jasne i ciemne, widoczne są ciała podstawne rzęsek w szczytowej części cytoplazmy komórek jasnych.
- III. Faza urzęsienia z przewagą komórek urzęsających się nad urzęsionymi – stwierdza się wszystkie cechy fazy ciliogennej, ale wiele komórek rzęskowych nie ma rzęsek, natomiast ciemne komórki sekrecyjne nie wystają nad powierzchnię nabłonka. Dominują komórki urzęsające się nad urzęsionymi.
- IV. Faza urzęsienia z przewagą komórek urzęsionych nad urzęsającymi się – większość komórek jest urzęsiona, ale wiele jeszcze jest w stadium urzęsiania się. Aktywność mitotyczna nie jest jeszcze przerwana. Komórki wydzielnicze zaczynają wystawać nad poziom nabłonka i w szczytowej części zawierają ziarnistości i glikogen. Przeważają komórki urzęsione.
- V. Faza komórek urzęsionych z aktywnością wydzielniczą komórek sekrecyjnych – większość komórek nabłonkowych jest urzęsiona, komórki urzęsające występują niezwykle rzadko. Komórki wydzielnicze są w pełni rozwinięte. W szczytowych częściach cytoplazmy wystających ponad powierzchnię nabłonka zawierają glikogen i ziarnistości. Kontury jąder obu typów komórek są mniej wyraziste.

- VI. Faza wczesnej regresji – obecne są komórki apoptotyczne rozrzucone w nabłonku, stwierdza się makrofagi, które fagocytują martwe komórki.
- VII. Faza późnej regresji – nabłonek jest atroficzny, aktywność sekrecyjna zmniejsza się, następuje utrata rzęsek. Obecne są martwe komórki i makrofagi. Jądra komórek są „wysuszone”.
- VIII. Faza całkowitej regresji – nabłonek jest bardzo niski, pozbawiony rzęsek, jądra komórek są małe, o nierównych obrysach, nie obserwuje się aktywności sekrecyjnej. Stwierdza się mało martwych komórek i mniej makrofagów.

## PODŚCIELISKO BŁONY ŚLUZOWEJ

W podścielisku błony śluzowej występują głównie trzy typy komórek. Pierwszy, najczęściej spotykany, to fibroblasty. Komórki te są niezróżnicowane ultrastrukturalnie. Nie mają desminy i miofilamentów, zawierają natomiast aktynę i ciała tłuszczowe. Drugi typ to komórki mięśni gładkich, bogate w miofilamenty, desminę i aktynę. Trzeci zawiera miofilamenty, natomiast nie ma desminy. Obliczono, że komórki te występują w stosunku 83/13/4 [48]. Poza tym w podścielisku znajdują się limfocyty, monocyty i komórki tuczne. Obecne są tam też liczne włókna retikuliny, tworzące sieć o wydłużonych oczkach, w niewielkiej ilości włókna kolagenowe oraz naczynia krwionośne i limfatyczne [19].

W fazie zależnej od estrogenów w jajowodzie progesteron działa jako antagonist estrogenów. Stwierdzono, że stężenie estradiolu w surowicy krwi powyżej 100 pg/ml indukuje ciliogenezę i sekrecję, natomiast gdy stężenie progesteronu jest powyżej 1 ng/ml, następuje atrofia, odrzucenie i zatrzymanie sekrecji już po 48 godzinach, nawet jeśli estradiol jest powyżej 200 pg/ml [9]. Wiadomo, że oddziaływanie na jajowód steroidowych hormonów płciowych odbywa się między innymi poprzez receptory estrogenowe i progesteronowe. Badaniami immunocytochemicznymi z użyciem monoklonalnych przeciwciał zmierzono stężenie tych receptorów w naturalnym cyklu i po podaniu hormonów. W cyklu naturalnym progesteron antagonizuje działanie estradiolu przez obniżenie stężenia receptorów estrogenowych poniżej progu wymaganego dla działania estradiolu. Podawanie estradiolu powoduje wzrost stężenia receptorów estrogenowych, natomiast progesteronu już po 24 godzinach ich spadek. Potwierdziły to pomiary koncentracji estradiolu tkankowego, które wykazały, że stężenie jego było znacząco niskie w trakcie przyjmowania progesteronu, nawet gdy estradiol był wysoki w surowicy krwi [9]. Stężenie receptorów progesteronowych rośnie po podaniu estradiolu, natomiast maleje, gdy podawany jest progesteron. Świadczy to o supresji przez progesteron jego własnych receptorów. Mimo to ma on działanie antyestrogenne przez obniżenie koncentracji receptorów estrogenowych. Opisany mechanizm działania na jajowód steroidowych hormonów płciowych nie jest jednak zupełnie jasny. Stwierdzono bowiem, że receptory estrogenowe i progesteronowe obecne są przede wszystkim w komórkach podścieliska i mięśni gładkich, a w nabłonku jest

ich niewiele i występują tylko w komórkach wydzielniczych [8]. Dlaczego więc estrogeny, jak i progesteron wykazują silne działanie na komórki migawkowe, skoro nie zidentyfikowano w nich receptorów na te hormony? Boutin i wsp. sugerują, że estrogeny i progesteron wpływają na nabłonek przez produkowane w komórkach podścieliska czynniki wzrostu, które dyfundują do nabłonka przez błonę podstawną [8]. Potwierdzeniem tej teorii były wyniki badań Giudice i wsp. oraz Adachi i wsp., którzy zidentyfikowali w nabłonku receptory dla nabłonkowych czynników wzrostu (specyficzne białka C-erbB-1 i C-erbB-2 o masie cząsteczkowej 185 kDa) [3,12]. Nie jest to jednak jedyna droga działania steroidowych hormonów płciowych. W badaniach z zastosowaniem hodowli *in vitro* komórek nabłonka jajowodu stwierdzono wprawdzie dodatni wpływ dodanych do hodowli nabłonkowych czynników wzrostu na aktywność proliferacyjną komórek nabłonka jajowodu, lecz tę taktywność nasilał także 17 $\beta$  estradiol, natomiast progesteron ją hamował. Być może estradiol i progesteron działają na nabłonek przez czynniki wzrostu produkowane nie tylko w komórkach podścieliska, lecz także w komórkach wydzielniczych nabłonka. Wskazuje na to inna praca Adachi i wsp. [3]. Badali oni inkorporację [3H] tymidyny do komórek nabłonka w hodowli tkankowej. Estrogeny wzmagają wbudowywanie [3H] tymidyny już po 12 godzinach. Obserwowano jednak również wzrost stężenia nabłonkowego czynnika wzrostu (EGF), a także receptorów dla tego czynnika w komórkach nabłonka. Dodanie do hodowli nonoklonalnych przeciwciał przeciw EGF hamowało estrogenową indukcję proliferacji. Inkorporacja [3H] tymidyny była wówczas taka sama jak w komórkach hodowanych bez estrogenów. Do tej pory nie znaleziono jednak przekaźnika sygnału estrogenowego i progesteronowego na urzęsienie, funkcje wydzielnicze oraz indukowanie proliferacji i apoptozy w komórkach nabłonka. Wyjaśnienia tego nie dostarczyły badania nad nowym receptorem estrogenowym beta, występuje on bowiem w jajowodzie w śladowych ilościach [35, 41]. Być może zlokalizowane w nabłonku jajowodu zostaną inne typy receptorów estrogenowych i progesteronowych, których istnienie sugerują Katzenellenbogen i Korach [21]. Intensywnie poszukiwali oni tego receptora odkrywając przy okazji pięć izomorficznych form receptora beta. Nowy typ receptora estrogenowego odkryli jednak w ubiegłym roku Heard i wsp. [18], nazywając go receptorem gamma. Nie wiadomo obecnie, czy receptor ten występuje w jajowodzie. Wyjaśnią to zapewne badania *in vitro* na czystych liniach komórek migawkowych i wydzielniczych [4].

Duże znaczenie dla prawidłowej czynności jajowodu ma płyn jajowodowy. Stanowi on środowisko dla kapacytacji plemników, procesu zapłodnienia i rozwoju zarodka. W jego skład wchodzi wydzielina komórek nabłonka jajowodu, płyn otrzewnowy i przesącz z naczyń krwionośnych. Ilość jego jest największa w fazie jajeczkowania i wprost proporcjonalna do stężenia estrogenów, a odwrotnie proporcjonalna do stężenia progesteronu. Na ilość tę wpływają także między innymi związki adrenergiczne i prostaglandyny. Od wielu lat prowadzi się intensywne badania nad składem płynu jajowodowego i rolą znajdujących się w nim substancji białkowych. W płynie tym zidentyfikowano specyficzne, syntetyzowane miejscowo pod wpływem estrogenów, glikoproteiny jajowodowe [1, 14, 24, 44]. Określono masę cząsteczkową tych glikoprotein i budujących je aminokwasów [14]. Są one wydzielane głównie w fazie



okołoowulacyjnej. Łącznie z cholesterolem, fosfolipidami i wolnymi aminokwasami białka te odpowiedzialne są za odżywianie zarodka w świetle jajowodu [28, 44, 46, 47]. Wyniki badań sugerują, że wymienione substancje, a także wydzielane do płynu jajowodowego enzymy [44] wpływają na kapacytację plemników, prawidłową reakcję akrosomalną i modyfikację otoczki przejrzystej komórki jajowej [14, 23, 28].

## CZYNNIKI WZROSTU I PRZEŻYCIA

Dalszych prac wymagają badania nad produkowanymi i wydzielanymi przez błonę śluzową jajowodu do jego światła aktywnymi związkami białkowymi stymulującymi i regulującymi, między innymi, rozwój zarodka przed implantacją [6, 22, 25, 27]. Do tej pory zidentyfikowano wiele tych związków. Należy do nich rodzina nabłonkowych czynników wzrostu: nabłonkowy czynnik wzrostu (EGF) [6], transformujący czynnik wzrostu (TGF $\alpha$ ) [22], insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF) [25, 27], amphiregulina (Ar) i nabłonkowy czynnik wzrostu wiążący heparynę (HbEGF). Poza nimi wykryto: płytkowy czynnik wzrostu (PDGF), fibroblastyczny czynnik wzrostu (bFGF), a także czynnik stymulujący kolonizację (SCF) [5], czynnik hamujący białaczkę (LJF) [6, 22, 39], łożyskową proteinę 14 (PP14), aktywinę A, czynnik martwicy nowotworów (TNF) [5, 22],  $\alpha$  i  $\beta$  integrynę, laktoferynę (LF) oraz cytokinetyczne interleukiny: 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i 6 (IL-6) i 8 (IL-8) [6, 22, 50]. Czynniki wzrostu: EGF, TGF $\alpha$ , IGF, HbEGF, PDGF, bFGF mają działanie embriotroficzne. Są produkowane w komórkach nabłonka i podścieliska błony śluzowej, a największe stężenie w jajowodzie osiągają w fazie jajeczkowania i wczesnej fazie lutealnej [27]. Czynniki martwicy nowotworów i cytokinetyczne interleukiny występują w największym stężeniu w odpowiedzi na stan zapalny [5]. Rola ich w embriogenezie nie jest jednak do końca wyjaśniona. Podobnie mało poznana jest rola wytwarzanego w jajowodzie tlenu azotu [11]. Na uwagę zwraca fakt obecności receptorów dla EGF, TGF $\alpha$  i IGF w komórkach nabłonka jajowodu. Ilość tych receptorów zależy między innymi od stężenia steroidowych hormonów płciowych i zmienia się w poszczególnych fazach cyklu. Ich pobudzenie zwiększa syntezę białek w nabłonku i indukuje jego proliferację.

## BŁONA MIĘŚNIOWA

Następną strukturalną i funkcjonalną częścią ściany jajowodu jest błona mięśniowa. W cieśni składa się ona z dwóch warstw mięśni gładkich: wewnętrznej o przebiegu okrężnym i spiralnym oraz zewnętrznej o przebiegu podłużnym [17, 19, 30]. W bańce pęczki włókien mięśniowych nie tworzą wyraźnych warstw. Przeplatają się one wzajemnie, dzielą i łączą tworząc nowe wiązki z różną orientacją. Sieci te otoczone są luźną tkanką łączną [19, 29, 30, 31, 45]. W warstwie mięśniowej występują też licznie

naczynia krwionośne. Naczynia te mają zdolność do poszerzania się i wypełniania krwią. Są oplecione wiązkami nerwów, które tworzą gęsty splot w warstwie okrężnej mięśni okolicy cieśniowej [19].

Na zewnątrz jajowód otoczony jest otrzewną o typowej budowie błony surowiczej, która przechodzi w otrzewną więzadła szerokiego macicy [19].

Jednym z nie do końca wyjaśnionych jest mechanizm przenoszenia komórki jajowej i zarodka w świetle jajowodu. Przyjmowano, że podstawową rolę w tym mechanizmie mają segmentowe skurcze mięśni gładkich jajowodu [17]. Ta czynność skurczowa jest najsilniejsza w czasie jajeczkowania, a następnie w fazie lutealnej ulega znacznemu osłabieniu. Nie tłumaczy ona jednak mechanizmu transportu komórki jajowej na powierzchni strzępków, gdzie transport ten jest najszybszy, a brak jest warstwy mięśniowej jajowodu. Ponadto, analizując budowę anatomiczną błony mięśniowej bańki jajowodu, brak jest morfologicznych danych wskazujących na możliwość jego jednokierunkowych skurczów. Dlatego Vizza i wsp. są zdania, że nie można wytłumaczyć procesu przenoszenia komórki jajowej i zarodka w bańce funkcją błony mięśniowej [45]. Większość badaczy uważa obecnie, że na powierzchni strzępek i w bańce bardzo ważną rolę w tym procesie mają komórki migawkowe [16]. Błona mięśniowa spełnia natomiast podstawową rolę w zatrzymaniu, a następnie przechodzeniu zarodka przez cieśń jajowodu, zamykając lub otwierając czynnościowy zwieracz jajowodowo-maciczy [17, 19, 29].

Aktywność mięśni gładkich zależy od ilości i pobudzenia receptorów  $\alpha$  i  $\beta$ . Stwierdzono, że pobudzenie receptorów  $\alpha$  powoduje skurcze jajowodu, natomiast receptory  $\beta$  odpowiedzialne są za ich osłabienie. Różnice w nasileniu i częstotliwości skurczów związane są ze wzajemnym stosunkiem tych obu receptorów. W cieśni przewagę mają receptory  $\alpha$  (stanowią od 70 do 90%), natomiast w bańce receptory  $\beta$  (stanowią od 50 do 70%). Stężenie obu typów receptorów zależy od estrogenów i progesteronu. Estrogeny nasilają syntezę receptorów  $\alpha$ , a progesteron hamuje ją, zwiększając jednocześnie syntezę receptorów  $\beta$ . Hormony te wpływają także na kurczliwość jajowodu zwiększając metabolizm noradrenaliny w neuronach narządów rozrodczych. Na kurczliwość tę mają także wpływ prostaglandyny.  $\text{PGF}_2\alpha$  stymuluje czynność skurczową, natomiast  $\text{PGE}_2$  hamuje ją. Produkcja i efekt działania obu prostaglandyn zmienia się w poszczególnych segmentach jajowodu i zależy od stężenia estradiolu i progesteronu. Bańka i strzępki produkują więcej prostaglandyn niż cieśń. W fazie proliferacyjnej dominuje produkcja  $\text{PGF}_2\alpha$ , natomiast w wydzielniczej  $\text{PGE}_2$ . Reaktywność dalszego odcinka cieśni na  $\text{PGF}_2\alpha$  obniża się pod wpływem progesteronu, natomiast na  $\text{PGE}_2$  zwiększa się. Na czynność mięśni gładkich jajowodu mają także wpływ oksytocyna, endotelina, relaksyna i przedsiorkowy peptyd natriuretyczny (ANP). Oksytocyna, przedsiorkowy peptyd natriuretyczny (ANP) i endotelina, której największe stężenie stwierdzono w cieśni, wpływa na skurcz włókien okrężnych i spiralnych w cieśni [24]. Relaksyna, syntetyzowana między innymi w nabłonku jajowodu, powoduje natomiast rozkurcz wszystkich grup włókien mięśniowych w całym narządzie. Poza wymienionymi czynnikami na zatrzymanie zarodka przed jego przejściem do macicy

wpływ mają także sploty żyłne w cieśni. Decydują one o napięciu ścian jajowodu, a ich wypełnienie powoduje niemal całkowite zamknięcie jego światła.

Jak wspomniano wcześniej, bardzo ważną rolę w przenoszeniu komórki jajowej i zarodka spełnia nabłonek jajowodu [17]. Steroidowe hormony płciowe mają wpływ nie tylko na jego urzęsienie, lecz także na czynność rzęsek komórek migawkowych [32, 38]. Nie wiadomo, czy wpływ ten jest bezpośredni, czy odbywa się przez inne substancje biologicznie czynne, np. angiotensynę II. Dzięki badaniom z użyciem lasera stwierdzono, że średnia częstotliwość ruchu rzęsek (CBF) w bańce jajowodu wynosi  $5,4 \pm 0,3$  Hz i że zwiększa się ona w odpowiedzi na pobudzenie angiotensyną II. Ilość receptorów na ten czynnik w komórkach migawkowych zależy natomiast od stężenia estrogenów i progesteronu [38]. Stężenie tych hormonów zdaje się więc jednak pełnić kluczową rolę w regulacji transportu jajowodowego.

Czas przenoszenia komórki jajowej i zarodka przez jajowód wynosi około 80 godzin, a najdłużej zapłodniona komórka jajowa i zarodek przebywa w bańce jajowodu [17]. Zmniejszone stężenie estrogenów lub podwyższone progesteronu, przez zredukowanie ilości komórek urzęsionych, znacznie przedłuża transport lub sprawia, że jest on niemożliwy [17]. Podobny efekt, mimo zachowanej drożności, może być następstwem zmian włóknistych i bliznowatych w ścianie jajowodu, spowodowanych przebytymi stanami zapalnymi, endometriozą lub zabiegami operacyjnymi [17].

Znajomość roli jajowodu w procesie rozrodu, a także jego prawidłowej budowy anatomicznej jest ważne w ocenie znaczenia stwierdzanych zmian morfologicznych przed planowanym leczeniem niepłodności pochodzenia jajowodowego. Nasilenie tych zmian powinno decydować o wyborze metody leczenia. Zbyt często się bowiem obecnie zdarza, że kobiety z tą przyczyną niepłodności kwalifikowane są do leczenia zapłodnieniem pozaustrojowym. Zapomina się, szczególnie w przypadkach niedrożności ujść brzusznych jajowodów, że w wybranych przypadkach operacje rekonstrukcyjne jajowodów dają dużo lepsze rezultaty niż leczenie metodą zapłodnienia pozaustrojowego.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ABE H. Immunocytochemical evidence that a specialized region of the rat oviduct secretes an oviductal glycoprotein. *J Anat* 1996; **188**: 333–339.
- [2] ABE H. The mammalian oviductal epithelium: regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histol Histopathol* 1996; **11**: 743–768.
- [3] ADACHI K, KURACHI H, HOMMA H, ADACHI H, IMAI T, SAKATA M et al. Estrogen induces epidermal growth factor (EGF) receptor and its ligands in human fallopian tube: involvement of EGF but not transforming growth factor- $\alpha$  in estrogen-induced tubal cell growth *in vitro*. *Endocrinology* 1995; **136**: 2110–2119.
- [4] ANDO H, KOBAYASHI M, TODA S. Establishment of a ciliated epithelial cell line from human fallopian tube. *Hum Reprod* 2000; **15**: 1597–603.
- [5] AULT KA, TAWFIK OW, SMITH-KING MM et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  response to infection with *Chlamydia trachomatis* in human fallopian tube organ culture. *Am J Obstet Gynecol* 1996; **175**: 1242.
- [6] BARMAT LI, WORRILOW KC, PAYNTON BV. Growth factor expression by human oviduct and buffalo rat liver coculture cells. *Fertil Steril* 1997; **67**: 775–779.

- [7] BONDIA AM, GABRIELLI MG, MARCHETTI L, MATERAZZI G, MENGHI G. Cytomorphological changes in the rabbit oviductal epithelium after human chorionic gonadotropin treatment. *Histol Histopathol* 1997; **12**: 135–146.
- [8] BOUTIN EL, SANDERSON RD, BERNFIELD M, CUNHA G.R.: Epithelialmesenchymal interaction in uterus and vagina after the expression of the cell surface proteoglycan, syndecan. *Dev Biol* 1991; **148**: 63–74.
- [9] BRENNER RM, SLAYDEN OD. Cyclic changes in the primate oviduct and endometrium. In: The physiology of reproduction. Eds. E. Knobil, J.D. Neill. Raven Press, New York 1994: p. 541–569.
- [10] CIGANKOVA V, KRAJNICA KOVA M, KOKARDOVA M., TOMAJKOVA E.: Morphological changes in the ewe uterine tube (oviduct) epithelium during puerperium. *Vet Med (Praha)* 1996; **41**: 339–346.
- [11] GAWROŃSKA B, BODEK G, ZIECIK AJ. Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase (NOS) in different regions of porcine oviduct during the estrous cycle. *J Histochem Cytochem* 2000; **48**: 867–875.
- [12] GIUDICE LC, DSUPIN BA, IRWIN JC, ECKERT RL. Identification of insuline growth factor binding proteins in human oviduct. *Fertil Steril* 1992; **57**: 294–301.
- [13] GOMEZ E, URIA H. Morphological and functional characterization of bovine oviductal epithelial cell monolayers cultured on polarizing membranes. *Reprod Nutr Dev* 1997; **37**: 151–162.
- [14] GONZALEZ M, GARCIA C, NIETO A.: Regional differences in uteroglobin biosynthesis along the rabbit oviduct: immunohistochemical and biochemical studies. *Histochem J* 1996; **28**: 209–215.
- [15] HAGIWARA H., OHWADA N., FUJIMOTO T. Intracytoplasmic lumina in human oviduct epithelium. *Ultrastruct Pathol* 1997; **21**: 163–172.
- [16] HALBERT S.A., PATTON DL, ZARUTSKIE PW, SOULES MR. Function and structure of cilia in the fallopian tube of an infertile woman with Kartagener's syndrome. *Hum Reprod* 1997; **12**: 55–58.
- [17] HARPER MJK. Gamete and zygote transport. In: The physiology of reproduction. Eds. E Knobil, JD Neill. Raven Press, New York 1994: p. 137–187.
- [18] HEARD DJ, NORBYN PL, HOLLOWAY J, VISSING H. Human ERRgamma, a third member of the estrogen receptor-related receptor (ERR) subfamily of orphan nuclear receptors: tissue-specific isoforms are expressed during development and in the adult. *Mol Endocrinol* 2000; **14**: 382–392
- [19] HOFFMAN J. Anatomy and physiology of the fallopian tube. In.: Atlas of female infertility surgery. Ed. R.B. Hunt. Mosby Year Book Inc., St. Louis 1995: p. 3–11.
- [20] JANSEN RP. Endocrine response in the fallopian tube. *Endocr Rev* 1984; **5**: 525–551.
- [21] KATZENELLENBOGEN BS, KORACH KS. A new actor in the estrogen receptor drama: ER-beta. *Endocrinology* 1997; **138**: 861–862.
- [22] KELTZ MD, BURADAGUNTA S, OLIVE DL, KLIMAN HJ, ARICI A. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in the human fallopian tube. *Am J Obstet Gynecol* 1996; **175**: 1611–1919.
- [23] KIM NH, FUNAHASI H, ABEYDEERA LR, MOON SJ, PRATHER RS, DAY BN. Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during fertilization of pig oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1996; **107**: 79–86.
- [24] KIM SH, CHO KW, KIM SZ, KOH GY. Characterization of the atrial natriuretic peptide system in the oviduct. *Endocrinology* 1997; **138**: 2410–2416.
- [25] LAI YM, WANG HS, LEE CL, HUANG HY, CHANG FH, LEE JF, SOON YK. Insulin-like growth factor-binding proteins produced by Vero cells, human oviductal cells and human endometrial cells, and the role of insulin-like growth factor-binding protein-3 in mouse embryo co-culture systems. *Hum Reprod* 1996; **11**: 1281–1286.
- [26] LI J, CHEN X, ZHOU J. Ultrastructural study on the epithelium of ligated fallopian tubes in women of reproductive age. *Anat Anz* 1996; **178**: 317–320.

