

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Biologii Komórki

**Izabela Skibińska**

**Molekularne mechanizmy działania  $17\beta$ -estradiolu,  
genisteiny i bisfenolu A na plemniki ludzkie**

Praca doktorska

**Promotor: dr hab. med. Małgorzata Kotwicka**

Poznań 2011

*Pani dr hab. med. Małgorzacie Kotwickiej*

*serdecznie dziękuję*

*za umożliwienie wykonania pracy, wskazanie  
bardzo interesującego tematu, wszystkie cenne  
wskazówki i uwagi podczas wykonywania  
analiz oraz za cierpliwość i wyrozumiałość*

*Składam serdeczne podziękowania*

*Pracownikom Katedry Biologii Komórki  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego  
w Poznaniu za wszelką pomoc i życzliwość*

# SPIS TREŚCI

## WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

1. WSTĘP .....	1
1.1. Wprowadzenie .....	1
1.2. Estrogeny i receptory estrogenowe .....	2
Estrogeny – struktura i funkcja .....	2
Struktura i rodzaje receptorów estrogenowych .....	4
Lokalizacja receptorów estrogenowych .....	8
1.3. Molekularne mechanizmy działania estrogenów .....	10
1.3.1 Genomowy mechanizm działania estrogenów .....	10
1.3.2. Niegenomowe działanie estrogenów .....	12
1.4. Biologia plemników ludzkich .....	19
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY .....	24
2.1. Założenia pracy .....	24
2.2. Cel pracy .....	25
3. MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ .....	26
3.1. Materiał .....	26
3.2. Metodyka badań .....	27
3.2.1. Przygotowanie nasienia .....	27
3.2.2. Immunohistochemiczna ocena ekspresji receptorów estrogenowych .....	27
3.2.3. Ocena żywotności plemników oraz procesu błonowej translokacji fosfatydyloseryny .....	28
3.2.4. Kinetyka zmian stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych .....	28
3.2.5. Analiza błonowego potencjału mitochondrialnego .....	29
3.2.6. Detekcja mitochondrialnego anionorodnika nadadtlenkowego .....	30
3.2.7. Technika pomiarów w cytometrze przepływowym .....	30
3.2.8. Analiza statystyczna .....	31
4. WYNIKI .....	32
4.1. Ekspresja receptorów estrogenowych w plemnikach ludzkich i knurów .....	32
4.2. Wpływ 17 $\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na żywotność i błonową translokację fosfatydyloseryny plemników ludzkich .....	34

4.3. Wpływ 17 $\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na kinetykę zmian stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w plemnikach ludzkich	37
4.4. Wpływ 17 $\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na błonowy potencjał mitochondrialny plemników ludzkich	45
4.5. Wpływ 17 $\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na poziom mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego	52
5. DYSKUSJA	55
5.1. Ekspresja receptorów estrogenowych typu 1. i 2. w plemnikach ludzkich i knurów	55
5.2. Wpływ estrogenów i ksenoestrogenów na żywotność plemników	58
5.3. Wpływ 17 $\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapniowych	62
5.4. Wpływ 17 $\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na mitochondria plemników	65
6. WNIOSKI	70
7. PIŚMIENNICTWO	71
8. STRESZCZENIE	86
9. ABSTRACT	88

## WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

<b>2OHE2</b>	2-hydroksyestradiol
<b>3'UTR</b>	3'-region niekodujący translacji
<b>4OHE2</b>	4-hydroksyestradiol
<b>5'UTR</b>	5'-region niekodujący translacji
<b>ADP</b>	adenozynodifosforan
<b>AF-1</b>	motyw odpowiedzialny za aktywację transkrypcji bez wiązania liganda ( <i>transcriptional activity function-1</i> )
<b>AF-2</b>	motyw odpowiedzialny za aktywację transkrypcji przez ligand ( <i>transcriptional activity function-2</i> )
<b>ALDOA</b>	A izoforma aldolazy 1
<b>An-V</b>	aneksyna V
<b>An-V/PI<sup>-</sup></b>	plemniki niewiążące aneksyny-V, niebarwiące się jodkiem propidionowym
<b>An-V/PI<sup>+</sup></b>	plemniki niewiążące aneksyny-V, barwiące się jodkiem propidionowym
<b>An-V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup></b>	plemniki wiążące aneksynę-V, niebarwiące się jodkiem propidionowym
<b>An-V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup></b>	plemniki wiążące aneksynę-V, barwiące się jodkiem propidionowym
<b>An-V-FITC</b>	aneksyna-V znakowana fluoresceiną
<b>AP</b>	alkaliczna fosfataza ( <i>alkaline phosphatase</i> )
<b>AP-1</b>	białko mające zdolność wiązania się z receptorem estrogenowym typu 1. ( <i>activating protein 1</i> )
<b>ART</b>	techniki rozrodu wspomaganego ( <i>assisted reproduction techniques</i> )
<b>ATP</b>	adenozynotrójfosforan
<b>ATP6,8</b>	podjednostki kompleksu ATPazy V
<b>Bcl-2</b>	białko antyapoptotyczne
<b>BSA</b>	surowicza albumina wołowa ( <i>bovine serum albumin</i> )
<b>cAMP</b>	cykliczny adenozynomonofosforan
<b>CATSPER</b>	specyficzne dla plemników kanały wapniowe
<b>COX 1,2,3</b>	podjednostki oksydazy cytochromowej
<b>CREB</b>	mitochondrialny czynnik transkrypcyjny aktywowany w odpowiedzi na cAMP ( <i>cyclic-AMP response element</i> )
<b>c-SRC</b>	protoonkogenna kinaza tyrozynowa ( <i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase</i> )
<b>CTCF</b>	ewolucyjnie zachowany motyw palca cynkowego ( <i>an evolutionary conserved zinc finger protein</i> )
<b>Cyt b.</b>	cytochrom b
<b>DAG</b>	diacyloglicerol
<b>DBD</b>	domena wiążąca DNA ( <i>DNA binding domain</i> )
<b>DES</b>	dietylstilbestrol
<b>DNA</b>	kwasy deoksyrybonukleinowe
<b>E2</b>	17β-estradiol
<b>EGFR</b>	receptor nabłonkowego czynnika wzrostu ( <i>epidermal growth factor receptor</i> )
<b>ERE</b>	swoisty element odpowiedzi na estrogeny ( <i>estrogen response element</i> )
<b>ESR</b>	receptory estrogenowe
<b>ESR1</b>	receptor estrogenowy typu 1.
<b>ESR2</b>	receptor estrogenowy typu 2.
<b>Fluo-3</b>	marker fluorescencyjny wolnych wewnątrzkomórkowych jonów wapnia
<b>FSC</b>	sygnały rozproszenia pod małym kątem ( <i>forward scatter</i> )
<b>GAPDH</b>	dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego
<b>GFR</b>	receptor dla czynnika wzrostu ( <i>growth factor receptor</i> )

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	nadtlenek wodoru
<b>HDL</b>	lipoproteina o wysokiej gęstości ( <i>high density lipoprotein</i> )
<b>HK1S</b>	heksokinaza 1
<b>HSP</b>	białka szoku termicznego ( <i>heat shock proteins</i> )
<b>IGF-1</b>	insulinopodobny czynnik wzrostu 1 ( <i>insulin-like growth factor-1</i> )
<b>IL-6</b>	interleukina 6 ( <i>interleukin-6</i> )
<b>IP<sub>3</sub></b>	1,4,5-trifosfoinozytol
<b>JC-1</b>	5,5',6'6'-czterochloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl
<b>LBD</b>	domena wiążąca ligand ( <i>ligand binding domain</i> )
<b>LDHA</b>	dehydrogenaza mleczanowa A
<b>LDL</b>	lipoproteina o niskiej gęstości ( <i>low density lipoprotein</i> )
<b>MAPK</b>	kinaza białkowa aktywowana mitogenem ( <i>mitogen activated protein kinase</i> )
<b>mCU</b>	mitochondrialny uniporter wapniowy
<b>MNAR</b>	modulator niegenomowej aktywności receptorów estrogenowych ( <i>modulator of nongenomic action of estrogen</i> )
<b>mRNA</b>	matrycowe RNA ( <i>messenger RNA</i> )
<b>mtDNA</b>	mitochondrialne DNA
<b>mtNOS</b>	mitochondrialna syntaza tlenu azotu
<b>NADH</b>	zredukowany dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
<b>ND (1-6)</b>	podjednostki kompleksu dehydrogenazy NADH
<b>NF-κB</b>	czynnik transkrypcyjny mający zdolność wiązania się z ESR1 ( <i>nuclear factor kappa B</i> )
<b>NLS</b>	sygnał lokalizacji jądrowej ( <i>nuclear localization signal</i> )
<b>NO</b>	tlenek azotu
<b>OXPHOS</b>	kompleksy systemu fosforylacji oksydacyjnej
<b>PI</b>	jodek propidionowy
<b>PI3K</b>	kinaza 3-fosfatydyloinozytolu ( <i>phosphoinositide-3 kinase</i> )
<b>PIP<sub>2</sub></b>	fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan
<b>PIP<sub>3</sub></b>	fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan
<b>piRNA</b>	małe niekodujące RNA charakterystyczne dla komórek linii germinalnej ( <i>piwi RNA</i> )
<b>PKA</b>	białkowa kinaza A ( <i>protein kinase A</i> )
<b>PS</b>	fosfatydyloseryna
<b>PST</b>	błonowa translokacja fosfatydyloseryny ( <i>membrane translocation of phosphatidylserin</i> )
<b>PTK</b>	kinaza tyrozynowa
<b>RA</b>	reakcja akrosomowa
<b>RAC3</b>	koaktywator ESR ( <i>receptor associated coactivator 3</i> )
<b>RaM</b>	szybki mechanizm pobierania jonów wapniowych ( <i>rapid mode of Ca<sup>2+</sup> uptake</i> )
<b>RFT</b>	reaktywne formy tlenu
<b>RID</b>	domena koaktywatorów, umożliwiająca im wiązanie się z receptorem ( <i>receptor interacting domain</i> )
<b>RNA</b>	kwasy rybonukleinowe
<b>rpm</b>	liczba obrotów rotora wirówki na minutę ( <i>revolutions per minute</i> )
<b>rRNA</b>	rybosomalny RNA
<b>RTA</b>	repressor tamoksifenu ( <i>repressor of tamoxifen activity</i> )
<b>SHBG</b>	globulina wiążąca hormony steroidowe ( <i>sex hormone binding globulin</i> )
<b>siRNA</b>	małe interferencyjne RNA
<b>sncRNA</b>	małe niekodujące RNA ( <i>small noncoding RNA</i> )
<b>snoRNA</b>	małe jąderkowe RNA ( <i>small nucleolar RNA</i> )

<b>SP1</b>	białko mające zdolność wiązania się z ERS1 ( <i>specificity protein 1</i> )
<b>SRC</b>	koaktywator receptorów hormonów steroidowych ( <i>steroid receptor coactivator</i> )
<b>SSC</b>	sygnał rozproszenia pod dużym kątem ( <i>side scatter</i> )
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	transformujący czynnik wzrostu $\alpha$ ( <i>transforming growth factor-<math>\alpha</math></i> )
<b>tiRNA</b>	małe RNA ( <i>tiny RNA</i> )
<b>TNF</b>	czynnik martwicy nowotworów ( <i>tumor necrosis factor</i> )
<b>tRNA</b>	transportujący RNA
<b>VEGF</b>	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
<b>WHO</b>	Światowa Organizacja Zdrowia ( <i>World Health Organisation</i> )
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	błonowy potencjał mitochondrialny



# 1. WSTĘP

## 1.1. Wprowadzenie

Szacuje się, że niezamierzona bezdzietność, zaliczana przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) do chorób społecznych, obejmuje około 10-18% par starających się o potomstwo. Przyjmuje się, że w 40-60% przypadków za przyczynę niepowodzeń w rozrodzie odpowiedzialny jest czynnik męski [8, 42].

Postuluje się, iż wśród wielu czynników wpływających niekorzystnie na wartość biologiczną nasienia ważnym elementem jest ekspozycja mężczyzny na ksenoestrogeny – estrogeny obcego pochodzenia (z greckiego *xeno* – obcy). Ksenoestrogeny zaliczane są do grupy tzw. „zakłócaaczy szlaków endokrynych” (ang. *endocrine disruptors*). Są to związki chemiczne, które ze względu na swoją strukturę mogą wchodzić w interakcje z układem hormonalnym, wykorzystując szlaki transdukcji sygnału endogennych hormonów [12, 107, 220, 246].

Rola estrogenów w męskim układzie rozrodczym jest przedmiotem intensywnych badań. Wykazano, że estrogeny są kluczowe dla prawidłowego rozwoju męskiego układu rozrodczego i przebiegu procesu spermatogenezy. Ich istotną rolę potwierdza obecność i heterogenna lokalizacja receptorów estrogenowych w licznych tkankach męskiego organizmu [41, 59, 149, 220].

W świetle aktualnego stanu wiedzy przyjmuje się, że komórkami docelowymi dla działania estrogenów są również plemniki ludzkie. Molekularne mechanizmy działania hormonów steroidowych na plemniki nie są jednak do końca scharakteryzowane.

Ze względu na specyficzną strukturę gamet męskich (DNA skoncentrowane do postaci parakrystalicznej, brak procesu transkrypcji) zakłada się, że steroidy działają na plemniki wyłącznie na drodze niegenomowej poprzez receptory błonowe. Sugeruje się, że podobnie jak to ma miejsce w komórkach somatycznych, estrogeny mogą również wpływać na funkcje obecnych w plemnikach mitochondriów. Nie można wykluczyć, że ksenoestrogeny środowiskowe, wykorzystując podobne szlaki transdukcji sygnału, mogą wpłynąć na biologię gamet męskich.

## 1.2. Estrogeny i receptory estrogenowe

### *Estrogeny – struktura i funkcja*

Endogenne estrogeny (17 $\beta$ -estradiol, estron i estriol) to hormony steroidowe, które biogenetycznie i strukturalnie wywodzą się z cholesterolu. Powstają przez aromatyzację androgenów – androstenodionu (estron) i testosteronu (estradiol). Wieloetapowa transformacja cholesterolu do estrogenów skutkuje redukcją liczby atomów węgla w cząsteczce (z 27 na 18). Proces ten zachodzi dzięki działaniu enzymów utleniających z grupy cytochromu P450. Zlokalizowane są one głównie w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Działanie aromatazy, pełniącej funkcję demetylasy usuwającej zwornikową grupę metylową (C19), to ostatni etap biogenetycznej transformacji estrogenów. Poszczególne estrogeny różnią się między sobą ustawieniem grup hydroksylowych. Ich cząsteczki są silnie hydrofobowe i lipofilne. Pozwala im to na naturalne przenikanie przez barierę krew – mózg. Struktura lipofilna pozwala dodatkowo na przenikanie przez błonę komórkową bezpośrednio do cytozolu. Estrogeny uwalniane są z miejsc syntezy w stanie niezwiązanym i tylko w takiej formie wykazują aktywność biologiczną, we krwi natomiast pozostają związane z białkami surowicy. Estron wiąże się w 90% z albuminami, a estradiol z globuliną wiążącą hormony steroidowe (SHBG; ang. *sex hormone binding globulin*) [91, 240].

Estrogenem o największej aktywności biologicznej jest 17 $\beta$ -estradiol. Najważniejszym jego źródłem są komórki ziarniste jajnika. Niewielkie ilości estradiolu powstają również w tkankach docelowych na drodze konwersji z estronu lub aromatyzacji dihydroandrosteronu i testosteronu. Estron, w stosunku do 17 $\beta$ -estradiolu, wykazuje około 5 do 10 razy mniejszą aktywność biologiczną. Podstawowym jego źródłem jest obwodowa konwersja z androstendionu. Estriol jest najsłabszym z estrogenów powstającym głównie jako produkt metabolizacji estradiolu i estronu [110].

Estrogeny zaliczane są do hormonów plejotropowych. Kluczową rolą estrogenów jest warunkowanie kształtowania się drugo- i trzeciorzędowych cech płciowych u kobiet. Funkcja ta związana jest z ich wpływem na rozwój: macicy, jajowodów, pochwy, sutka i zewnętrznych narządów płciowych. Estrogeny pobudzają proces proliferacji komórek podścieliska błony śluzowej macicy oraz wzrost jej masy mięśniowej. Stymulują również wzrost i dojrzewanie komórek nabłonkowych pochwy i jajowodów. Dodatkowo, będąc aktywatorami syntezy

prostaglandyn, wpływają na perystaltykę i czynność skurczową macicy i jajowodów [57, 214, 236].

Estrogeny wykazują wielokierunkowe działanie również w organizmie męskim. Regulują rozwój układu płciowego męskiego, a także funkcję dojrzałych jąder oraz innych narządów płciowych. Są również odpowiedzialne za warunkowanie męskich zachowań płciowych [59].

Estrogeny wykazują korzystny wpływ na układ sercowo-naczyniowy. Za pośrednictwem tlenku azotu (NO), endotelin i prostaglandyn rozszerzają naczynia krwionośne (np. naczynia wieńcowe). Kształtują one profil lipidowy krwi; obniżają stężenie cholesterolu całkowitego, zwiększają stężenie lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL, ang. *high density lipoprotein*) i zmniejszają stężenie lipoprotein o niskiej gęstości (LDL, ang. *low density lipoprotein*). Niedobór estrogenów powoduje wzrost stężenia wolnych kwasów tłuszczowych we krwi [55, 89, 188].

Ponadto stwierdzono, że estrogeny, wpływając na przepuszczalność błon komórkowych, zwiększają nawodnienie tkanek, poprawiając elastyczność skóry i funkcjonowanie błon śluzowych. Odgrywają także dużą rolę w procesie rozmieszczenia tkanki tłuszczowej w organizmie kobiety [163]. Estrogeny zwiększają także poziom biosyntezy białek w wątrobie, w tym substratu dla reniny i fibrynogenu. Powodują obniżenie stężenia glukozy we krwi poprzez wpływ na komórki beta trzustki i zwiększenie wątrobowego klirensu insuliny [10].

Estrogeny wpływają również w istotny sposób na układ mięśniowo-szkieletowy. Poprzez działanie antagonistyczne w stosunku do parathormonu, estrogeny zapobiegają nadmiernej resorpcji kości. Wskazuje się, że wpływając w bezpośredni sposób na kompleksy białek miofibrylarnych, są w stanie modulować siłę skurczów mięśniowych [172]. Postuluje się, że estrogeny mogą aktywować i pobudzać proliferację komórek satelitarnych, stymulując proces naprawy uszkodzonych włókien mięśniowych. Występujące w okresie menopauzy obniżenie poziomu estrogenów skutkuje między innymi osteoporozą, spadkiem siły i masy mięśniowej oraz wydłużonym okresem regeneracji włókien mięśniowych [74].

Efekt plejotropowy estrogenów przejawia się również w ich wielokierunkowym oddziaływaniu na układ nerwowy – od wpływu na fenotypowe różnicowanie neuroblastów, modulowanie neurotransmisji (głównie cholinergiczej) po neurogenezę, synaptogenezę, regenerację elementów układu nerwowego oraz szeroko rozumianą neuroprotekcję. Estrogeny są niezwykle istotne w zwiększaniu czynności hipokampa, struktury mózgu biorącej udział w zapamiętywaniu. Dowiedziono, że opóźniają pojawianie się zaburzeń funkcji poznawczych

w chorobie Alzheimera. Estrogeny regulują także stany emocjonalne oraz funkcje kognitywne i uczenie się (pamięć deklaratywna) [91, 154, 186, 193].

Znana jest również rola estrogenów w procesie kancerogenezy. Hormony te pobudzają rozwój i wzrost nowotworów poprzez zwiększenie proliferacji komórek, indukcję białek receptorowych i nasilenie syntezy DNA. Estrogeny zaburzają też funkcje układu immunologicznego oraz zmieniają metabolizm substancji kancerogennych [17, 48, 69, 100, 135, 218].

### *Struktura i rodzaje receptorów estrogenowych*

Estrogeny działają na komórki docelowe poprzez receptory estrogenowe (ESR), należące do rodziny receptorów jądrowych. Receptory te pełnią rolę czynników transkrypcyjnych wpływających na ekspresję określonych genów. Pod wpływem ESR rośnie ekspresja genów kodujących białka stymulujące proces proliferacji, sprzyjające przeżyciu oraz wzrostowi nowotworów [49]. Zaliczamy do nich między innymi geny kodujące: receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (IGF-1, ang. *insulin-like growth factor-1*) [157], cyklinę D1 [37], antyapoptotyczne białko Bcl-2 [33], czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) [70] czy transformujący czynnik wzrostu  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ , ang. *transforming growth factor- $\alpha$* ) [54]. Aktywne formy ESR mogą również wpłynąć na hamowanie ekspresji genów. Proces taki obserwujemy szczególnie w stosunku do genów, które kodują białka hamujące proces transkrypcji oraz białek o właściwościach antyproliferacyjnych czy antyangiogennych [202, 254].