- [27] LIGHTEN AD, MOORE GE, WINSTON RM, HARDY K. Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical *in-vitro* fertilization culture. *Hum Reprod* 1998; **13**: 3144–3150.
- [28] MENEZO Y, GUERIN P. The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997; **73**: 99–104.
- [29] MUGLIA U. et al. The three-dimensional architecture of the myosalpinx in the cow as revealed by scanning electron microscopy. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1997; **29**: 201–207.
- [30] MUGLIA U. et al. The three-dimensional architecture of the myosalpinx in the sheep as revealed by scanning electron microscopy. *Arch Histol Cytol* 1996; **59**: 331–338.
- [31] MUGLIA U, VIZZA E, CORRER S, GERMANA G, MOTTA PM. The three-dimensional architecture of the myosalpinx in the rat (*Rattus norvegicus*) as revealed by scanning electron microscopy. *Histol Histopathol* 1996; **11**: 873–880.
- [32] MURRAY MK. Changes in secretory status, cell height and percentage ciliation of epithelial lining of sheep fimbria oviduct during early pregnancy. *J Reprod Fertil* 1996; **106**: 173–183.
- [33] NOVAK E, EVERETT HS. Ciclical and other variations in the tubal epithelium. *Am J Obstet Gynecol* 1998; **16**: 499–530.
- [34] ODOR DL, GADDUM-ROSSE P, RUMERY RE, BLANDAN RJ. Cilic variations in the oviductal ciliated cells during the menstrual cycle and after estrogen treatment in the pig-tailed monkey, *Macaca nemestrina*. *Anat Rec* 1980; **198**: 35–57.
- [35] PELLETIER G, LABRIE C, LABRIE F. Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol* 2000; **165**: 359–370.
- [36] ROPERTO F, BRUNETTI A, SAVIANO L, GALATI P. Morphologic alterations in the cilia of a cat. *Vet Pathol* 1996; **33**: 460–462.
- [37] SALLINEN K, VERAJANKORVA E, POLLANEN P. Expression of antigens involved in the presentation of lipid antigens and induction of clonal anergy in the female reproductive tract. *J Reprod Immunol* 2000; **46**: 91–101.
- [38] SARIDOGAN E, DJAHANBAKHCH O, PUDDEFOOT JR et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II stimulation of ciliary activity in human fallopian tube. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**: 2719–2725.
- [39] SENTURK LM, ARICI A. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Am J Reprod Immunol* 1998; **39**: 144–151.
- [40] SULZ L, VALENZUELA JP, SALVATIERRA AM, ORTIZ ME, CROXATTO MB. The expression of alpha(v) and beta3 integrin subunits in the normal human fallopian tube epithelium suggests the occurrence of a tubal implantation window. *Hum Reprod* 1998; **13**: 2916–2920.
- [41] TAYLOR AH, AL-AZZAWI F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol* 2000; **24**: 145–155.
- [42] TIEMANN U, NEELS P, KUCHENMEISTER U, WALZEL H, SPITSCHAK M. Effect of ATP and platelet-activating factor on intracellular calcium concentrations of cultured oviductal cells from cows. *J Reprod Fertil* 1996; **108**: 1–9.
- [43] VERHAGE HG, BAREITHER ML, JAFFE RC et al. Cyclic changes in ciliation, secretion and height, of the oviductal epithelium in women. *Am J Anat* 1979; **156**: 345–365.
- [44] VITAIOLI L, GOBETTI A, BALDONI E. Arylsulphatase A activity and sulphatide concentration in the female rabbit oviduct are under physiological hormonal influence. *Histochem J* 1996; **28**: 149–156.
- [45] VIZZA E, CORRER S, MUGLIA U, MARCHIOLLI F, MOTTA PM. The three-dimensional organization of the smooth musculature in the ampulla of the human fallopian tube: a new morpho-functional model. *Hum Reprod* 1995; **10**: 2400–2405.
- [46] WALKER DJ, VLAD MT, KENNEDY CR. Establishment of human tubal epithelial cells for coculture in an IVF program. *J Assist Reprod Genet* 1997; **14**: 83–87.
- [47] WALKER SK, HILL JL, KLEEMANN DO, NANCARROW CD. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biol Reprod* 1996; **55**: 703–710.

- [48] YAMAZAKI K, EYDEN BP. Ultrastructural and immunohistochemical studies of stromal cells in lamina propria of human fallopian tube ampullar mucosa: the recognition of CD34 positive reticular network' and its putative function for immune surveillance. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996; **28**: 325.
- [49] YANAI-INBAR I, SILVERBERG SG. Mucosal epithelial proliferation of the fallopian tube: prevalence, clinical associations, and optimal strategy for histopathologic assessment. *Int J Gynecol Pathol* 2000; **19**: 139–144.
- [50] YEUNG WS et al. The production of interleukin-1 alpha immunoreactivity by human oviducal cells in a coculture system. *J Assist Reprod Genet* 1996; **13**: 772–775.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 30.10. 2002 r.*

*Przyjęto: 24.11. 2002 r.*

*Adres autorów: Unii Lubelskiej 1, 71-252 Szczecin*

*e-mail: [kurzawa@sci.pam.szczecin.pl](mailto:kurzawa@sci.pam.szczecin.pl)*

## HORMONY NAJĄDRZA

### EPIDIDYMAL HORMONES

Barbara WISZNIEWSKA, Mariola MARCHLEWICZ

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Pomorskiej AM Szczecin

**Streszczenie:** Plemniki po opuszczeniu jądra nie są jeszcze w pełni dojrzałe. W najądrzu przechodzą szereg przemian morfologicznych, biochemicznych i funkcjonalnych. Ich efektem jest osiągnięcie przez plemniki zdolności do ruchu postępowego, przeżywania w męskich i żeńskich drogach płciowych, kapacytacji, przeprowadzania reakcji akrosomalnej i zapłodnienia komórki jajowej. Specyficzne środowisko, w którym plemniki dojrzewają i utrzymywane są w żywotności, tworzone jest przez komórki nabłonkowe wyścielające przewód najądrza. Komórki te syntetyzują i uwalniają do światła białka, glikoproteiny, glikolipidy, fosfolipidy, niezbędne na każdym etapie dojrzewania i magazynowania plemników. Procesy sekrecyjne, a także resorpcyjne komórek nabłonkowych regulowane są głównie przez androgeny. Komórki nabłonkowe najądrza szczura wykazują cechy komórek steroidogennych, a w warunkach *in vitro* syntetyzują androgeny, które aromatyzowane są przez te komórki do  $17\beta$ -estradiolu. Komórki nabłonkowe najądrza są źródłem jeszcze innych hormonów, takich jak: proopiomelanokortyna, proenkefalina czy oksytocyna. Dlatego też najądrze rozpatrywać należy również jako obwodowy gruczoł wydzielania wewnętrznego.

**Słowa kluczowe:** komórki nabłonkowe najądrza, hormony, receptory hormonów.

**Summary:** Spermatozoa leaving the testis are immature. They undergo numerous morphological, biochemical and functional changes during passage through the epididymis, where they acquire the ability for progressive motility, survival in male and female tracts, the ability to capacitation, the acrosome reaction and fertilization. The specific microenvironment for sperm maturation and the maintenance of sperm viability is formed by epididymal epithelial cells. The cells synthesize and release into the lumen of epididymis proteins, glycoproteins, glycolipids, phospholipids essential for the maturation and storage of spermatozoa. The secretion and reabsorption in epididymal epithelial cells is androgen-dependent. However, epididymal epithelial cells of rat *in vitro* reveal also intrinsic steroidogenic activity. They synthesize androgens, that are aromatized to  $17\beta$ -estradiol. Additionally, they are the source of proopiomelanocortin, proenkephalin and oxytocin. Therefore, the epididymis should be seen additionally as a peripheral endocrine organ.

**Key words:** epididymal epithelial cells, hormones, hormone receptors.

Po procesie spermiacji, niedojrzałe jeszcze plemniki wraz z płynem kanalikowym, transportowane są do kanalików odprowadzających, które wraz z początkowym odcinkiem przewodu najądrza tworzą głowę tego narządu. Dzięki resorbcyjnym funkcjom komórek nabłonkowych kanalików odprowadzających, ponad 90% płynu kanalikowego ulega reabsorpcji. Aktywne metabolicznie komórki sekrecyjne tego nabłonka sprawiają, że plemniki znajdują się w nowym środowisku, charakterystycznym tylko dla tego odcinka najądrza. Podczas przechodzenia przez najądrze, plemniki eksponowane są na zmieniające się środowisko swoiste dla każdej strefy głowy, trzonu czy ogona. Wytworzenie określonego składu płynu najądrza możliwe jest zarówno dzięki aktywności resorbcyjnej, jak i sekrecyjnej komórek nabłonkowych wyścielających przewód najądrza [24]. Komórki te syntetyzują i uwalniają do światła przewodu białka, glikoproteiny, glikolipidy, fosfolipidy, różne dla poszczególnych stref najądrza, a wykorzystywane przez plemniki na każdym etapie ich dojrzewania czy przeżywania w najądrzu [35]. Procesy te wymagają sekwencyjnej ekspresji szeregu genów komórek nabłonkowych najądrza, a także precyzyjnej jej regulacji [10, 52]. Efektem przebywania plemników w poszczególnych strefach najądrza jest to, że plemniki ludzkie po osiągnięciu trzonu najądrza [2], a zwierzęce początkowego odcinka ogona [13] stają się dojrzałymi gametami, wykazującymi zdolności do ruchu postępowego, przeżywania w męskich i żeńskich drogach płciowych, przeprowadzania kapacytacji i reakcji akrosomalnej, interakcji z osłoną przejrzystą i zapłodnienia komórki jajowej [9]. Właściwości nabyte w procesie najądrzowego dojrzewania plemniki zachowują podczas ich magazynowania w ogonie najądrza [35].

Zarówno morfologia, jak i funkcja komórek nabłonkowych najądrza regulowana jest głównie przez androgeny i czynniki pozaandrogenne syntetyzowane w gonadzie. Wiadomo też, że komórki nabłonkowe najądrza mogą same być źródłem różnych hormonów.

## ANDROGENY

Androgeny dostarczane są do najądrza dwiema drogami. Transportowane są bezpośrednio z jądra wraz z płynem kanalikowym, w kompleksie z białkiem wiążącym androgeny (ABP – *Androgen Binding Protein*), syntetyzowanym przez komórki Sertoliego nabłonka plemnikotwórczego [40]. ABP wiąże testosteron (T) i dihydrotestosteron (DHT), wobec którego wykazuje 2-krotnie wyższe powinowactwo. Kompleks androgen-ABP może być w całości absorbowany ze światła przewodu przez komórki nabłonkowe proksymalnej części najądrza. Po oddysocjowaniu, androgeny uwalniane są w komórkach i przekazywane swoistym receptorom androgenowym (AR).

Drugą pulę androgenów w najądrzu stanowią te dostarczane z krwią, drogą naczyń krwionośnych oplatających przewód najądrza. Transport tych androgenów odbywa się wbrew gradientowi stężeń przez błonę komórkową części podstawnej komórek nabłonkowych. Następnie, drogą dyfuzji przez błonę komórkową części apikalnej



komórek, hormony te dostają się do światła przewodu, gdzie wiążą się z ABP. W płynie najądrza, szczególnie głowy, ABP występuje w dużych stężeniach, zbliżonych do sumy stężeń T i DHT. W największych ilościach androgeny transportowane są przez komórki głowy i trzonu najądrza. W świetle głowy stężenie tych hormonów, głównie DHT, jest około 50 razy wyższe niż stężenie androgenów we krwi naczyń krwionośnych tego odcinka najądrza [56].

Za główny androgen najądrza uważany jest dihydrotestosteron (DHT), który powstaje w komórkach nabłonkowych drogą konwersji T. Proces ten katalizowany jest przez 5 $\alpha$ -reduktazę [39], enzym występujący w dwóch izoformach w komórkach nabłonkowych najądrza. Izoformy te kodowane są przez dwa odrębne geny [50], ekspresja których podlega wieloczynnikowej regulacji, różnej w różnych strefach najądrza [10]. DHT w najądrzu podlegać może dalszemu metabolizowaniu do 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diolu (3 $\alpha$ -diol), a u niektórych gatunków zwierząt też do 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diolu (3 $\beta$ -diol) [30].

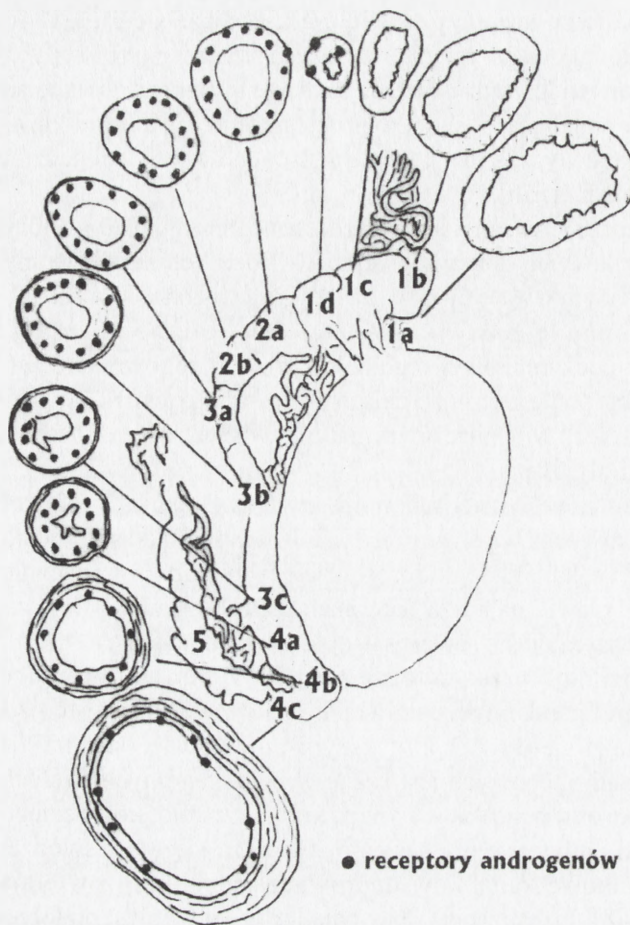
Przy tak dużej ilości androgenów w najądrzu, hormony te występują w różnym stężeniu w komórkach nabłonkowych i w płynie najądrza, w zależności od strefy tego narządu [19]. I tak, stężenie T w kanalikach odprowadzających jądra jest znacznie wyższe niż stężenie DHT. W głowie najądrza natomiast wzrasta stężenie DHT w stosunku do T i ta zależność utrzymuje się również w ogonie najądrza [51].

Androgeny w najądrzu działają przez swoiste wewnątrzjądrowe receptory androgenowe – AR. Głównymi ligandami receptora androgenowego są testosteron i dihydrotestosteron. DHT wiąże się do AR z wyższym powinowactwem niż T. Rozmieszczenie receptorów androgenowych jest różne w poszczególnych strefach najądrza. W najądrzu człowieka ekspresję AR ujawniają komórki nabłonkowe całego przewodu (ryc. 1), przy czym najwyższe ich stężenie stwierdza się w przewodzie trzonu [48]. Komórki nabłonkowe kanalików odprowadzających nie zawierają receptorów androgenowych [48]. Lokalizacja AR w najądrzu zwierząt jest podobna [58]. Badania doświadczalne wskazują, że przy zablokowanym dostępie androgenów do najądrza stężenie AR w komórkach nabłonkowych przewodu najądrza przez długi czas utrzymywane jest na stałym poziomie. Stężenie AR natomiast w komórkach nabłonkowych prostaty i pęcherzyków nasiennych w takim przypadku wyraźnie się obniża [37].

Wyniki badań *in vitro* prowadzonych na komórkach nabłonkowych najądrza szczura wskazują, że dodatkowym źródłem androgenów w najądrzu są same komórki nabłonkowe. Komórki te mają ultrastrukturalne cechy komórek produkujących hormony steroidowe (ryc. 2, 3), a ponadto uwalniają do środowiska hodowlanego androgeny [54].

## ESTROGENY

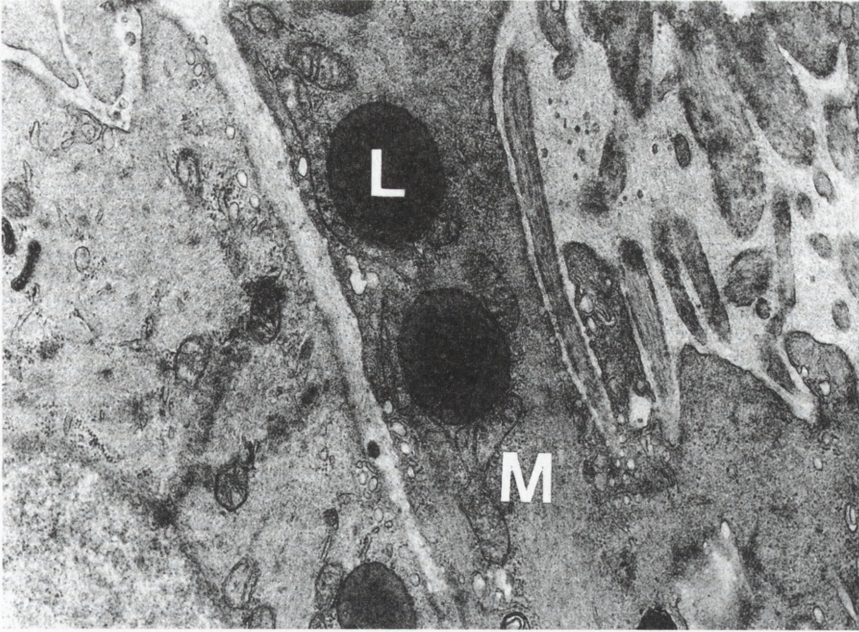
Drugą grupę hormonów działających w najądrzu stanowią estrogeny. Wchodzą do narządu takimi samymi drogami, jak androgeny. Badania prowadzone już w latach osiemdziesiątych ubiegłego stulecia wskazywały na udział estrogenów w syntezie



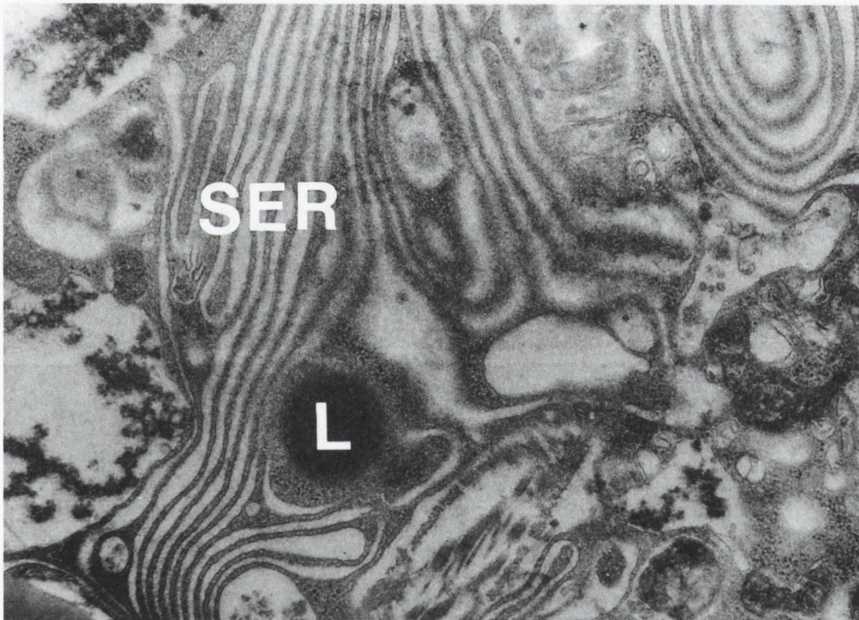
RYCINA 1. Schemat przedstawiający ekspresję receptorów androgenowych w poszczególnych strefach jądra człowieka: 1a-d – kanaliki odprowadzające; 2a-4c – przewód jądra; 5 – nasieniowód, 1a-2b – głowa jądra; 3a-3c – trzon jądra; 4a-4c – ogon jądra [Ergün i wsp. 1997 i Ungefroren i wsp. 1997 – schemat zmieniony]

niektórych białek w komórkach nabłonkowych niedojrzałych i dojrzałych płciowo jądra królików [44, 45] oraz obecność receptorów estrogenowych (ER) w jądrze [12]. W czasie rozwoju embrionalnego myszy, ER pojawiają się jeszcze przed całkowitym zróżnicowaniem jądra. W tym też czasie obecne są w przewodach, różnicujących się w drogi wyprowadzające plemniki [20]. Dopiero odkrycie drugiego typu receptorów estrogenowych nazwanych  $\beta$  (ER $\beta$ ) [29], oprócz tych wcześniej opisywanych, które nazwano receptorami estrogenowymi  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), rzuciło nowe światło na możliwe drogi działania estrogenów w jądrze.

Badania uwzględniające dwa typy receptorów estrogenowych, pozwoliły ustalić, że ich dystrybucja w jądrze jest zróżnicowana [14, 34, 41]. W komórkach



RYCINA 2. Krople lipidowe (L) otoczone mitochondriami z wydłużonymi grzebieniami (M) w cytoplazmie hodowanych komórek nabłonkowych najądrza szczura. TEM x 21300



RYCINA 3. Krople lipidowe (L) i siateczka śródplazmatyczna gładka (SER) w cytoplazmie hodowanych komórek nabłonkowych najądrza szczura. TEM x 22000

nabłonkowych kanalików odprowadzających jądra występują receptory estrogenowe  $\alpha$ , czyli tam gdzie brak jest receptorów androgenowych. W komórkach nabłonkowych przewodu najądrza natomiast występują receptory estrogenowe  $\beta$  (ryc. 4). Estrogiem działającym przez ER $\alpha$  przypisuje się ważną rolę w regulacji funkcji kanalików odprowadzających [27, 31]. Jak wspomniano wcześniej, główną funkcją kanalików odprowadzających jest reabsorpcja płynu napływającego wraz z plemnikami z jądra. Poprzez regulację czynności systemu endocytarnego komórek nieurzęsionych nabłonka, estrogeny regulują ten proces. Badania prowadzone na myszach  $\alpha$ ERKO wspierają tę hipotezę [22, 23]. Rola estrogenów działających poprzez receptory estrogenowe  $\beta$ , ekspresję których ujawniają komórki nabłonkowe przewodu najądrza, nie jest wyjaśniona.

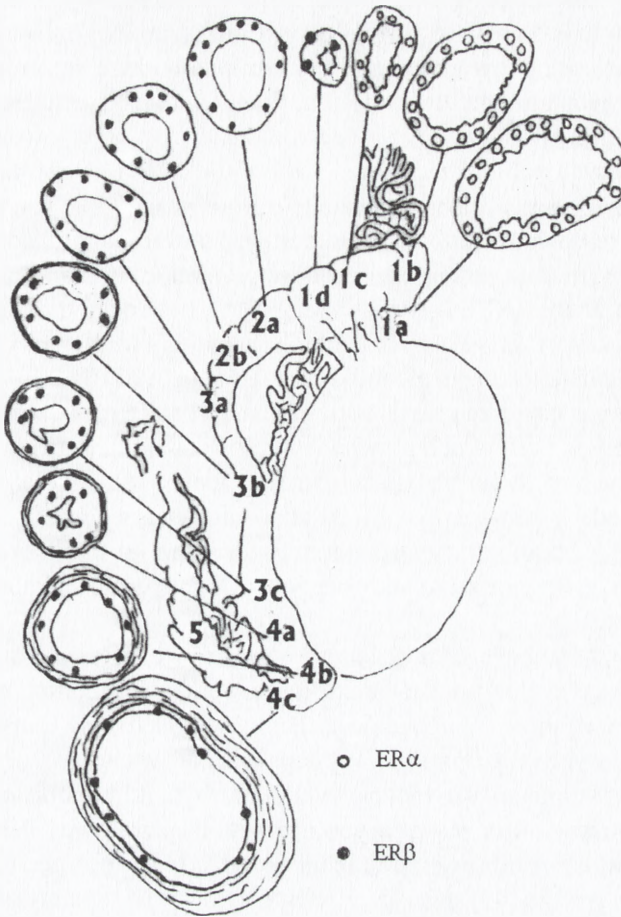
Na to, że estrogeny są niezbędne dla funkcjonowania męskiego układu płciowego wskazuje obecność receptorów estrogenowych w narządach tego układu już podczas rozwoju embrionalnego, ich obecność w komórkach gonady i komórkach nabłonkowych przewodów wyprowadzających plemniki [33, 38, 41] oraz fakt, że lista komórek narządów układu płciowego męskiego, wykazujących aktywność aromatazy cytochromu P450 i syntetyzujących estrogeny, coraz bardziej się wydłuża. Rzeczywiście, estrogeny w męskim układzie płciowym występują w dużych stężeniach. W płynie *rete testis* szczura stężenie estrogenów sięga wartości 249 pg/ml [17], podczas gdy w surowicy krwi tych zwierząt wynosi średnio 60 pg/ml. W nasieniu mężczyzny stężenie estrogenów osiąga wartości 14–162 pg/ml [4], a w surowicy krwi wynosi około 60 pg/ml [11]. Dziś już wiadomo, że w męskim układzie płciowym zdolność do aromatyzacji androgenów i uwalniania estrogenów mają zarówno komórki somatyczne, jak i płciowe gonady [5, 6].

Do niedawna uważano, że na terenie najądrza ludzkiego i zwierząt jedynymi komórkami, mającymi zdolność aromatyzowania androgenów, są przebywające tam plemniki [26]. Jednak, na podstawie badań prowadzonych na hodowlach komórek nabłonkowych najądrza szczura wykazano, że komórki te zawierają w cytoplazmie aktywną aromatazę cytochromu P450, aromatyzują androgeny przez siebie syntetyzowane i uwalniają do środowiska hodowlanego estrogeny w wysokich stężeniach [54, 55]. Zdolność syntezy i uwalniania estrogenów do środowiska mają również hodowane komórki nabłonkowe najądrza mężczyzn [dane niepublikowane].

## INNE HORMONY SYNTETYZOWANE W NAJĄDRZU

W najądrzu wykazano również obecność hormonów, których syntezy się tu nie spodziewano.

Wśród genów obecnych w komórkach nabłonkowych najądrza znajdują się geny kodujące prekursory neuropeptydów. Wykazują one specyficzną ekspresję, zależną od strefy najądrza. Należą do nich gen *pomc* (proopiomelanokortyna), kodujący POMC prekursora  $\beta$ -endorfiny, adrenokortykotropiny (ACTH) i hormonu stymulującego



RYCINA 4. Schemat przedstawiający ekspresję receptorów estrogenowych  $\alpha$  i  $\beta$  (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ) w poszczególnych strefach najądrza człowieka: 1a–d – kanałki odprowadzające; 2a–4c – przewód najądrza; 5 – nasieniowód, 1a–2b – głowa najądrza; 3a–3c – trzon najądrza; 4a–4c – ogon najądrza, (Ergün i wsp. 1997 i Ungefroren i wsp. 1997 – schemat zmieniony)

melanocyty ( $\alpha$ MSH) oraz gen *enk* proenkefaliny, kodujący peptydy opiatowe, metionilo-enkefalinę i leucylo-enkefalinę (met- i leu-enkefalina) [10].

W komórkach nabłonkowych najądrza zwierząt wykazano radioimmunologicznie  $\beta$ -endorfinę i ACTH [46, 47]. Transkrypt genu *pomc*, ulegającego ekspresji w komórkach głowy najądrza, ma długość 0,8 kZ, tak jak mRNA *pomc* w jądrze, jednak jest krótszy od mRNA wykrywanego w komórkach przysadki mózgowej [8]. Przypuszcza się, że neuropeptydy te pełnią para- i/lub autokrynną funkcję wobec komórek nabłonkowych najądrza lub mogą oddziaływać na plemniki przebywające w świetle przewodu. Można też przypuszczać, że  $\beta$ -endorfina, podobnie jak w komórkach Leydiga [7], mogłaby modulować syntezę hormonów steroidowych w najądrzu.

Gen *enk* natomiast, ulega ekspresji w komórkach nabłonkowych na całej długości najądrza. Stopień tej ekspresji jest najwyższy w proksymalnej części głowy [10]. U szczura, segment początkowy najądrza wykazuje najwyższe stężenie mRNA proenkefaliny, w porównaniu z innymi tkankami. Wielkość transkryptu jest taka sama, jak mRNA proenkefaliny w mózgu [18]. Jednak, stężenie syntetyzowanego białka w komórkach głównych nabłonka najądrza stanowi tylko 10% stężenia białka syntetyzowanego w mózgu, podczas gdy stężenie mRNA w najądrzu jest o około 300% wyższe [28]. Przeprowadzone badania sugerują, że ekspresja najądrzowego genu proenkefaliny regulowana jest przez obecność plemników w najądrzu lub czynnik związany z plemnikami [18]. Sugestie te oparte są na stwierdzeniu, że poziom mRNA proenkefaliny w komórkach głównych nabłonka najądrza gwałtownie wzrasta, gdy po pierwszej fali spermatogenicznej plemniki osiągają najądrze [18].

Rola enkefaliny w najądrzu nie jest wyjaśniona, zwłaszcza że peptydy wywodzące się z proenkefaliny w komórkach głównych nabłonka najądrza różnią się od tych w tkance nerwowej. Nie stwierdza się w najądrzu met- i leu-enkefaliny, a peptydy enkefaliny, niebędące pentapeptydami, o znacznie wyższej masie cząsteczkowej wykrywane były w tkance, płynie najądrzowym oraz na plemnikach segmentu inicjalnego najądrza. Przypuszcza się, że peptydy te mogą pełnić unikalną, specyficzną funkcję w najądrzu.

W najądrzu wykazano również obecność hormonów części nerwowej przysadki, chociaż ich miejsce syntezy nadal budzi kontrowersje. Wiadomo, że hormony te syntetyzowane są w jądrze. W gonadzie szczura wykryte zostały transkrypty genów kodujących oksytocynę i wazopresynę. Występują jednak w bardzo małych stężeniach [15]. W najądrzu natomiast, oksytocyna wykrywana była immunohistochemicznie w komórkach kanalików odprowadzających i głowy najądrza owcy. Nie wykrywano jednak neurofizyny, białka przenoszącego oksytocynę. Na tej podstawie Veeramachaneni i Amann [49] sugerują, że oksytocyna nie jest syntetyzowana lokalnie w najądrzu. Pozytywna reakcja immunohistochemiczna w komórkach nabłonkowych najądrza jest więc konsekwencją absorpcji oksytocyny, transportowanej z jądra i znajdującej się w świetle przewodu. U szczura jednak, podwiązanie kanalików odprowadzających czy kastracja nie powodowały braku immunoreaktywnej oksytocyny w najądrzu [21]. Oksytocyna lokalizowana była głównie w komórkach nabłonkowych głowy najądrza, chociaż wykrywana była również w komórkach nabłonkowych ogona najądrza. Dowodzi to lokalnej produkcji oksytocyny, podlegającej kontroli przez androgeny. Jak wykazały badania, komórki nabłonkowe najądrza owcy zawierają receptory oksytocyny [53]. Pomijając klasyczną rolę oksytocyny w kurczliwości ściany najądrza i regulacji przepływu plemników przez przewód, inne fizjologiczne funkcje oksytocyny w najądrzu są nieznanne. W świetle badań dowodzących steroidogennej aktywności komórek nabłonkowych najądrza szczura [54, 55] można przypuszczać, że oksytocyna, tak jak w jądrze mogłaby regulować syntezę testosteronu [16], oprócz już wcześniej stwierdzonej zdolności tego hormonu do stymulacji aktywności  $5\alpha$ -reduktazy w najądrzu.

Aktualnie brak jest danych na temat syntezy wazopresyny w najądrzu.

## RECEPTORY DLA HORMONÓW NIEPRODUKOWANYCH W NAJĄDRZU

W komórkach nabłonkowych najądrza daniela, immunocytochemicznie oraz hybrydyzacją *in situ*, wykazano ekspresję receptora prolaktyny [25]. Stężenie RNA receptora prolaktyny w najądrzu znacznie przewyższyło jego stężenie w jądrze. Rola prolaktyny w najądrzu nie jest w pełni wyjaśniona. Uważa się, że uczestniczy w utrzymywaniu właściwej masy najądrza, reguluje transport płynu [3], a także stymuluje mitozę oraz regenerację komórek nabłonka najądrza. Można przypuszczać, że prolaktyna reguluje też syntezę hormonów steroidowych w komórkach nabłonkowych szczura.

W komórkach nabłonkowych najądrza szczura wykazano ponadto receptory melatoniny, co sugeruje bezpośrednią regulację funkcji najądrza przez ten hormon. Ekspresja receptorów melatoniny ograniczona jest do komórek nabłonkowych trzonu najądrza [36]. Wykazano, że melatonina stymuluje proliferację komórek nabłonkowych w warunkach *in vitro*, a proces ten zależny jest od czasu ekspozycji komórek na ten hormon oraz od stężenia androgenów w medium [32]. Badania molekularne pozwoliły ustalić, że melatonina działa poprzez receptory błonowe, a jej efekt stymulujący proliferację komórek nabłonkowych trzonu najądrza, związany jest z hamowaniem aktywności cAMP [43].

Badania ostatnich lat zogniskowane są na ustaleniu, czy komórki nabłonkowe najądrza wykazują ekspresję receptora hormonu luteinizującego (LH-R). Aktualnie ustalono, że w komórkach niedojrzałych oraz dojrzałych płciowo małych występuje mRNA receptorów LH [57]. Obecność receptorów LH w najądrzu niedojrzałych zwierząt wskazuje na udział tego hormonu w rozwoju i wzroście najądrza. Podanie hCG niedojrzałym małym powoduje gwałtowny wzrost najądrzy [42]. U osobników dojrzałych hormon luteinizujący mógłby być włączony w koordynację procesów dojrzewania plemników [1, 57]. Wykazano ponadto, że komórki główne nabłonka wszystkich odcinków najądrza myszy mają zdolność wiązania LH pochodzenia zarówno endogennego, jak i egzogenego [1]. Można zatem założyć, że synteza androgenów oraz 17 $\beta$ -estradiolu w komórkach nabłonkowych najądrza szczura mogłaby podlegać regulacji przez tę gonadotropinę.

## PODSUMOWANIE

Najądrze człowieka i zwierząt odgrywa ważną funkcję w dojrzewaniu plemników przez wytworzenie mikrośrodowiska o unikalnym składzie w każdej strefie narządu. Wymaga to precyzyjnej kontroli ekspresji poszczególnych genów i syntezy białek, w określonej kolejności i właściwej strefie najądrza. Funkcję regulacyjną przypisuje się głównie androgenom i innym czynnikom syntetyzowanym na terenie jądra. Przy rozpatrywaniu funkcji najądrza pomija się jednak jego funkcję endokrynną i wpływ hormonów lokalnie syntetyzowanych na procesy toczące się w najądrzu. Najądrze

należałoby więc rozpatrywać nie tylko jako narząd, w którym dojrzewają i magazynowane są plemniki, ale również jako gruczoł wydzielania wewnętrznego, którego funkcja podlega kontroli nadrzędnej.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ADAMS CS, BRUMLOW WB. Immunocytochemical detection of luteinizing hormone in epididymis of mature mouse. *Histochemistry* 1989; **91**: 495–499.
- [2] BEDFORDT JM. The status and the state of the human epididymis. *Hum Reprod Update* 1994; **9**: 2187–2199.
- [3] BRUMLOW WM, ADAMS CS. Immunocytochemical detection of prolactin or prolactin-like immunoreactivity in epididymis of mature male mouse. *Histochemistry* 1990; **93**: 299–304.
- [4] BUJAN L, MIEUSSET R, AUDRAN F, LUMBROSO S, SULTAN C. Increased oestradiol level in seminal plasma in infertile men. *Hum Reprod* 1993; **8**: 74–77.
- [5] CARREAU S, GENISSEL C, BILINSKA B, LEVALLET J. Source of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Intern J Androl* 1999; **22**: 211–223.
- [6] CARREAU S. Germ cells: a new source of estrogen in the male gonad. *Molec Cell Endocrinol* 2001; **178**: 65–72.
- [7] CHANDRASHEKAR V, BARTKE A. The influence of  $\beta$ -endorphin on testicular endocrine function in adult rats. *Biol Reprod* 1992; **47**: 1–5.
- [8] CHEN C-L, MATHER JP, MORRIS PL, BARDIN CW. Expression of pro-opiomelanocortin-like gene in the testis and epididymis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **82**: 5672–5675.
- [9] COHEN DJ, ELLERMAN DA, CUASNICÚ PS. Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. *Biol Reprod* 2000; **63**: 462–468.
- [10] CORNWALL GA, HANN SR. Specialized gene expression in the epididymis. *J Androl* 1995; **16**: 379–383.
- [11] CUNNINGHAM GR, LIPSCHULTZ LJ. Diseases of the testes and male sex organs. [w] Kohler PO [red.] Clinical endocrinology. John Wiley & Sons Inc, New York 1986: 263–301.
- [12] DANZO BJ, ELLER BC, HENDRY WJ. Identification of cytoplasmic estrogen receptors in the accessory sex organs of the rabbit and their comparison to the cytoplasmic estrogen receptor in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol* 1983; **33**: 197–209.
- [13] DYSON AL, ORGEBIN-CRIST MC. Effect of hypophysectomy and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Endocrinology* 1973; **93**: 391–402.
- [14] ERGÜN S, UNGEFROREN H, HOLSTEIN AF, DAVIDOFF MS. Estrogen and progesterone receptors and estrogen receptor-related antigen (ER-D5) in human epididymis. *Molec Reprod Develop* 1997; **47**: 448–455.
- [15] FOO N-C, CARTER D, MURPHY D, IVELL R. Vasopressin and oxytocin gene expression in rat testis. *Endocrinology* 1991; **128**: 2118–2128.
- [16] FRAYNE J, NICHOLSON HD. The effect of oxytocin on testosterone production by isolated rat Leydig cells is mediated via specific oxytocin receptor. *Biol Reprod* 1995; **52**: 1268–1273.
- [17] FREE MJ, JAFFE RA. Collection of rete testis fluid from rats without previous efferent duct ligation. *Biol Reprod* 1979; **20**: 269–278.
- [18] GARRETT JE, GARRETT SH, DOUGLASS J. A spermatozoa-associated factor regulates proenkephalin gene expression in the rat epididymis. *Molec Endocrinol* 1990; **4**: 108–118.
- [19] GOYAL HO, WILLIAMS CS, KHALIL MK, VIG MM, MALONEY MA. Postnatal differentiation of the ductus deferens, tail of epididymis, and distal body of the epididymis in goats occurs independently of rete testis fluid. *Anat Record* 1999; **254**: 508–520.
- [20] GRECO TL, FURLOW D, DUELLO TM, GORSKI J. Immunodetection of estrogen receptors in fetal and neonatal male mouse reproductive tracts. *Endocrinology* 1992; **130**: 421–429.



- [21] HARRIS GC, FRAYNE J, NICHOLSON HD. Epididymal oxytocin in the rat; its origin and regulation. *Intern J Androl* 1996; **19**: 278–286.
- [22] HESS RA, BUNICK D, BAHR J. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract – a review. *Molec Cell Endocrinol* 2001; **178**: 29–38.
- [23] HESS RA, ZHOU Q, NIE R, OLIVEIRA C, CHO H, NAKAI M, CARNES K. Estrogens and epididymal function. *Reprod Fertil Dev* 2001; **13**: 273–283.
- [24] HINTON BT, PALLADINO MA. Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid environment. *Microsc Res Tech* 1995; **30**: 67–81.
- [25] JABBOUR HN, CLARKE LA, MCNEILLY AS, EDERY M, KELLY PA. Is prolactin a gonadotrophic hormone in red deer (*Cervus elaphus*)? Pattern of expression of the prolactin receptor gene in the testis and epididymis. *J Molec Endocrinol* 1998; **20**: 175–182.
- [26] JANULIS L, HESS RA, BUNICK D, NITTA H, JANSSEN S, ASAWA Y, BAHR JM. Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase which decreases as sperm traverse the epididymis. *J Androl* 1996; **17**: 111–116.
- [27] JONES MEE. Oestrogens in male reproduction. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 2000; **14**: 505–516.
- [28] KEW D, JIN DF, KIM F, LADDIS T, KILPATRICK DL. Translation status of proenkephalin mRNA in the rat reproductive system. *Molec Endocrinol* 1989; **3**: 1191–1196.
- [29] KUIPER GGJM, ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, NILSSON S, GUSTAFSSON JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 5925–5930.
- [30] LARMINAT MA, HINRICHE M, SCORTICATI C, GHIRLANDA JM, BLAQUIER JA, CALANDRA RS. Uptake and metabolism of androgen by the human epididymis *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1980; **59**: 397–402.
- [31] LEE K-H, HESS RA, BAHR JM, LUBAHN DB, TAYLOR J, BUNICK D. Estrogen receptor  $\alpha$  has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules. *Biol Reprod* 2000; **63**: 1873–1880.
- [32] LI L, WONG JTY, PANG SF, SHIU SYW. Melatonin-induced stimulation of rat corpus epididymal epithelial cell proliferation. *Life Sci* 1999; **65**: 1967–1976.
- [33] MAHATO D, GOULDING EH, KORACH KS, EDDY EM. Estrogen receptor- $\alpha$  is required by the supporting somatic cells for spermatogenesis. *Molec Cell Endocrinol* 2001; **178**: 57–63.
- [34] MANSOUR MM, MACHEN MR, TARLETON BJ, WILEY AA, WOWER J, BARTOL FF, GOYAL HO. Expression and molecular characterization of estrogen receptor alpha messenger RNA in male reproductive organs of adult goats. *Biol Reprod* 2001; **64**: 1432–1438.
- [35] MOORE HD. Contribution of epididymal factors to sperm maturation and storage. *Andrologia* 1998; **30**: 233–239.
- [36] PANG SF, LI L, AYRE EA, PANG CS, LEE PP, XU RK, CHOW PH, YU ZH, SHIU SY. Neuroendocrinology of melatonin in reproduction: recent developments. *J Chem Neuroanat* 1998; **14**: 157–166.
- [37] PARIS F, WEINBAUER GF, BLUM V, NIESCHLAG E. The effect of androgens on the immunohistochemical localization of the androgen receptor in accessory reproductive organs of male rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994; **48**: 129–137.
- [38] PELLETIER G, LABRIE C, LABRIE F. Localization of oestrogen receptor  $\alpha$ , oestrogen receptor  $\beta$  and androgen receptor in the rat reproductive organs. *J Endocrinol* 2000; **165**: 359–370.
- [39] RITTMASER RS.  $5\alpha$ -reductase inhibitors. *J Androl* 1997; **18**: 582–587.
- [40] ROBAIRE B, VIGER R. Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol Reprod* 1995; **52**: 226–236.
- [41] SAUNDERS PTK, SHARPE RM, WILLIAMS K, MACPHERSON S, URQUART H, IRVINE DS, MILLAR MR. Differential expression of oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Molec Hum Reprod* 2001; **7**: 227–236.

- [42] SCHLATT S, ARSLAN M. Endocrine control of testicular somatic and premeiotic germ cell development in the immature testis of the primate *Macaca mulatta*. *Eur J Endocrinol* 1995; **133**: 235–247.
- [43] SHIU SY, LI L, SIU SW, XI SC, FONG SW, PANG SF. Biological basis and possible physiological implications of melatonin receptor-mediated signaling in the rat epididymis. *Biol Signals Recept* 2000; **9**: 172–187.
- [44] TONEY TW, DANZO BJ. Androgen and estrogen effects on protein synthesis by the adult rabbit epididymis. *Endocrinology* 1989; **125**: 243–249.
- [45] TONEY TW, DANZO BJ. Estrogen and androgen regulation of protein synthesis by the immature rabbit epididymis. *Endocrinology* 1989; **125**: 231–242.
- [46] TSONG S-D, PHILIPS DM, HALMI N, KRIEGER D, BARDIN CW.  $\beta$ -endorphin is present in the male reproductive tract of five species. *Biol Reprod* 1982; **27**: 755–764.
- [47] TSONG S-D, PHILIPS DM, HALMI N, LIOTTA AS, MAGIORIS A, BARDIN CW, KRIEGER DT. ACTH and  $\beta$ -endorphin-related peptides are present in multiple sites in the reproductive tract of the male rat. *Endocrinology* 1982; **110**: 2204–2206.
- [48] UNGERFROREN H, IVELL R, ERGÜN S. Region-specific expression of the androgen receptor in the human epididymis. *Molec Hum Reprod* 1997; **3**: 933–940.
- [49] VEERAMACHANENI DNR, AMANN RP. Oxytocin in the ovine ductuli efferentes and caput epididymidis: immunolocalization and endocytosis from the luminal fluid. *Endocrinology* 1990; **126**: 1156–1164.
- [50] VIGER RS, ROBAIRE B. The mRNAs for the steroid  $5\alpha$ -reductase isozymes, types 1 and 2, are differentially regulated in the rat epididymis. *J Androl* 1996; **17**: 27–34.
- [51] VREEBURG JTM. Distribution of testosterone and  $5\alpha$ -dihydrotestosterone in rat epididymis and their concentrations in efferent duct fluid. *J Endocrinol* 1975; **67**: 203–210.
- [52] WENDA-RÓŻEWICKA L. Mechanizmy regulujące dojrzewanie plemników w najądrzu. *Post Biol Kom* 1999; **26 Supl. 1**: 173–180.
- [53] WHITTINGTON K, ASSINDER SJ, PARKINSON T, LAPWOOD KR, NICHOLSON HD. Function and localization of oxytocin receptors in the reproductive tissue of rams. *Reproduction* 2001; **122**: 317–325.
- [54] WISZNIEWSKA B. Steroidogenic characteristics of *in vitro* cultured epididymal epithelial cells of the rat. *Reprod Biol* 2001; **1**: 60–66.
- [55] WISZNIEWSKA B. Primary culture of the rat epididymal epithelial cells as a source of oestrogen. *Andrologia* 2002; **34**: 180–187.
- [56] YAMAMOTO M, TURNER TT. Transepithelial movement of non-polar compounds in male reproductive tubule examined by *in vivo* microperfusion and *in vivo* micropuncture. *J Urol* 1990; **143**: 399–853–856.
- [57] ZHANG T, GUO CX, HU ZY, LIU YX. Localization of plasminogen activator and inhibitor, LH and androgen receptors and inhibin subunits in monkey epididymis. *Mol Hum Reprod* 1997; **3**: 945–952.
- [58] ZHU L-J, HARDT MP, INIGO IV, HUHTANIEMI I, BARDIN CW, MOO-YOUNG AJ. Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Reprod* 2000; **63**: 368–376.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 20.10. 2002 r.

Przyjęto: 24.11. 2002 r.

Adres autora: Ul. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin

e-mail: [barbwisz@sci.pam.szczecin.pl](mailto:barbwisz@sci.pam.szczecin.pl)

## ZASTOSOWANIE CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ DO OCENY KONDENSACJI I INTEGRALNOŚCI DNA PLEMNIKÓW LUDZKICH

APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY TO EVALUATE  
OF HUMAN SPERM DNA CONDENSATION AND INTEGRITY

Małgorzata PIASECKA

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Pomorskiej AM, Szczecin

**Streszczenie:** Wiele przypadków męskiej nieplodności ma podłoże genetyczne i molekularne prowadzące do morfologicznych i funkcjonalnych zaburzeń plemników. Rozwój i zastosowanie technik wspomagane go rozrodu, szczególnie ICSI – *Intracytoplasmic Sperm Injection*, stwarza ryzyko wprowadzenia do komórki jajowej plemnika z nieprawidłowym DNA (np. z zaburzoną kondensacją i nacięciami). Może to być przyczyną braku koncepcji lub wczesnych poronień. W artykule opisano dwa testy (*Sperm Chromatin Structure* i *TUNEL Assay*), w których wykorzystuje się cytometrię przepływową do wczesnej detekcji zaburzeń kondensacji i integralności DNA w dużej liczbie plemników. Testy te mają istotne znaczenie prognostyczne dla zapłodnienia *in vivo* i *in vitro*.