Istnieją dwa typy receptorów estrogenowych: receptor estrogenowy typu 1. (ESR1) oraz receptor estrogenowy typu 2. (ESR2)<sup>1</sup>. Oba receptory są aktywne biologicznie i wykazują różną specyficzność tkankową, inny wzór aktywacji genów oraz odmienne powinowactwo do ligandów egzo- i endogennych. Receptor typu 1. kodowany jest przez gen zbudowany z ośmiu eksonów, natomiast typu 2. z dziewięciu. Gen receptora typu 1. (*ESR1*), zlokalizowany został w części q24-q27 chromosomu 6. i zbudowany jest z 488,3 tysięcy par zasad. Receptor estrogenowy typu 2. kodowany jest przez gen *ESR2* zmapowany w prążku q23.2 chromosomu 14. Gen ten zbudowany jest z 61,2 tysięcy par zasad [63, 73, 95, 110, 154, 182].

---

<sup>1</sup> Według najnowszych wytycznych dotyczących ujednoczenia nazw genów i kodowanych przez nie białek zaleca się dla opisu różnych typów receptora estrogenowego nazwy: receptor estrogenowy typu 1. (wcześniej określany jako receptor estrogenowy typu  $\alpha$ ) oraz receptor estrogenowy typu 2. (wcześniej określany jako receptor estrogenowy typu  $\beta$ ).

ESR1 i ESR2, podobnie jak inne receptory jądrowe, składają się z sześciu domen, oznaczanych literami od A do F (ryc. 1.). Domena A/B, znajdująca się na aminowym końcu białka, zawiera motyw AF-1 odpowiedzialny za aktywację transkrypcji (ang. *transcriptional activation function 1*). Motyw AF-1 jest niezależny od przyłączenia liganda, ale specyficzny dla tkanki i promotora. Wskazuje się, że aktywność motywu AF-1 receptora estrogenowego typu 1. jest bardzo niska i nie odgrywa istotnego znaczenia w funkcjonowaniu białka. Domena A/B stanowi również miejsce wiązania koaktywatorów (SRC, ang. *steroid receptor coactivator*).

Domena C obu typów receptorów jest najbardziej konserwatywna. Odpowiada za dimeryzację receptora oraz przyłączanie kompleksu ligand-receptor do swoistej sekwencji DNA (domena DBD, ang. *DNA binding domain*). Domena DBD posiada dwa motywy tzw. palców cynkowych, które są wynikiem koordynacyjnego wiązania jonów cynkowych ( $Zn^{2+}$ ) z czterema resztami cysteiny łańcucha polipeptydowego. Jeden z motywów przyłącza się w miejscu dużego rowka DNA w promotorze genu docelowego, natomiast drugi stabilizuje to wiązanie dzięki interakcji z resztami fosforanowymi nukleotydów [177].

Domena zawiasowa (domena D) posiada także pewne właściwości wiązania DNA. Zawiera ona sygnał lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localisation signal*). W domenie tej występuje tzw. rejon giętki receptora, który umożliwia rotację domeny wiążącej DNA o  $180^\circ$  w stosunku do innych domen.

Domena E, znajdująca się na końcu karboksylowym białka, zawiera sekwencję odpowiedzialną za przyłączenie swoistego liganda (LBD, ang. *ligand binding domain*). Mieszczącemu się w niej motywowi AF-2 (ang. *transcriptional activity function 2*) przypisuje się funkcję transkrypcyjną aktywowaną przez ligand. Domena E umożliwia również dimeryzację receptorów jądrowych.

Funkcja C-końcowej domeny F receptorów estrogenowych nie została w pełni wyjaśniona. Rejon ten najprawdopodobniej odpowiedzialny jest za rozróżnianie agonistów i antagonistów estrogenów oraz aktywację transkrypcji [63, 110, 240].

Istnieją liczne izoformy ESR1 i ESR2, których powstanie jest wynikiem alternatywnego składania (ang. *alternative splicing*) [18, 77, 160]. Ponieważ ESR1 i ESR2 zbudowane są z charakterystycznych domen, należy oczekiwać, że białka receptorowe pozbawione pewnych obszarów będą pełnić odmienne funkcje.

AF-1	DBD	NLS	LBD	AF-2
A/B	C	D	E	F
H <sub>2</sub> N				COOH
aktywność transkrypcyjna	wiązanie DNA	lokalizacja jądrowa	zawiera kieszonkę wiążącą ligand	aktywacja transkrypcji
interakcja z koregulatorami	dimeryzacja receptorów	elastyczność cząsteczki umożliwiającą zmianę konformacji przestrzennej	wiązanie z białkami szoku cieplnego dimeryzacja i lokalizacja receptora interakcja z koregulatorami aktywność transkrypcyjna	rozróżnianie agonistów i antagonistów
18% homologii ESR1 i ESR2	97% homologii ESR1 i ESR2	30% homologii ESR1 i ESR2	59% homologii ESR1 i ESR2	18% homologii ESR1 i ESR2

**Ryc. 1.** Schemat budowy receptorów estrogenowych z uwzględnieniem funkcji poszczególnych domen. Oznaczenia: AF-1 – motyw odpowiedzialny za aktywację transkrypcji 1, DBD – domena wiążąca DNA; NLS – sygnał lokalizacji jądrowej, LBD – domena wiążąca ligand, AF-2 – motyw odpowiedzialny za aktywację transkrypcji 2 (za [63] i [240], we własnej modyfikacji).

Izoformy mRNA *ESR1* powstają jako efekt alternatywnego składania fragmentów łańcucha w obrębie 5'-regionu niekodującego translacji (5'UTR) oraz kilku pierwszych eksonów położonych powyżej kodonu start (AUG). Początkowo wyodrębniano kilka wariantów *ESR1*, które mimo różnic w sekwencji miały tę samą masę cząsteczkową 66 kDa [77]. Aktualnie wyróżnia się również warianty *ESR1* o masie 46 kDa, powstające jako efekt rozpoczęcia translacji od wewnętrznego kodonu metioninowego cząsteczki mRNA. Białko to wykazuje brak aminokwasów zakodowanych w pierwszym eksonie genu *ESR1*. Wariant ten ma zdolność tworzenia heterodimerów z formą natywną *ESR1*, jednak z powodu zablokowania w nim domeny AF-1 powstały heterodimer nie jest w pełni funkcjonalny [160].

W aktualnym piśmiennictwie wyróżnia się pięć wariantów splicingowych *ESR2*, z których większość została wykryta w nowotworach estrogenozależnych. Sugeruje się, że niektóre z wariantów splicingowych *ESR2* (wariant 4. i wariant 5.), mogą tworzyć heterodimery z izoformą pierwszą *ESR2*, nasilając jej zdolność aktywowania transkrypcji w mechanizmie

niezależnym od liganda. Izoforma druga ESR2 posiada zdolność hamowania zależnej od liganda aktywności transkrypcyjnej ESR1, tworząc z nią heterodimer. Istnieją doniesienia wskazujące, że wariant 2. ESR2 nie może wiązać estradiolu a także, że preferencyjnie tworzy heterodimery z ESR1, nie zaś z innymi wariantami ESR2. W pewnych przypadkach raka piersi zaobserwowano, że alternatywne warianty mRNA dla ESR2 wykazują wyższą ekspresję niż forma natywna receptora. Stwierdzono ponadto, że niektóre izoformy ESR2, posiadają delecję eksonów 5 i/lub 6, czego konsekwencją jest brak domeny wiążącej ligand. Tworząc heterodimer z ESR1 całkowicie blokują aktywność transkrypcyjną takiego kompleksu [63, 95, 160, 228].

Podobnie jak u ludzi, również u szczura zidentyfikowano pięć izoform ESR2 [248]. Istnieją znaczne rozbieżności struktury receptorów, które uniemożliwiają jednoznaczne odnalezienie odpowiedników u obu gatunków. Fakt ten sugeruje, iż może istnieć wysoka specyficzność gatunkowa w tym zakresie lub, że jeszcze wiele izoform receptora nie zostało scharakteryzowanych. Istnienie tak wielu izoform receptorów estrogenowych niesie ze sobą potencjalną możliwość zróżnicowania w sile przyłączenia liganda, oddziaływania z odpowiednią sekwencją w promotorze genu docelowego, a także aktywności transkrypcyjnej. Jest zatem bardzo prawdopodobne, iż zmiana w poziomie ekspresji poszczególnych izoform ESR komórki może być wykorzystywana jako istotny element regulujący komórkową odpowiedź na estrogeny [110].

Receptory estrogenowe wykazują odmienne powinowactwo wobec różnych ligandów. Stwierdzono, że  $17\beta$ -estradiol wykazuje większe powinowactwo do ESR1 niż do ESR2. Podobnie estron łączy się preferencyjnie z ESR1, natomiast estriol z ESR2. Różnice te wynikają między innymi z faktu, iż kieszeń wiążąca ligand w ESR2 jest znacznie mniejsza niż analogiczny fragment receptora ESR1 [19, 60, 105]. Ten sam ligand, w zależności od tego, czy połączy się z ESR1 czy z ESR2, może pełnić raz rolę agonisty, innym zaś razem – antagonisty. Jest to również zależne od promotora genu, do którego przyłącza się kompleks ligand-receptor. Zależność tę można prześledzić na przykładzie estradiolu. Występując w kompleksie z ESR2, może on pełnić rolę agonisty poprzez aktywację transkrypcji genu witellogeniny. Może być też antagonistą – hamując transkrypcję genu czynnika martwicy nowotworów (TNF, ang. *tumor necrosis factor*) [87, 110, 113]. Również w przypadku fitoestrogenów (estrogeny pochodzenia roślinnego) powinowactwo do ESR zależy od rodzaju fitohormonu, typu receptora oraz gatunku zwierzęcia. Na przykład genisteina (popularny fitoestrogen zawarty w roślinach strączkowych np. w soi), z silnym powinowactwem wiąże się z ESR2. Inne typy fitoestrogenów,

które w stosunku do genisteiny cechują się brakiem jednej (daidzeina, biochanina A) lub dwóch (formononetyna) grup hydroksylowych, wykazują zmniejszenie lub nawet całkowitą utratę zdolności wiązania do ESR2 [173, 182].

### *Lokalizacja receptorów estrogenowych*

Dystrybucja receptorów ESR1 i ESR2 wykazuje znaczne zróżnicowanie tkankowe. Bardzo często obydwie formy receptorów zlokalizowane są w tych samych tkankach, jednak często jeden z nich wykazuje zdecydowanie większy poziom ekspresji w porównaniu do drugiego. W przypadku ESR1 największy poziom ekspresji mRNA dla tego białka został stwierdzony w komórkach nabłonkowych [191, 192] i mięśniówce macicy [12, 230], komórkach podścieliska [64] i komórkach ziarnistych jajnika [191], gruczole sutkowym [111], komórkach zrębu [66] i komórkach epitelialnych prostaty [191, 192, 219], najądrzu [32], kardiomiocytach serca [90, 147], aorcie [269], nerce [29], osteoblastach i osteoklastach [30] oraz chondrocytach [273] w tkance kostnej, w hepatocytach wątroby [2], w komórkach chromofilnych nadnercza [22] i komórkach układu odpornościowego [145]. W mózgu wysoki poziom mRNA dla ESR1 wykazano w przysadce [82] i podwzgórzu [116], czyli w rejonach odpowiedzialnych za zachowanie rozrodcze [182]. W badaniach immunohistochemicznych w większości powyższych tkanek wzór ekspresji białka ESR1 odpowiadał ekspresji jego transkryptu, a białko zlokalizowane było głównie na terenie jądra komórkowego [110].

Najwyższy poziom ekspresji mRNA dla ESR2 zlokalizowano w jajniku – w komórkach podścieliska, komórkach tkalnych i ziarnistych [53, 123, 221]. Transkrypt dla ESR2 stwierdzono także w kardiomiocytach serca [65], komórkach ośrodkowego układu nerwowego (głównie w hipokampie) [267], oddechowego [171, 184], pokarmowego [38, 247] oraz moczowopłciowego (np. w prostatie) [191, 192, 198].

Współwystępowanie obydwu typów receptorów stwierdzono w jajniku i macicy [191], gruczole sutkowym [111], miocytach i fibroblastach serca [90], płucach [259], w pniu mózgu i rdzeniu kręgowym [257], a także komórkach Purkiniego w mózdzku [197]. Szeroko rozpowszechnione są również w komórkach układu immunologicznego, takich jak limfocyty [145], komórki dendrytyczne śledziony [270], a także komórki immunokompetentne innych tkanek, np. makrofagi [136] czy komórki Langerhansa skóry [155].



W narządach męskiego układu płciowego receptory estrogenowe, zarówno typu pierwszego jak i drugiego, również są szeroko rozpowszechnione [25, 44, 97, 191]. Lokalizacja ESR w organizmie mężczyzny jest jednak bardzo zróżnicowana w zależności od etapu rozwoju, przy czym na ogół ekspresja ESR2 jest silniejsza niż ESR1. Wskazuje się na obecność obu typów receptorów estrogenowych w dojrzałych plemnikach, jednak doniesienia na temat ich lokalizacji są niejednoznaczne [13, 206, 231].

**Tabela 1.** Rozmieszczenie receptorów estrogenowych typu 1. i 2. w męskim układzie rozrodczym z uwzględnieniem różnych etapach rozwoju organizmu (według [59]).

Narząd męskiego układu płciowego	Płodowe		Noworodkowe		Dojrzałe	
	ESR1	ESR2	ESR1	ESR2	ESR1	ESR2
Komórki Leydiga	+	++	++	++	+/-	++
Komórki Sertoliego	--	++	--	++	--	++
Przewodniki odprowadzające	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Komórki plemnikotwórcze	--	+++	--	++	--	+++
Komórki nabłonkowe najądrza	--	++	--	++	--	+++
Nasieniowód	--	++	--	++	--	+++
Pęcherzyk nasienny	?	?	+	++	+	++
Prostata	?	?	+	++	+	+++

Użyte oznaczenia: + słaba ekspresja ESR, ++ średnia ekspresja ESR, +++ silna ekspresja ESR, -- brak ekspresji ESR, +/- nie wszystkie komórki tego samego typu są ESR pozytywne.

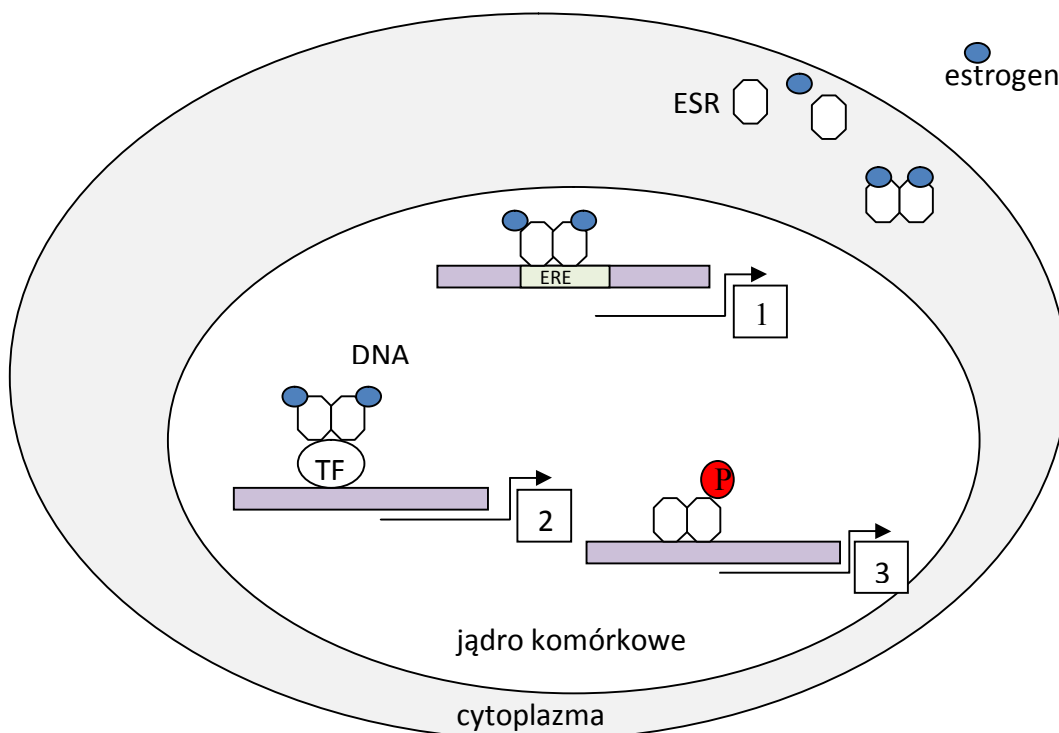
## 1.3. Molekularne mechanizmy działania estrogenów

### 1.3.1. Genomowy mechanizm działania estrogenów

Estrogeny, jako związki lipofilne, przechodzą do komórek docelowych na drodze dyfuzji. Występujące w cytoplazmie nieaktywne formy ESR1 i ESR2 są związane z dużym kompleksem białek opiekuńczych z rodziny białek szoku termicznego (HSP, ang. *heat shock proteins*), takich jak HSP70 i HSP90. Przyłączenie liganda do receptora aktywuje go. Zmiany konformacyjne, zachodzące podczas aktywacji receptora, powodują oddysocjowanie białek opiekuńczych, co umożliwia dimeryzację receptora. W tej formie receptory estrogenowe transportowane są do jądra komórkowego. ESR1 i ESR2 mogą tworzyć homodimery lub heterodimery. Homodimery ESR1 są przeważnie silniejszymi aktywatorami procesu transkrypcji niż homodimery ESR2. Heterodimery przy wysokim stężeniu hormonu wykazują aktywność zbliżoną do homodimerów ESR1, natomiast przy niższym stężeniu ich aktywność transkrypcyjna zdecydowanie maleje [26, 63, 110].

Receptory estrogenowe mogą wywierać swój wpływ na genom komórki w kilku mechanizmach (ryc. 2). Klasyczny mechanizm działania wiąże się z bezpośrednim wiązaniem dimerów ze swoistym elementem odpowiedzi na estrogeny (ERE, ang. *estrogen response element*), zlokalizowanym w promotorze genu docelowego. Ten fragment genu ma budowę odwróconych powtórzeń, czyli sekwencji palindromowych: 5'GGTCAnnnTGACC3', gdzie n oznacza dowolny nukleotyd. Jest to tak zwana sekwencja konsensusowa dla przyłączania ESR. Receptory estrogenowe łączą się również z sekwencjami ERE, które różnią się nieco budową od sekwencji konsensusowej. Wykryto na przykład, że ESR1 może przyłączyć się do sekwencji złożonej z jednej połowy palindromu ERE, która poprzedzona jest trójnukleotydową sekwencją TCA [110].

Drugi model działania receptorów estrogenowych dotyczy sytuacji, kiedy po połączeniu ESR z ligandem i utworzeniu dimeru, nie dochodzi do wiązania z ERE. Wskazuje się, że około jedna trzecia genów człowieka, których aktywność jest regulowana przez estrogeny, nie posiada sekwencji ERE. Alternatywne drogi działania estrogenów na genom są przedmiotem intensywnych badań [104].



**Ryc. 2.** Mechanizmy genomowego działania estrogenów. 1. Po utworzeniu kompleksu ligand-receptor dimer, łącząc się ze swoistym elementem odpowiedzi na estrogeny (ERE), wpływa na ekspresję genu docelowego. 2. Kompleks ligand-receptor nie łączy się z ERE, lecz łączy się z innymi czynnikami transkrypcyjnymi (TF) wiążącymi DNA. 3. Droga niezależna od przyłączenia liganda – fosforylacja receptora estrogenowego doprowadza do jego aktywacji i umożliwia mu połączenie z ERE (na podstawie [26], we własnej modyfikacji).

Jednym z mechanizmów transdukcji sygnału wykorzystywanym przez ESR, jest ich oddziaływanie z innymi czynnikami transkrypcyjnymi wiążącymi DNA. Przyłączenie dimeru ESR do czynnika transkrypcyjnego powoduje stabilizację kompleksu DNA-czynnik transkrypcyjny i/lub promuje rekrutację innych koaktywatorów inicjujących transkrypcję. Do czynników transkrypcyjnych, mających zdolność wiązania się z ESR1, zalicza się między innymi: białka SP1 (ang. *specificity protein 1*) i AP-1 (ang. *activating protein 1*) oraz czynnik NF- $\kappa$ B (ang. *nuclear factor kappa B*) [217, 133]. Do genów, które 17 $\beta$ -estradiol aktywuje poprzez interakcję receptora estrogenowego z czynnikiem transkrypcyjnym AP-1, należą między innymi geny kodujące kolagenazę [266], IGF1 [255] oraz cyklinę D [146, 216]. 17 $\beta$ -estradiol, poprzez utworzenie kompleksu ESR/AP-1, może również hamować transkrypcję genów zależnych od AP-1 np. genu dla acetylotransferazy cholinowej. W podobnym mechanizmie oddziaływania ESR z czynnikiem transkrypcyjnym SP1, regulowana jest ekspresja wielu genów, których promotor jest bogaty w sekwencje GC. Na tej drodze 17 $\beta$ -estradiol aktywuje między innymi

geny dla receptora LDL [143], c-fos [68] oraz cykliny D1 [43]. Z kolei poprzez czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B, 17 $\beta$ -estradiol powoduje hamowanie ekspresji genu kodującego interleukinę 6 (IL-6, ang. *interleukin 6*) [209].