**Słowa kluczowe:** plemniki, kondensacja DNA, nacięcia DNA, cytometria przepływowa, apoptoza, ultrastruktura.

**Summary:** Many cases of male infertility are of genetic and molecular nature which may lead to morphological and functional disorders of spermatozoa. Both the development and application of Assisted Reproductive Techniques, particularly Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI), may produce a risk of injecting a spermatozoon with damaged DNA (e.g. abnormal condensation and strand breaks) into ovum which in turn may threaten conception or contribute to an early abortion. The present review provides an overview of two assays (*Sperm Chromatin Structure* and *TUNEL Assay*) in which flow cytometry is applied to detect early condensation and integrity abnormalities of DNA in large number of spermatozoa. These assays are of considerable predictive value for *in vivo* and *in vitro* fertilization.

**Key words:** spermatozoa, DNA condensation, DNA strand breaks, flow cytometry, apoptosis, ultrastruktura.

**Stosowane skróty:** **SCSA** – sperm chromatin structure assay; **TUNEL** – terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling; **ICSI** – intracytoplasmic sperm injection; **FITC** (*fluorescein isothiocyanate*) – fluoresceina; **TdT** – terminalna deoksynukleotydylo transferaza.

## LICZNE MORFOLOGICZNO-FUNKCJONALNE ZABURZENIA PLEMNIKÓW WYMAGAJĄ DODATKOWYCH METOD BADAWCZYCH

Niepłodność małżeńska prawie w 50% przypadków dotyczy niepłodności męskiej. Z licznych doniesień wynika, że gonada mężczyzn produkuje plemniki w wielu przypadkach z morfologiczno-funkcjonalnymi zaburzeniami często mającymi podłoże genetyczne i molekularne, prowadzącymi do braku uzyskania koncepcji lub też do poronień [10,16, 29,31,37,56].

Różnorodność molekularnych uszkodzeń plemników, które nie mogą być wykrywane konwencjonalnymi metodami stosowanymi w rutynowej analizie nasienia, a które mogą występować w idiopatycznej niepłodności, skłania do wprowadzenia dodatkowych i komplementarnych metod badawczych plemników, pozwalających na precyzyjną i wręcz indywidualną ocenę komórek rozrodczych. Wnikliwa molekularna diagnostyka pomaga lepiej ujawnić i wyjaśnić patofizjologię plemnika prowadzącą do niepłodności. Z drugiej strony prawidłowe parametry plemników, stwierdzone w konwencjonalnej ocenie komórek rozrodczych, nie wykluczają istnienia w ejakulacie subpopulacji plemników o upośledzonej zdolności do zapłodnienia czy też wręcz jej pozbawionej, tym bardziej że populacja plemników wykazuje dużą heterogenność.

Precyzyjna ocena plemników staje się niezbędna, zwłaszcza przy wyborze i zastosowaniu technik wspomaganego rozrodu, gdzie w przypadku azoospermii wykorzystuje się komórki nawet aspirowane bezpośrednio z jądra [7,54]. Taka wnikliwa ocena pozwala przewidzieć szansę na uzyskanie koncepcji lub też częściowo uniknąć przenoszenia do komórki jajowej zmian genetycznych. W wielu przypadkach, gdy liczba plemników i ich jakość nie jest wystarczająca do fizjologicznego zapłodnienia komórki jajowej, techniki wspomaganego rozrodu są w zasadzie jedyną szansą na uzyskanie potomstwa. Nie można w takiej sytuacji zapomnieć o jak najpełniejszej diagnostyce plemników.

## CYTOMETRIA PRZEPLYWOWA W OCENIE KONDESACJI I INTEGRALNOŚCI DNA PLEMNIKÓW

Cytometria przepływowa umożliwia badanie komórek w przepływie wcześniej barwionych określonym fluorochromem, jest w ostatnich latach często używana do oceny plemników ludzkich i zwierzęcych [5,20,27,28,43]. Na podstawie odbitego i rozproszonego światła laserowego pozwala na ustalenie różnych subpopulacji komórek w zależności od ich wielkości (FSC – *forward scatter*) i zawarty w nich ziarnistości (SCC – *side scatter*) [38]. Metodą cytometrii można ilościowo mierzyć wiązanie się różnych sond fluorescencyjnych do określonych struktur komórkowych. Wartość i rodzaj fluorescencji, w zależności od użytego fluorochromu, może być miarą prawidłowości lub też wyrazem patologicznych procesów zaistniałych w komórce.

Zastosowanie metody zapłodnienia pozaustrojowego – ICSI (*Intracytoplasmic Sperm Injection*) umożliwia połączenie się nieprawidłowego plemnika z komórką jajową. W takich przypadkach decydujące znaczenie ma zbadanie, czy chromatyna jest prawidłowo skondensowana i nie jest fragmentowana, gdyż tylko dojrzała i nieuszkodzona chromatyna może podlegać dekonduacji w cytoplazmie komórki jajowej. To dalej prowadzi do wytworzenia się przedjądra męskiego i połączenia materiału genetycznego obu gamet. Identyfikacja zaburzeń kondensacji i integralności DNA w dużej liczbie plemników i w ciągu krótkiego czasu możliwa jest dzięki zastosowaniu cytometrii przepływowej (10000 obiektów/3–4 min/próba badana), która jest metodą czułą i precyzyjną, umożliwiającą uzyskanie obiektywnej oceny. Sprawia to, że staje się niezbędna w ocenie nasienia pacjentów, wykraczającej poza rutynowe badanie.

### Analiza kondensacji DNA chromatyny plemników – SCSA

Test SCSA (*sperm chromatin structure assay*) po raz pierwszy został opisany w 1980 roku przez Evenson i wsp. [18]. Obecnie znalazł szerokie zastosowanie w jakościowej ocenie DNA plemników ludzkich [19,22,41,58] i zwierzęcych [20,43]. Wykorzystując metachromatyczne właściwości oranżu akrydyny można monitorować podatność chromatynowego DNA na denaturację *in situ* wywołaną wysoką temperaturą lub niskim pH [13,26,41,59]. Kwaśne środowisko powoduje częściowe rozwinięcie podwójnej helisy DNA przede wszystkim w chromatynie o zmienionej strukturze, nieprawidłowo skondensowanej. Efektem denaturacji jest pojawienie się odcinków jednoniciowego DNA, które można identyfikować za pomocą oranżu akrydyny. Plemniki zawierające chromatynę zwartą, prawidłowo skondensowaną są odporne na denaturację i w zasadzie nie obserwuje się w takich komórkach dużej obecności zdenaturowanego DNA w postaci pojedynczych nici DNA. Oranż akrydyny ma zdolność interkalacji do DNA. Wiążąc się z pojedynczą nicią DNA emituje on czerwone światło fluorescencji, natomiast wbudowywanie fluorochromu do podwójnej helisy DNA powoduje emisję zielonej fluorescencji. Detekcja i analiza obu fluorescencji w cytometrze przepływowym pozwala na wykrycie zaburzeń kondensacji DNA. Wartość stosunku czerwonej fluorescencji do całkowitej fluorescencji (czerwona fluorescencja+zielona fluorescencja) ( $\alpha_p$ ) odzwierciedla podatność DNA na denaturację, jej rozmiar i stopień upakowania DNA [9]. Umożliwia to wykrycie molekularnych zmian chromatyny, które mogą być przyczyną obniżonej zdolności plemników do zapłodnienia.

### Analiza nacięć DNA chromatyny plemników – metoda TUNEL

Metoda TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling*) polega na dołączeniu do wolnego końca 3' OH łańcucha DNA substratu znakowanego fluoresceiną (dUTP-FITC) emitującą zielone światło (metoda bezpośrednia, z wykorzystaniem *APO-Direct Kit*). Inkorporacja tego substratu katalizowana jest przez terminalną deoksynukleotydylo transferazę (TdT). W metodzie pośredniej stosuje się monoklonalne przeciwciało znakowane FITC (antiBrdU-FITC

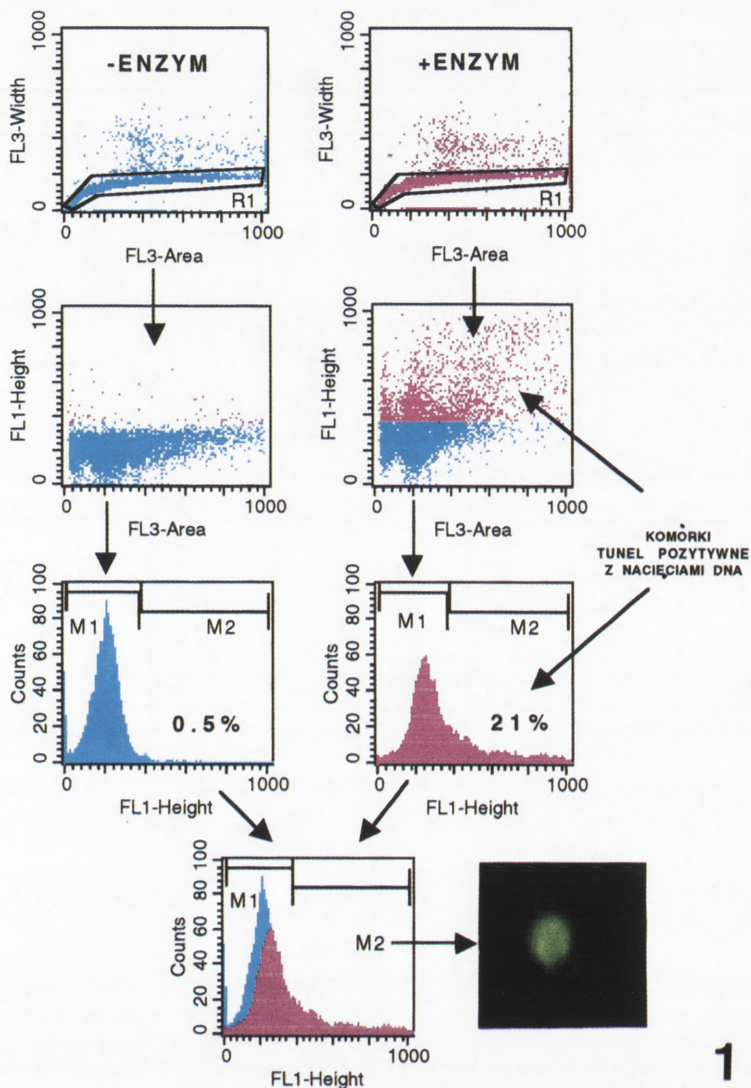
mAb), skierowane przeciwko wbudowywanemu substratowi (Br-dUTP, odpowiednik tymidyny). Zastosowanie FITC pozwala na detekcję nacięć DNA w chromatynie badanej populacji komórek. Morfologiczny obraz fluorescencji odpowiadający nacięciom DNA można obserwować w mikroskopie fluorescencyjnym (ryc.1). Umożliwia to nie tylko ocenić dystrybucję fluorescencji – nacięć w obrębie jądra komórki, ale i przekonać się o specyficzności wiązania użytej sondy fluorescencyjnej. Fluorescencja nie powinna występować, w przypadku plemników, poza ich główką (ryc.1) i nie powinna mieć miejsca w przypadku kontroli negatywnej – reakcji wykonanej bez dodatku enzymu. Na podstawie ilościowych pomiarów fluorescencji, za pomocą cytometru przepływowego, można ocenić odsetek komórek TUNEL-negatywnych – niezawierających nacięć DNA (komórki wykazują jedynie autofluorescencję) oraz odsetek komórek TUNEL-pozytywnych zawierających pęknięcia DNA (komórki wykazują wartości fluorescencji większe niż wartość autofluorescencji) (ryc.1,2).

## ZABURZENIA KONDENSACJI I INTEGRALNOŚCI CHROMATYNY ZMNIEJSZAJĄ SZANSĘ ZAPŁODNIENIA PLEMNIKÓW

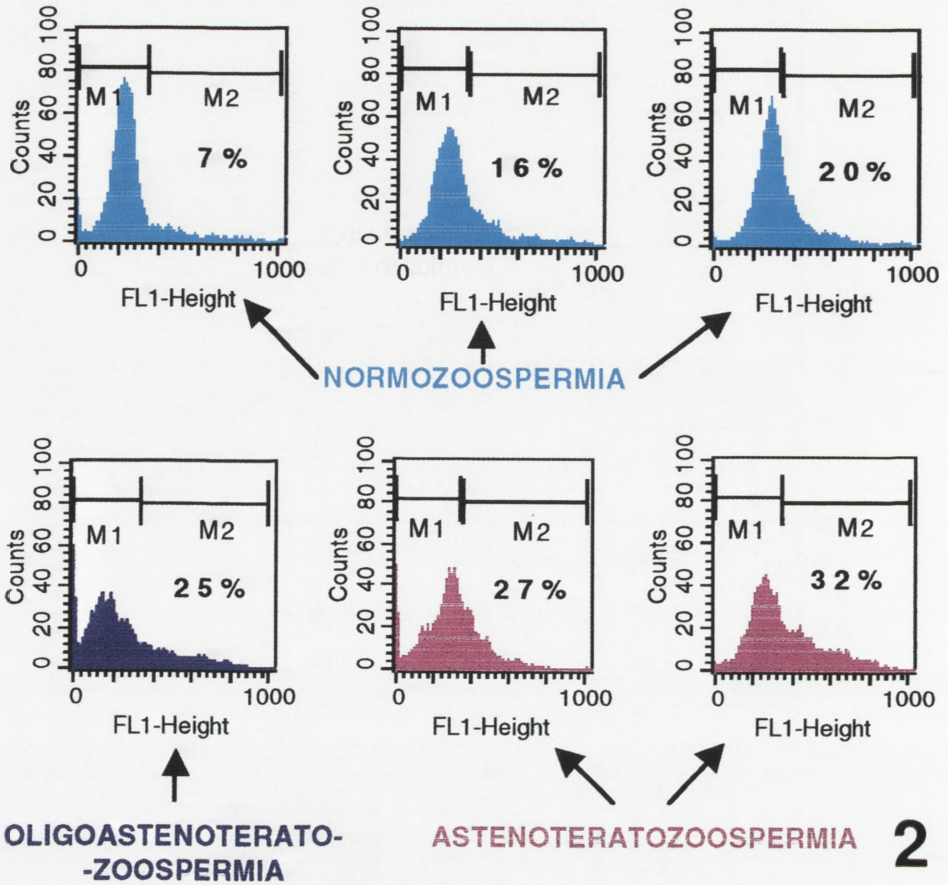
Dopuszczalny odsetek plemników z zaburzeniami kondensacji chromatyny

Spano i wsp. [59] wykazali, że wzrost odsetka plemników z zaburzeniami kondensacji chromatyny powyżej 20% zmniejsza szansę na uzyskanie ciąży, a wzrost powyżej 40% jest przyczyną braku uzyskania koncepcji *in vivo*. Natomiast Evenson i wsp. [19] podają, że już 30% ejakulowanych plemników mających nieprawidłową chromatynę, identyfikowaną za pomocą SCSA, powoduje niepłodność. Dopuszczalny odsetek plemników z nieprawidłowo skondensowaną chromatyną u mężczyzn płodnych, według tych samych autorów, wynosi 15%. Został on ustalony na podstawie analizy statystycznej u 85% płodnych badanych pacjentów. Podobnie, Larson i wsp. [41] proponują 15% plemników z uszkodzonym DNA jako górną granicę odsetka u płodnych mężczyzn.

Plemniki z zaburzeniami kondensacji chromatyny w badaniach klinicznych, pomimo prawidłowej morfologii i prawidłowego ruchu, mają obniżoną zdolność do zapłodnienia zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [19,40]. Ponadto nieprawidłowo skondensowana chromatyna plemnika zmniejsza szansę nie tylko na zapłodnienie, ale i na dalsze prawidłowe podziały zapłodnionej już komórki jajowej [13,22,55]. Tłumaczy to brak uzyskania koncepcji czy też spontaniczne poronienia przy prawidłowych parametrach plemników (zapłodnienie *in vivo*) lub gdy stosuje się metodę zapłodnienia pozaustrojowego – ICSI (*Intracytoplasmic Sperm Injection*), wprowadzając do komórki wyselekcjonowany plemnik. Z drugiej strony ICSI umożliwia połączenie się morfologicznie nieprawidłowego plemnika i/lub nieruchliwego z komórką jajową. W takich przypadkach szansa na uzyskanie koncepcji i ciąży zależy między innymi od jakości DNA plemnika, co wykazali Larson i wsp. [41] stosując ICSI u pacjentów z globozoospermia.



RYCINA 1. Analiza odsetka ejakulowanych, ludzkich plemników z reakcją TUNEL, w cytometrze przepływowym (FACSCalibur cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA); oceniano plemniki z bramki R - zaznaczonej na cytogramie FL3A/FL3W; plemniki TUNEL- negatywne – oznaczone kolorem niebieskim – zlokalizowane są w dolnej bramce na cytogramie FL3A/FL1, natomiast na histogramie występują w obrębie markera M1 tworząc pik dla komórek wykazujących jedynie autofluorescencję; plemniki TUNEL- pozytywne – oznaczone kolorem czerwonym – zlokalizowane są w górnej bramce na cytogramie FL3A/FL1, natomiast na histogramie występują w obrębie markera M2; ustawienie bramek na cytogramie FL3A/FL1 i ustawienie markerów na histogramach zostało ustalone na podstawie wyniku kontroli negatywnej (reakcja wykonana bez dodatku enzymu – TdT); reakcję TUNEL przeprowadzono wykorzystując APO-BRDU Kit (BioSource International, Inc.); do wykresu dołączono obraz mikroskopowo-fluorescencyjny plemnika (x 2600) z pozytywną reakcją TUNEL, wykazującego zieloną fluorescencję w obrębie główki; obserwacje przeprowadzono w mikroskopie fluorescencyjnym Axioskop, Carl Zeiss, Jena GmbH, Germany; FL3 – numery kanałów dla czerwonej fluorescencji plemników barwionych jodkiem propidyny – PI; FL1 – numery kanałów dla zielonej fluorescencji plemników traktowanych przeciwciałem, znakowanym fluoresceiną, skierowanym przeciwko substratowi Br dUTP (FITC- antiBrdU mAb)



RYCINA 2. Porównawcza cytometryczna analiza odsetka plemników TUNEL pozytywnych na podstawie histogramów dla FL1 u pacjentów z prawidłowymi parametrami plemników (normozoospermia), z zaburzeniami koncentracji, ruchu i morfologii plemników (oligoasthenoteratozoospermia) i z zaburzeniami ruchu i morfologii plemników (asthenoteratozoospermia); analiza została przeprowadzona zgodnie z zasadami podanymi przy ryc. 1; pacjenci z normozoospermia wykazują zróżnicowanie w odsetku plemników z nacięciami DNA; koncentrację i ruch plemników ustalono na podstawie standardowych kryteriów podanych przez WHO [61], natomiast ich morfologię oceniano wg ścisłych kryteriów Kruger i wsp. [38]

### Nacięcia DNA plemnika a jego morfologiczno-funkcjonalne parametry

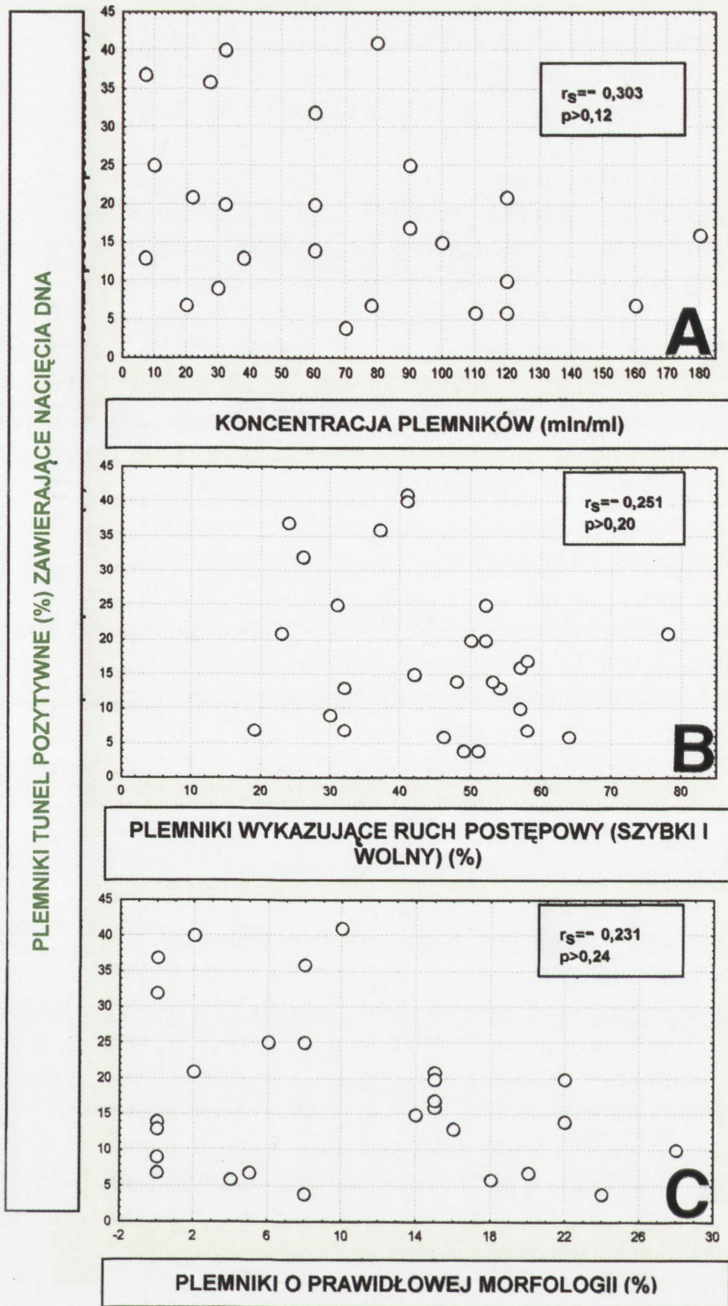
Nacięcia DNA mogą towarzyszyć morfologiczno-funkcjonalnym zmianom plemników. Niektórzy autorzy [4,14,24,32,36,46,50,51,65] wykazali istotne statystycznie korelacje między odsetkiem plemników z nacięciami DNA a ich koncentracją, odsetkiem plemników z ruchem postępowym lub odsetkiem plemników o prawidłowej lub nieprawidłowej morfologii. Wyniki cytowanych autorów wskazują, że plemniki o nieprawidłowej budowie i /lub z zaburzeniami ruchu również mogą zawierać nacięcia DNA. W subpopulacji wyselekcjonowanych ruchliwych plemników należy spodziewać



się mniejszej ilości plemników z nacięciami DNA [4,12,24,51,53,54]. Ponadto w niektórych przypadkach zmniejszonej koncentracji plemników można oczekiwać wzrostu ilości komórek z uszkodzonym DNA [32,33,51]. Takie silne zależności zaobserwowali Gandini i wsp. [24] w przypadku oligoastenoteratozoospermii, nowotworów jąder i w chorobie Hodgkina. Integralność DNA plemnika może być ściśle związana z jakością nasienia.

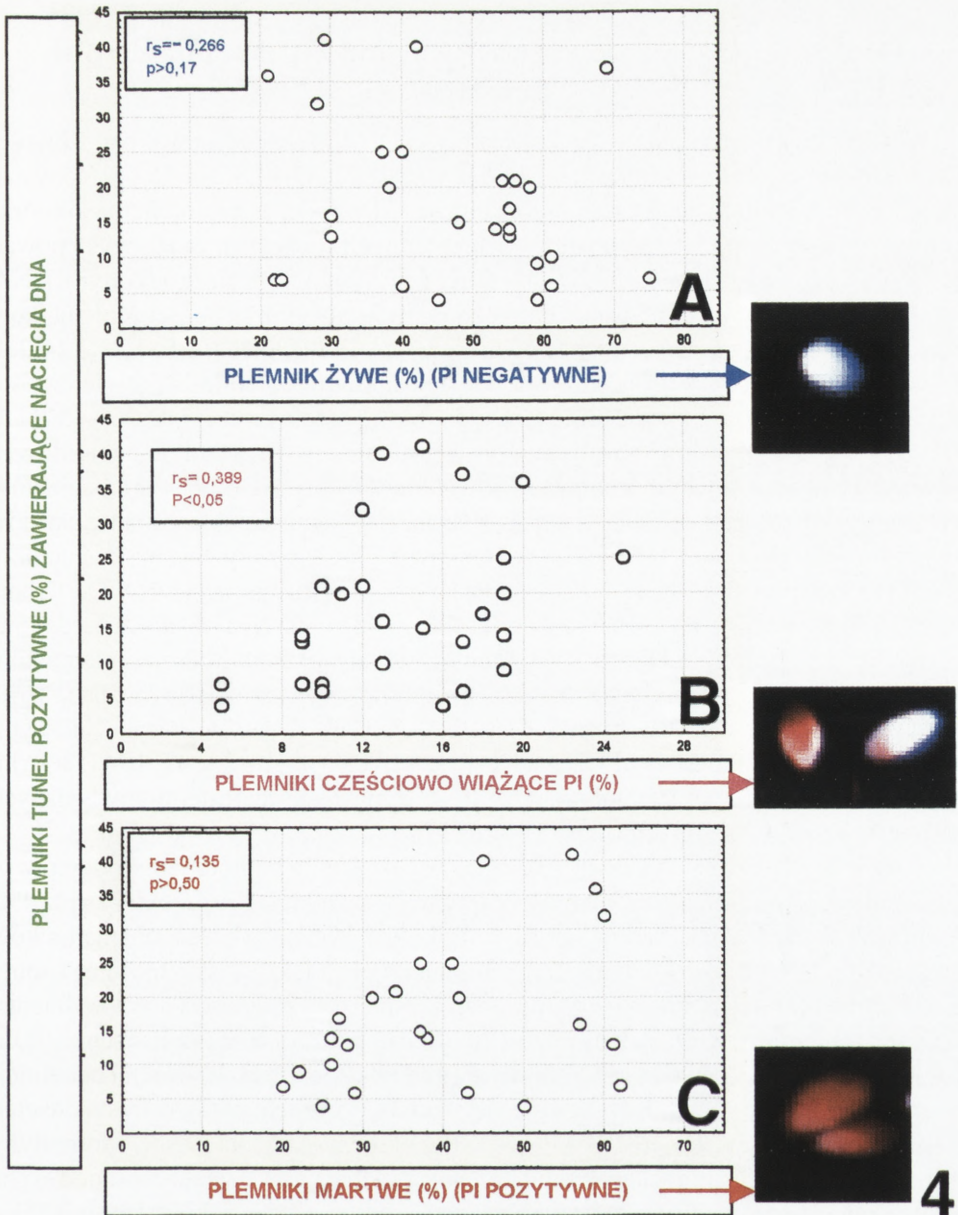
Wyniki badań klinicznych są jednak rozbieżne, gdyż niektórzy autorzy nie znaleźli istotnych związków między morfologiczno-funkcjonalnymi zaburzeniami plemników a integralnością ich DNA [8,26,41,50]. Wynika to – jak można przypuszczać – z heterogenności populacji plemników. Gorczyca i wsp. [26] nie stwierdzili istotnej korelacji między odsetkiem plemników z nacięciami DNA a ruchem czy koncentracją plemników. W przypadku tego ostatniego parametru Muratori i wsp. [50] również nie znaleźli związku. Podobnie Chan i wsp. [8] nie znaleźli istotnej korelacji między nacięciami DNA a morfologią plemników czy uszkodzeniem ich akrosomu. Natomiast Oosterhuis i wsp. [51] nie zaobserwowali istotnej korelacji między nacięciami DNA a zdolnością plemników do pęcznienia w warunkach hypoosmotycznych (HOS test – *hyposmotic swelling test*), będącej wyrazem prawidłowej przepuszczalności błony komórkowej dla wody. W badaniach własnych, wykonanych na plemnikach ludzkich (n=27, 9 przypadków normozoospermii-N, 2 astenozoospermii-A, 3 teratozoospermii-T, 10 astenoteratozoospermii-AT, 3 oligoastenoteratozoospermii-OAT), nie stwierdzono również istotnej statystycznie korelacji między odsetkiem plemników TUNEL-pozytywnych a koncentracją, morfologią i ruchem plemników (ryc. 3). Nie znaleziono także istotnego związku między odsetkiem plemników żywych, martwych (ryc.4 A,C) a także odsetkiem plemników z mitochondriami funkcjonalnymi (ryc. 5). Istotna statystycznie korelacja występowała jedynie pomiędzy odsetkiem plemników, które tylko częściowo gromadziły jodek propidyny (ryc. 4B).

Brak istotnego statystycznie związku pomiędzy nacięciami DNA a funkcjonalno-morfologicznymi cechami plemników sugeruje, że prawidłowe plemniki mogą zawierać ponacinany DNA, natomiast uszkodzone komórki niekoniecznie muszą wykazywać nacięcia DNA, co sugerował w swoich badaniach Host i wsp. [32–35] i co może wynikać z badań własnych. Pacjenci z normozoospermia (n=9) ujawniali zdecydowanie różne odsetki plemników TUNEL pozytywnych (6–21%, ryc.2). Ponadto, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ( $p>0,37$ ; test U Manna Whitneya) w odsetku plemników z nacięciami DNA pomiędzy pacjentami bez zaburzeń ruchu ( $14\pm 7\%$ ; mediana 15%; n=12: 9N, 3T) a pacjentami z astenozoospermia ( $20\pm 14\%$ ; mediana 15%; n=15: 2A, 10AT, 3OAT). Brak istotnego statystycznie związku pomiędzy integralnością genomu plemników a ich morfologiczno-funkcjonalnymi cechami mógłby tłumaczyć wzrost odsetka plemników z pofragmentowanym DNA w przypadku pacjentów tylko z oligozoospermia lub o niewyjaśnionych przyczynach niepłodności, u których w badaniach rutynowych nie stwierdza się zaburzeń parametrów plemników [33,34]. Wykorzystanie w takiej sytuacji dodatkowej fluorocytometrycznej oceny plemników pozwala wyjaśnić niekiedy przyczyny niepłodności.



3

RYCINA 3. Korelacje pomiędzy odsetkiem plemników TUNEL-pozytywnych a koncentracją plemników (A), odsetkiem plemników mających ruch postępowy (B), odsetkiem plemników o prawidłowej morfologii (C);  $r_s$  – współczynnik korelacji Spearmana (Spearman rank correlation coefficient);  $n=27$

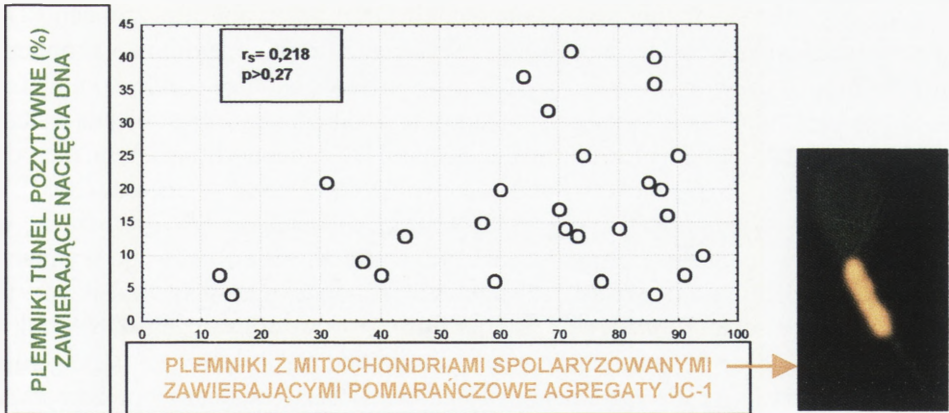


RYCINA 4. Korelacje pomiędzy odsetkiem plemników TUNEL pozytywnych a odsetkiem plemników żywych (A), martwych (C), częściowo wiążących PI (subpopulacja pośrednia) (B);  $n=27$ ; identyfikacja plemników żywych, martwych i pośrednich została przeprowadzona dla plemników barwionych PI (10 mg/ml) i analizowanych w cytometrze przepływowym; do wykresów dołączono obrazy mikroskopowo-fluorescencyjne plemników ( $\times 2600$ ) barwionych jednocześnie hoechst 33342 (0,4 mg/ml) i PI (Sigma Aldrich); hoechst gromadzi się na całym obszarze główki żywych plemników z nieprzerwaną błoną komórkową (biało-niebieska fluorescencja, A); PI gromadzi się na całym obszarze główki martwych plemników z przerwaną błoną komórkową (czerwona fluorescencja, C); w subpopulacji pośredniej oba fluorochromy gromadzą się jednocześnie – hoechst głównie w części postakrosomalnej, a PI w części akrosomalnej główki plemnika (B)

## Odsetek plemników z nacięciami DNA może decydować o możliwości zapłodnienia

Wielkość odsetka plemników z pęknięciami nici DNA może decydować o możliwości uzyskania koncepcji w warunkach *in vivo* i *in vitro* [8,32,33,34,35,44,46,65], co wiąże się z istotną, wspomnianą wcześniej rolą chromatyny podczas zapłodnienia komórki jajowej i dalszych podziałów zygoty. U niepłodnych mężczyzn może występować podwyższony odsetek plemników TUNEL-pozytywnych z uszkodzonym DNA [4,24,32,33,46,54,65]. W przypadku normozoospermii, stwierdzany odsetek plemników z nacięciami DNA jest różny i może wynosić poniżej 1% [32,33],  $2,5 \pm 1,2\%$  [24] lub  $6,2 \pm 0,7\%$ . Podczas gdy u pacjentów z niewyjaśnioną niepłodnością stwierdza się  $1,9 \pm 1,1\%$  plemników z nacięciami DNA [33], w oligozoospermi  $2,7 \pm 2,96\%$  [39] lub  $3,1 \pm 3,6\%$  [33], w oligoastenoteratozoospermi oraz w przypadku pacjentów z nowotworem jąder czy w chorobie Hodgkina  $11 \pm 4\%$  [24]. Natomiast w u pacjentów z obstrukcyjną azoospermią Ramos i wsp. [54], analizując plemniki pobrane z jąder, najądrza i nasieniowodu, wykazali  $18,9 \pm 2,4\%$  plemników TUNEL-pozytywnych. Inni autorzy [50,51] wykazali zdecydowanie większe odsetki plemników z nacięciami DNA. Oosterhuis i wsp. [51] stwierdzili  $20 \pm 15\%$  plemników TUNEL-pozytywnych u badanych pacjentów, a Muratori i wsp. [50] –  $11 \pm 8\%$ . W badaniach własnych, średni odsetek plemników TUNEL-pozytywnych u pacjentów z normozoospermią wynosił  $14 \pm 6\%$  (mediana  $16\%$ ,  $n=9$ ) i nie różnił się istotnie statystycznie od odsetka plemników pacjentów z nieprawidłowymi parametrami plemników ( $19 \pm 13\%$ , mediana  $15\%$ ,  $p>0,55$ ,  $n=18$ : 2A, 3T, 10AT, 3OAT). Natomiast średni odsetek plemników TUNEL-pozytywnych dla całej grupy badanych pacjentów wynosił  $18 \pm 11\%$  (mediana  $15\%$ ,  $n=27$ ).

Host i wsp. [34,35] wykazali, że szansa na uzyskanie zapłodnienia oocytów *in vitro* maleje, gdy odsetek plemników z pofragmentowanym DNA przekracza już  $4\%$ . Autorzy wykazali ujemną, istotną statystycznie korelację między odsetkiem plemników z nacięciami DNA a odsetkiem uzyskanych zapłodnień [34,35]. Wskazuje to na istotny związek między integralnością genomu gamety męskiej a jej zdolnością do zapłodnienia. Obniżona integralność DNA plemników upośledza ich zdolność przyłączenia się do komórek nabłonka jajowodu [17], obniża ich zdolność do hyperaktywacji i penetracji *zona pellucida* [8]. Ponadto, obserwuje się częstsze poronienia, gdy wzrasta odsetek plemników z uszkodzonym DNA [1,55]. Pojedyncze nacięcia DNA chromatyny plemnika mogą być naprawiane w zapłodnionej komórce jajowej. Natomiast podwójne lub też pojedyncze nacięcia o dużym zasięgu – jak sugeruje Sakkas i wsp. [55] – przekraczają możliwości naprawcze komórki jajowej i stają się letalne, gdyż mogą upośledzać podziały zygoty i w efekcie stać się przyczyną wczesnych, samoistnych poronień. Wydaje się, że rozmiar uszkodzeń DNA plemnika oraz zdolności naprawcze komórki jajowej, między innymi, określają dalsze losy zygoty, jej zdolność do podziałów i dalej wczesne etapy rozwoju zarodkowego [1].



RYCINA 5. Korelacja pomiędzy odsetkiem plemników TUNEL-pozytywnych a odsetkiem plemników z mitochondriami funkcjonalnymi, spolaryzowanymi, mającymi zdolność gromadzenia pomarańczowych agregatów JC-1 (n=27); JC-1 jest fluorochromem gromadzącym się w mitochondriach w zależności od wartości potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej; agregaty JC-1, emitujące pomarańczową fluorescencję, powstają w mitochondriach przy wysokim potencjale mitochondrialnym, natomiast monomery JC-1, emitujące zieloną fluorescencję, występują w mitochondriach z niskim potencjałem; odsetek plemników z mitochondriami spolaryzowanymi został ustalony dla plemników barwionych JC-1 (10 mg/ml, Molecular Probe, Europe BV, Leiden, The Netherlands) i analizowanych w cytometrze przepływowym; do wykresu dołączono obraz mikroskopowo-fluorescencyjny plemnika (x 3000) barwionego JC-1, widoczna pomarańczowa fluorescencja na całej długości wstawki, co wskazuje na obecność funkcjonalnych mitochondriów

## PRZYCZYNY ZABURZEŃ STRUKTURY I INTEGRALNOŚCI DNA CHROMATYNY PLEMNIKÓW

### Nieprawidłowa kondensacja DNA

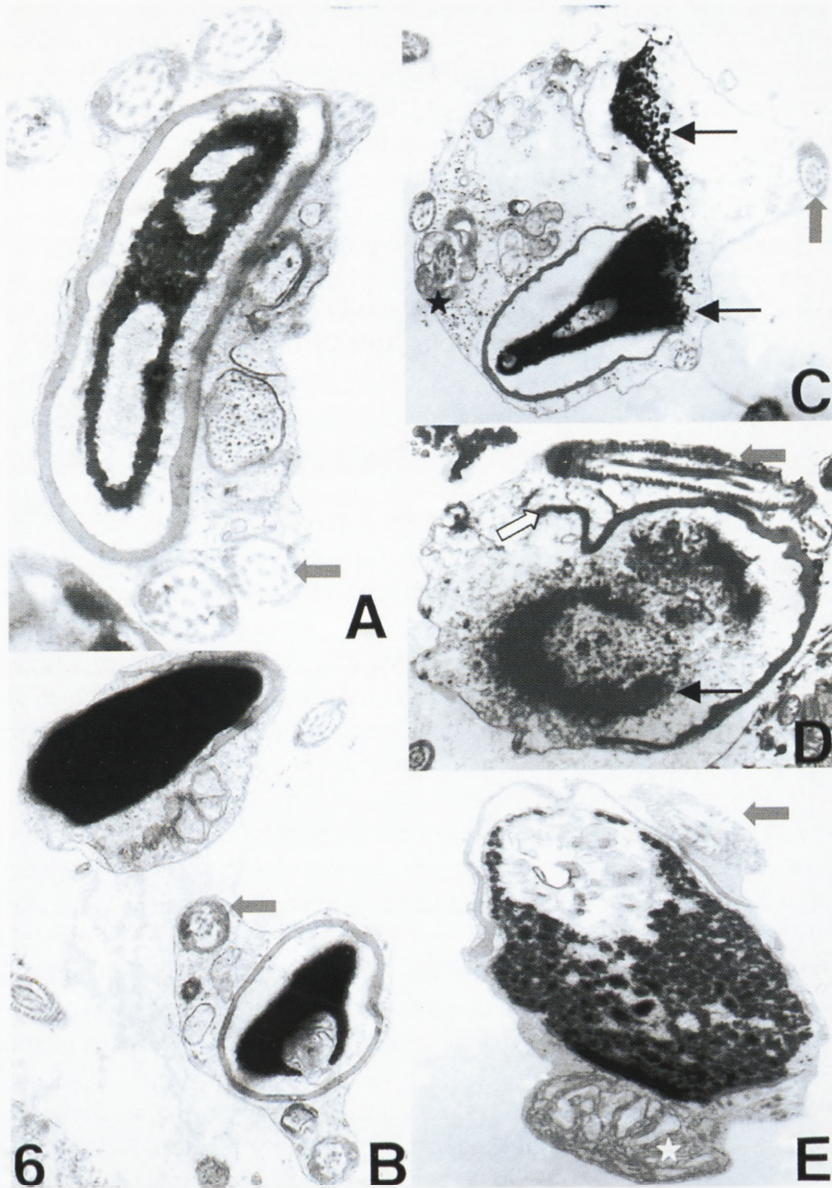
Dojrzałość DNA wiąże się z prawidłową jego kondensacją zależną od stosunku protamin (P1/P2) i prawidłowego ich rozmieszczenia w jądrze plemnika. Umożliwiają one w specyficzny sposób upakowanie długiej nici DNA. Niezwykle intensywna kondensacja DNA jest możliwa dzięki utlenianiu grup sulfhydrylowych białek protaminowych i wytworzeniu mostków dwusiarczkowych, które stabilizują i uodparniają białka na działanie czynników fizyko-chemicznych [22,47,55]. Może to zabezpieczać materiał genetyczny podczas długiej wędrówki plemników przez męskie i żeńskie drogi płciowe. Protaminy pojawiają się w okrągłych spermatydach podczas spermiogenezy [42]. Następuje wtedy wymiana histonów na protaminy. Proces ten związany jest z ekspresją odpowiednich genów dla poszczególnych protamin [25]. Nieprawidłowe zmiany ilościowe protamin prowadzą do nieprawidłowej kondensacji DNA, powstania chromatyny luźnej i w konsekwencji do niepłodności męskiej [6,21,22,55,63,64].

Inna przyczyna nieprawidłowej kondensacji DNA związana jest z obecnością przetrwałych, endogennych nacięć DNA. Wykazano, że nieprawidłowo skondensowana chromatyna zawiera nacięcia DNA. Stwierdza się istotną korelację pomiędzy odsetkiem plemników ze zwiększoną podatnością na denaturację rejestrowaną testem SCSA [26,64] a odsetkiem plemników z nacięciami DNA, identyfikowanymi metodą TUNEL lub odsetkiem plemników z uszkodzonym DNA wykazany metodą COMET (*single cell gel electrophoresis assay*) [12]. Endogenne nacięcia DNA tworzą się w sposób naturalny podczas spermatogenezy, gdyż umożliwiają i ułatwiają wymianę histonów na protaminy. Powstają dzięki aktywności endogennych nukleaz. Enzymy te wraz z topoizomerazą II odgrywają istotną rolę zarówno w nacinaniu DNA, jak i łączeniu jego końców [55]. Pozostanie nacięć w chromatynie plemników – jak sugerują niektórzy autorzy – wskutek nieprawidłowej aktywności endonukleaz i topoizomerazy II, prowadzi do zaburzeń protaminacji i dalej kondensacji DNA, czego efektem jest obniżona zdolność plemników do zapłodnienia [22,26,48,55].

Obecność zatem nacięć DNA w ejakulowanych plemnikach może odzwierciedlać zaburzenia spermatogenezy prowadzące do uwalniania z nabłonka plemnikotwórczego plemników z niedojrzałą chromatyną. Plemniki te przeważnie mają ultrastrukturalne zmiany w jądrze, które są wyrazem molekularnych zaburzeń kondensacji. Chromatyna ich wykazuje morfologiczne cechy niedojrzałości: ziarnistą i włóknistą substrukturę, zawiera jasne wakuole i inkluzje błonowe [24,50], co zaobserwowano również w badaniach własnych (ryc. 6). Tak zmienione plemniki niekoniecznie muszą wykazywać morfologiczno-funkcjonalne zmiany, stwierdzone w rutynowej analizie [22,48,50,55]. Dlatego też – jak dyskutowano wcześniej – nie zawsze plemniki z nacięciami DNA to komórki z obniżonym ruchem czy nieprawidłową morfologią. Podejrzenie zaburzeń kondensacji chromatyny skłania do dalszej diagnostyki zarówno mikroskopowo-elektronowej, jak i molekularnej dla wykrycia endogenne nacięcia DNA. Nie można również pominąć faktu, że fragmentacja DNA może być efektem apoptozy zachodzącej w plemnikach [22,24,26,55].

### Apoptoza plemników

Apoptozę w nabłonku plemnikotwórczym można rozważać jako proces kontrolujący i ograniczający nadmierną proliferację spermatogonii, pozwalający na ustalenie odpowiedniej liczby komórek, które dalej będą podlegały podziałom i różnicowaniu [54]. Ponadto, programowana śmierć komórek umożliwia eliminowanie uszkodzonych komórek pojawiających się podczas regularnej spermatogenezy, co ogranicza liczbę nieprawidłowych plemników uwalnianych z jądra. Z drugiej jednak strony nadmierna apoptoza w nabłonku plemnikotwórczym może być wyrazem zaburzeń spermatogenezy wywołanych przez czynniki genetyczne, parakryne czy środowiskowe lub też może wynikać z zaburzeń kontroli i regulacji samego procesu programowanej śmierci. W takich przypadkach prowadzi to do sterility [23,30,49,60,61].



RYCINA 6. Obserwacje mikroskopowo-elektronowe plemników pacjenta z oligoastenoteratozoospermia, u którego odsetek plemników TUNEL-pozytywnych wynosił 25% (ryc.2.); A,B,E: przekrój przez główkę plemnika otoczoną cytoplazmą zawierającą błoniasty i ziarnisty materiał, witki (szara strzałka) i zdegenerowane mitochondria (biała gwiazdka) (E); chromatywa plemnika wykazuje cechy morfologicznej niedojrzałości odzwierciedlające zaburzenia kondensacji chromatyny – jasne wakuole (A,B,E) niekiedy zawierające błony (B,E) oraz ziarnista jej substruktura (E); C,D: cytoplazmatyczne konglomeraty przypominające ciała apoptotyczne (28) zawierające błoniasty i ziarnisty materiał oraz częściowo zdegradowane struktury plemnika – fragmenty nieprawidłowo skondensowanej chromatyny (czarna strzałka), akrosomu (biała strzałka) i witki (szara strzałka) i wstawki (czarna strzałka); transmisyjny mikroskop elektronowy – JEM-1200 EX (JOEL Ltd, Tokyo, Japan); Ax31000, Bx15000, Cx12000, Dx14000, Ex16000

Wydaje się, że apoptoza komórek plemnikotwórczych nie jest procesem do końca skutecznym, gdyż ejakulowane plemniki mogą wykazywać molekularne i morfologiczne cechy komórek apoptotycznych [3,24,26,55]. W ejakulowanych plemnikach wykazano subpopulację plemników z powierzchnią fosfatydyloseryną. Taka lokalizacja na błonie komórkowej odzwierciedla molekularne jej zmiany w początkowym etapie apoptozy [4,14,15,51]. Ponadto u niepłodnych mężczyzn, zwłaszcza w przypadku złej jakości nasienia, stwierdzono również duży odsetek plemników (nawet 50%) wykazujących na swej powierzchni ekspresję białka Fas, zawierającego domeny śmierci, zaangażowanego w inicjację apoptozy [55,56]. Z kolei, wielu autorów – jak omawiano powyżej – zidentyfikowało w nasieniu plemniki z nacięciami DNA, które można odnieść do końcowego etapu apoptozy [12,22,24,26,32,33,50,51,55]. Natomiast obserwacje ultrastrukturalne, opisywane przez niektórych autorów i przeprowadzone w badaniach własnych, ujawniają liczne zmiany w jądrze plemnika, wstawce czy witce, mogące odzwierciedlać morfologiczne etapy apoptozy plemników [3,24, ryc. 6]. Ponadto w nasieniu stwierdza się liczne cytoplazmatyczne konglomeraty zawierające fragmenty struktur plemnika odnoszone często do ciałek apoptotycznych pojawiających się w końcowym etapie programowanej śmierci [24, ryc. 6]. Zastanawiające jest, dlaczego pomimo toczącej się apoptozy w nabłonku plemnikotwórczym, w ejakulacie, zwłaszcza pacjentów niepłodnych, pojawiają się komórki apoptotyczne? Dlaczego nie są one usuwane na terenie jądra czy też dalej najądrza? W ostatnich latach zostało sformułowane pojęcie *abortive apoptosis*, tłumaczące uwalnianie z gonady komórek apoptotycznych – i jak można oczekiwać – ciałek apoptotycznych niefagocytowanych przez komórki Sertoliego wskutek braku synchronizacji spermatogenezy z apoptozą, która w takim przypadku może być procesem niekompletnym i niespełniającym swojej roli, czyli nieeliminującym uszkodzonych komórek [55,56]. Wydaje się, że ten brak synchronizacji szczególnie ma silny wyraz kliniczny w przypadku pacjentów niepłodnych, u których obok nieprawidłowych rutynowych parametrów plemników, stwierdza się ich ultrastrukturalne zmiany odnoszone do komórek apoptotycznych; podobnie u pacjentów o niewyjaśnionej niepłodności, u których występuje brak zmian w rutynowych parametrach plemników, ale u których może występować wysoki odsetek plemników z nacięciami DNA [24,33,34,51,65].