Wskazuje się również na możliwość oddziaływania receptorów estrogenowych na genom w mechanizmie niezależnym od liganda. Postuluje się, że aktywowana czynnikami wzrostowymi kaskada kinaz proteinowych może wywołać fosforylację receptora estrogenowego, co doprowadza do jego aktywacji i umożliwia mu połączenie z ERE [26].

Aktywność transkrypcyjna receptorów estrogenowych, jak wspomniano wcześniej, jest kształtowana przez ich oddziaływanie z kofaktorami (koaktywatorami i korepresorami). Przyłączenie liganda do receptora estrogenowego indukuje zmiany konformacji domeny wiążącej ligand, co pozwala na wiązanie kofaktorów. W domenie LBD receptorów estrogenowych obecna jest charakterystyczna kieszeń hydrofobowa. Przy połączeniu ESR z agonistą, helisa 12 tej kieszeni zostaje zorientowana antyrównolegle w stosunku do helisy 11. Powoduje to ekspozycję hydrofobowego rowka i umożliwia wiązanie białek koregulacyjnych. Natomiast po połączeniu ESR z antagonistą, helisa 12 układa się w rowku hydrofobowym i uniemożliwia tym samym wiązanie kofaktorów [225].

### 1.3.2. Niegenomowe działanie estrogenów

#### *Transdukcja sygnału związana z błoną komórkową*

Jest wiele dowodów na to, iż estrogeny wykazują szybkie działanie, które nie może być poprzedzone aktywacją syntezy RNA i białek. Na obecnym etapie wiedzy przyjmuje się, że niegenomowy mechanizm działania hormonów steroidowych jest ich powszechną właściwością. Nie ma jednak jednego, uniwersalnego dla wszystkich steroidów mechanizmu działania. Niegenomowe systemy transdukcji wykorzystywane przez hormony steroidowe są zależne od rodzaju hormonu i komórki docelowej na którą działają [26, 61, 83, 258].

Szybkie efekty działania estrogenów z wykorzystaniem sygnalizacji błonowej były po raz pierwszy opisywane przez Clara Szego i June Davis'a w 1967 roku [239]. Badacze ci zaobserwowali stymulowany 17 $\beta$ -estradiolem szybki (pojawiający się po kilku sekundach) wzrost stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w komórkach macicy szczura. W kolejnej publikacji tego zespołu, która ukazała się 10 lat później w *Nature*, autorzy wskazywali na obecność specyficznych miejsc wiążących estrogeny w błonie komórkowej

komórek izolowanych z endometrium [195]. Musiało upłynąć jednak kolejnych 20 lat do czasu, kiedy stwierdzono, że w indukowane estradiolem szybkie odpowiedzi komórki zaangażowane są najprawdopodobniej klasyczne receptory estrogenowe. Norfleet i współpracownicy w 1999 roku, używając do immunohistochemicznej detekcji przeciwciał skierowanych przeciwko ESR1, wykazali w błonie komórkowej różnych komórek obecność białka bardzo podobnego do klasycznych, estrogenowych receptorów jądrowych [181]. Istnieją również prace, które podważają możliwość występowania klasycznych ESR w błonie komórkowej [250].

Badania z zastosowaniem antysensowych oligonukleotydów wskazują jednak, że błonowy receptor estrogenowy i klasyczny jądrowy ESR1 mają bardzo podobną strukturę. Dodatkowo badania prowadzone na komórkach izolowanych od myszy z nokautem ESR1/ESR2 wykazały, że są one pozbawione błonowych miejsc wiążących estrogeny oraz nie wykazują szybkiej odpowiedzi komórkowej na stymulację 17 $\beta$ -estradiolem [141, 190]. W dostępnym piśmiennictwie istnieje wiele prac wskazujących na obecność subpopulacji klasycznych, jądrowych receptorów ESR1 i ESR2 w błonie komórkowej [47, 211].

Zwraca się uwagę na fakt, że struktura białkowa klasycznych ESR nie zawiera domen transbłonowych charakterystycznych dla receptorów błonowych. Dlatego sugeruje się, że ESR dzięki potranslacyjnym modyfikacjom są tylko w błonie komórkowej zakotwiczone lub są powiązane z innymi białkami błonowymi. Kim i współpracownicy na podstawie przeprowadzonych analiz sugerują, że istnieją warianty splicingowe ESR, które sprawiają, że receptory stają się integralnymi białkami transbłonowymi. Wskazuje się między innymi na warianty splicingowe ESR1 (wariant 46 i 66), które pozbawione są domeny A/B [120].

Zakładając, że ESR wykazują lokalizację błonową powstaje pytanie, jakie są mechanizmy zarządzające ich migracją w kierunku błony?

Przyjmuje się, że maksymalnie 5-10% wszystkich receptorów estrogenowych komórki wykazuje lokalizację błonową [141]. W większości miejscem lokalizacji ESR jest błona komórkowa kaweoli<sup>2</sup> [46, 120]. Ponieważ te struktury błonowe mają specyficzny skład lipidowy, uważa się je za jeden z rodzajów tratw lipidowych<sup>3</sup> [104]. Kształt i formowanie się kaweoli jest najprawdopodobniej związany z obecnością specyficznego dla nich białka kaweoliny. Postuluje się, że kaweolina-1 pełni rolę kluczowego transportera ESR1 do błony

---

<sup>2</sup> Kaweole (z łac. *caveolae* – małe jaskinie), to występujące w wielu typach komórek (szczególnie w endotelialnych i w adipocytach) pęcherzykowate wpuklenia błony komórkowej o średnicy 50-100 nm.

<sup>3</sup> Tratwy lipidowe – heterogenne mikrodomeny błony komórkowej, cechujące się podwyższoną zawartością cholesterolu, glikolipidów i sfingolipidów, wykazujące inną niż reszta błony komórkowej płynność i grubość; struktura ich błony stwarza dogodne warunki do zakotwiczenia białek.

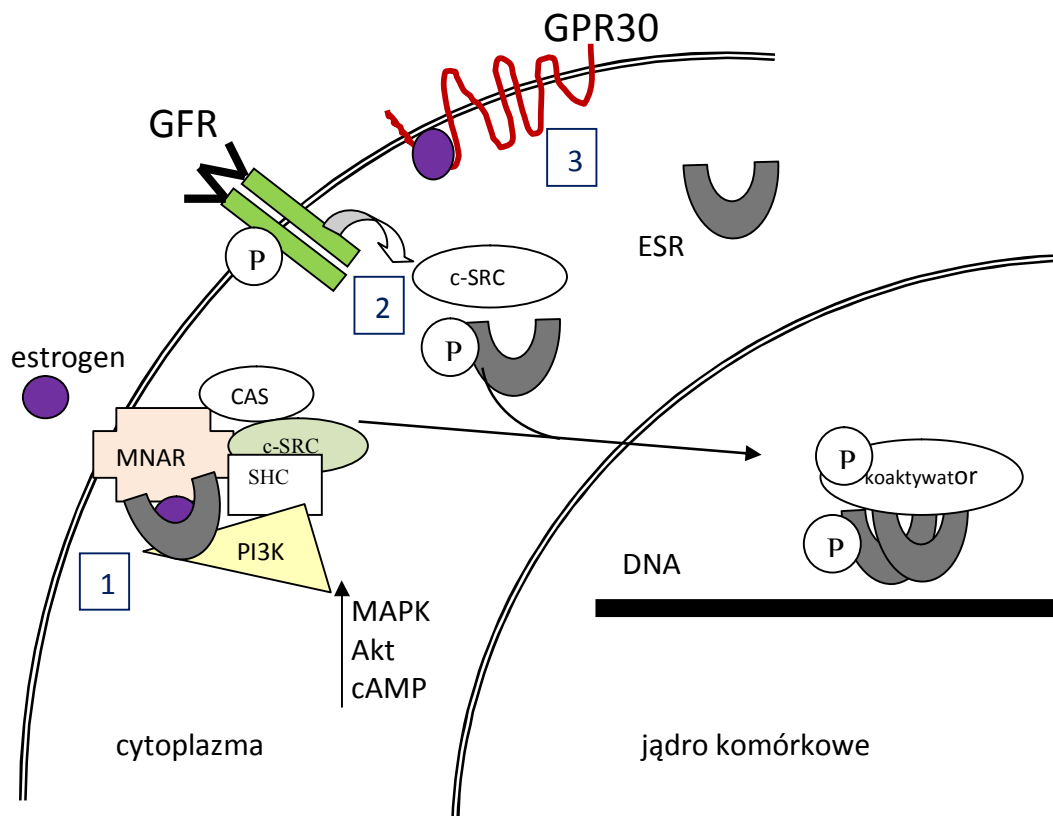
komórkowej. Oddziaływanie kaweoliny-1 z ESR1 możliwe jest dzięki potranslacyjnym modyfikacjom zachodzącym w monomerach ESR1.

Wiadomo, że białka, które kierowane są do cytoplazmy, mogą czasami ulegać zakotwiczeniu w błonie komórkowej od strony cytoplazmatycznej. Dzieje się tak np. po przyłączeniu kwasu palmitynowego do reszt cystein występujących wewnątrz łańcucha polipeptydowego. Utworzenie tego typu kotwicy palmitoilowej umożliwia nie tylko błonową lokalizację białek, ale również może mieć znaczenie regulatorowe. Wskazuje się, że proces palmitoilacji obejmuje również reszty cysteiny znajdujące się w domenie E receptora estrogenowego. Obecność motywu palmitoilowego wykazano w aminokwasach 445-453 domeny LBD. Palmitoilacja monomeru ESR1 umożliwia mu związanie kaweoliny-1, transport do kaweoli i zakotwiczenie w tratwach lipidowych błony komórkowej [141]. Wskazuje się, że w wiązanie kaweoliny-1 zaangażowana jest również seryna 522 domeny E. Znaczenie powyższych oddziaływań w błonowej lokalizacji ESR potwierdzają obserwacje wskazujące, że komórki pozbawione kaweoliny-1 wykazują tylko jądrową lokalizację ESR1 [210]. Mimo, że zjawisko to jest z pewnością kluczowe dla błonowej lokalizacji ESR, to jednak nie tłumaczy dlaczego tylko około 5-10% tych receptorów wykazuje lokalizację błonową, podczas gdy prawie 100% ESR zawiera motyw palmitoilowy.

Ponieważ ESR1 i ESR2 nie wykazują aktywności kinaz, dlatego dodatkowe molekuly muszą przenosić informacje z błonowego kompleksu ligand/ESR tworząc czytelny sygnał cytoplazmatyczny.

Białkiem, któremu przypisuje się funkcję koordynatora w transdukcji sygnału z ESR jest modulator niegenomowej aktywności receptorów estrogenowych (MNAR, ang. *modulator of nongenomic action of estrogen receptor*). MNAR łączy się poprzez ufosforylowaną tyrozyne z kinazą 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K, ang. *phosphoinositide-3 kinase*). Z domeną wiążącą ligand receptora estrogenowego łączy się on za pośrednictwem podobnej do koaktywatora sekwencji LXXLL, natomiast z kinazą tyrozynową c-SRC (ang. *proto-oncogene tyrosine-protein kinase*, nazwa krótka SRC pochodzi od słowa *sarkoma* - mięsak) poprzez motyw bogaty w prolinę [79].

Do białek, które wchodzi w interakcje z ESR, zalicza się również białko adaptorowe SHC i białko CAS. Przyjmuje się, że wydajność przekazywania sygnału z ESR rośnie dzięki MNAR, który zbliża do siebie wymienione powyżej cząsteczki (ryc. 3.) [79].



**Ryc. 3.** Błonowe systemy transdukcji sygnału wykorzystywane przez estrogeny. 1. Za pośrednictwem modulatora niegenomowej aktywności receptorów estrogenowych (MNAR), receptory estrogenowe zbliżają się do białek uczestniczących w transdukcji sygnału do cytoplazmy. 2. Aktywacja receptorów dla czynników wzrostu (GRF) wpływa na fosforylację ESR, co umożliwia mu wiązanie z DNA. 3. W błonie komórkowej obecne są receptory dla estrogenów GPR30, różniące się strukturą od klasycznych ESR. Pozostałe oznaczenia: PI3K – kinaza 3-fosfatydoinozytolu, c-SRC – kinaza tyrozynowa c-SRC, CAS i SHC – białka adaptorowe, MAPK – kinaza białkowa aktywowana mioginem, Akt – kinaza białkowa B (na podstawie [79] we własnej modyfikacji).

Wskazuje się, że alternatywą dla klasycznych receptorów estrogenowych jest nieklasyczny, błonowy receptor dla estrogenów GPR30. Uczestniczy on w szybkiej odpowiedzi komórek na estrogeny [117, 203, 265]. Obecność GPR30 wykazano w błonie komórkowej oraz w retikulum endoplazmatycznym keratynocytów i w komórkach raka piersi. Mimo, że GPR30 bierze udział w błonowej transdukcji sygnału estrogenów, to wykazuje on stosunkowo niską zdolność ich wiązania [249]. Inne doniesienia wskazują, że interakcje GPR30 z  $17\beta$ -estradiolem wymagają mikromolarnych stężeń hormonu [153]. Na obecnym etapie badań rola GPR30 jako receptora dla estrogenów jest ciągle kontrowersyjna.

Zwraca się również uwagę na możliwość współdziałania pomiędzy receptorami dla czynników wzrostu (GFR, z ang. *growth factor receptor*) i ESR. Wskazuje się, że aktywacja receptorów dla czynników wzrostu wpływa na pulę jądrową ESR. Proces ten zachodzi przez

aktywację fosforylacji receptorów ESR, a także ich koaktywatorów, w konsekwencji zaś prowadzi do transkrypcji wybranych genów. Postuluje się ponadto, że receptory błonowe dla niektórych czynników wzrostu, np. receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. *epidermal growth factor receptor*) czy receptor dla IGF (IGFR, ang. *insulin-like growth factor receptor*) mogą być w sposób pośredni lub bezpośredni aktywowane przez przybłonowe ESR [63].

Zaobserwowano, że estrogeny zwiększają aktywność cykazy adenylowej i produkcję cyklicznego AMP (cAMP) [14, 103, 211]. Aktywacja szlaku kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MAPK, ang. *mitogen activated protein kinase*) po ekspozycji na 17 $\beta$ -estradiol była opisywana w: komórkach raka piersi [164], komórkach endotelialnych [52] czy w osteoblastach [72, 106].

Często opisywany mechanizm niegenomowego działania estrogenów wiąże się z regulacją receptorów związanych z białkiem G. Sugeruje się, że odbywa się to poprzez wiązanie białek G ze ściśle określoną izoformą receptora estrogenowego [138, 142]. Przeprowadzone badania wskazują, że ESR1 może łączyć się z białkiem G $_{\alpha i}$  oraz z podjednostką G $_{\beta \gamma}$ , ale nie wykazuje takiej cechy w stosunku do podjednostki G $_{\gamma q}$  czy G $_{\alpha s}$ . W odniesieniu do ESR2 nie stwierdzono dotychczas, by wiązały się one z białkami G [240]. W osteoblastach, receptory estrogenowe poprzez interakcje z białkami G, mogą wpływać na aktywność fosfolipazy C. Prowadzi to do pojawienia się takich wtórnych przekaźników informacji, jak 1,4,5-trifosfoinozytol (IP $_3$ ) oraz diacyloglicerol (DAG). IP $_3$  wiąże się z receptorami zlokalizowanymi na błonie retikulum endoplazmatycznego, co powoduje uwalnianie z jego cystern wolnych jonów wapniowych. Wewnątrzkomórkowy wzrost stężenia wolnych jonów wapniowych prowadzi z kolei do aktywacji białkowej kinazy C (PKC) i drogi sygnałowej związanej z cyklazą adenylową i kinazą białkową A [137].

Zaobserwowano, że 17 $\beta$ -estradiol aktywuje sygnał transdukcji związany z kinazą 3-fosfatydyloinozytolu w komórkach raka piersi, komórkach endotelialnych i komórkach trzustki. Aktywowana estrogenami kinaza doprowadza do pojawienia się w komórce wtórnych przekaźników informacji takich jak fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (PIP $_2$ ) i fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforan (PIP $_3$ ) [26].



## *Wpływ estrogenów na mitochondria*

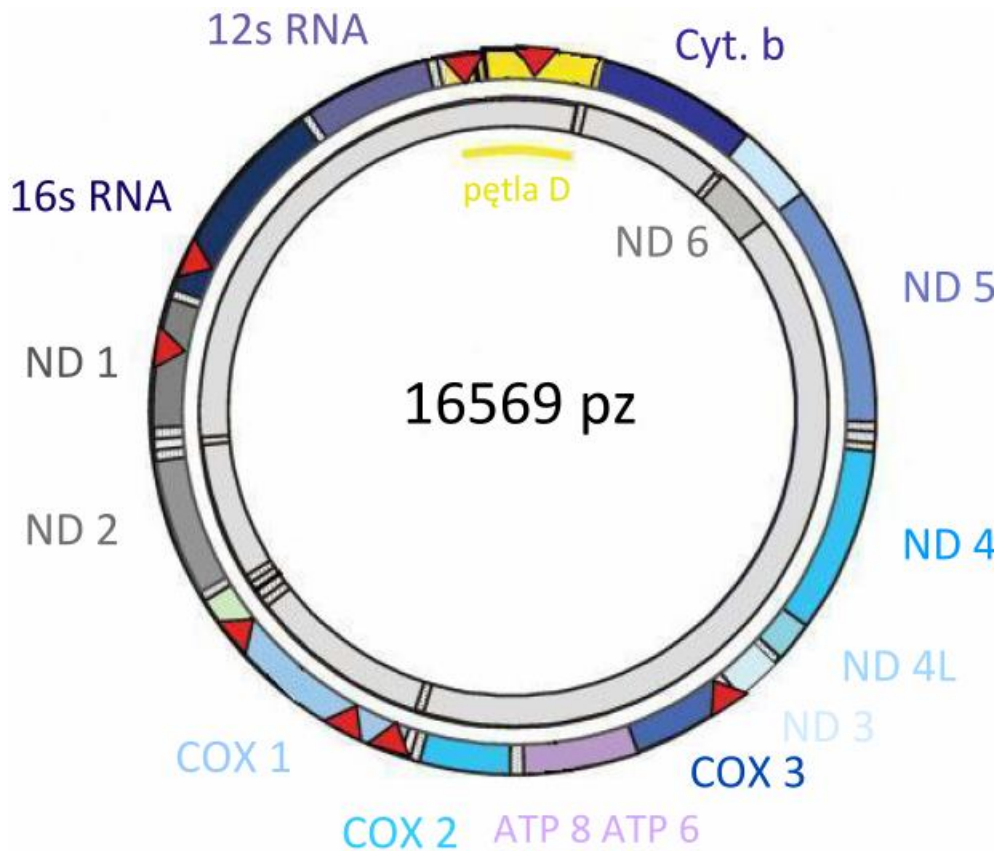
Na podstawie aktualnego stanu wiedzy należy przyjąć, że estrogeny mogą wpływać w bezpośredni sposób na funkcję mitochondriów, jednak mechanizm ten nie został do końca poznany [85, 207, 240, 246]. Stwierdzono, że do mitochondriów transportowane są estrogeny egzogenne. Zjawisku temu sprzyjają właściwości lipofilne tych związków. Wskazuje się, że w komórkach oprócz biernej dyfuzji, obecny jest również szybki mechanizm transportu estrogenów do mitochondriów, najprawdopodobniej na drodze endocytozy zależnej od receptora [50]. Przyjmuje się, że ze względu na dużą zawartość lipidów, mitochondria stanowią swoisty rezerwuar estrogenów komórki [76, 240].

W mitochondriach komórek somatycznych stwierdzono obecność ESR. Mimo, że często obecne były zarówno forma ESR1, jak i ESR2, większość mitochondriów wykazywała ESR2 jako formę dominującą. Analiza masy mitochondrialnych ESR2 wskazuje na występowanie różnych izoform receptora [199]. Mechanizmy sterujące transportem ESR do mitochondriów są słabo poznane.

Sugeruje się, że podobnie jak w jądrze komórkowym, ESR pełnią w mitochondriach rolę czynników transkrypcyjnych. Wykazano, że estrogeny wpływają na ekspresję genów mitochondrialnego DNA (mtDNA). Stwierdzono między innymi stymulowany estradiolem wzrost ekspresji genów kodujących białka mitochondrialnego łańcucha oddechowego np. w komórkach przysadki szczura stwierdzono wzrost mRNA dla podjednostki oksydazy cytochromowej (Cox 2), w komórkach raka piersi mRNA dla Cox 1 i 2, w komórkach hipokampa mRNA Cox 3, a w komórkach tarczycy szczurów wzrost mRNA Cox 3, Cox 4, podjednostek kompleksu dehydrogenazy NADH (ND 1, 4, 5, 6) oraz mRNA podjednostki 16S rybosomów [24, 85, 205]. Obserwowanemu po stymulacji estrogenami wzrostowi poziomu mRNA, często towarzyszył wzrost aktywności kodowanego przez nie białka [235].