Manicardi i wsp. sugerował, że obecność nacięć DNA plemników niekoniecznie musi wskazywać na apoptozę tych komórek [48]. Zaburzenia struktury chromatyny związane z nieprawidłową jej kondensacją mogą być objawem zaburzeń spermiogenezy, w której dochodzi szczególnie do silnej kondensacji materiału genetycznego. Zakłócenie tego procesu prowadzi do uwolnienia niedojrzałych form plemników [49], o czym wspomniano powyżej. Wynika z tego, że identyfikacja tylko nacięć DNA plemników jest niewystarczająca do stwierdzenia obecności komórek apoptotycznych w nasieniu, tym bardziej że mogą one pojawiać się wskutek stresu tlenowego i obniżonego potencjału antyoksydacyjnego nasienia [36].



## Stres tlenowy zmniejsza integralność DNA plemników

Integralność DNA plemników może zależeć od ilości reaktywnych form tlenu (ROS – *reactive oxygen species*) w męskich drogach płciowych. W ilościach fizjologicznych ROS są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania gamet. Prawidłowa ich zawartość jest utrzymywana dzięki równowadze pomiędzy ich generowaniem a potencjałem antyoksydacyjnym plemników i nasienia (katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationu, albuminy, tauryna, askorbinian, mocznik) [4,22]. Zwiększona ilość nacięć DNA pojawia się pod wpływem stresu tlenowego (zaburzona równowaga pomiędzy generowaniem ROS a procesami antyoksydacyjnymi) wyrażonego zwiększoną ilością ROS w nasieniu [4,22].

Barroso i wsp. [4] wykazali istotną korelację między odsetkiem plemników z nacięciami DNA a wartościami ROS w nasieniu nieplodnych pacjentów. Podobne wyniki otrzymano w badaniach *in vitro*, w których plemniki poddane były działaniu  $H_2O_2$  [2,11,14,45,52,53]. Zwiększony odsetek plemników z nacięciami DNA stwierdzono także we frakcji plemników z obniżoną ruchliwością, w której była również podwyższona generacja ROS w porównaniu z frakcją komórek ruchliwych [4]. Ponadto, Aitken i wsp. [2] wykazali obniżoną ruchliwość plemników, zwiększoną fragmentację DNA plemników oraz upośledzone zdolności plemników do fuzji z oocytami pod wpływem stresu tlenowego. Sugeruje to powiązanie integralności genomu plemników, ich morfologiczno-funkcjonalnych parametrów i stresu tlenowego. Tłumaczyć to może również podwyższony odsetek plemników z uszkodzonym DNA w przypadku mężczyzn nieplodnych ze złą jakością nasienia, u których stwierdza się niekiedy obniżony potencjał antyoksydacyjny nasienia [36]. Suplementacja *in vitro* askorbinianem zmniejsza generację ROS wywołaną  $H_2O_2$  i przez to fragmentację DNA plemników [11].

## Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania Prof. dr hab. Jerzemu Kawiakowi i Pracownikom Zakładu Cytologii Klinicznej CMKP w Warszawie oraz prof. dr hab. Wenencjuszowi Domagale i pracownikom Zakładu Patomorfologii Pomorskiej Akademii Medycznej za umożliwienie rozpoczęcia i kontynuację oceny plemników w cytometrze przepływowym oraz możliwość przeprowadzenia obserwacji mikroskopowo-elektronowych.

## PIŚMIENICTWO

- [1] AHMADI A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 1999; **284**: 696–704.
- [2] AITKEN RJ, GORDON E, HARKISS D, TWIGG JR, MILNE P, JENNINGS Z, IRVINE DS. Relative impact oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; **59**: 1037–1046.
- [3] BACCETTI B, COLLODEL G, PIOMBONI P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996; **28**: 587–596.

- [4] BARROSO G, MORSHEDI M, OEHNINGER S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; **15**: 1338–1344.
- [5] BAUMBER J, BALL BA, GRAVANCE CG, MEDINA V, DAVIES-MOREL MCG. *J Androl* 2000; **21**: 895–902.
- [6] BENCH G, CORZETT MH, de YEBRA L, OLIVIA R, BALHORN R. Protein and DNA contents in sperm from an infertile human male possessing protamine defects that vary over time. *Mol Reprod Develop* 1998; **50**: 345–353.
- [7] CALOGERO AE. Epididymal and testicular sperm retrieval in azoospermic patients and the outcome of intracytoplasmic sperm injection in relation to the etiology of azoospermia. *Fertil Steril* 2001; **75**: 215–216.
- [8] CHAN PJ, CORSELLI JU, PATTON WC, JACOBSON JD, CHAN SR, KING A. A simple comet assay for archived sperm correlates DNA fragmentation to reduced hyperactivation and penetration of zona-free hamster oocytes. *Fertil Steril* 2001; **75**: 186–192.
- [9] DARZYNKIEWICZ Z, TRAGANOS F, SHARPLESS T, MELAMED MR. Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Exp Cell Res* 1975; **90**: 411–428.
- [10] DIEMER T, DESJARDINS. Developmental and genetic disorders in spermatogenesis. *Hum Reprod* 1999; **5**: 120–140.
- [11] DONELLY ET, MCCLURE N, LEWIS SEM. The effect of ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol supplementation *in vitro* on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis* 1999; **16**: 505–511.
- [12] DONNELLY ET, O'CONNEL M, MCCLURE N, LEWIS SEM. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; **15**: 1552–1561.
- [13] DURAN EH, GURGAN T, GUNALP S, ENGINSU ME, YARALI H, AYHAN A. A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization *in vitro*. *Hum Reprod* 1998; **13**: 1235–1239.
- [14] DURU NK, MORSHEDI M, OEHNINGER S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000; **74**: 1200–1207.
- [15] DURU NK, MORSHEDI M, SCHUFFNER A, OEHNINGER S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *J Androl* 2001; **22**: 646–651.
- [16] EGOZCUE S, BLANCO J, VENDRELL JM, GARCIA F, VEIGA A, ARAN B, BARRI PN, VIDAL F, EGOZCUE J. Human male infertility: chromosome anomalies meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod* 2000; **6**: 93–105.
- [17] ELLINGTON JE, EVENSON DP, WRIGHT RW Jr, JONES AE, SCHNEIDER CS, HISS GA. *Fertil Steril* 1999; **71**: 924–929.
- [18] EVENSON DP, DARZYNKIEWICZ Z, MELAMED MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; **240**: 1131–1133.
- [19] EVENSON DP, JOST LK, MARSHALL D, ZINAMAN MJ, CLEGG E, PURVIS K, de ANGLIS P, CLAUSSEN OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; **14**: 1039–1049.
- [20] EVENSON DP. Loss of livestock breeding efficiency due to uncomposable sperm nuclear defects. *Reprod Fertil Dev* 1999; **11**: 1–15.
- [21] EVENSON DP, JOST LK, CORZETT M, BALHORN R. Characteristic of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a cause study. *J Androl* 2000; **21**: 739–746.
- [22] EVENSON DP, LARSON KL, JOST AL. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002; **23**: 25–43.
- [23] GĄCZARZEWICZ D, UDAŁA J, BŁASZCZYK B. Apoptoza komórek gametogenicznych w czasie spermatogenezy. *Medycyna Wet* 2000; **56**: 639–644.

- [24] GANDINI L, LOMBARDO F, PAOLI D, CAPONNECCHIA L, FAMILIARI G, VERLENGIA C, DONDERO F, LENZI A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; **15**: 830–839.
- [25] GARDINER-GARDER M, BALLESTEROS M, GORDON M, TAM PPL. Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the  $\beta$ -globin domain in human sperm. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 3350–3356.
- [26] GORCZYCA W, TRAGANOS F, JESIONOWSKA H, DARZYNKIEWICZ Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993; **207**: 202–205.
- [27] GRAHAM JK. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci* 2001; **68**: 239–247.
- [28] GRAVANCE CG, GARNER DL, MILLER MG, BERGER T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reprod Toxicol* 2001; **15**: 5–10.
- [29] HARGREGAVE TB. Genetic basis of male infertility. *Br Med Bull* 2000; **56**: 650–671.
- [30] HELAL MA, MEHMET H, NSB THOMAS, COX PM, RALPH DJ, BAJORIA R, CHATTERJEE R. Ontogeny of human fetal testicular apoptosis during first, second, and third trimesters of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 1189–1193.
- [31] HORTE A, VIERULA M, TOPPARI J, SUOMINEN J. Reassessment of sperm morphology of archival semen smears from the period 1980–1994. *I J Androl* 2001; **24**: 120–124.
- [32] HOST E, LINDERBERG S, KAHN JA, ERNST E, CHRISTENSEN F. *Obstet Gynecol Scand* 2000; **78**: 336–339.
- [33] HOST E, LINDERBERG S, ERNST E, CHRISTENSEN F. DNA strand breaks in human spermatozoa: a possible factor, to be considered in couples suffering from unexplained infertility. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; **78**: 662–625.
- [34] HOST E, LINDERBERG S, SMIDT-JENSEN S. DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilization *in vitro* in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; **79**: 189–193.
- [35] HOST E, LINDERBERG S, SMIDT-JENSEN S. The role of DANN strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; **79**: 559–563.
- [36] IRVINE DS, TWIGG JP, GORDON EL, FULTON N, MILNE PA, AITKEN RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000; **21**: 33–44.
- [37] IRVINE DS. Male reproductive health: cause for concern? *Andrologia* 2000; **32**: 195–208.
- [38] KAWIAK J, SKIERSKI JS. Cytometria przepływowowa w badaniach komórek i niektóre jej zastosowania lekarskie. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 239–254.
- [39] KRUGER TF, ACOSTA AA, SIMMONS KF, SWANSON RJ, MATTA JF, OEHNINGER S. Predictive value of abnormal sperm morphology in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1998; **49**: 112–117.
- [40] LARSON KL, de JONGE CJ, BARNES AM, JOST LK, EVENSON DP. Relationship of assisted reproductive technique (ART) outcomes with sperm chromatin integrity and maturity as measured by the sperm chromatin structure assay (SCSA). *Hum Reprod* 2000; **15**: 1717–1722.
- [41] LARSON KL, BRANNIAN JD, SINGH NP, BURBACH JA, JOST LK, HANSEN KP, KREGER DO, EVENSON DP. Chromatin structure in globozoospermia: A case report. *J Androl* 2001; **22**: 424–431.
- [42] LESCOAT D, BLANCHARD MT, LAVALUT MT, QUERNEE D, Le LANNOU D. Ultrastructural and immunocytochemical study of P1 protamine localization in human testis. *Andrologia* 1993; **25**: 93–99.
- [43] LEWIN LM, GOLAN R, FREIDLIN P, SHOCHAT L. A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry. *Comp Biochem Physiol* 1999; **124**: 133–137.

- [44] LOPES S, JURISICOVA A, CASPERR RF. Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; **13**: 703–708.
- [45] LOPES S, JURISICOVA A, SUN JG, CASPER RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; **13**: 896–900.
- [46] LOPES S, SUN JG, JURISICOVA A, MERIANO J, CASPER RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; **69**: 528–532.
- [47] LOVE CHC, KENNEY RM. Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biol Reprod* 1999; **60**: 615–620.
- [48] MANICARDI GC, TOMBACCO A, BIZZARO D, BIANCHI U, BIANCHI BG, SAKKAS D. DNA strand breaks in ejaculated human spermatozoa: comparison of susceptibility to the nick translation and terminal transferase assays. *Histochem J* 1998; **30**: 33–39.
- [49] MARTINCIC DS, KLUN IV, ZORN B, VRTOVEC HM. Germ cell apoptosis in the human testis. *Eur J Physiol* 2001; **442** suppl: R159–R160.
- [50] MURATORI M, PIOMBONI P, BALDI E, FILIMBERTI E, PECCHIOLI P, MORETTI E, GAMBERA L, BACCETTI B, BIAGIOTTI R, FORTI G, MAGGI M. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 2000; **21**: 903–912.
- [51] OOSTERHUIS GJE, MULDER AB, KALSBECK-BATENBURG B, LAMBALK CB, SCHOMAKER J, VERMES I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality. *Fertil Steril* 2000; **74**: 245–250.
- [52] POTTS RJ, NOTARIANNI LJ, JEFFERIES TM. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mutat Res* 2000; **447**: 249–265.
- [53] RAMOS L, WETZELS MM. Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. *Hum Reprod* 2001; **16**: 1703–1707.
- [54] RAMOS L, M SC, KLEINGELD P, MEULEMAN E, van KOOY R, KREMER J, BRAAT D, WETZELS A. Assessment of DNA fragmentation of spermatozoa that were surgically retrieved from men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2002; **77**: 233–237.
- [55] SAKKAS D, MARIETHOZ E, MANICARDI G, BIZZARO D, BIANCHI PG, BIANCHI U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999; **4**: 31–37.
- [56] SAKKAS D, MARIETHOZ E, JOHN JCSt. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1998; **251**: 350–355.
- [57] SESHAGIRI PB. Molecular insights into the causes of male infertility. *J Biosci* 2001; **26** suppl: 429–435.
- [58] SPANO M, KOLSTAD AH, LARSEN SB, CORDELLI E, LETER G, GIWERCMAN A, BONDE JP, ASCLEPIOS. The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Hum Reprod* 1998; **13**: 2495–2505.
- [59] SPANO M, BONDE JP, HJOLLUND HI, KOLSTAD HA, CORDELLI E, LETER G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil Steril* 2000; **73**: 43–50.
- [60] TAKAGI S, ITOH N, KIMURA M, SASAO T, TSUKAMOTO T. Spermatogonial proliferation and apoptosis in hypospermatogenesis associated with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2001; **76**: 901–907.
- [61] TESARIK J, GRECO E, MENDOZA C. Assisted reproduction with *in-vitro*-cultured testicular spermatozoa in cases of severe cell apoptosis: a pilot study. *Hum Reprod* 2001; **16**: 2640–2645.
- [62] WHO, Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge University Press, 1992.
- [63] de YEBRA L, BALLESCA JL, VANRELL JA, BASSAS L, OLIVIA R. Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J Biol Chem* 1993; **268**: 10553–10557.

- [64] de YEBRA L, BALLESCA JL, VANRELL JA, CORZETT M, BALHORN R, OLIVIA R. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil Steril* 1998; **69**: 755–759.
- [65] ZINI A, BIELECKI R, D.V.M., PHANG D, ZENZES MT. Correlation between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001; **75**: 674–677.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 30.10. 2002 r.*

*Przyjęto: 24.11. 2002 r.*

*Adres autora: ul. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin*



## ROLA PROLAKTYNY W UKŁADZIE PŁCIOWYM MĘSKIM

### ROLE OF PROLACTIN IN MALE REPRODUCTIVE SYSTEM

Maria LASZCZYŃSKA

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin

*Streszczenie:* Prolaktyna (PRL), białkowy hormon o masie cząsteczkowej ok. 23 kD jest syntetyzowana głównie w komórkach przysadki mózgowej, ale również i inne komórki organizmu mogą produkować ten hormon. Przsadkowe laktotrofy wykazują morfologiczną i funkcjonalną heterogenność w zależności od płci, a syntetyzowana PRL ulega wielu potranslacyjnym modyfikacjom. PRL i jej molekularne warianty mogą wpływać na różne procesy biologiczne, a wydzielanie tego hormonu jest regulowane przez różnorodne czynniki stymulujące i hamujące. W układzie płciowym męskim PRL wpływa nie tylko na morfologię i funkcję jądra, ale również najądrza, pęcherzyków nasiennych, prostaty i plemników. PRL może działać bezpośrednio przez swoje receptory zlokalizowane w tych narządach, jak również pośrednio przez wpływ na uwalnianie gonadotropin i na wydzielanie testosteronu. Przedstawiono budowę i lokalizację receptorów PRL w narządach męskiego układu płciowego, jak również działanie tego hormonu w tych narządach w następstwie hiperprolaktynemii. Mimo dobrze poznanego i udokumentowanego mechanizmu działania PRL w układzie płciowym żeńskim wpływ tego hormonu na układ płciowy męski nie został jeszcze szczegółowo wyjaśniony i wymaga dalszych badań.

*Słowa kluczowe:* prolaktyna, jądro, najądrze, plemniki, pęcherzyki nasienne, prostata, receptory prolaktyny, hiperprolaktynemia.

*Summary:* Prolactin (PRL), the protein hormone of molecular weight of approximately 23 kD is synthesized mainly by the cells of adenohypophysis. However, other cells are capable of producing this hormone too. Pituitary lactotrophs demonstrate morphological and functional sex dependent heterogeneity and synthesized PRL undergoes variable posttranslational modifications. Prolactin and its structural variants can influence many biological processes and secretion of this hormone is controlled by numerous releasing and inhibiting factors. In the male reproductive system PRL affects not only the morphology and function of testis, but also epididymis, seminal vesicles, prostate and spermatozoa. Prolactin may act directly through its receptors localized within these organs and indirectly through regulation of gonadotropins liberation from the pituitary gland or testosterone secretion from the testis. The structure and localization of prolactin receptors in the male reproductive tract were discussed in the study. The effect of this hormone following hyperprolactinemia was also determined in the organs mentioned above. Unlike the effect of PRL on the female reproductive system, which is well established and determined, the influence of this hormone on the male reproductive system has not been fully investigated and further studies in this area are required.

*Key words:* prolactin, testis, epididymis, spermatozoa, seminal vesicles, prostate, prolactin receptors, hyperprolactinemia.

**Wykaz skrótów:** PRL (*prolactin*) – prolaktyna, OT (*oxytocin*) – oksytocyna, TRH (*thyrotropin-releasing hormone*) – hormon uwalniający tyreotropinę, DA (*dopamine*) – dopamina, PrRP (*prolactin-releasing peptide*) – peptyd uwalniający prolaktynę, RT PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) – technika odwrotnej łańcuchowej reakcji polimerazy, GH (*growth hormone*) – hormon wzrostu, IL-6, 11 (*interleukin 6, 11*) – interleukina 6, 11, EPO (*erythropoietin*) – erytropoetyna, TPO (*trombopoietin*) – trombopoetyna, G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów, Nb2 – linia komórkowa chłoniaka, JAK 2 (*Janus kinase*) – kinaza tyrozynowa z rodziny Janus, STATs (*signal transducers and activators of transcription*) – czynniki transkrypcyjne, Ras/Raf/kinazy MAP (*mitogen activated protein kinases*) – kinazy białkowe aktywowane mitogenem, Src – kinaza tyrozynowa z rodziny Src, LH (*lutening hormone*) – lutropina, T<sub>3</sub> (*triiodothyronine*) – trójiodotyronina, FSH (*follicle-stimulating hormone*) – folitropina, T (*testosterone*) – testosteron, DHT (*dihydrotestosterone*) – dwuhydrot testosteron.

## WSTĘP

Prolaktyna (PRL) jest najstarszym filogenetycznie hormonem przysadkowym i jednocześnie najbardziej wielostronnym, ponieważ reguluje różnorodne procesy fizjologiczne. Badania nad tym hormonem rozpoczęły się pod koniec lat dwudziestych ubiegłego stulecia i do chwili obecnej przypisuje się prolaktynie wpływ na tak różnorodne procesy, jak: osmoregulacja, metabolizm, wzrost i rozwój, zachowanie, rozród [2, 7, 28, 35] oraz na gruczoł mlekowy [2, 14, 35], układ immunologiczny [2, 35, 42], nerwowy [2, 7], endokrynologiczny [2, 18] i rozrodczy [2, 5, 26, 35].

Na podstawie licznych doniesień, od wielu lat wiadomo, że w układzie płciowym męskim PRL wpływa nie tylko na morfologię i funkcję jądra [23, 25, 26], ale również najądrza [23], gruczołów dodatkowych [23, 34] i plemników [23, 24]. PRL może działać bezpośrednio przez swoje receptory zlokalizowane w tych narządach [2, 8, 11, 15, 32], jak również pośrednio przez wpływ na uwalnianie gonadotropin i na wydzielanie testosteronu [12, 23].

Mimo dobrze poznanego i udokumentowanego mechanizmu działania PRL w układzie płciowym żeńskim wpływ tego hormonu na układ płciowy męski nie został jeszcze szczegółowo wyjaśniony. Występują różnice związane z syntezą PRL w laktotrofach, regulacją jej wydzielania i docelowym działaniem tego hormonu na narządy w obu tych układach. Ostatnio przedstawiono mechanizm działania PRL w układzie rozrodczym samicy [5]. Celem tego artykułu jest zaprezentowanie PRL jako heterogennego hormonu, przedstawienie budowy i lokalizacji receptorów prolaktynowych w narządach męskiego układu płciowego, jak również wykazanie wpływu PRL na te narządy. W pracy zostaną również przedstawione wyniki badań dotyczące wpływu PRL na jądro, najądrze, pęcherzyki nasienne i plemniki w następstwie hiperprolaktynemii [23, 24, 25].



## HETEROGENNOŚĆ PROLAKTYNY MODYFIKACJE POTRANSKRYPCYJNE I POTRANSLACYJNE

W 1980 roku sklonowano gen dla ludzkiej PRL zlokalizowany na chromosomie 6. Produktem transkrypcji genu PRL jest białkowy hormon o masie cząsteczkowej 23 kD, który w takiej formie jest syntetyzowany nie tylko w komórkach przysadki, ale również i w innych komórkach i narządach organizmu [14, 35]. Jest to główna, krążąca z krwią forma PRL zwana również małą PRL (*little PRL*) w odróżnieniu od polimerycznej dużej formy (*big PRL*) o masie cząsteczkowej 45–50 kD, czy multimerycznej bardzo dużej formy (*big big PRL*) o m. cz. 150–170 kD [3, 17]. Zarówno transkrypcja genu PRL, jak i jej sekrecja może być regulowana przez czynniki stymulujące i hamujące wydzielanie tego hormonu [1, 10, 19, 35].

Prolaktyna ulega wielu potranslacyjnym modyfikacjom. Może być glikozylowana w aparacie Golgiego, a w wyniku tego procesu powstaje produkt 25 kD, może być także fosforylowana, ulegać deamidacji, siarczanowaniu oraz dimeryzacji i polimeryzacji. PRL może również ulegać rozszczepieniu do mniejszych fragmentów: 8 kD, 16 kD i 22 kD. [37]. Ten ostatni fragment 22 kD – (PRL 1-173) znany jako kalikreina, jest specyficznym produktem sekrecyjnym w laktotrofach u szczurów płci żeńskiej, niewykrytym natomiast u szczurów samców. To rozszczepienie ma również swoje odbicie na poziomie tkanki docelowej, gdzie zidentyfikowano specjalne receptory dla fragmentu PRL 16 kD (PRL 1-148) w mózgu, nerce, wątrobie i komórkach śródbłonna [35], ale nie w narządach męskiego układu płciowego. Sugeruje się ważną rolę tego rozszczepionego fragmentu PRL 16 kD – wpływ na zahamowanie angiogenezy [7]. Molekularne warianty PRL mogą również działać jako auto- lub parakrynowe regulatory. W przysadce mózgowej, produkt rozszczepienia PRL 16 kD może działać parakrynowo, wywierając mitogeny efekt na przysadkowe gonadotrofy, tyreotrofy, jak również somatotrofy i kortykotrofy [35]. Natomiast inny potranslacyjny produkt PRL działa w sposób autokrynowy na laktotrofy regulując ich własną sekrecję. W układzie płciowym męskim PRL 23 kD odgrywa ważną rolę w regulacji funkcji reprodukcyjnych [35, 37, 40]. Ten białkowy hormon wpływa nie tylko na jądro i jądrową steroidogenezę, ale także na najądrze, nasieniowód i gruczoły dodatkowe przez swoje receptory zlokalizowane w tych narządach [2, 9, 27, 34, 40].

## HETEROGENNOŚĆ PRZYSADKOWYCH LAKTOTROFÓW W ZALEŻNOŚCI OD PŁCI

Laktotrofy przysadki mózgowej, w przeciwieństwie do pozostałych typów komórek tego gruczołu, wykazują różnorodność komórkową i to zarówno morfologiczną, jak i funkcjonalną [38].

Różnorodność morfologiczna, u dojrzałych płciowo szczurów samców, oceniana jest na podstawie kształtu komórek laktotropowych, wielkości i kształtu ziaren sekrecyjnych oraz różnego stopnia organizacji organelli komórkowych [38]. Laktotrofy charakteryzują się owalnym, wielobocznym lub wydłużonym kształtem i można je podzielić na 3 typy komórek wydzielających PRL: niedojrzały, z małymi ziarnami sekrecyjnymi o średnicy 100 nm i słabo rozwiniętymi organellami komórkowymi; pośredni, z okrągłymi ziarnami o średnicy 150–250 nm i umiarkowanie rozwiniętymi organellami oraz dojrzały typ komórek, zawierający duże, polimorficzne ziarna o średnicy 300–700 nm i dobrze rozwinięte organelle komórkowe. Dla przysadek samców szczurzych charakterystyczny jest pośredni typ komórek i stanowi on 50% wszystkich komórek wydzielających ten hormon, natomiast dla przysadek samic szczurzych – typ dojrzały. Są również doniesienia, że u szczurów samców przekształcanie się poszczególne typów komórek wydzielających PRL zachodzi pod wpływem niektórych czynników stymulujących wydzielanie PRL, takich jak: estradiol, oksytocyna (OT), hormon uwalniający tyreotropinę (TRH) oraz tyroksyna, co w efekcie może modulować wydzielanie PRL.

Różnorodność funkcjonalna laktotrofów manifestuje się ich podziałem na wiele subpopulacji [38], które u samców i samic szczurzych różnią się między innymi: podstawowym wydzielaniem PRL, jak również odpowiedzią na czynniki stymulujące i hamujące wydzielanie tego hormonu, takie jak: dopamina (DA) [1], TRH, endoteliny [20] czy też peptyd uwalniający prolaktynę (PrRP) [39]. W literaturze spotyka się dużo informacji dotyczących laktotrofów u samic, natomiast mało jest doniesień odnośnie laktotrofów u samców [20, 39]. Stwierdzono jednak, że u samców szczurzych występują subpopulacje laktotrofów z różną odpowiedzią na DA i TRH.

Przysadkowe laktotrofy wykazują także różnice w ich rozmieszczeniu w przysadce, jak również w ich zawartości procentowej w zależności od płci. Wykazano, że u szczurów samców laktotrofy są porozrzucane w przedniej części przysadki mózgowej, a czasami tworzą tylko skupienia. Natomiast u samic laktotrofy są zlokalizowane głównie w części obwodowej i centralnej przysadki. U samic szczurzych laktotrofy stanowią 54% wszystkich komórek przedniej części przysadki mózgowej, natomiast u samców – 37%. Ta mniejsza zawartość procentowa laktotrofów u szczurów samców, jak również duża różnorodność morfologiczna i funkcjonalna tych komórek u obu płci może korelować z różną sekrecją PRL u tych zwierząt.

## RECEPTORY PROLAKTYNY W UKŁADZIE PŁCIOWYM MĘSKIM

W ciągu ostatnich 30 lat receptory PRL, w męskim układzie płciowym, wykryto w: jądrze, najądrzu, pęcherzykach nasiennych, nasieniowodzie, prostatie i plemnikach [8, 9, 11, 15, 16, 31, 32, 33]. Stosowano różne metody do wykrywania receptorów PRL zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. W narządach męskiego układu płciowego receptory lokalizowano immunohistochemicznie na poziomie mikroskopu świetlnego i elektronowego [9, 11, 15, 31], autoradiograficznie [32], metodą hybrydyzacji *in situ* [11, 15, 32] oraz metodą *northern blot* i *western blot*, jak również obecność mRNA receptora PRL oceniano metodą RT PCR [8, 9, 29, 31, 33].

Budowa receptora PRL została ostatnio szczegółowo przedstawiona w wielu artykułach [2, 7, 9, 35, 42], również i w Postęпах Biologii Komórki [5], dlatego nie będzie szczegółowo omówiona w tym artykule. Receptory PRL należą do rodziny receptorów cytokinowych klasy I, do której także należą receptory dla hormonu wzrostu (GH), interleukiny 6 (IL-6), IL-11, erytropoetyny (EPO), trombopoetyny (TPO), czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytów (G-CSF) i wielu innych cytokin [2, 42]. W latach dziewięćdziesiątych odkryto trzy formy receptora PRL: krótką (42-kD), pośrednią (65-kD) i długą (80-kD) [42]. Wszystkie te formy składają się z 3 części: pozakomórkowej, przez błonową i cytoplazmatycznej, a różnią się tylko długością i składem aminokwasowym części cytoplazmatycznej. U szczura i myszy stwierdzono obydwie formy receptora długą i krótką, u człowieka formę długą, natomiast forma pośrednia receptora PRL występuje u szczura w komórkach Nb2 (linia komórkowa chłoniaka) [2, 32, 42], a ostatnio wykryto ją również w prostatie człowieka [21].

Cząsteczka PRL łączy się z dwiema cząsteczkami receptora PRL i powoduje ich dimeryzację. Homodimeryzacja receptora daje początek kaskadzie procesów zachodzących w cytoplazmie, takich jak: autofosforylacja kinaz tyrozynowych z rodziny Janus (JAK 2) i fosforylacja przez nie białek aktywujących transkrypcję (STATs). Oprócz szlaku JAK/STAT receptor PRL może również przekazywać sygnał w komórce za pomocą innych szlaków, takich jak: Ras/Raf/kinazy MAP czy też kinaz tyrozynowych z rodziny Src [7].

W jądrze, ekspresja genu receptora PRL była wykazana u różnych gatunków: szczura, barana, daniela i koguta [8, 11, 15, 16, 29, 32]. U szczura receptory PRL wykryto w komórkach Leydiga zlokalizowanych w tkance śródmiąższowej, jak również

TABELA 1 Lokalizacja receptorów PRL w narządach męskiego układu płciowego u człowieka i szczura

Narząd	Komórki	Receptor PRL forma długa i pośrednia człowiek		Receptor PRL forma długa i krótka szczur	
		+	[9]	++	[11,32]
Jądro	Komórki Leydiga	+	[9]	++	[11,32]
	Komórki Sertoliego	-	[9]	++	[8,11,32]
	Spermatogonie	+	[9]	++	[11,32]
	Spermatocyty	+	[9]	++	[11,32]
	Spermatydy	+	[9]	++	[11,32]
	Plemniki	-	[9]	++	[11]
Najądrze	Nabłonkowe	+	[9]	++	[32]
Nasieniowód	Nabłonkowe	+	[9]	++	
Pęcherzyki nasienne	Nabłonkowe	+	[9]	++	[32]
Prostata	Nabłonkowe	++	[9,31]	++	[32]

w komórkach nabłonka plemnikotwórczego: komórkach Sertoliego, spermatogoniach, spermatocytach, spermatydach i plemnikach [8, 11, 32]. Natomiast w najądrzu, pęcherzykach nasiennych i prostatie receptory PRL demonstrowano u tych gatunków w komórkach nabłonkowych [15, 31, 32, 33]. Ostatnio Hair i wsp. [9] przeprowadzili badania nad ekspresją receptora PRL w ludzkim jądrze i narządach dodatkowych. Po raz pierwszy wykazali oni lokalizację receptorów PRL w komórkach Leydiga i komórkach germinalnych, jak również w komórkach nabłonkowych najądrza, nasieniowodu, pęcherzyków nasiennych i prostaty. Interesujące wydaje się porównanie lokalizacji receptorów PRL w jądrze szczura [8, 11] i człowieka [9]. W ludzkim jądrze [9] komórki Leydiga wykazywały słabą reakcję immunohistochemiczną na receptor PRL w porównaniu z silną reakcją na ten receptor występującą w nabłonku plemnikotwórczym. Najsilniejszą reakcję immunohistochemiczną na receptor PRL wykazywały komórki od spermatocytów pachytenowych począwszy, poprzez kolejne stadia aż do wydłużających się spermatyd. Natomiast spermatogonie oraz spermatocyty leptotenowe i zygotenowe, jak również i plemniki nie wykazywały pozytywnej reakcji immunohistochemicznej na ten receptor. Ponieważ badania te zostały niedawno wykonane na materiale pochodzącym z sześciu biopsji ludzkich jąder, dalsze badania powinny być kontynuowane różnymi metodami w celu potwierdzenia tej lokalizacji. Przy użyciu metody immunohistochemicznej i RT PCR wykazano u człowieka obecność długiej formy receptora PRL w jądrze i formy długiej i pośredniej w prostatie [21].

## DZIAŁANIE PROLAKTYNY NA JĄDRO

Wpływ PRL na funkcję jądra był badany u różnych gatunków zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* [4, 26, 27, 30, 36]. Przyjmuje się, że PRL stymuluje funkcje jądra u większości ssaków [2]. W jądrze szczura komórki Leydiga są głównymi, docelowymi komórkami dla PRL i hormon ten utrzymuje w nich prawidłową morfologię. Komórki Leydiga mają receptory dla PRL i LH i hormony te uczestniczą w steroidogenezie [11, 32]. W świetle współczesnych badań wiadomo, że PRL może działać na dwóch różnych poziomach steroidogenezy jądra. Z jednej strony może zwiększać liczbę receptorów dla LH, a więc wrażliwość jądra na odpowiedź centralną, z drugiej może razem z LH, bezpośrednio stymulować syntezę androgenów i obniżać aktywność aromatazy. W komórkach Leydiga PRL, razem z LH, jest uznawana jako regulator steroidogenezy [2]. Przeprowadzone badania *in vitro* wykazały, że PRL w komórkach Leydiga szczura, może stymulować sekrecję zarówno testosteronu, jak i estradiolu i efekt ten może być modulowany nie tylko przez LH, ale także GH i T<sub>3</sub> [30]. Natomiast ostatnio, grupa badaczy fińskich, również w badaniach *in vitro*, wykazała polimorficzne, regulatorowe działanie PRL na mysie komórki Leydiga, zależne od czasu i dawki dodawanego hormonu i zaproponowała wewnątrzkomórkowy mechanizm działania PRL w tych komórkach [27].

Badania ostatnich lat wykazały obecność receptorów PRL, jak również mRNA dla tych receptorów, w komórkach nabłonka plemnikotwórczego szczura. Receptory

PRL zlokalizowano nie tylko w komórkach Sertoliego (forma długa i krótka) [8], ale także w komórkach germinalnych i plemnikach [11, 32]. Ze względu na wielkość swojej cząsteczki, PRL nie jest w stanie sama dotrzeć do przedziału adluminalnego kanalika krętego z powodu występowania bariery krew-jądro. W świetle tych faktów przyjmuje się, że komórki Sertoliego po związaniu się z PRL są transporterami tego hormonu do spermatocytów i spermatyd zlokalizowanych w przedziale adluminalnym. Badania te potwierdzają bezpośredni wpływ PRL na komórki germinalne zlokalizowane w tym przedziale [11]. Komórki Sertoliego mają receptory dla PRL, jak również dla FSH. Wykazano, że PRL stymuluje ilość receptorów dla FSH w komórkach Sertoliego, z kolei FSH reguluje ekspresję receptorów PRL formy długiej w tych komórkach [8]. Można zatem przyjąć, że PRL i FSH kontrolują aktywność komórek Sertoliego. Wyniki wielu badań wskazują, że PRL wpływa na różnicowanie się spermatocytów i na spermiację i może być uznawana jako potencjalny regulator spermatogenezy [8]. Wykazano ponadto, że u myszy PRL jest syntetyzowana w jądrze lokalnie i może działać jako autokrynowy i parakrynowy czynnik modulujący funkcję gonad [13]. Z przedstawionych doniesień wynika, że działanie PRL w jądrze związane jest z działaniem klasycznych gonadotropin, LH i FSH, przez ułatwienie i wzmocnienie działania tych hormonów w promowaniu pełnej jądrowej aktywności.

## **DZIAŁANIE PROLAKTYNY NA NAJĄDRZE, NASIENIOWÓD, PĘCHERZYKI NASIENNE I PLEMNIKI**

Wpływ PRL na najądrze, nasieniowód i pęcherzyki nasienne nie jest tak dobrze udokumentowany jak wpływ tego hormonu na jądro. Wykazano jednak obecność receptorów PRL w komórkach nabłonkowych tych narządów u szczura [32], daniela [15], a ostatnio również u człowieka [9]. Obecność receptorów PRL w tych komórkach sugeruje, że PRL jest mocno zaangażowana w regulację procesów sekrecji i absorpcji i kontrolę transportu płynów przez błonę komórkową, co jest zgodne z funkcją PRL w nabłonkach wielu innych gatunków. Badania na zwierzętach wykazały, że PRL działa razem z androgenami i stymuluje aktywność tych narządów [2].

Od wielu lat wiadomo, że najądrze jest narządem androgenozależnym. Wykryto w nim receptory dla wielu hormonów, również dla testosteronu (T), dwuhydrotestosteronu (DHT) [44] i dla PRL [49, 32]. Porównawcze badania immunohistochemiczne przeprowadzone przez Jabbour i wsp. [15] wykazały większą ekspresję receptora PRL w komórkach nabłonkowych najądrza aniżeli jądra, co może potwierdzać ważną rolę PRL w tym narządzie. Chociaż dokładna rola tego hormonu w najądrzu pozostaje jeszcze do wyjaśnienia, to od dawna postuluje się, że PRL w najądrzu pełni podobne funkcje jak w jądrze i gruczołach dodatkowych. W komórkach nabłonkowych najądrza PRL może działać jako regulator steroidogenezy. Wykazano, że hormon ten może modulować aktywność aromatazy i  $5\alpha$ -reduktazy katalizującej przejście T do DHT. PRL stymuluje również wychwytywanie testosteronu przez komórki nabłonkowe najądrza, jak również stymuluje produkcję steroidów najądrzowych. Ostatnio w

badaniach *in vitro* stwierdzono syntezę androgenów w komórkach nabłonkowych najądrza szczura [41], co potwierdza steroidogenny charakter tych komórek. W najądrzu ssaków PRL może jeszcze wpływać na wiele innych procesów [2]. Utrzymuje ona właściwy ciężar tego narządu oraz reguluje transport płynu przez najądrze. PRL moduluje również aktywność niektórych glikozydaz najądrzowych, które jak większość innych enzymów są androgenozależne. Hormon ten wpływa także na procesy związane z syntezą i sekrecją białek najądrzowych. Są również doniesienia o stymulującym wpływie PRL na wydzielanie kwasów sialowych u szczurów poddanych orchidektomii, jak również i takie, że przy całkowitym braku androgenów, PRL wpływa regenerująco na nieprawidłowe komórki nabłonkowe najądrza.

Pęcherzyki nasienne są ważnymi gruczołami w męskim układzie płciowym, ponieważ ich wydzielina stanowi dużą część ejakulatu. Gruczoły te są androgenozależne i również wykryto w nich receptory dla PRL [9, 32]. Podobnie jak w najądrzu, tak i w pęcherzykach nasiennych PRL stymuluje wiele procesów zachodzących w tych gruczołach, chociaż na niektóre wpływa hamująco. Wykazano, że PRL podwyższa stężenie lipidów w wydzielinie pęcherzyków nasiennych, jak również stymuluje procesy lipogenezy i podwyższa aktywność kwaśnej fosfatazy w tych gruczołach, natomiast wpływa hamująco na procesy glikozylacji zachodzące w komórkach nabłonkowych [2].

W ciągu ostatnich kilku lat pojawiły się informacje o działaniu PRL na plemniki i nasienie. Badania na szczurach wykazały obecność receptorów PRL w tych komórkach [11], natomiast w ludzkich plemnikach Hair i wsp. [9] nie stwierdzili obecności tego receptora w badaniach immunohistochemicznych. Na podstawie różnych badań można przyjąć, że PRL zwiększa wiązanie  $Ca^{2+}$  do plemników oraz stymuluje transport ejakulowanych i najądrzowych plemników. Wykazano również, że hormon ten stymuluje metabolizm energetyczny plemników; podwyższa aktywność ATP-azy, stężenie fruktozy, jak również glikozylację, natomiast obniża zawartość  $Zn^{2+}$  [2, 35]. Od dawna wiadomo, że PRL jest obecna w plazmie nasienia i wpływa na różne funkcje plemników. Ludzkie nasienie zawiera wysokie stężenie PRL, 1,6 razy wyższe aniżeli w surowicy [35]. Sugeruje to, że PRL musi być syntetyzowana lokalnie lub jest aktywnie transportowana z osocza. Wykryto już pozaprzysadkowe źródła PRL, do których zalicza się również jądro i prostatę [13, 40]. Wydaje się, że PRL może być również syntetyzowana przez najądrze i pęcherzyki nasienne, ponieważ jej stężenie spada o około 50% po wazektomii, ale to wymaga jeszcze potwierdzenia i dalszych badań. PRL jest również proponowana jako odwracalny środek męskiej antykoncepcji. Badania przeprowadzone na psach [36] wykazały, że podawanie PRL w dawce 600 mg/kg m.c. przez 3 miesiące powoduje spadek ilości plemników aż do azoospermii, spadek ruchliwości tych komórek, jak również wzrost ilości plemników nieprawidłowych. Proces ten jednak jest odwracalny, ponieważ po 3 miesiącach po wycofaniu tego hormonu, zawartość spermy normalizuje się i psy zachodzą w ciążę.

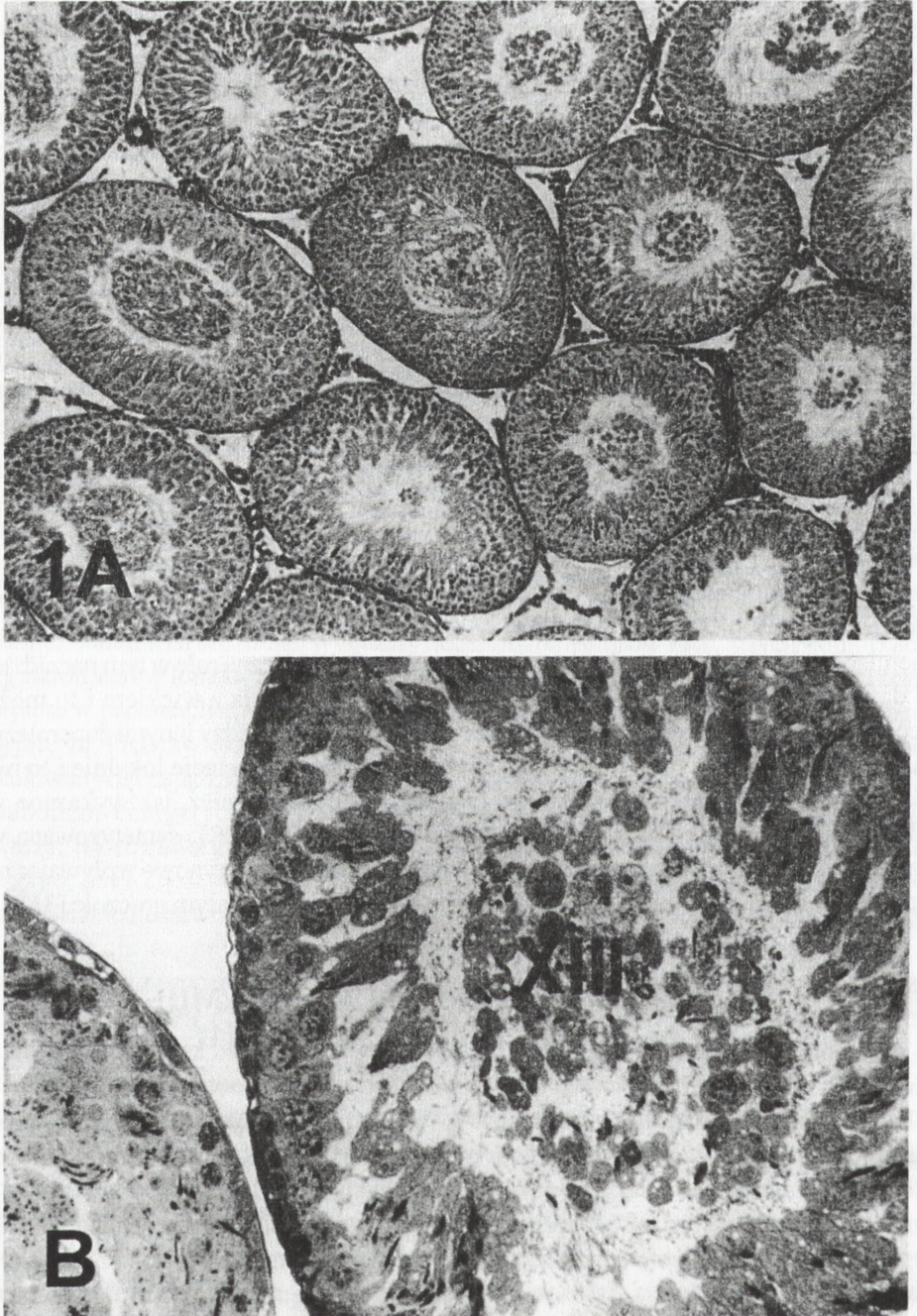
## DZIAŁANIE PROLAKTYNY NA PROSTATĘ

Działanie PRL na prostatę, z uwzględnieniem jej podziału na płaty, jest tak szerokie, że przekracza ramy tego artykułu, dlatego ograniczę się do przedstawienia najważniejszych informacji dotyczących wpływu PRL na ten gruczoł. Podobnie jak w jądrze, najądrzu i pęcherzykach nasiennych receptory PRL wykryto również w prostacie [9, 31, 32]. W badaniach *in vitro* wykazano, że androgeny i estrogeny stymulują ekspresję receptorów PRL w hodowanych komórkach nabłonkowych prostaty. PRL może wiązać się ze swoim receptorem bezpośrednio i stymulować aktywności 5 $\alpha$ -reduktazy. W ten sposób hormon ten zwiększa konwersję T do DHT w prostacie. Od wielu lat wiadomo, że PRL jest wymagana dla rozwoju prostaty i również stymuluje wzrost dojrzałego gruczołu. U gryzoni hormon ten może wzmacniać wpływ T na prostatę przez wzrost gęstości jądrowych receptorów androgenowych [35]. Są również doniesienia, że PRL może działać na prostatę niezależnie od T. W prostacie ssaków PRL wpływa także na wiele innych procesów [2]. Produkcja kwasu cytrynowego, pierwszorzędowa funkcja prostaty jest bezpośrednio zwiększana przez PRL przez stymulację syntezy tego kwasu i zahamowanie jego rozpadu. Również proliferacyjne i wydzielnicze funkcje komórek nabłonkowych prostaty są stymulowane przez PRL u człowieka i gryzoni. Reiter i wsp. [34] wykazali, że PRL, GH i LH, niezależnie lub synergistycznie z androgenami, odgrywają znaczącą, fizjologiczną rolę w tym narządzie. Od dawna już wiadomo, że stężenie PRL w surowicy wzrasta z wiekiem i to może mieć związek z rozwojem różnych procesów patologicznych, między innymi hiperplazją i rakiem prostaty [34]. PRL jest również syntetyzowana w prostacie lokalnie i to nie tylko w komórkach nabłonkowych tego gruczołu [31], ale również, jak wykazano w badaniach *in vitro*, w komórkach mięśniowych gładkich [40]. PRL syntetyzowana w prostacie lokalnie może działać autokrynowo, parakrynowo i intrakrynowo wpływając na wzrost i różnicowanie prostaty oraz na procesy sekrecyjne w dojrzałym gruczole [31].