Proponuje się kilka mechanizmów, poprzez które estrogeny wpływają na genom mitochondrialny. Po pierwsze wskazuje się, że w niekodujących fragmentach niektórych mitochondrialnych genów znajdują się miejsca wiążące ESR podobne do ERE, które występują na genach jądrowych (ryc. 4). Przepuszczalne sekwencje ERE, głównie o charakterze połowicznych palindromów, były identyfikowane w kilku mitochondrialnych genach np. genach kodujących pętle -D, 12s-rRNA, Cox 1 i 2, tRNA dla glicyny oraz podjednostkę 4 i 5 dehydrogenazy NADH [200]. W dostępnej literaturze obecne są również prace wskazujące, że estrogeny mogą hamować aktywność kompleksu I, II, III i IV łańcucha

oddechowego oraz mitochondrialną syntazę ATP [76, 240]. W związku z tym przyjmuje się, że możliwy jest klasyczny, zależny od ERE, mechanizm regulacji ekspresji genów.



**Ryc. 4.** Genom mitochondrialny (mtDNA). Przypuszczalne miejsca wiązania receptorów estrogenowych zaznaczone zostały czerwonymi strzałkami. Miejsca te zawierają sekwencję konsensusową AGAACxxxTGTCT, charakterystyczną dla wszystkich receptorów jądrowych klasy I (zalicza się do nich receptory estrogenowe, receptor androgenowy, glukokortykoidowy oraz receptor progesteronowy). Pozostałe oznaczenia: ATP 6, 8 – podjednostki kompleksu ATPazy V, COX 1, 2, 3 – podjednostki oksydazy cytochromowej, Cyt. b. – cytochrom b, ND (1-6) – podjednostki kompleksu dehydrogenazy NADH (na podstawie [199] we własnej modyfikacji).

Sugeruje się również, że estrogeny wpływają na genom mitochondrialny na drodze niezależnej od ERE. Wskazuje się, że ESR mogą się wiązać z innymi mitochondrialnymi czynnikami transkrypcyjnymi np. z czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym w odpowiedzi na cAMP (CREB ang. *cyclic-AMP response element*) [139].

Postuluje się, że estrogeny działają na mitochondria nie tylko poprzez wpływ na mtDNA. Zaobserwowano, że stymulują one lokalny, mitochondrialny wzrost stężenia jonów wapniowych. Sugeruje się, że estrogeny hamują zależny od jonów sodu wypływ jonów wapnia z mitochondriów. Konsekwencją mitochondrialnego wzrostu stężenia jonów wapniowych jest nasilona synteza reaktywnych form tlenu (RFT) takich jak anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^*$ ), nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) czy rodnik hydroksylowy ( $OH^*$ ). Wskazuje się, że indukowany estrogenami mitochondrialny wzrost stężenia jonów  $Ca^{2+}$  stymuluje aktywność

mitochondrialnej syntazy tlenku azotu (mtNOS), co prowadzi do hamowania aktywności oksydazy cytochromu c [245].

Estrogeny mogą oddziaływać na mitochondria również w mechanizmie pośrednim poprzez wpływ na aktywność MAPK [85].

#### 1.4. Biologia plemników ludzkich

Plemnik to bardzo specyficzna i wysoce wyspecjalizowana komórka, zawierająca minimalne ilości cytoplazmy oraz skondensowane DNA. Bardzo długo postrzegany był tylko jako jednostka transportująca genom ojcowski do oocyta. Okazało się jednak, iż w obrębie plemników obecne są czynniki niezbędne do prawidłowego przebiegu procesu zapłodnienia oraz wczesnych etapów embriogenezy. Zaliczyć do nich należy np. czynnik aktywujący oocyt (należący do fosfolipidowej grupy enzymów hydrolitycznych) [189] czy plemnikowy centrosom, który uważany jest za kluczowy element odpowiedzialny za organizację mikrotubul w zarodku [165, 166, 167].

Funkcjonalne i strukturalne cechy plemników wiążą się ściśle z kolejnymi etapami procesu zapłodnienia, a więc z kapacytacją, rozpoznaniem gamet, reakcją akrosomową czy fuzją gamet.

Błonę komórkową plemników ludzkich cechuje duża heterogenność jej poszczególnych fragmentów. W oparciu o właściwości fizyczne, chemiczne i immunologiczne, w błonie komórkowej plemników ludzkich wyróżnia się pięć domen. W obrębie główki wyodrębnia się trzy główne domeny: region akrosomowy, okolicę równikową oraz domenę postakrosomową. W wici wyróżnia się natomiast dwie domeny: wstawkę i część główną witki. Mechanizmy utrzymujące heterogenność i wysoką niezależność domen są ciągle słabo poznane. Wyraźne strukturalne granice między domenami wyznaczają pierścień tylny (granica między częścią równikową i postakrosomową) oraz obręcz pierścieniowata (granica wstawki i części głównej witki). Pozostałe domeny błony zachowują wysoką integralność mimo braku uchwytnych fizycznych barier. Wskazuje się, że na utrzymywanie heterogenności poszczególnych domen błony plemników wpływają między innymi: 1. oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy elementami błony, a składnikami glikokaliksu, 2. obecność tratw lipidowych oraz 3. elementy cytoszkieletu plemnika, które także wykazują silną polaryzację występowania [126].

Ostatnio wiele uwagi poświęca się tratwom lipidowym występującym w obrębie błony komórkowej plemników. Ich obecność stwierdzono w plemnikach wszystkich gatunków ssaków, ale na większą skalę niż w komórkach somatycznych [15, 179, 222, 223, 224].

Zwiększona stabilność tratw błony komórkowej plemników sugeruje, iż mogą one stanowić tzw. „supertratwy”, składające się z trwałych, mniejszych subdomen [222]. Miejscowe wzbogacenie błony komórkowej główki plemników w tratwy lipidowe sugeruje, że mogą one modulować jego interakcje z oocytem [108, 243].

Bardzo ważnym modulatorem zmian zachodzących w plemnikach na różnych etapach procesu zapłodnienia są zmiany stężenia wolnych jonów wapniowych. Stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w plemnikach po ejakulacji jest rzędu 5-100 nmol/l. Podczas kapacytacji obserwuje się stopniowy wzrost stężenia wolnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do wartości rzędu 125-175 nmol/l [132]. Z kolei różne etapy reakcji akrosomowej (RA) wymagają różnych poziomów jonów wapniowych np. na pierwszym etapie RA do aktywacji fosfolipazy C (PLC, ang. *phospholipase C*) potrzebny jest dużo mniejszy wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  niż do zainicjowania procesu fuzji błon [34].

Kluczowym czynnikiem kontrolującym zmiany stężenia jonów wapniowych w plemnikach są systemy pomp i kanałów błonowych. Najważniejszym elementem utrzymującym niskie stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie plemników jest zlokalizowana w błonie komórkowej  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaza, wydalająca jony  $\text{Ca}^{2+}$  z cytoplazmy do przestrzeni pozakomórkowej [81]. Podobna ATPaza wapniowa, zlokalizowana w zewnętrznej błonie akrosomowej, transportuje jony wapniowe do matriks akrosomu [67, 237, 238]. Z kolei pompa  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  i wymiennicz  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  powodują dokomórkowy napływ jonów  $\text{Ca}^{2+}$  [27]. W błonie komórkowej oraz w zewnętrznej błonie akrosomowej plemników występują różne typy kanałów wapniowych takich jak: kanały wapniowe receptorowe, kanały bramkowane wysokim potencjałem lub cyklicznymi nukleotydami [204, 213]. Stwierdzono, że przy pierwszej fazie reakcji akrosomowej jony wapniowe napływają z przestrzeni zewnątrzkomórkowej poprzez zależne od potencjału kanały wapniowe typu T oraz kanały wapniowe bramkowane cGMP. Ta pierwsza faza wzrostu stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  jest niezbędna do aktywacji PLCy i prowadzi do powstania  $\text{IP}_3$ . Obserwowany podczas RA kolejny wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  jest z kolei konsekwencją związania się  $\text{IP}_3$  z białkiem receptorowym znajdującym się na zewnętrznej błonie akrosomalnej, które jest kanałem wapniowym bramkowanym  $\text{IP}_3$  [175, 260]. Sugeruje się, że kanały wapniowe bramkowane  $\text{IP}_3$  są również zaangażowane w proces hyperaktywacji plemników [158]. Kanały tego typu stwierdzono również u podstawy witki, w pofałdowanych fragmentach otoczki jądrowej [99, 158]. Podstawa witki jest miejscem, gdzie inicjowane są jej wygięcia i dlatego sugeruje się, że uwolnione przez  $\text{IP}_3$  jony  $\text{Ca}^{2+}$  są jednym z czynników aktywujących ten proces [158]. W błonie komórkowej głównej części witki znajdują się specyficzne dla plemników, bramkowane potencjałem kanały wapniowe typu CATSPER [201, 213]. Jak dotąd opisano cztery rodzaje białek rodziny CATSPER (CATSPER 1-4). Wykazano,

że CATSPER1 i CATSPER2 są niezbędne do hiperaktywacji plemników i co za tym idzie do uzyskania przez nie zdolności do zapłodnienia komórki jajowej. Sugeruje się również istotną rolę białek CATSPER w regulacji właściwego poziomu ATP [39, 158].

Energii dla ruchu pod postacią ATP dostarczają plemnikom znajdujące się we wstawce mitochondria [233]. Plemniki mają niedużą, w stosunku do komórek somatycznych, ilość wydłużonych mitochondriów ułożonych w ciasną helisę, tworzącą 11-15 skrętów (po dwa mitochondria na skręt). Charakterystyczną cechą plemników jest niespotykana silna stabilność zewnętrznej błony mitochondrialnej, bardzo odpornej na działanie detergentów, zmiany temperatury i ciśnienia osmotycznego. Wiąże się to prawdopodobnie ze zjawiskami kompresji i rozciągania, jakim ta struktura jest poddawana podczas ruchów witki [176]. Mitochondria plemników biorą również udział w utrzymywaniu homeostazy wapniowej. W mechanizm szybkiego napływu jonów wapniowych z cytoplazmy do macierzy mitochondrialnej zaangażowany jest mitochondrialny uniporter wapniowy (mCU, z ang. *mitochondrial calcium uniporter*) [122, 229]. Transportowi jonów  $Ca^{2+}$  przez mCU towarzyszy spadek potencjału elektrycznego. Jest to transport elektrogeny, dlatego sprawne funkcjonowanie mCU wymaga wysokiego potencjału w poprzek błony mitochondrialnej. Aktywność mCU regulują nukleotydy adeninowe: wysokie stężenia ATP hamuje uniporter, a ADP aktywuje transport  $Ca^{2+}$  przez mCU [112, 229]. W wewnętrznej błonie mitochondrialnej obecny jest również tzw. szybki mechanizm pobierania jonów wapniowych (RaM, z ang. *rapid mode of  $Ca^{2+}$  uptake*), który uruchamiany jest podczas krótkotrwałej ekspozycji mitochondriów na wysokie stężenie jonów  $Ca^{2+}$  [229]. Nadmierny napływ jonów wapniowych do mitochondriów wiąże się ze znacznym spadkiem potencjału błony mitochondrialnej, co może aktywować megakanały i uruchomić kaskadę zdarzeń prowadzącą do śmierci komórki.

Mimo, że plemniki mogą wykorzystywać energię z glikolizy, to jednak w dużej mierze ich fizjologia zależy od przemian tlenowych toczących się w mitochondriach [232]. Podczas tych przemian generowane są reaktywne formy tlenu. Przyjmuje się, że w plemnikach istnieją dwa podstawowe mechanizmy generowania RFT: mitochondrialny proces fosforylacji oksydacyjnej oraz błonowy enzymatyczny system oksydazy NADPH [4, 7, 80]. W warunkach fizjologicznych w plemnikach produkowane są między innymi  $O_2^*$ ,  $OH^-$ ,  $NO^-$  czy  $H_2O_2$  [4, 7, 8, 62, 80, 84, 94]. Stwierdzono, że niskie stężenia RFT odgrywają istotną rolę w procesie dojrzewania plemników. Biorą one udział w procesach związanych z kondensacją chromatyny jądrowej, a wpływając na syntezę cAMP i fosforylację białek, uczestniczą w uzyskiwaniu przez plemniki zdolności ruchu [4, 7, 78]. Plemniki są jednak szczególnie podatne na stres oksydacyjny, ponieważ zawierają w swej strukturze liczne substraty będące celem ataku dla

wolnych rodników (głównie nienasycone kwasy tłuszczowe oraz DNA). Dzieje się tak również ze względu na specyficzną kompartmentalizację komórki, ograniczającą jej wielkość oraz zawartość cytoplazmy. Z powodu dużej wrażliwości plemników na stres oksydacyjny plazma nasienna oraz cytoplazma plemników zawierają enzymy (dysmutazę ponadtlenkową, katalazę i oksydoreduktazę glutation/ $H_2O_2$ ) oraz związki antyoksydacyjne (tiole, kwas askorbinowy, kwas moczowy, tauryna, hipotauryna,  $\alpha$ -tokoferol) biorące udział w neutralizacji nadmiaru RFT [3, 5]. Przyjmuje się, że stres oksydacyjny jest odpowiedzialny za spadek ruchliwości plemników [251] i uszkodzenia DNA [6], co poważnie obniża potencjał zapłodniający gamet męskich.

Konsekwencją nieaktywnej transkrypcyjnie, parakrystalicznej struktury chromatyny plemników, jest niewielka objętość jądra dojrzałej gamety męskiej. Stanowi ona zaledwie około pięć procent objętości jądra przeciętnej komórki somatycznej [264]. Tak silna kondensacja chromatyny jądrowej jest możliwa dzięki zastąpieniu nukleosomów kompleksami DNA-protaminy, co powoduje, że DNA tych komórek nie jest helikalnie skręcone. Protaminy to zasadowe białka o małej masie cząsteczkowej (4000-12000 Da). Wiążą się one z DNA wzdłuż fosfodiesterowego szkieletu, stymulując jego zwijanie w szerokie, koncentryczne kręgi, które silnie kondensują, tworząc strukturę toroidu. Sugeruje się, że taka struktura chromatyny plemnika ma zabezpieczyć genom ojcowski przed uszkodzeniami natury fizyko-chemicznej podczas podróży plemnika przez elementy męskiego i żeńskiego układu rozrodczego. W dojrzałym plemniku pozostaje jednak około piętnaście procent histonów tworzących strukturę nukleosomów. Mogą one być wyznacznikiem lokalizacji genów ulegających transkrypcji na bardzo wczesnych etapach embriogenezy [268].

W związku z faktem, iż jądrowy DNA plemników ulega stopniowemu unieczynnieniu wraz z postępem spermatogenezy, rozwijające się spermatydy, nadal syntetyzują białka potrzebne do upakowania chromatyny oraz dokończenia procesu dojrzewania na matrycy wcześniej utworzonego mRNA [234]. Mimo, że w dojrzałych plemnikach również znajduje się mRNA (stwierdzono obecność ponad 3000 jego rodzajów), jak dotąd nie stwierdzono procesu transkrypcji w tych komórkach. Dyskutuje się jednak szeroko możliwość występowania procesu translacji w męskich komórkach rozrodczych. Pojawiły się badania wskazujące na możliwość syntezy białek zakodowanych w jądrowym DNA na mitochondrialnych rybosomach 55S [93]. Sugeruje się, że translacja zachodząca na mitochondrialnych rybosomach plemników jest kluczowa dla prawidłowego rozwoju zarodka na wczesnych etapach embriogenezy [134].

Plemniki posiadają również antysensowe odpowiedniki kilkunastu mRNA, a przypuszczalnie także zawierają siRNA (małe interferencyjne RNA) [185]. siRNA w komórkach

somatycznych jest bardzo ważnym elementem regulacji ekspresji genów i przez to znalazł zastosowanie w technikach wyciszania genów. W plemnikach odkryto również obecność małego, niekodującego sncRNA (ang. *small noncoding RNA*), wywodzącego się z mikroRNA (miRNA), a także z produktów przemian tRNA i małego jąderkowego RNA (snoRNA, ang. *small nucleolar RNA*) [109, 114, 115]. Ostatnio scharakteryzowano w plemnikach również powstające w miejscach transkrypcji małe tiRNA (ang. *tiny RNA*) [241, 242], co epigenetycznie może wskazywać na powiązanie z zachowanym ewolucyjnie motywem palca cynkowego CTCF (ang. *an evolutionary conserved zinc finger protein*). Przyjmuje się, że sncRNA w plemnikach może odgrywać rolę w remodelowaniu chromatyny i ochronie genomu przed transpozycją. Rodzina miRNA jest najlepiej poznana spośród różnych rodzajów plemnikowych sncRNA. Po raz pierwszy miRNA zidentyfikowano w plemnikach ludzi [185], następnie jego obecność potwierdzono u myszy [11] i w plemnikach knurów [58]. Rola miRNA polega głównie na potranskrypcyjnej degradacji mRNA poprzez interakcję z nieulegającym translacji obszarem 3' (3'-UTR). Ostatnie badania donoszą również o istnieniu niekodującego piRNA (piwi RNA), najprawdopodobniej biorącego udział w dojrzewaniu plemników [178].

Wciąż dyskutowana jest funkcja, jaką mRNA oraz scnRNA odgrywają w dojrzałych plemnikach lub na wczesnych etapach rozwoju zarodka [130, 134]. Przyjmuje się, że plemnikowe RNA może odgrywać istotną rolę strukturalną, np. jądrowe RNA utrzymuje wiązanie z histonami. Prawdopodobnie RNA zlokalizowane we wstawce może ulec translacji pod wpływem określonych warunków, np. podczas procesu kapacytacji. Proponuje się, że miRNA i piRNA mogą wpływać na rozwój komórek, ukrywając powtarzające się i podlegające transpozycji elementy, bądź mogą odgrywać znaczącą rolę w momencie zapłodnienia. RNA transportowane do oocytu w trakcie zapłodnienia może być ważne na wczesnych etapach embriogenezy np. mRNA może ulec translacji do PLCzeta, specyficznego plemnikowego białka utrzymującego homeostazę  $Ca^{2+}$ . Sugeruje się, że antysensowe RNA i mikroRNA mogą dokonać epigenetycznych modyfikacji i modulować wczesną ekspresję genów w zarodku [11, 40, 88, 118, 119, 208, 256]. Na obecnym etapie wiedzy wiele pytań na temat roli różnych typów RNA występujących w plemnikach pozostaje bez odpowiedzi i wymaga dalszych wnikliwych badań.

Ze względu na swoją strukturę plemniki ludzkie stanowią bardzo dobry model do badania niegenomowego mechanizmu działania hormonów steroidowych. Fakt, że mitochondria stanowią ich podstawowe organellum komórkowe sprawia, iż postulowany wpływ estrogenów i ksenoestrogenów na mitochondria jest w aspekcie fizjologii plemników bardzo ważny.

## 2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

### 2.1. Założenia pracy

Sugeruje się, że występująca u mężczyzn homeostaza estrogenowo-androgenowa może zostać zaburzona przez estrogenne i/lub antyandrogenne działanie ksenobiotyków. Słuszność tej hipotezy potwierdzają wyniki badań doświadczalnych prowadzonych na modelach zwierzęcych, zmiany o charakterze feminizacji występujące i coraz częściej obserwowane u dziko żyjących zwierząt, a także narastające problemy rozrodcze mężczyzn. Zakłada się, że ich przyczyną może być nadmierna ekspozycja mężczyzn na ksenoestrogeny.

W środowisku występuje wiele ksenoestrogenów pochodzenia naturalnego (np. fitoestrogeny) lub wytwarzanych przez człowieka [59, 107, 220]. Wyróżnia się cztery podstawowe kategorie związków, wykazujących działanie podobne do słabych estrogenów: 1. farmaceutyki, z których najbardziej znany jest dietylstilbestrol (DES), 2. produkty przemysłowe, np. organochloryny, a wśród nich fenole, takie jak bisfenol A, 3. substancje stosowane w rolnictwie np. część herbicydów i pestycydów oraz oraz 4. składniki diety zawierające np. fitoestrogeny (takie jak izoflawony (np. genisteina), kumestany i lignany) czy resztki pestycydów obecnych na owocach i warzywach, jak również składniki tworzyw sztucznych używanych do produkcji opakowań żywności.

Wiedza na temat wpływu ksenoestrogenów na organizm męski jest ciągle niewystarczająca, a wyniki dostępnych badań często prowadzą do sprzecznych wniosków. W mediach stawiane jest pytanie, czy mężczyznom grozi feminizacja z powodu zbyt dużej ekspozycji na estrogeny. Wielu biologów uważa, że stężenia ksenoestrogenów w otoczeniu człowieka i w żywności są zbyt małe, by móc spowodować istotne zmiany w narządach płciowych i w zachowaniu mężczyzn. Należy jednak pamiętać, że mimo, iż ksenoestrogeny mogą występować w organizmie mężczyzn w niskich stężeniach i same być może nie byłyby w stanie w istotny sposób wpływać na potencjał rozrodczy mężczyzn, to jednoczesne występowanie kilku związków o działaniu estrogenym (nawet jeśli osiągają one niskie stężenie w organizmie), może wzmocnić efekt i doprowadzić do niekorzystnych zjawisk.

Wiadomo, że estrogeny mogą wywierać swój efekt na plemniki jedynie na drodze niegenomowej. Wyniki badań wskazują na występowanie w plemnikach szybkich zmian w odpowiedzi na estradiol. Jak do tej pory molekularne mechanizmy transdukcji sygnału



wykorzystywane przez estrogeny w plemnikach nie są do końca poznane. Nie można wykluczyć, że podobnie jak to ma miejsce w komórkach somatycznych, estrogeny wpływają na funkcje zawartych w plemnikach mitochondriów.

Przyjmuje się, że jeżeli ksenoestrogeny wpływają na biologię plemników, to wykorzystują do tego celu szlaki transdukcji sygnału endogennych estrogenów.

Zakłada się, że zwiększona ekspozycja plemników na endogenne estrogeny i ksenoestrogeny może niekorzystnie wpłynąć na biologię gamet męskich.

## 2.2. Cel pracy

Celem pracy jest poznanie mechanizmów poprzez które  $17\beta$ -estradiol i wybrane ksenoestrogeny (genisteina i bisfenol A) wpływają na biologię plemników ludzkich oraz zbadanie, czy analizowane związki wykazują synergizm działania.

### Szczegółowe cele pracy

1. Ocena ekspresji receptorów estrogenowych typu 1. i 2. w plemnikach ludzkich i w plemnikach knura.
2. Zbadanie wpływu  $17\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na żywotność oraz na proces błonowej translokacji fosfatydyloseryny w plemnikach ludzkich.
3. Analiza kinetyki zmian stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w plemnikach ludzkich pod wpływem  $17\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A.
4. Zbadanie wpływu  $17\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na błonowy potencjał mitochondrialny plemników ludzkich.
5. Określenie wpływu  $17\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach plemników ludzkich.

## 3. MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

### 3.1. Materiał

Materiał do badań stanowiło nasienie mężczyzn diagnozowanych w Klinice Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (w badaniach wykorzystywano resztki nasienia, które pozostały po przeprowadzonych badaniach diagnostycznych).

Nasienie pozyskiwane było drogą masturbacji, po 3 – 5 dniowym okresie abstynencji płciowej. W każdym przypadku materiał poddawany był rutynowej analizie andrologicznej.

Do badań kwalifikowano tylko nasienie spełniające kryteria normozoospermii (WHO, 2010 r.):

- koncentracja  $\geq 15 \times 10^6$  plemników/ml,
- > 58% plemników żywych,
- > 32% plemników wykazujących ruch progresywny,
- > 4% plemników o prawidłowej morfologii oraz
- zawartość leukocytów  $< 10^6$ /ml.

Każda seria doświadczeń, po ustaleniu warunków pomiaru, wykonana została w piętnastokrotnych powtórzeniach. Łącznie do badań wykorzystano 115 ejakulatów.

Do badań immunohistochemicznych wykorzystano również plemniki knurów pochodzące od knurów rozplodowych. Nasienie otrzymano dzięki uprzejmości Wielkopolskiego Centrum Hodowli i Rozrodu Zwierząt w Tulcach.

Kontrolę pozytywną w badaniach immunohistochemicznych stanowiło endometrium pochodzące od kobiet operowanych z powodów ginekologicznych. Na potrzeby prowadzonych badań nie pobierano żadnego dodatkowego materiału biologicznego.

Na przeprowadzenie badań uzyskano akceptację Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (nr uchwały 654/07).

## 3.2. Metodyka badań

### 3.2.1. Przygotowanie nasienia

Nasienia upłynniano przez 45 minut w temperaturze pokojowej. Badania immunohistochemiczne przeprowadzone zostały na rozmazach wykonanych z nasienia pełnego. W celu oddzielenia plemników od plazmy nasiennej, upłynnione nasienie wirowano (400g, 5 minut), a następnie przepłukiwano dwukrotnie PBS. Z tak przygotowanej zawiesiny plemników wykonywano rozmazy na szkiełkach podstawowych.

Nasienie knurów użyte do badań immunohistochemicznych przed wykonaniem rozmazów, rozcieńczano w stosunku 1:5 w medium Ham F-10 (Sigma-Aldrich).

Do badań oceniających wpływ 17- $\beta$ estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na biologię plemników wykorzystywane były plemniki izolowane z nasienia techniką swim-up. W tym celu na znajdujące się w probówce wirówkowej (Falcon 2075) upłynnione nasienie pełne, umieszczone w łaźni wodnej pod kątem 45°, наносono delikatnie, po ściankach naczynia, 1,5 ml medium Ham F-10. Komórki inkubowano przez 45 minut w temperaturze 37°C. Następnie zbierano medium znad nasienia, wirowano przez 5 minut x 500g., a uzyskany osad z wyizolowanymi komórkami, zawieszano w medium inkubacyjnym Ham F-10 z dodatkiem 35 g/l albuminy ludzkiej.

W przeprowadzonych badaniach oceniających wpływ 17 $\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na żywotność plemników, proces błonowej translokacji fosfatydoseryny oraz produkcję mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego zawiesinę plemników inkubowano przez 2 godziny, w temperaturze 37°C, w kontrolowanym 5% stężeniu CO<sub>2</sub> z badanymi związkami w stężeniach końcowych 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-8</sup> i 10<sup>-6</sup> mol/l. Przeprowadzona została również seria badań, w których komórki inkubowane były ze wszystkimi analizowanymi związkami jednocześnie, w stężeniach końcowych 10<sup>-10</sup> mol/l.

We wszystkich badaniach grupę kontrolną stanowiły plemniki inkubowane w wyżej wymienionych warunkach, w medium inkubacyjnym, bez dodatku badanych związków.

### 3.2.2. Immunohistochemiczna ocena ekspresji receptorów estrogenowych

Rozmazy plemników do badań immunohistochemicznych utrwalane były w 4% buforowanym roztworze paraformaldehydu przez 10 minut w temperaturze pokojowej.

W celu odsłonięcia antygenów, szkiełka gotowano dwukrotnie w kuchence mikrofalowej (2 x 10 min., 250W), w buforze cytrynianowym o pH 6,0 (0,1 mol/l kwasu cytrynowego, 0,1 mol/l roztwór cytrynianu sodu) i pozostawiano do wystygnięcia w temperaturze pokojowej. Aby uniknąć niespecyficznego wiązania przeciwciał, preparaty umieszczano w buforze blokującym TBS-T (100 mmol/l Tris, 65 mmol/l NaCl, 0,1% Tween 20; pH 7,5), zawierającym 3% BSA (Roche Diagnostic) na noc w temperaturze 4°C.

Do oceny ekspresji receptorów estrogenowych użyte zostały pierwszorzędowe poliklonalne królicze przeciwciała skierowane przeciwko receptorom estrogenowym ESR1 (firmy Santa Cruz Biotechnology) oraz ESR2 (firmy Abcam) w rozcieńczeniu 1:50. Inkubację z przeciwciałami pierwszorzędownymi prowadzono przez całą noc w temperaturze 4°C. Po inkubacji szkiełka płukano trzykrotnie przez 15 minut w buforze TBS-T. Następnie preparaty inkubowano z drugorzędownymi kozimi przeciwciałami antykróliczymi skoniugowanymi z alkaliczną fosfatazą (AP) (Sigma-Aldrich), po uprzednim zablokowaniu aktywności endogennej fosfatazy roztworem lewamisolu [2 mmol/l] (Sigma-Aldrich). Reakcję barwną wywoływano substratem dla AP – mieszaniną BCIP/NBT (Sigma-Aldrich).

Kontrolę negatywną do badań stanowiły preparaty, w których pierwszorzędowe przeciwciała zastępowano buforem blokującym. Jako kontrolę pozytywną zastosowano skrawki endometrium.

### 3.2.3. Ocena żywotności plemników oraz procesu błonowej translokacji fosfatydyloseryny

Do oznaczania błonowej translokacji fosfatydyloseryny z wewnętrznego do zewnętrznego listka błony komórkowej zastosowane zostało barwienie aneksyną-V (An-V) znakowaną fluoresceiną (An-V-FITC) (Mollecular Diagnnestic, Niemcy). Fosfatydyloseryna eksponowana na powierzchni komórki, w sposób wybiórczy wiązana jest przez aneksynę-V w obecności jonów wapniowych. Barwienie przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta.

W celu odróżnienia plemników żywych od martwych, zastosowano jednocześnie barwienie jodkiem propidionowym (PI) (Sigma-Aldrich, USA) w stężeniu końcowym 0,125 µg/ml.

Komórki inkubowano z An-V-FITC i PI przez 20 minut, w ciemności i temperaturze pokojowej. Następnie próbki były przepłukiwane dwukrotnie (5 min x 2400 rpm) medium Ham F-10 i do czasu pomiaru w cytometrze przepływowym trzymane w ciemności na lodzie.

#### 3.2.4. Kinetyka zmian stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych

Do oceny kinetyki zmian stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych wykorzystano marker fluorescencyjny Fluo-3 (Molecular Probes, USA), wprowadzany do komórek w postaci zestryfikowanej (Fluo-3 AM). Endogenne esterazy hydrolizują fluorochrom, który w tej postaci ma zdolność wiązania wolnych jonów wapniowych. Intensywność fluorescencji Fluo-3 wzrasta ze wzrostem ilości związanych jonów wapniowych.

Plemniki inkubowane były z Fluo-3 w stężeniu końcowym 4  $\mu\text{mol/l}$  przez 45 minut, w ciemności, w temp. 37° C, przy zachowaniu szczegółowych zasad inkubacji i pomiaru zalecanych przez producenta. Analiza zmian stężenia wolnych jonów wapniowych w plemnikach stymulowanych 17 $\beta$ -estradiolem i ksenoetrogenami została przeprowadzona z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego oraz cytometru przepływowego.

Do badań wykorzystano mikroskop konfokalny LSM 510 (Zeiss, Niemcy) z obiektywem Plan Achromat 63x/1.4 Oil DIC. Do badań w mikroskopie konfokalnym plemniki unieruchamiano

w 1% roztworze agarozy niskotopliwej. Obserwacje w mikroskopie konfokalnym prowadzone były przez 300 sekund. Zmiany intensywności fluorescencji Fluo-3 rejestrowane były w dziesięciosekundowych interwałach. Analiza w mikroskopie konfokalnym umożliwiła analizę kinetyki zmian stężenia jonów wapniowych zachodzącą w pojedynczych komórkach.

Ponadto wykorzystując cytometr przepływowy, przeprowadzono ocenę zmian stężenia wolnych jonów wapniowych w populacji plemników, po pięciu i piętnastu minutach po podaniu badanych związków. Komórki, w których nie obserwowano zmian stężenia wolnych jonów wapniowych pod wpływem badanych związków, stymulowano nasyconym roztworem KCl.

#### 3.2.5. Analiza błonowego potencjału mitochondriów

Potencjał błonowy mitochondriów plemników oceniano przy użyciu fluorchromu JC-1 (5,5',6'6'-czterochloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl, ang. *carbocyanine iodode*), (Molecular Probes, USA) według metody zalecanej przez producenta we własnej modyfikacji [129]. JC-1 jest fluorchromem kumulującym się w mitochondriach. W zależności od wielkości mitochondrialnego potencjału błonowego ( $\Delta\Psi_m$ ) powstają agregaty JC-1 (gdy  $\Delta\Psi_m > 80\text{-}100$  mV) lub monomery JC-1 (gdy  $\Delta\Psi_m < 80 - 100$  mV). JC-1, rozpuszczony w DMSO, dodawano do zawiesiny plemników w stężeniu końcowym 1  $\mu\text{mol/l}$  i inkubowano w ciemności przez 30 minut, w temp. 37° C. Następnie zawiesinę komórek płukano dwukrotnie (5 min x 2400

rpm) medium Ham F-10. Do bramkowania komórek z niskim  $\Delta\Psi_m$  wykorzystano walinomycynę (rozpręgacz mitochondrialny powodujący depolaryzację wewnętrznej błony mitochondrialnej, a co za tym idzie, spadek  $\Delta\Psi_m$ ).

W analizach cytometrycznych przeprowadzono ocenę odsetka plemników z wysokim i niskim potencjałem mitochondrialnym. Potencjał mitochondrialny plemników analizowano po 5, 15 i 30 minutach od stymulacji badanymi związkami.

### 3.2.6. Detekcja mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego

Ocena ilościowa anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach plemników wykonana została z zastosowaniem fluorochromu MitoSOX RED (Molecular Probes, Inc.), zgodnie z metodą opisaną przez Koppers i współpracowników [124], z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego i cytometru przepływowego.

MitoSOX RED jest barwnikiem fluorescencyjnym, specyficznym wycelowanym na mitochondria żywych komórek. MitoSOX RED, rozpuszczalny w tłuszczach kation, wnika do wnętrza komórek, gdzie kumuluje się w mitochondriach. Następnie zostaje utleniony przez anionorodnik ponadtlenkowy (reakcji takiej nie dają inne reaktywne formy tlenu ani reaktywne formy azotu). Utleniony produkt daje silną fluorescencję pod wpływem związania z kwasami nukleinowymi. MitoSOX Red rozpuszczano w DMSO i dodawano do zawiesiny komórek w stężeniu końcowym 2  $\mu\text{mol/l}$ . Następnie komórki inkubowano w ciemności, przez 15 minut, po czym przepłukiwano dwukrotnie (5 min x 2400 rpm) medium Ham F-10.

### 3.2.7. Technika pomiarów w cytometrze przepływowym

Sygnaly fluorescencyjne plemników znakowanych odpowiednimi fluorochromami rejestrowane były przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur (Becton-Dickinson, USA).

Sygnaly rozproszenia pod małym kątem (FSC, ang. *forward scatter*) i rozproszenia pod dużym kątem (SSC, ang. *side scatter*), umożliwiające odpowiednio ocenę wielkości przepływającej przez cytometr komórki i ziarnistości jej cytoplazmy wykorzystano do bramkowania populacji plemników. W każdym doświadczeniu analizowano 15 000 komórek.

Zielona fluorescencja aneksyny-V-FITC indukowana była światłem lasera argonowego o długości fali 488 nm i rejestrowana w pierwszym kanale fluorescencyjnym (FL1) przez detektor przeznaczony do rejestracji światła o zakresie 515 – 545 nm. Czerwono-różowa

fluorescencja jodku propidionowego wzbudzana była światłem lasera argonowego o długości fali 488 nm, natomiast rejestrowana w trzecim kanale fluorescencyjnym (FL3) o zakresie powyżej 650 nm. Barwnik JC-1, przeznaczony do pomiaru potencjału błonowego mitochondriów, wzbudzany był światłem lasera argonowego, a fluorescencja fluorochromu mierzona była w dwóch kanałach: w kanale FL1 o zakresie: 515 – 545 nm (monomery JC-1) oraz FL2 o zakresie 561 – 603 nm (agregaty JC-1). Intensywność fluorescencji Fluo-3, po wzbudzeniu światłem lasera argonowego o długości fali 488 nm, była rejestrowana w pierwszym kanale fluorescencyjnym (FL1), przez detektor o zakresie 515 – 545 nm. Fluorescencja barwnika MitoSOX Red wzbudzana była światłem lasera argonowego o długości fali 488 nm i rejestrowana w kanale FL2 o zakresie 561 – 603 nm.

Wszystkie dane były zbierane i analizowane przy użyciu programu komputerowego CellQuest Pro, wersja 5.2.1 (Becton-Dickinson, USA).

### 3.2.8. Analiza statystyczna

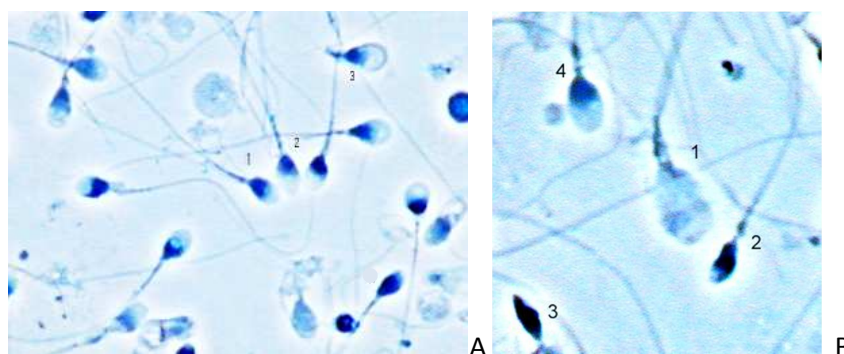
Opracowanie statystyczne danych przeprowadzone zostało w wykorzystaniu pakietu statystycznego STATISTICA 7.1 i GraphPad InStat oraz arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel 2003.

W przeprowadzonych badaniach dla oceny różnic pomiędzy odsetkami plemników stosowano testy nieparametryczne. Dla porównania kilku grup zmiennych niepowiązanych zastosowano test Kruskala-Wallisa (w przypadku wystąpienia różnic istotnych statystycznie wykonywano test wielokrotnych porównań Dunna), porównywanie zmian wartości danego parametru w czasie wykonywano testem Friedmana z testem analizy kontrastów Dunna. Różnice uznawano za istotne statystycznie, gdy poziom istotności  $p < 0,05$ .

## 4. WYNIKI

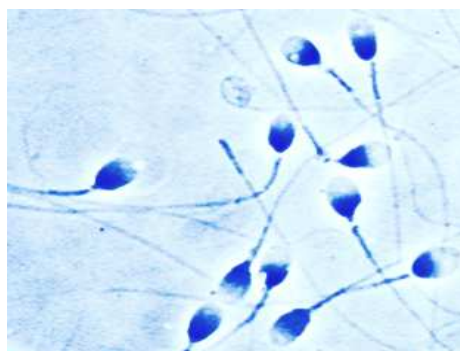
### 4.1. Ekspresja receptorów estrogenowych w plemnikach ludzkich i knura

Analiza immunohistochemiczna wykazała, że zarówno w plemnikach ludzkich, jak i w plemnikach knurów, obecne są receptory estrogenowe typu 1. i typu 2. W plemnikach ludzkich o prawidłowej morfologii receptory ESR1 lokalizowane były głównie w części postakrosomowej główki oraz we wstawkach plemników (ryc. 5). W pojedynczych plemnikach widoczna była reakcja błonowa w szczytowej części główki. W plemnikach o nieprawidłowej morfologii główki ESR1 lokalizowano na obszarze całej główki, lub w ogóle nie stwierdzano ich obecności. Słaba ekspresja ESR1 widoczna była również w głównej części wtki.



**Ryc. 5.** Ekspresja ESR1 w plemnikach ludzkich. A. Widoczna silna reakcja ESR1 w części postakrosomowej i we wstawkach (plemniki 1-2); w pojedynczych plemnikach widoczna była reakcja błonowa w domenie akrosomowej (plemnik 3); B. plemnik o wydłużonej główce (1, 2) z silną reakcją na terenie całej główki, 3 – brak reakcji barwnej w plemników o dużej główce. 4 – reakcja w domenie postakrosomowej i we wstawce w plemniku o prawidłowej morfologii. Barwienie alkaliczną fosfatazą, powiększenie obiektywu x100.

ESR2 w plemnikach ludzkich lokalizowano w części postakrosomowej i we wstawkach. Słaba reakcja barwna była widoczna w głównej części wtki (ryc. 6).

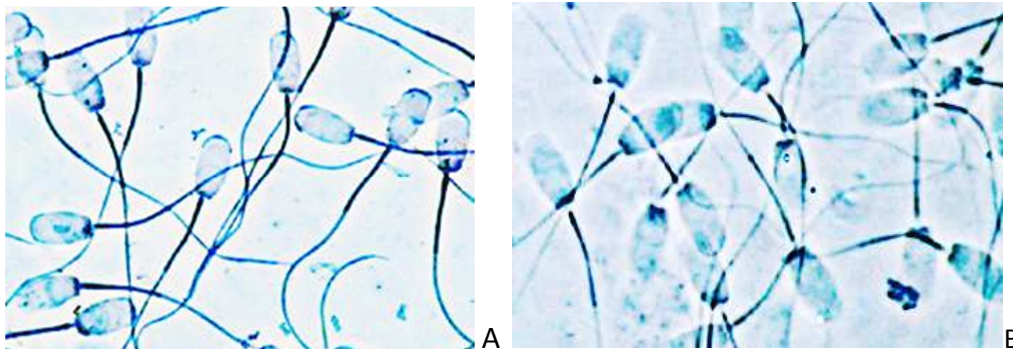


**Ryc. 6.** Ekspresja ESR2 w plemnikach ludzkich. Widoczna silna reakcja na terenie wstawki i części postakrosomowej główki. Barwienie alkaliczną fosfatazą, powiększenie obiektywu x100.