## NASTĘPSTWA HIPERPROLAKTYNEMII W UKŁADZIE PŁCIOWYM MĘSKIM

W odniesieniu do fizjologicznych stężeń PRL hypoprolaktynemia jest spotykana stosunkowo rzadko [22], natomiast podwyższone stężenia PRL są często przyczyną hiperprolaktynemii, która może mieć różną etiologię [6, 17, 25, 43].

Następstwem hiperprolaktynemii w jądrze może być zaburzenie czynności gonad, jak również niepłodność, która manifestuje się takimi objawami, jak: osłabienie potencji, a nawet całkowitą impotencją, osłabieniem libido, oligozoospermią, azoospermią, czasami niskim stężeniem testosteronu i hipogonadyzmem. Trudne jest jednak wyjaśnienie mechanizmu, który prowadzi do zaburzeń płodności u mężczyzn z hiperprolaktynemią tylko na podstawie wyników badań klinicznych. Dlatego wiele doświadczeń przeprowadzono na zwierzęcych. modelach hiperprolaktynemii [23, 24, 25, 36].



RYCINA 1. Przekroje przez kanaliki kręte jądra szczura z hiperprolaktynemi wywołan metokopramidem (A i B). W świetle kanałów zluszczone komórki plemnikotwórcze. Spermatozoa stopnia 13 luźno tkwi w nabłonku plemnikotwórczym w kanaliku w stadium XIII (B) PAS, pow. 160 x (A), 670x (B)



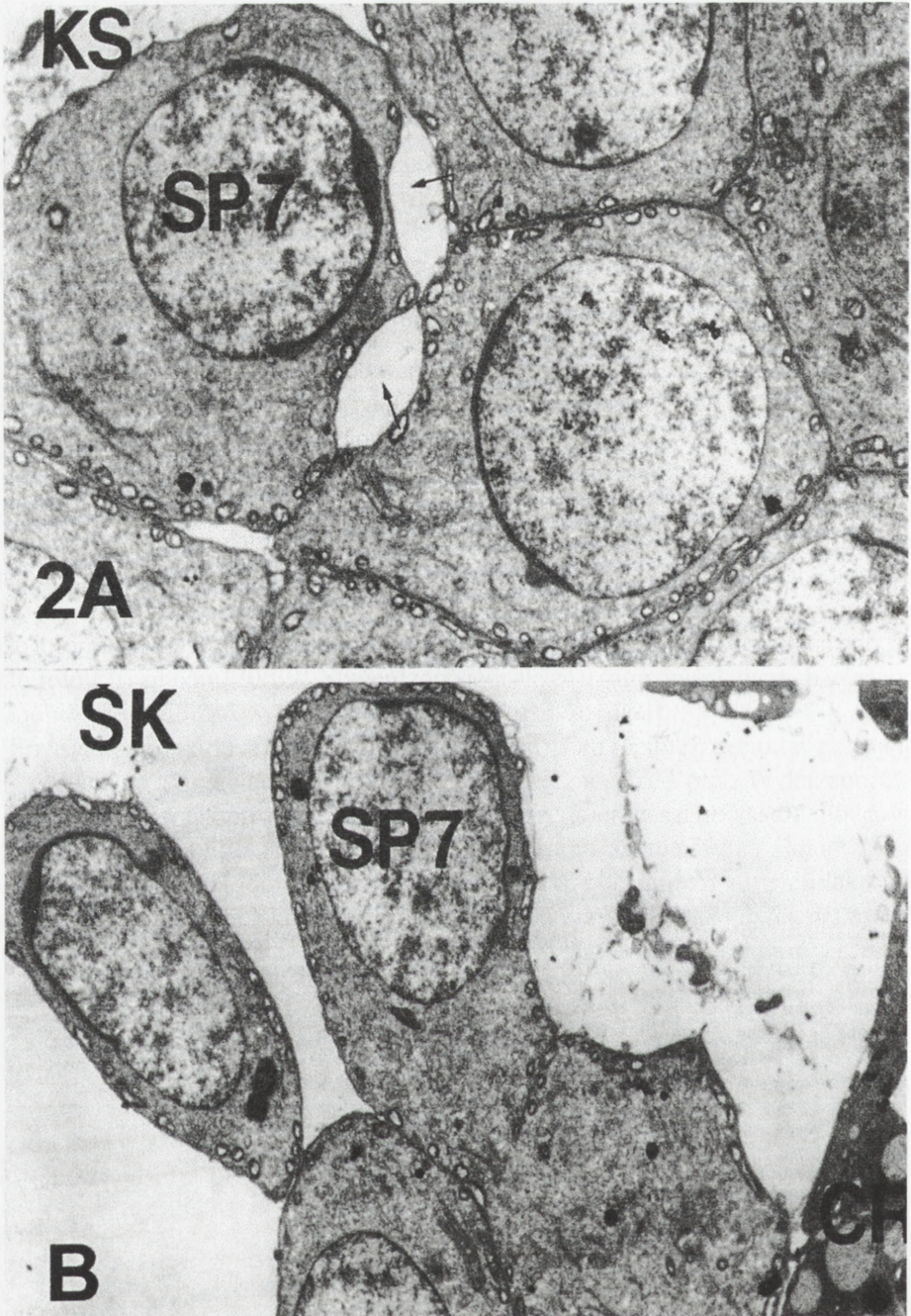
Badania przeprowadzone na szczurach wykazały w jądrze przedwczesne uwalnianie do światła kanalików krętych niedojrzałych komórek plemnikotwórczych (ryc. 1) w wyniku zaburzenia budowy połączeń między nimi a komórkami Sertoliego, tzw. specjalizacji komórek Sertoliego [23]. W badaniach tych stwierdzono również nieprawidłowe ustawienie akrosomów wydłużających się spermatyd w stosunku do błony podstawnej. To mogło być przyczyną zaburzenia budowy połączeń między komórkami Sertoliego a tymi spermatydami i przedwczesnego ich uwalniania do światła kanalika. Obserwowano również uwalnianie młodszych (okrągłych) spermatyd do światła kanalika (ryc. 2). Uwolnione do światła spermatydy często wykazywały zmiany struktur budujących wstawkę plemnika, brak aksonemy, jak również zaburzenie lokalizacji włókien gęstych. W badaniach tych próbowano wyjaśnić mechanizm, za pomocą którego podwyższone stężenia PRL wkraczają w funkcję gonad. Objawem hiperprolaktynemii jest mała liczba plemników w najądrzu (ryc. 3). Badania w ME wykazały zmiany w budowie ultrastrukturalnej komórek nabłonkowych przewodu głowy i ogona najądrza szczurów z hiperprolaktynemią. Dotyczyły one głównie siateczki endo-plazmatycznej ziamistej, aparatu Golgiego, mitochondriów oraz powierzchni wydzielniczej tych komórek. W mikroskopie elektronowym skaningowym; obserwowano mniej wydzieliny, mniej mikroosmków, niskie i grube mikroosmki, a nawet ich brak, jak również fagocytozę plemników przez komórki nabłonkowe najądrza. To mogło się przyczyniać do mniejszej liczby plemników obserwowanych w świetle przewodu najądrza [23]. Stwierdzono również zmiany w plemnikach najądrzowych w następstwie hiperprolaktynemii i to w badaniach ultrastrukturalnych, jak i w mikroskopie świetlnym w odczynach histochemicznych na okydoreduktazy zlokalizowane we wstawce plemników [23, 24].

## PODSUMOWANIE

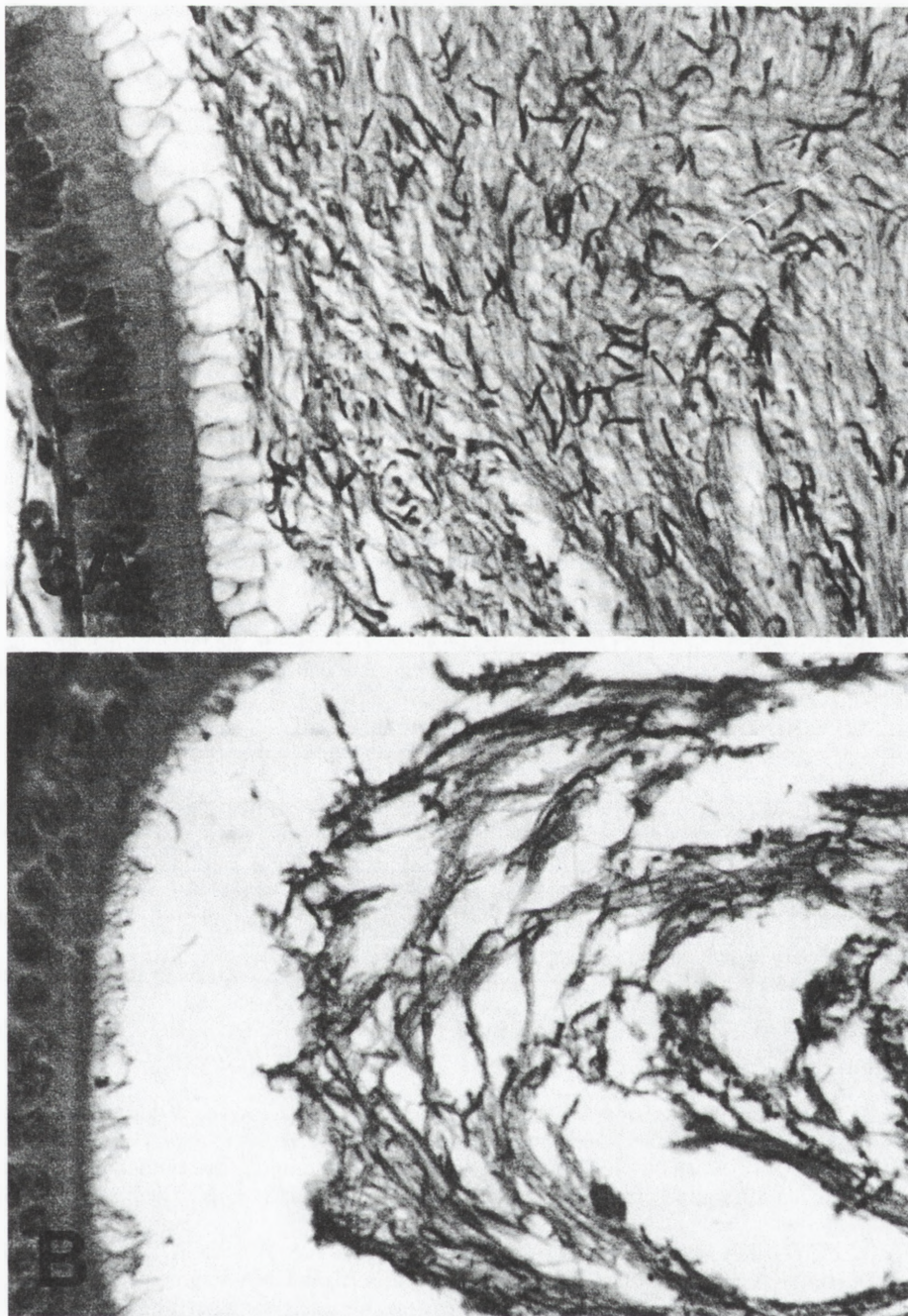
Mechanizm działania PRL w układzie płciowym męskim nie jest tak dobrze poznany jak w układzie rozrodczym samicy. Należy jednak mieć nadzieję, że już następne badania przyczynią się do szczegółowego wyjaśnienia tego mechanizmu.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] BEN-JONATHAN N, HNASKO R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 2001; **22**: 724–763.
- [2] 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. *Endocr Rev* 1998; **19**: 225–268.
- [3] CAVACO B, PRAZERES S, SANTOS MA, SOBRINHO LG, LEITE V. Hyperprolactinemia due to big prolactin is differentially detected by commercially available immunoassays. *J Endocrinol Invest* 1999; **22**: 203–208.
- [4] CHANDRASHEKAR V, BARTKE A, AWONIYI CA, TSAI-MORRIS CH, DUFAU ML, RUSSELL LD, KOPCHICK JJ. Testicular endocrine function in GH receptor gene disrupted mice. *Endocrinology* 2001; **142**: 3443–3450.



RYCINA 2. Odrywające się spermatydy stopnia 7 (SP7) do światła kanalika krętego szczura z hiperprolaktynemią wywołaną metoklopramidem (A i B). Częściowy brak połączeń między spermatydą a komórką Sertoliego (strzałka). Światło kanalika (SK), ciało resztkowe (CR), komórka Sertoliego (KS), pow. 4200 x (A), 3500 x (B)



RYCINA 3. Przekrój przez głowę najądrza szczura kontrolnego (A) i ogon najądrza szczura z hiperprolaktynią wywołaną metoklopramidem (B). Mało plemników w świetle przewodu ogona najądrza (B), pow. 670 x (A, B)

- [5] CIERESZKO R. Mechanizm działania prolaktyny w układzie rozrodczym samicy. *Post Biol Kom* 2001; **28** supl.: 57–67.
- [6] DICKSON RA, GLAZER WM. Neuroleptic-induced hyperprolactinemia. *Schizophr Res* 1999; **35**: S75–S86.
- [7] FREEMAN ME, KANYICSKA B, LERANT A, NAGY G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Phys Rev* 2000; **80**: 1523–1631.
- [8] GUILLAUMOT P, BENAHMED M. Prolactin receptors are expressed and hormonally regulated in rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 1999; **149**: 163–168.
- [9] HAIR WM, GUBBAY O, JABBOUR HN, LINCOLN GA. Prolactin receptor expression in human testis and accessory tissues: localization and function. *Mol Hum Reprod* 2002; **8**: 606–611.
- [10] HENTGES S, SARKAR DK. Transforming growth factor- $\beta$  regulation of estradiol-induced prolactinomas. *Frontier Neuroendocrinol* 2001; **22**: 340–363.
- [11] HONDO E, KUROMARU M, SAKAI S, OGAWA K, HAYASHI Y. Prolactin receptor expression in rat spermatogenic cells. *Biol Reprod* 1995; **52**: 1284–1290.
- [12] HUANG WJ, YEH J-Y, TSAI S-CH, LIN H, CHIAO Y-CH, CHEN J-J, LU CH-CH, HWANG S-W, WANG S-W, CHANG LS, WANG PS. Regulation of testosterone secretion by prolactin in male rats. *J Cell Biochem* 1999; **74**: 111–118.
- [13] IMAOKA T, MATSUDA M; MORI T. Expression of prolactin messenger ribonucleic acid in the mouse gonads during sexual maturation. *Life Sci* 1998; **63**: 2251–2258.
- [14] IWASAKA T, UMEMURA S, KAKIMOTO K, KOIZUMI H, OSAMURA YR. Expression of prolactin mRNA in rat mammary gland during pregnancy and lactation. *J Histochem Cytochem* 2000; **48**: 389–395.
- [15] JABBOUR HN, CLARKE LA, Mc NEILLY AS, EDERY M, KELLY PA. Is prolactin a gonadotropic hormone in red deer (*Cervus elaphus*)? Pattern of expression of the prolactin receptor gene in the testis and epididymis. *J Mol Endocrinol* 1998; **20**: 175–182.
- [16] JABBOUR HN, LINCOLN GA. Prolactin receptor expression in the testis of the ram: localization, functional activation and the influence of gonadotropin. *Mol Cell Endocrinol* 1999; **148**: 151–161.
- [17] JESKE W, ZDUNOWSKI P, BARTOSIEWICZ Z, KONDRACKA A, GORZELAK K, ZGLICZYŃSKI W, SZCZUPACKA I. Large molecular weight in patients with hyperprolactinemia. *Endokrynol Pol* 2000; **51**: 237–248.
- [18] KAMIŃSKA B, OPAŁKA M, CIERESZKO RE, DUSZA L. The involvement of prolactin in the regulation of adrenal cortex function on pigs. *Dom Anim Endocrinol* 2000; **19**: 147–157.
- [19] KANYICSKA B, LERANT A, FREEMAN ME. Endothelin is an autocrine regulator of prolactin secretion. *Endocrinology* 1998; **139**: 5164–5173.
- [20] KANYICSKA B, SELIX MT, FREEMAN ME. Autocrine regulation of prolactin secretion by endothelins. *Endocrine* 2001; **16**: 133–137.
- [21] KLINE JB, ROEHRS H, CLEVENGER CV. Functional characterization of the intermediate isoform of the human receptor. *J Biol Chem* 1999; **274**: 35461–35468.
- [22] LAFUENTE A, ALVAREZ-DEMANUEL E, MARQUEZ N, ESQUIFINO AI. Pubertal dependent effects of cadmium on episodic prolactin secretion in male rats. *Arch Toxicol* 1999; **73**: 60–63.
- [23] LASZCZYŃSKA M. Struktura i funkcja jądra i narządów dodatkowych w doświadczalnej hiperprolaktynemii wywołanej metoklopramidem. *Ann Acad Med Stetin, Suppl* 1997; **36**: 1–84.
- [24] LASZCZYŃSKA M, PIASECKA M, KRAM A. Alterations in the mitochondria of rat spermatozoa after experimental hyperprolactinemia. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; **37**: 87–88.
- [25] LASZCZYŃSKA M, SŁUCZANOWSKA-GŁĄBOWSKA S, PIASECKA M, SKOWRON J, DĘBIŃSKA-SZYMAŃSKA T. Germ cells with nuclear DNA fragmentation related to apoptotic cells in rat testis in experimental hyperprolactinemia induced by metoclopramide. *Folia Histochem Cytobiol* 2002; **40**: 163–164.
- [26] LINCOLN GA, TOWNSEND J, JABBOUR HN. Prolactin actions in the sheep testis: a test of the primiting hypothesis. *Biol Reprod* 2001; **65**: 936–943.

- [27] MANNA PR, EL-HEFNAWY T, KERO J, HUHTANIEMI T. Biphasis action of prolactin in the regulation of murine Leydig tumor cell function. *Endocrinology* 2001; **142**: 308–318.
- [28] MANZON LA. The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *Gen Comp Endocrinol* 2002; **125**: 291–310.
- [29] MAO JN, BURNSIDE J, LI L, TANG J, DAVOLOS C, COGBURN LA. Characterization of unique truncated prolactin receptor transcripts, corresponding to the intracellular domain, in the testis on the sexually mature chicken. *Endocrinology* 1999; **40**: 1165–74.
- [30] MARAN RRM, ARUNAKARAN J, ARULDHAS MM. Prolactin and Leydig cells: biphasis effects of prolactin on LH-, T- and GH-induced testosterone/ oestradiol secretion by Leydig cells in pubertal rats. *Int J Androl* 2001; **24**: 48–55.
- [31] NEVALAINEN MT, VALVE EM, INGLETON PM, NURMI M, MARTIKAINEN PM, HÄRKÖNEN PL. Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J Clin Invest* 1997; **99**: 618–627.
- [32] OUHTIT A, MOREL G, KELLY PA. Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in rat reproductive tissues. *Biol Reprod* 1993; **49**: 528–536.
- [33] PEIRCE SK, CHEN WY. Quantification of prolactin receptor mRNA in multiple human tissues and cancer cell lines by real time RT-PCR. *J Endocrinol* 2001; **171**: R1–R4.
- [34] REITER E, HENNUY B, BRUYNINX M, CORNET A, KLUG M, MC NAMARA M, CLOSSET J, HENNEN G. Effects of pituitary hormones on the prostate. *Prostate* 1999; **38**: 159–165.
- [35] SARAPURA VD. Prolactin normal physiology. [w] Wierman ME [red.] Contemporary Endocrinology, Vol. 3: Diseases of the Pituitary: Diagnosis and Treatment. Totowa, NJ: Humana Press Inc 1997: 43–70.
- [36] SHAFIK A. Prolactin injection, a new contraceptive method: experimental study. *Contraception* 1994; **50**: 191–199.
- [37] SINHA YN. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 1995; **16**: 354–369.
- [38] TAKAHASHI S. Development and heterogeneity of prolactin cells. *Int Rev Cytol* 1995; **157**: 33–98.
- [39] TOKITA R, NAKATA T, KATSUMATA H, KONISHI S, ONODERA H, IMAKI J, MINAMI S. Prolactin secretion in response to prolactin-releasing peptides and the expression of the prolactin releasing peptides gene in the medulla oblongata are estrogen dependent in rats. *Neurosci Lett* 1999; **276**: 103–106.
- [40] UNTERGASSER G, RUMPOLD H, PLASE E, WITKOWSKI M, BERGER P. Seminal plasma factors induce *in vitro* PRL secretion in smooth muscle cells of the human prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 5577–5584.
- [41] WISZNIEWSKA B. Steroidogenic characteristics of *in vitro* cultured epididymal epithelial cells of the rat. *Reprod Biol* 2001; **1**: 60–66.
- [42] YU-LEE L-Y. Molecular actions of prolactin in the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; **215**: 35–52.
- [43] ZGLICZYŃSKI W, ZDUNOWSKI P, JESKE W, BRZEZIŃSKI J, KRÓLICKI L. Przyczyny hiperprolaktynemii: różnicowanie mikroprolaktynoma z przerostem przysadki. *Endokrynol Pol* 2000; **51**: 211–224.
- [44] ZHU LJ, HARDY MP, INIGO IV, HUHTANIEMI I, BARDIN CW, MOO-YOUNG AJ. Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Reprod* 2000; **63**: 368–376.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 30.10. 2002 r.

Przyjęto: 24.11. 2002 r.

Adres autora: ul. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin











# INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron druku i do 100 pozycji bibliograficznych koniecznie z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi);

2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach druku z kilkoma pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);

3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie z podwójnym odstępem. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s.) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rycin. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następujące przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.] Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rycin powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. **Barwne ryciny i zdjęcia są płatne.** Wymiary poszczególnych rycin, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko 1. autora i oznaczenie góry i dołu ilustracji. Jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora. Od stycznia 2003 r. Redakcja wprowadza **odpłatność 300,- zł za artykuł nie przekraczający 15 str. druku.**

Redakcja prosi także o dołączenie tytułu artykułu i podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin	Treść pracy nie była uprzednio publikowana, nie została wysłana do innej redakcji	<i>tak nie</i>	<i>tak nie</i>
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę	Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego	<i>tak nie</i>	<i>tak nie</i>
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście	z komputera IBM	<i>tak nie</i>	<i>tak nie</i>

Odpowiadam za całość pracy opisanej w załączonym maszynopisie *tak nie*

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w „Postępie Biologii Komórki” przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

*podpisy wszystkich autorów*

TREŚĆ – CONTENTS

STARCZEWSKI A., KURZAWA R., SZYDŁOWSKA I.: Znaczenie jajowodów w rozrodzie The role of oviduct in a reproduction	1
WISZNIEWSKA B., MARCHLEWICZ M.: Hormony najądrza Epididymal hormones	13
PIASECKA M.: Zastosowanie cytometrii przepływowej do oceny kondensacji i integralności DNA plemników ludzkich Application of flow cytometry to evaluate of human sperm DNA condensation and integrity	25
ŁASZCZYŃSKA M.: Rola prolaktyny w układzie płciowym męskim Role of prolactin in male reproductive system	45

*Indeks 369705*

**Warunki prenumeraty kwartalnika PBK**

***Prenumerata na rok 2003***

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2003 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](mailto: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 2003:  
dla instytucji (bibliotek) wynosi 150 zł,  
dla odbiorców indywidualnych 50 zł.

***Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2003***

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](mailto: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 25 dollars USA