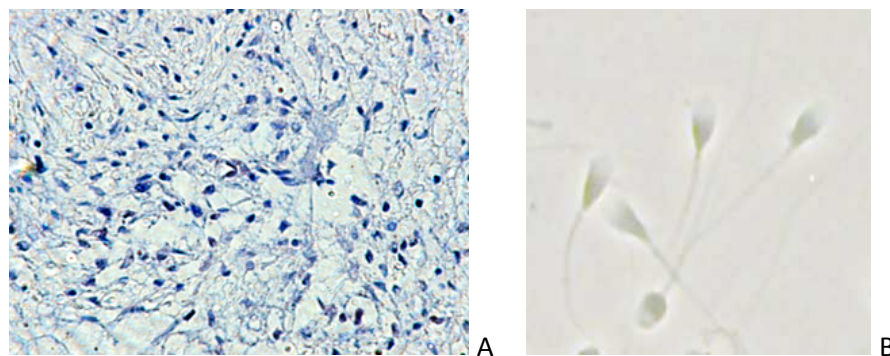


Analiza topohistochemiczna receptorów estrogenowych typu 1. w plemnikach knurów wykazała ich silną ekspresję na obszarze wstawek. Stwierdzano również reakcję barwną na terenie głównej części witki i tylnej części główki. U części plemników widoczna była silna ekspresja ESR1 błonie komórkowej szczytowej części główki (ryc. 7A).

Ocena immunohistochemiczna receptorów estrogenowych typu II. w plemnikach knurów wykazała ich silną ekspresję na obszarze wstawek oraz w tylnej części główki (ryc. 7B).



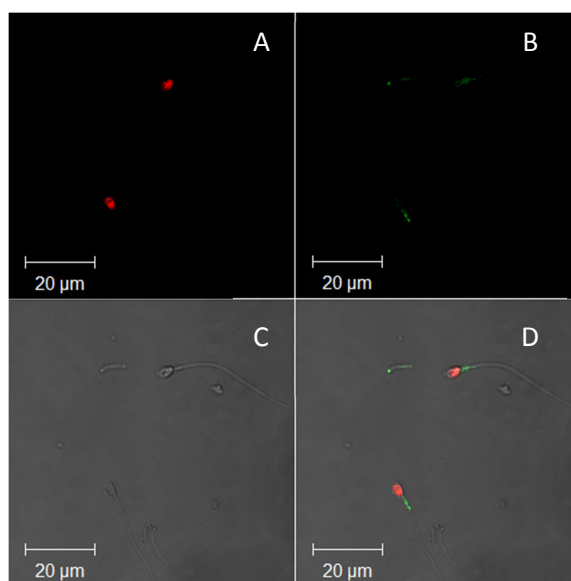
**Ryc. 7.** Ekspresja ESR1 (A) i ESR2 (B) w plemnikach knura. Najwyższy poziom ekspresji dla obu receptorów rejestrowano we wystawkach plemników. ESR1 występował ponadto w głównej części witki, a w licznych komórkach również w części szczytowej główki. Barwienie alkaliczną fosfatazą, powiększenie obiektywu x100.



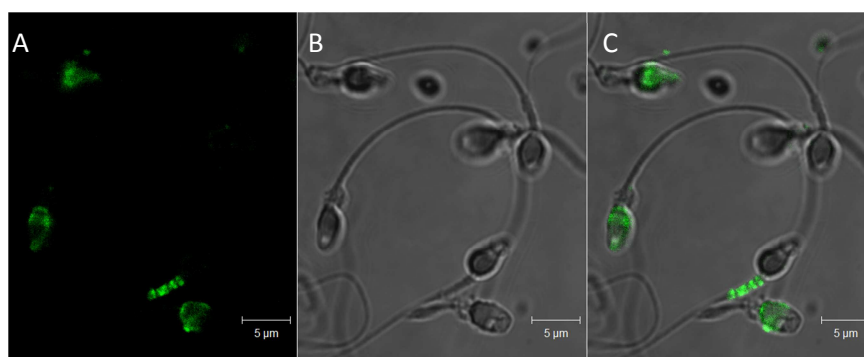
**Ryc. 8.** Reakcje kontrolne. A. Kontrola pozytywna na ESR1 przeprowadzona na endometrium, widoczna silna reakcja na terenie jąder. B. Kontrola negatywna przeprowadzona na rozmazach plemników; inkubacja bez przeciwciał pierwszorzędowych; powiększenie obiektywu x100.

#### 4.2. Wpływ $17\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na żywotność i proces błonowej translokacji fosfatydyloseryny

W celu oceny wpływu  $17\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na żywotność i proces błonowej translokacji fosfatydyloseryny w plemnikach ludzkich zastosowano podwójne barwienie komórek aneksyną V i jodkiem propidionowym (ryc. 9). Miejscem, w którym najczęściej obserwowano translokację PS, była błona komórkowa wstawki. W nasieniu obecne były również plemniki z translokacją PS w części akrosomowej i postakrosomowej (ryc. 10).



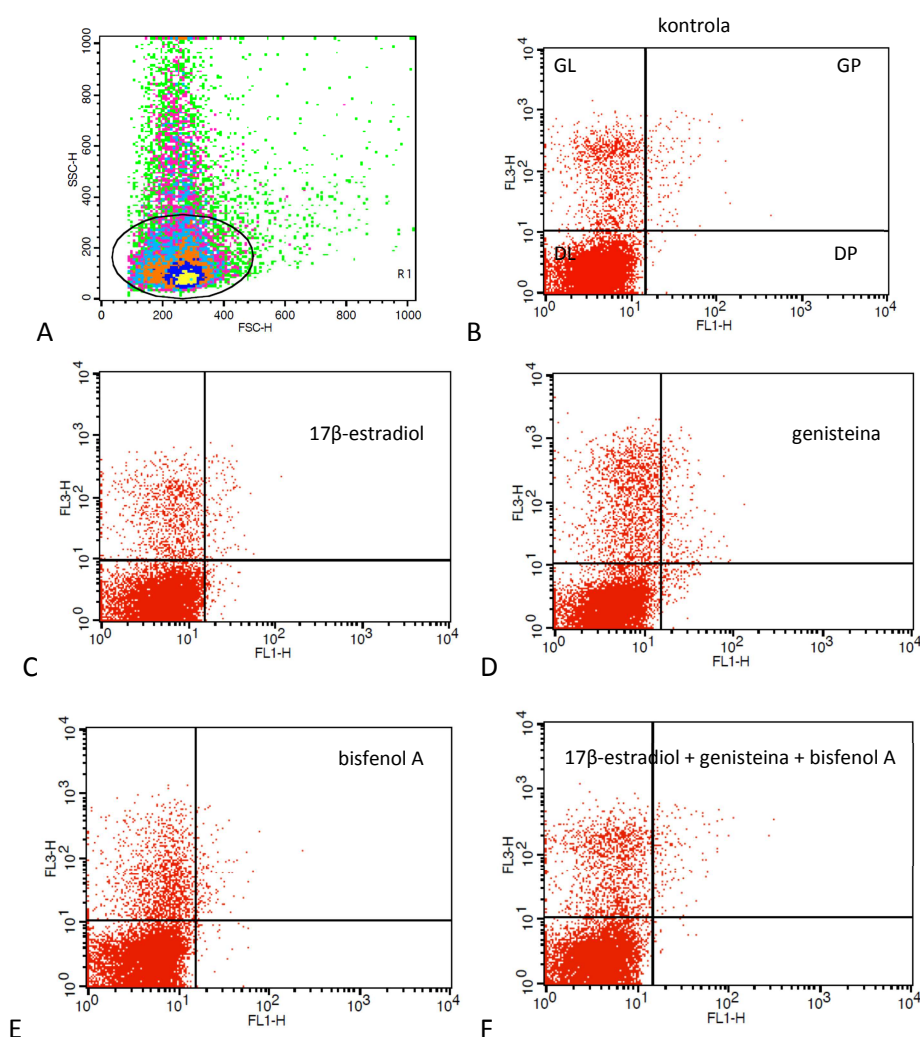
**Ryc. 9.** Ocena żywotności i błonowej translokacji fosfatydyloseryny w plemnikach ludzkich. Komórki barwione aneksyną-V znakowaną fluoresceiną (zielona fluorescencja) oraz jodkiem propidionowym (różowo-czerwona fluorescencja). Zdjęcie z mikroskopu konfokalnego. Oznaczenia: A. kanał fluorescencji czerwonej, B. kanał fluorescencji zielonej, C. kanał transmisyjny, D. nałożenie obrazu z kanału A, B i C.



**Ryc. 10.** Błonowa translokacja fosfatydyloseryny w plemnikach ludzkich. Widoczne wiązanie aneksyny-V we wstawkach i główkach plemników. Barwienie aneksyną-V znakowaną fluoresceiną. Oznaczenia: A. kanał fluorescencji zielonej, B. kanał transmisyjny, C. nałożenie obrazu z kanału A i B.

W oparciu o analizę mikroskopową i dane z cytometru przepływowego (ryc. 11) wyodrębniono w nasieniu cztery frakcje plemników:

- 1) plemniki żywe bez błonowej translokacji PS - niebarwiące się jodkiem propidionowym oraz nie wiążące aneksyny-V (An-V/PI<sup>-</sup>),
- 2) plemniki żywe z translokacją PS - wiążące aneksynę-V, niebarwiące się PI (An-V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>),
- 3) plemniki martwe bez translokacji PS - niewiążące aneksyny-V, barwiące się PI (An-V<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>),
- 4) plemniki martwe z translokacją PS - wiążące aneksynę-V i barwiące się PI (An-V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>).



**Ryc 11.** Analiza cytometryczna zmian odsetka plemników z błonową translokacją fosfatydyloseryny (barwienie aneksyną-V znakowaną fluoresceiną) z uwzględnieniem ich żywotności (barwienie jodkiem propidionowym). A. bramkowanie komórek na podstawie sygnału SSC i FSC. B. Plemniki grupy kontrolnej po izolacji techniką swim-up: GL (kwadrat górny lewy) – komórki wiążące tylko jodek propidionowy; GP (kwadrat górny prawy) – komórki wiążące aneksynę-V i jodek propidionowy; DL (kwadrat dolny lewy) – komórki niewybarwione; DP (kwadrat dolny prawy) – komórki wiążące tylko aneksynę-V. C-F. Ocena żywotności i błonowej translokacji fosfatydyloseryny po dwugodzinnej inkubacji odpowiednio z 17β-estradiolem, genisteiną, bisfenolem A i wszystkim związkami jednocześnie w stężeniach końcowych 10<sup>-10</sup> mol/l. Oznaczenia: SSC-H – sygnał rozproszenia pod dużym kątem; FSC-H – sygnał rozproszenia pod małym kątem; FL1-H – kanał fluorescencji 515 – 545 nm, FL3-H – kanał fluorescencji > 650 nm.

Stwierdzono, że dwugodzinna inkubacja plemników z 17 $\beta$ -estradiolem, genisteiną lub bisfenolem A nie powodowała istotnych statystycznie zmian odsetka wyodrębnionych frakcji plemników, niezależnie od stosowanej dawki (tabela 2). Nie zaobserwowano również by analizowane związki wpływały na topografię miejsc, w który występowała błonowa translokacja PS.

Inkubacja plemników jednocześnie z wszystkimi badanymi związkami w stężeniach końcowych 10<sup>-10</sup> mol/l również nie wpływała w sposób istotny statystycznie na żywotność i proces błonowej translokacji fosfatydyloseryny (tabela 2).

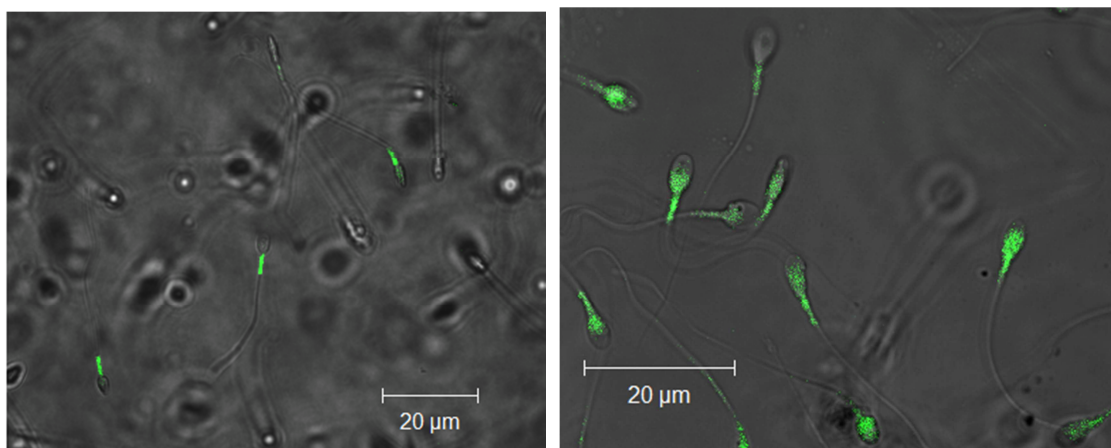
**Tabela. 2.** Wpływ 17 $\beta$ -estradiolu, genisteiny lub bisfenolu A na żywotność i proces błonowej translokacji fosfatydyloseryny (N=15)

	Frakcje plemników			
	An-V <sup>-</sup> /PI <sup>+</sup> [%]	An-V <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> [%]	An-V <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup> [%]	An-V <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> [%]
10 <sup>-10</sup> mol/l				
kontrola	18,3±8,6	3,6±2,4	77,4±10,1	0,6±0,7
17 $\beta$ -estradiol	19,1±10,4	3,7±2,5	75,9±11,1	1,2±1,2
genisteina	18,6±8,5	4,7±3,1	75,2±10,7	1,4±1,7
bisfenol A	17,3±7,3	3,6±2,6	78,5±9,9	0,5±0,4
p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
10 <sup>-8</sup> mol/l				
kontrola	15,3±6,1	3,4±2,3	80,5±7,8	0,7±0,7
17 $\beta$ -estradiol	15,2±4,7	3,6±1,4	80,3±7,8	0,8±0,9
genisteina	16,2±6,2	3,7±3,1	79,1±8,1	0,9±0,8
bisfenol A	17,1±8,4	2,5±0,9	79,6±8,6	0,7±0,4
p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
10 <sup>-6</sup> mol/l				
kontrola	15,9±5,5	2,4±1,5	81,2±7,1	0,4±0,2
17 $\beta$ -estradiol	16,1±6,9	2,2±1,1	81,1±8,3	0,7±0,7
genisteina	16,0±6,9	2,1±1,6	81,3±8,2	0,4±0,2
bisfenol A	15,7±4,6	2,7±2,1	80,8±6,5	0,7±0,8
p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
17 $\beta$ -estradiol + genisteina + bisfenol A [10 <sup>-10</sup> mol/l]				
kontrola	15,9±5,5	2,4±1,5	81,2±7,1	0,4±0,2
estradiol + genisteina + bisfenol A	17,1±6,9	2,2±1,1	78,1±8,4	0,7±0,7
p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

podane wartości to średnia  $\pm$  odchylenie standardowe

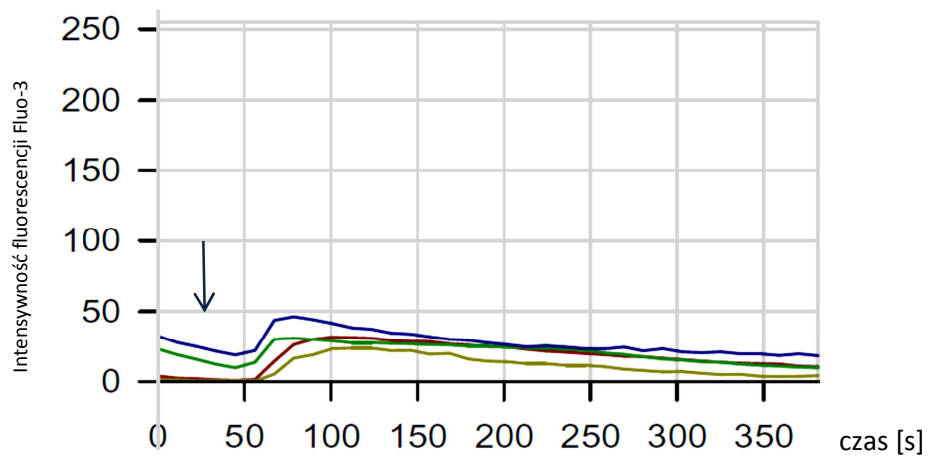
#### 4.3. Wpływ $17\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na kinetykę zmian stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w plemnikach ludzkich

Ocenę zmian stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w pojedynczych komórkach wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego, w oparciu o barwienie fluorochromem Fluo-3, którego intensywność fluorescencji koreluje ze stężeniem wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . W plemnikach wyizolowanych techniką swim-up, najwyższe stężenie wolnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  rejestrowano w okolicy wstawek i w części postakrosomowej główek (ryc. 12).

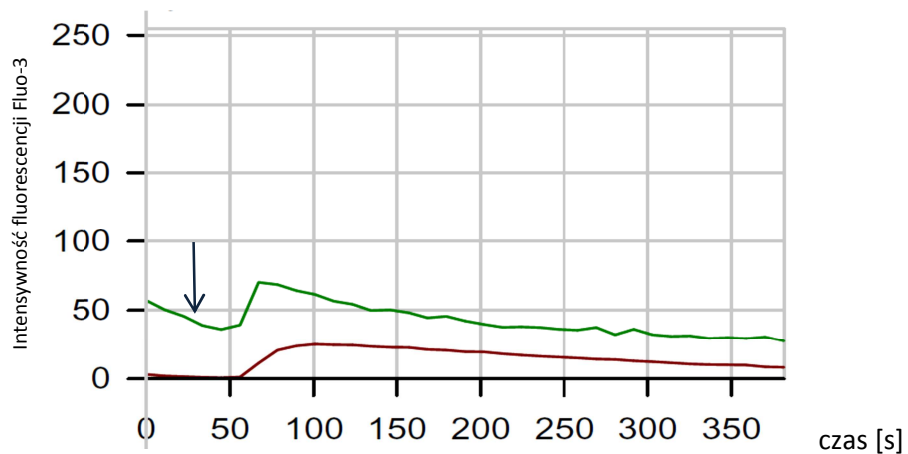


**Ryc. 12.** Ocena stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w plemnikach ludzkich. Komórki wyizolowane techniką swim-up wykazywały najwyższe stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w okolicy wstawek (A) i części postakrosomowej główki (B). Zdjęcie z mikroskopu konfokalnego. Barwienie fluorochromem Fluo-3.

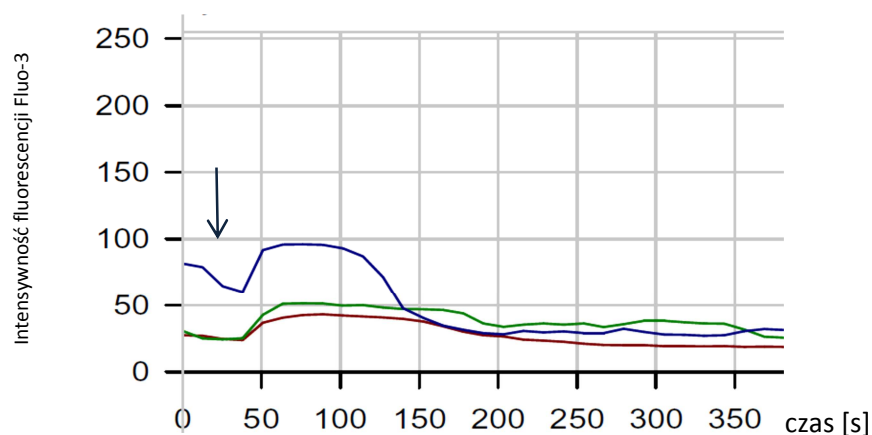
Stwierdzono, że stymulacja plemników ludzkich  $17\beta$ -estradiolem powoduje wzrost stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych. Reakcja rozpoczęła się już po kilku sekundach od stymulacji. Maksymalny wzrost stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  rejestrowano po 25-100 sekundach od podania hormonu. W kolejnych sekundach obserwacji rejestrowano stopniowy spadek intensywności fluorescencji Fluo-3. Dynamika reakcji była zależna od dawki hormonu (ryc. 13-15).



**Ryc. 13.** Kinetyka zmian stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w plemnikach ludzkich stymulowanych  $17\beta$ -estradiolem w stężeniu końcowym  $10^{-10}$  mol/l. Wykresy w różnych kolorach odpowiadają reakcjom wybranych plemników. Strzałką zaznaczono moment podania hormonu.

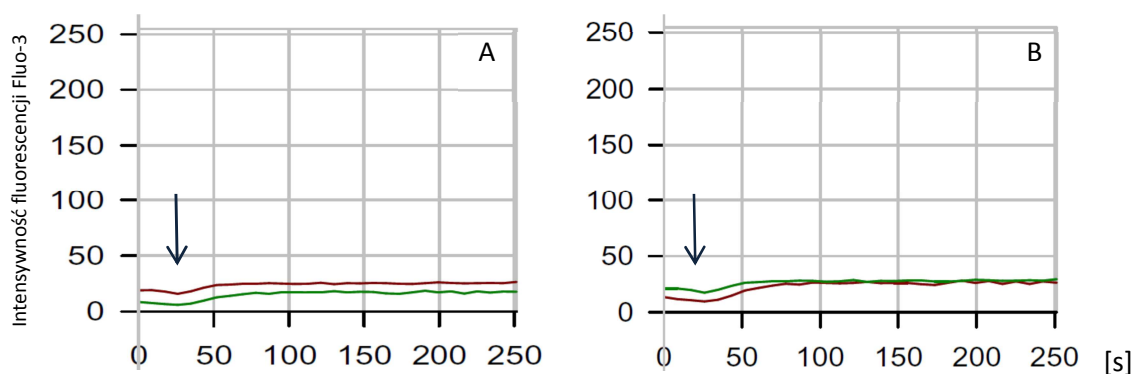


**Ryc. 14.** Kinetyka zmian stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w dwóch plemnikach ludzkich stymulowanych  $17\beta$ -estradiolem w stężeniu końcowym  $10^{-8}$  mol/l. Strzałką zaznaczono moment podania hormonu.



**Ryc. 15.** Kinetyka zmian stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w trzech plemnikach ludzkich stymulowanych  $17\beta$ -estradiolem w stężeniu końcowym  $10^{-6}$  mol/l. Strzałką zaznaczono moment podania hormonu.

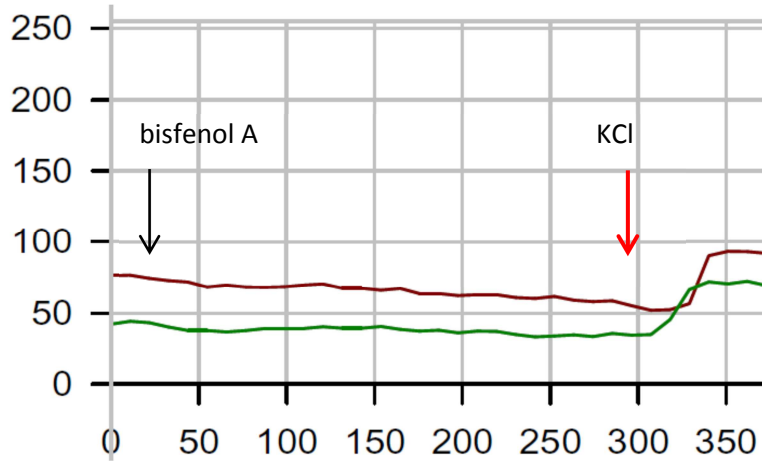
Genisteina w stężeniu końcowym  $10^{-10}$  mol/l nie powodowała w plemnikach ludzkich istotnych zmian stężenia wolnych jonów wapniowych. Stymulacja komórek genisteiną w stężeniu końcowym  $10^{-8}$  mol/l i  $10^{-6}$  mol/l powodowała niewielki wzrost stężenia jonów wapniowych, który rozpoczął się już po kilku sekundach od stymulacji i utrzymywał się na podwyższonym poziomie przez cały czas obserwacji (ryc. 16).



**Ryc. 16.** Kinetyka zmian stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w plemnikach ludzkich stymulowanych genisteiną w stężeniu końcowym  $10^{-8}$  mol/l (A) i  $10^{-6}$  mol/l (B). Strzałką zaznaczono moment podania związku.

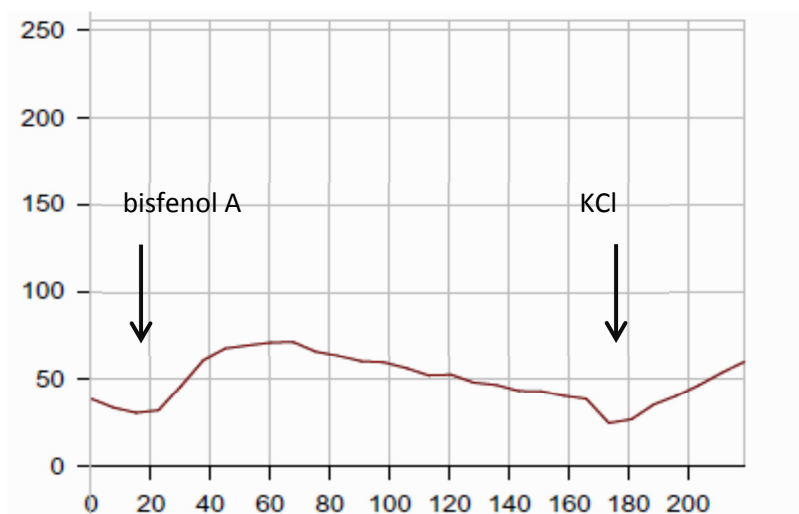
W badaniach przeprowadzonych przy pomocy mikroskopu konfokalnego w ponad 95% stymulowanych plemników nie zarejestrowano istotnego wpływu bisfenolu A na stężenie wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych, niezależnie od zastosowanego stężenia. Plemniki, w których nie zaobserwowano zmian stężenia jonów wapniowych pod wpływem

bisfenolu A, stymulowano nasyconym roztworem KCl, po którym rejestrowano charakterystyczny przejściowy wzrost stężenia jonów wapniowych (ryc. 17).



**Ryc. 17.** Kinetyka zmian stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w plemnikach ludzkich stymulowanych bisfenolem A w stężeniu końcowym  $10^{-6}$  mol/l. Strzałkami zaznaczono moment podania bisfenolu A i KCl.

W przeprowadzonych analizach tylko w pojedynczych plemnikach po stymulacji bisfenolem A w stężeniu końcowym  $10^{-6}$  mol/l zarejestrowano przemijający wzrost stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych (ryc. 18).

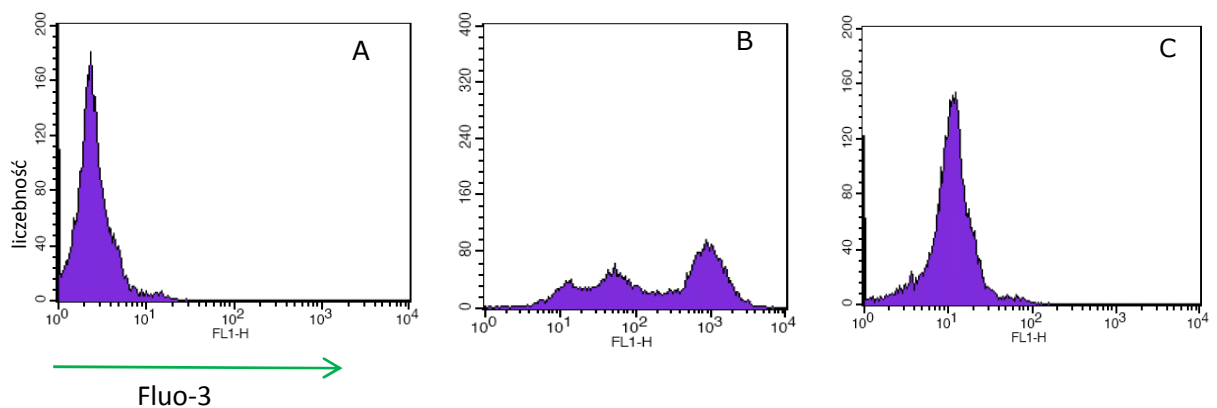


**Ryc. 18.** Kinetyka zmian stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w plemniku ludzkim stymulowanym bisfenolem A w stężeniu końcowym  $10^{-6}$  mol/l. Strzałkami zaznaczono moment podania bisfenolu A i KCl.



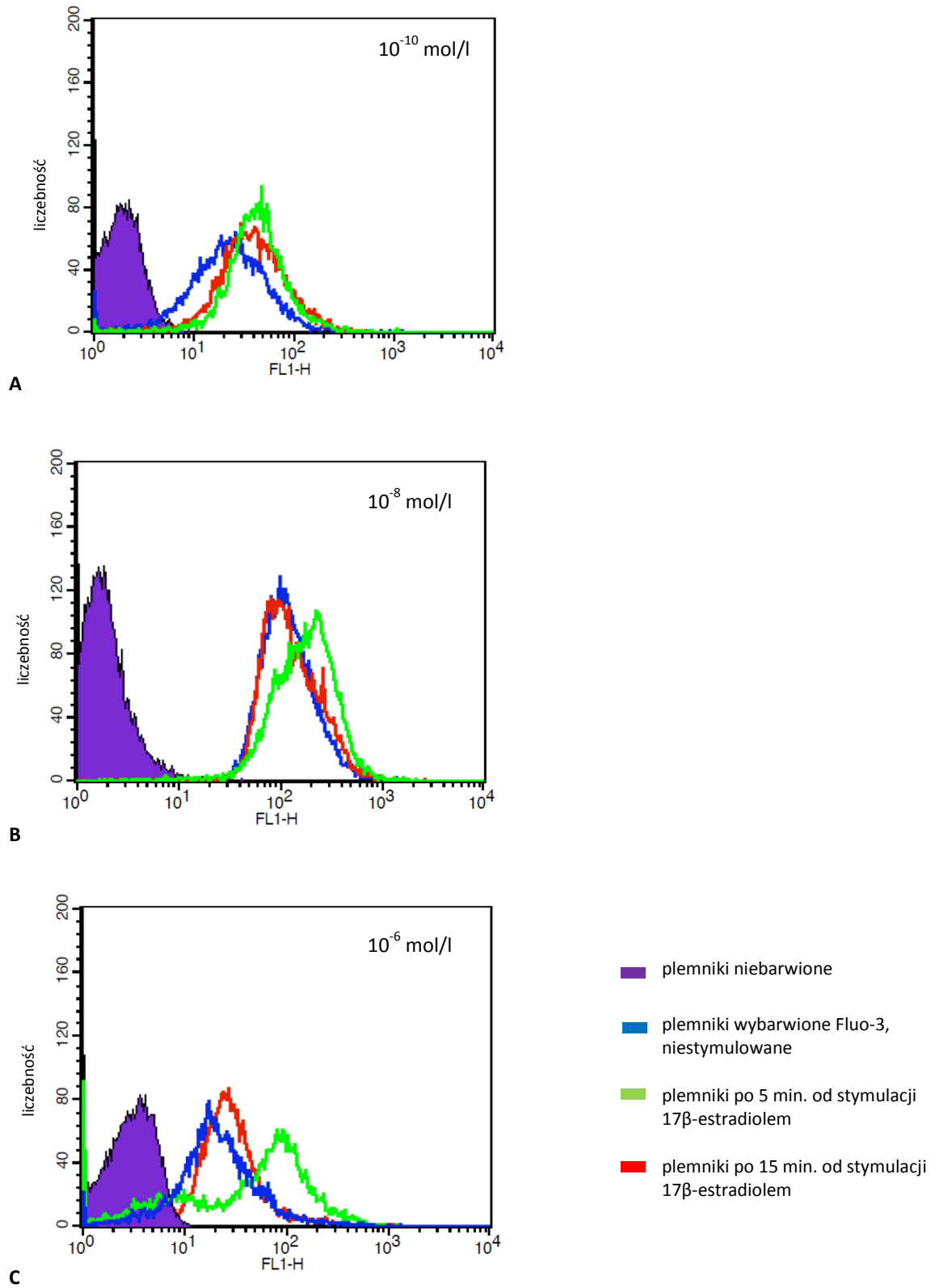
Do oceny zmian stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów w populacji komórek wykorzystano pomiary zmian intensywności fluorescencji Fluo-3 wykonane w cytometrze przepływowym.

Stwierdzono, że w nasieniu pełnym obecne są plemniki różniące się znacznie stężeniem wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (ryc. 19B). Populacja plemników wyizolowanych techniką swim-up wykazywała znaczną homogenność pod tym kątem i charakteryzowała się niskim stężeniem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (niski poziom intensywności fluorescencji Fluo-3) (ryc. 19C).



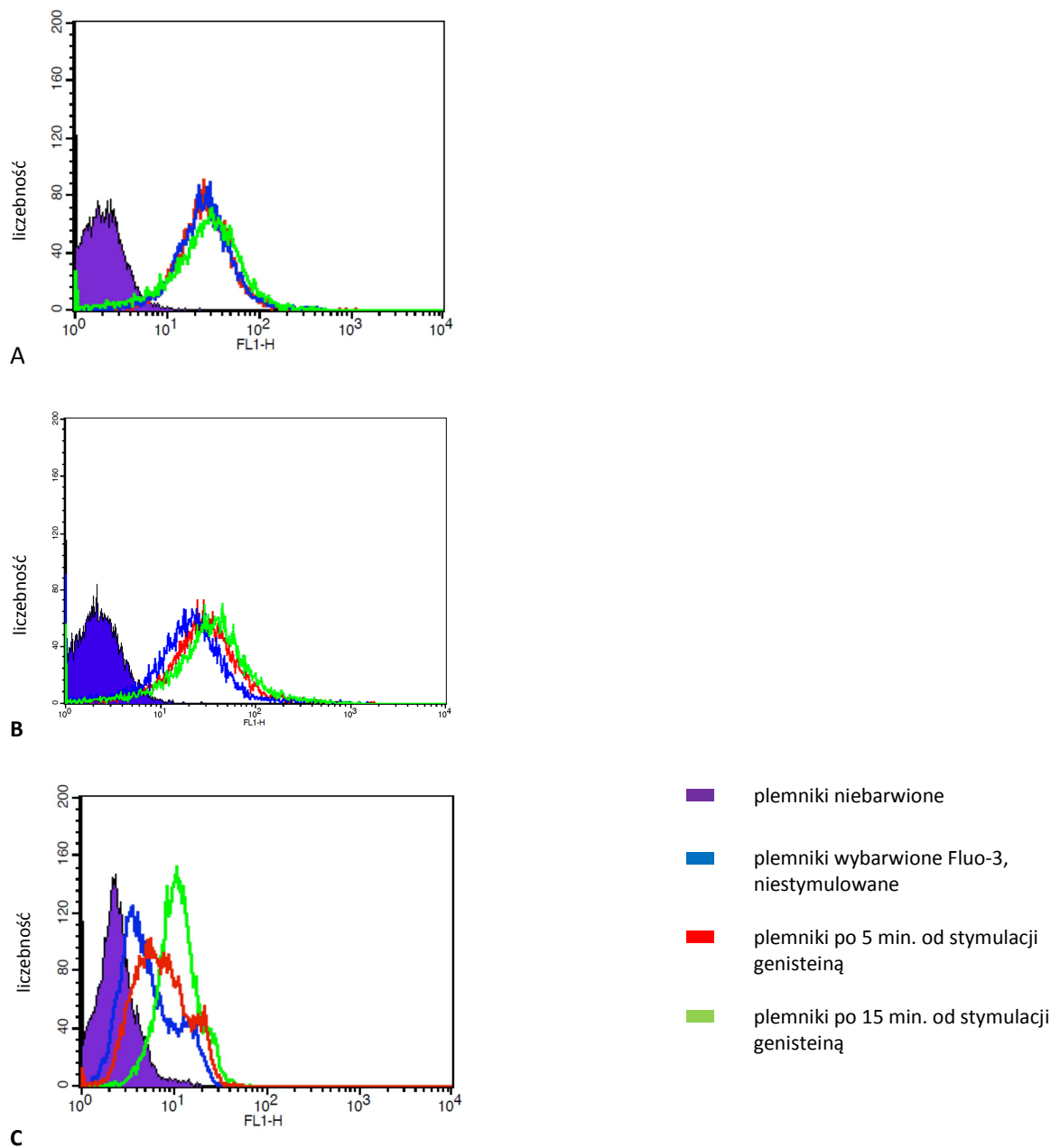
**Ryc. 19.** Ocena poziomu wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w plemnikach przy pomocy cytometru przepływowego z wykorzystaniem fluorochromu Fluo-3. A. komórki niewybarwione, B. heterogenna populacja plemników zawartych w nasieniu pełnym, C. homogenna populacja plemników wyizolowanych techniką swim-up. Oznaczenia: FL1-H – kanał fluorescencji o zakresie 515-545 nm.

Analiza zmian stężenia wolnych jonów wapniowych w plemnikach ludzkich stymulowanych  $17\beta$ -estradiolem, dokonana na podstawie zmian intensywności fluorescencji Fluo-3, potwierdziła obserwacje poczynione w badaniach mikroskopowych, że hormon ten powoduje wzrost stężenia wolnych jonów wapniowych, a reakcja jest zależna od dawki. Po 5 minutach od stymulacji rejestrowano znaczący wzrost intensywności fluorescencji, który po 15 minutach powracał do poziomu wartości wyjściowych (ryc. 20).



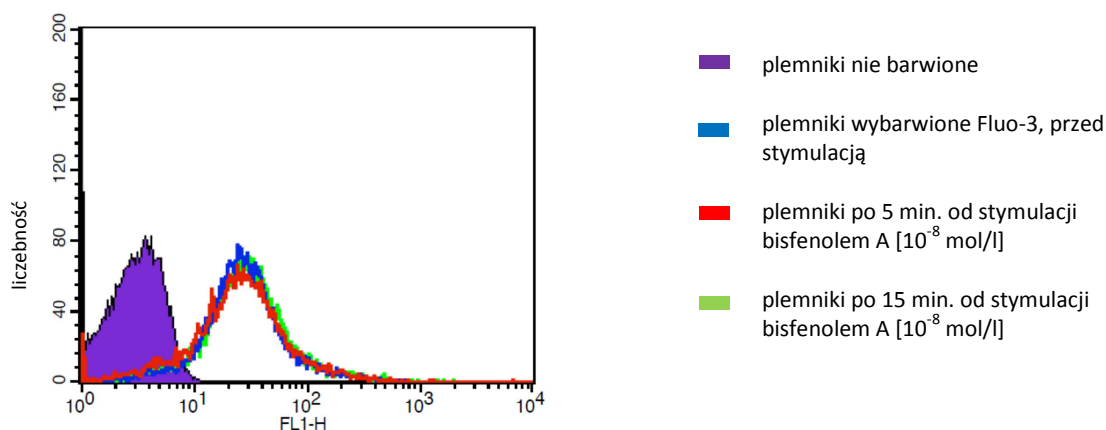
**Ryc. 20.** Stymulowane  $17\beta$ -estradiolem, w stężeniu końcowym  $10^{-10}$  mol/l (A),  $10^{-8}$  mol/l (B) i  $10^{-6}$  mol/l (C), zmiany poziomu wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w plemnikach ludzkich rejestrowane po 5 i 15 minutach od stymulacji. Barwienie Fluo-3. Oznaczenia: FL1-H – kanał fluorescencji o zakresie 515-545 nm.

Po stymulacji genisteiną w stężeniu końcowym  $10^{-8}$  mol/l i  $10^{-6}$  mol/l obserwowano świadczące o wzroście stężenia wolnych jonów wapniowych, nasilenie intensywności fluorescencji Fluo-3. Po 5 minutach od stymulacji w kanale FL-1 rejestrowano jednak niewielki wzrost intensywności fluorescencji, natomiast po 15 minutach zmiana ta była bardzo wyraźna i zależna od dawki fitoestrogenu (ryc. 21).



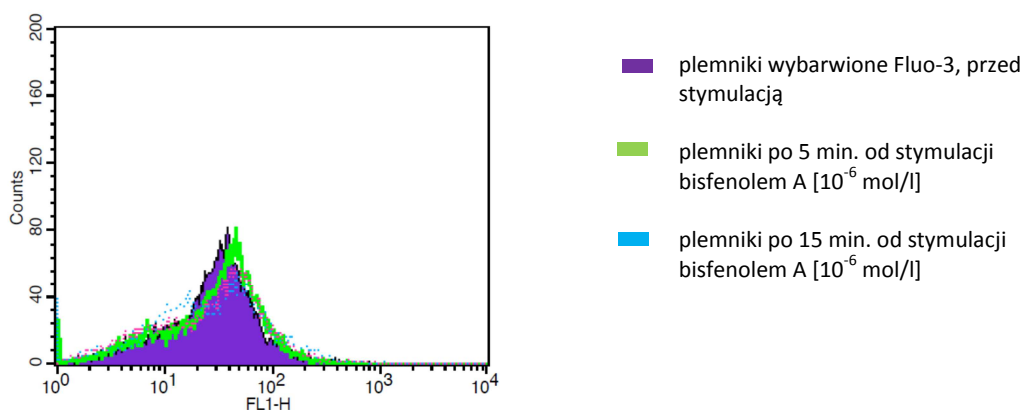
**Ryc. 21.** Stymulowane genisteiną, w stężeniu końcowym  $10^{-10}$  mol/l (A),  $10^{-8}$  mol/l (B) i  $10^{-6}$  mol/l (C), zmiany poziomu wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w plemnikach ludzkich rejestrowane po 5 i 15 minutach od stymulacji. Barwienie Fluo-3. Oznaczenia: FL1-H – kanał fluorescencji o zakresie 515-545 nm.

Stymulacja plemników bisfenolem A, niezależnie od zastosowanej dawki, nie wywoływała wyraźnych zmian intensywności fluorescencji rejestrowanych w kanale FL-1, zarówno po 5, jak i po 15 minutach od podania ksenoestrogenu (ryc. 22).



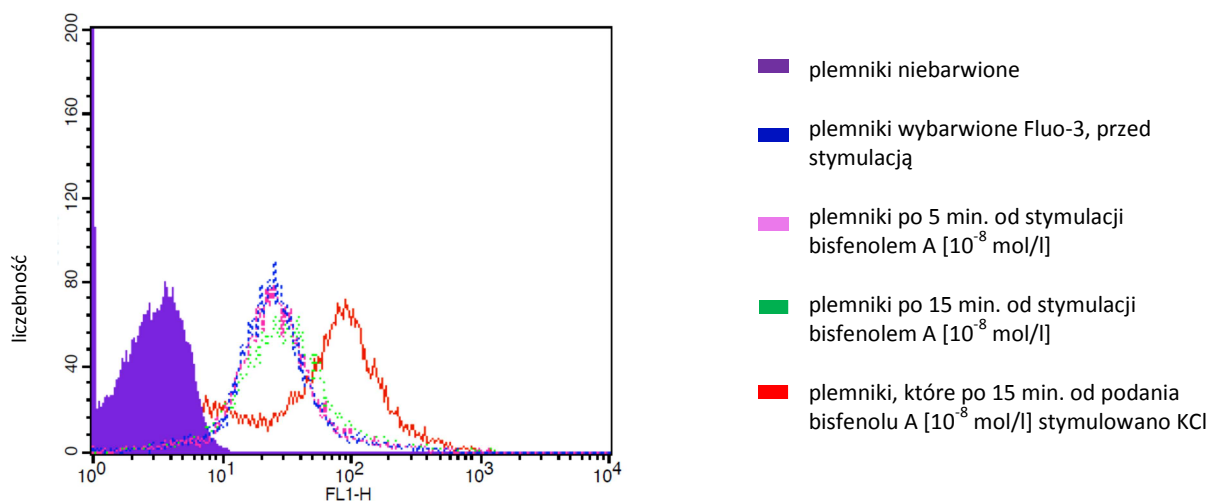
**Ryc. 22.** Stymulowane bisfenolem A, w stężeniu końcowym  $10^{-8}$  mol/l, zmiany poziomu wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w plemnikach ludzkich po 5 i 15 minutach od stymulacji. Barwienie Fluo-3. Oznaczenia: FL1-H – kanał fluorescencji o zakresie 515-545 nm.

W nielicznych nasiennych przy stymulacji plemników bisfenolem A w stężeniu końcowym  $10^{-6}$  mol/l, zarówno po 5 jak i po 15 minutach od podania związku, widoczny był niewielki wzrost intensywności fluorescencji (ryc. 23)



**Ryc. 23.** Stymulowane bisfenolem A [ $10^{-6}$  mol/l] zmiany stężenie wolnych jonów wapniowych w plemnikach po 5 i 15 minutach od stymulacji. Oznaczenia: FL1-H – kanał fluorescencji o zakresie 515-545 nm

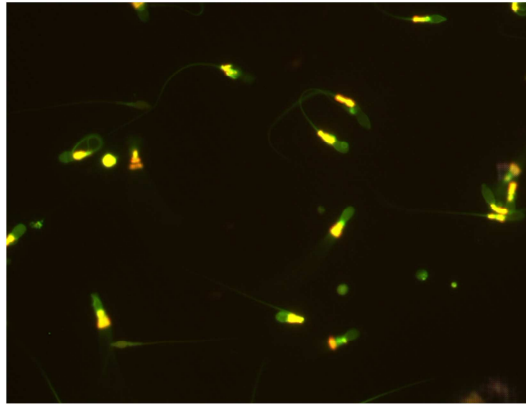
W badaniach, w których nie rejestrowano zmian intensywności fluorescencji po 5 i 15 minutach od podania bisfenolu A, kontrolnie stymulowano komórki nasyconym roztworem KCl. Pomiar dokonany bezpośrednio po podaniu KCl wykazał znaczny wzrost intensywności fluorescencji Fluo-3 (ryc. 24).



**Ryc. 24.** Stymulowane bisfenolem A [ $10^{-6}$  mol/l] i nasyconym roztworem KCl zmiany stężenie wolnych jonów wapniowych w plemnikach. Oznaczenia: FL1-H – kanał fluorescencji o zakresie 515-545 nm.

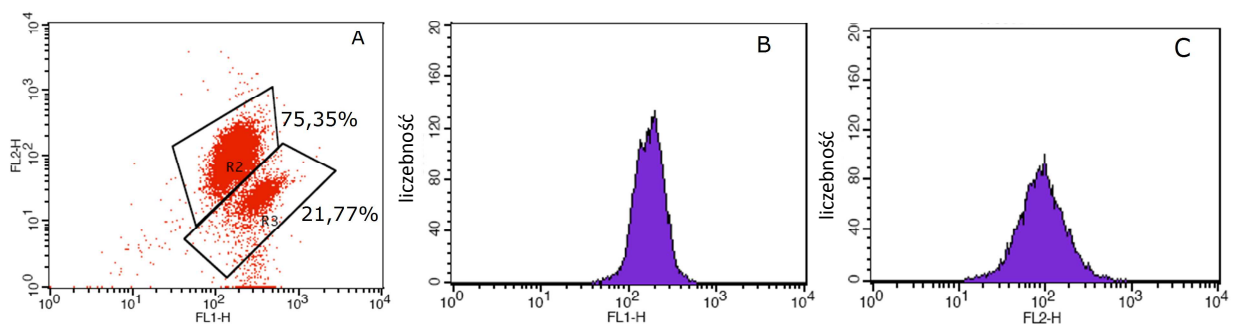
#### 4.4. Wpływ $17\beta$ -estradolu, genisteiny i bisfenolu A na błonowy potencjał mitochondrialny plemników ludzkich

Ocenę wpływu  $17\beta$ -estradolu, genisteiny i bisfenolu A na mitochondrialny potencjał błonowy plemników ludzkich wykonano techniką cytometrii przepływowej w oparciu o barwienie fluorochromem JC-1. Zarówno w nasieniu pełnym, jak i w populacji plemników wyizolowanych techniką swim-up, obecne były plemniki wykazujące wysoki i niski błonowy potencjał mitochondrialny.



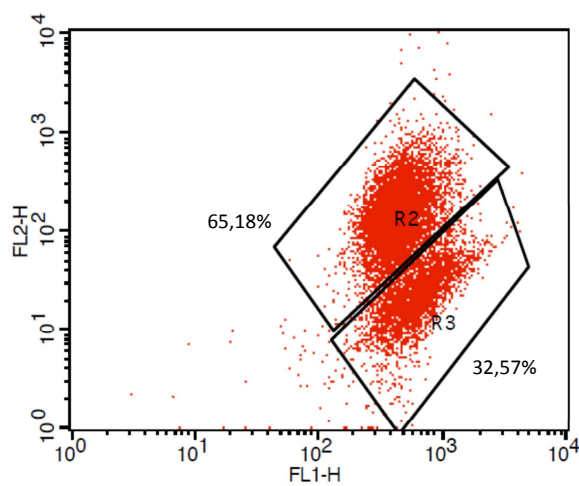
**Ryc. 25.** Ocena potencjału błonowego mitochondriów plemników. Barwienie JC-1. Plemniki po izolacji techniką swim-up z mitochondriami wykazującymi wysoki potencjał błonowy (pomarańczowe wstawki). Mikroskop fluorescencyjny; pow. obiektywu x100.

Na podstawie analizy cytometrycznej stwierdzono, że we frakcji plemników wyizolowanych techniką swim-up od 60% do 92% plemników wykazywała wysoki  $\Delta\Psi$  mitochondrialny (ryc. 25 i 26).

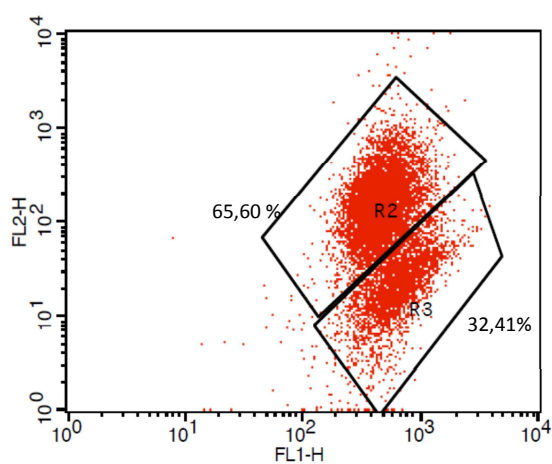


**Ryc. 26.** Cytometryczna ocena potencjału błonowego mitochondriów plemników zawartych we frakcji wyizolowanej techniką swim-up z przykładowego nasienia z normozoospermia. Barwienie JC-1. A. bramkowanie komórek z wysokim (rejon R2) i niskim (rejon R3) błonowym potencjałem mitochondrialnym. B. ocena intensywności fluorescencji w kanale FL1-H – monomery JC-1, niski potencjał błonowy mitochondriów. C. ocena intensywności fluorescencji w kanale FL2-H – agregaty JC-1, wysoki potencjał błonowy mitochondriów.

Ocena grupy kontrolnej nie wykazała istotnych statystycznie zmian błonowego potencjału mitochondrialnego plemników podczas 30 minutowej obserwacji (ryc. 27).



A



B

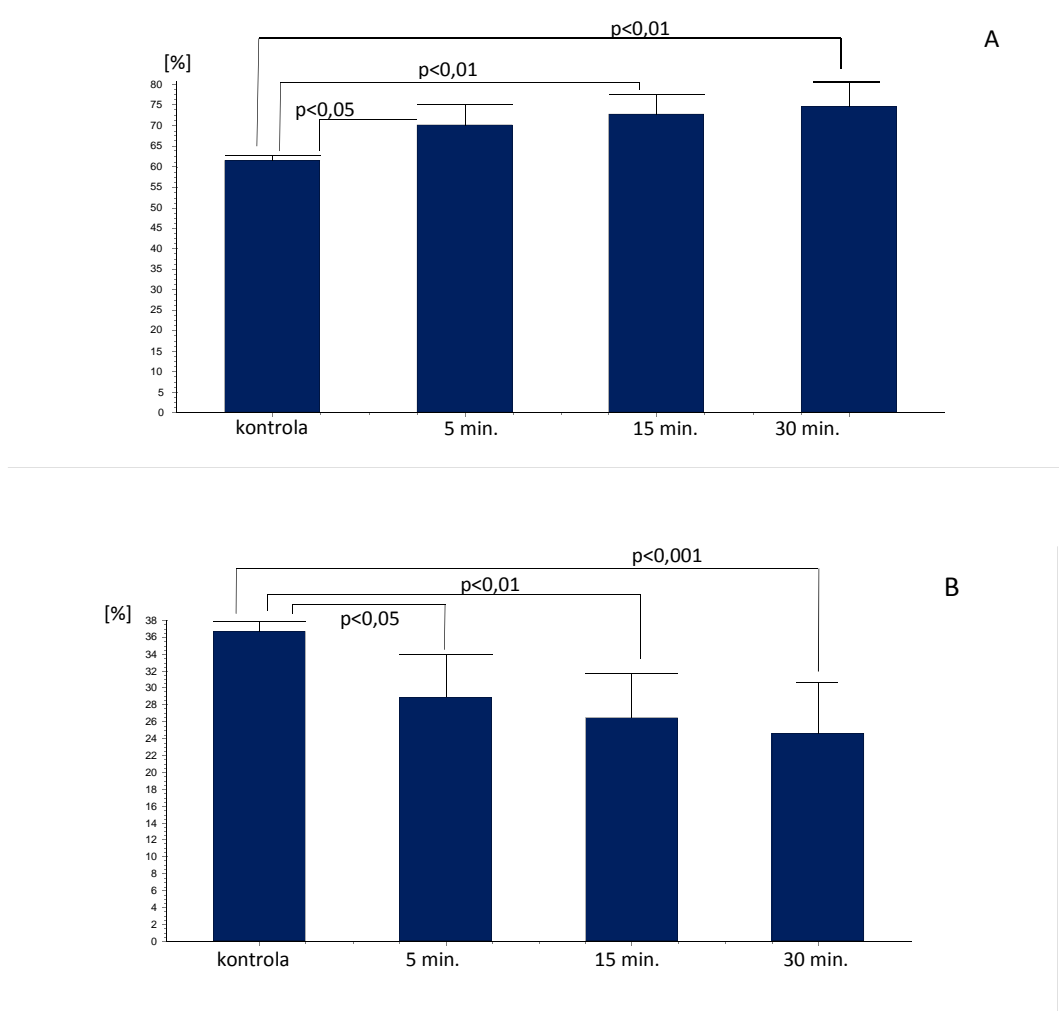
**Ryc. 27.** Cytometryczna ocena zmian potencjału błonowego mitochondriów plemników grupy kontrolnej. A. wartości wyjściowe, B. potencjał mitochondrialny plemników grupy kontrolnej po 30 minutach. Oznaczenia: R2 - plemniki z wysokim potencjałem mitochondrialnym, R3 – plemniki z niskim potencjałem mitochondrialnym, FL1-H – kanał emisyjny 515-545 nm, FL2-H – kanał emisyjny 561-603 nm

Przeprowadzone badania wykazały, że stymulacja plemników ludzkich 17 $\beta$ -estradiolem powoduje zależne od dawki zmiany  $\Delta\Psi$  mitochondriów.

Inkubacja plemników z 17 $\beta$ -estradiolem w stężeniu końcowym 10<sup>-10</sup> mol/l nie powodowała istotnych statystycznie zmian  $\Delta\Psi$  mitochondriów plemników po 5, 15 i 30 minutach inkubacji ( $p > 0,05$ ).

Inkubacja plemników z 17 $\beta$ -estradiolem w stężeniu końcowym 10<sup>-8</sup> mol/l powodowała istotny statystycznie wzrost odsetka plemników z wysokim  $\Delta\Psi$  mitochondriów ( $p = 0,004$ ) oraz istotny statystycznie spadek odsetka plemników z niskim  $\Delta\Psi$  mitochondriów ( $p = 0,01$ ).

Statystycznie znaczne różnice wystąpiły we wszystkich analizowanych przedziałach czasowych (ryc. 28).



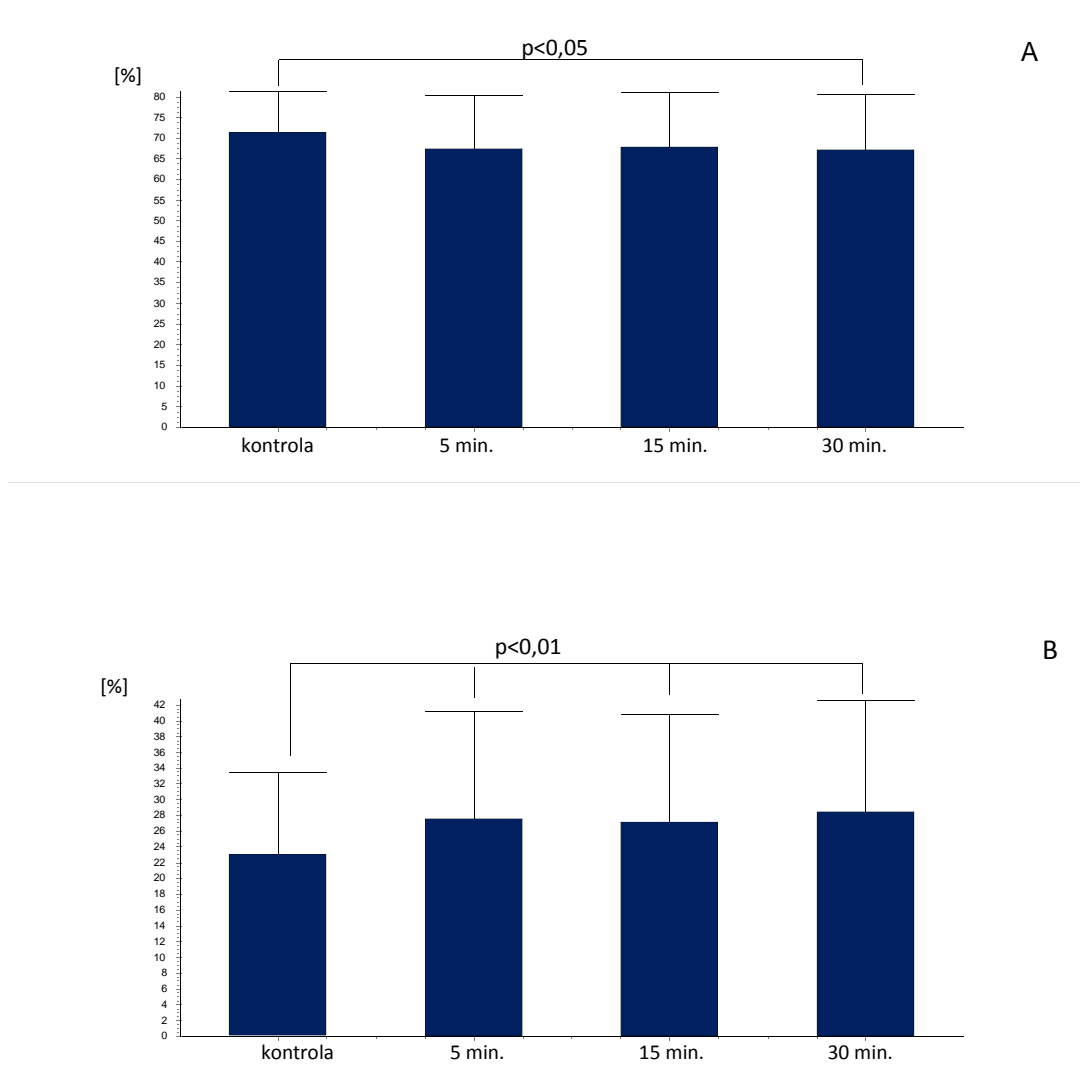
**Ryc. 28.** Wpływ  $17\beta$ -estradolu [ $10^{-8}$  mol/l] na mitochondrialny potencjał błonowy plemników.

A. Zmiany odsetka plemników z wysokim potencjałem mitochondrialnym.

B. Zmiany odsetka plemników z niskim potencjałem mitochondrialnym.

Inkubacja plemników z  $17\beta$ -estradiolem w stężeniu końcowym  $10^{-6}$  mol/l powodowała istotny statystycznie spadek odsetka plemników z wysokim  $\Delta\Psi$  mitochondriów ( $p=0,04$ ) oraz istotny statystycznie wzrost odsetka plemników z niskim  $\Delta\Psi$  mitochondriów ( $p<0,01$ ). Test wielokrotnych porównań wykazał, że istotny statystycznie spadek odsetka plemników z wysokim  $\Delta\Psi$  mitochondriów wystąpił po 30 minutach inkubacji (ryc. 29A), natomiast dla odsetka plemników z niskim  $\Delta\Psi$  mitochondriów różnica istotna statystycznie wystąpiła dla wszystkich analizowanych przedziałów czasowych (ryc. 29B).





**Ryc. 29.** Wpływ  $17\beta$ -estradolu [ $10^{-6}$  mol/l] na mitochondrialny potencjał błonowy plemników.

A. Zmiany odsetka plemników z wysokim potencjałem mitochondrialnym.

B. Zmiany odsetka plemników z niskim potencjałem mitochondrialnym.

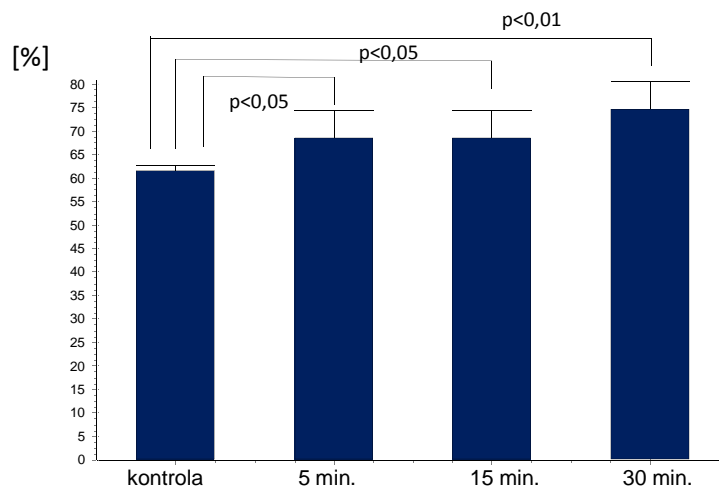
Inkubacja plemników z genisteiną niezależnie od zastosowanej dawki nie powodowała istotnych statystycznie zmian  $\Delta\Psi$  mitochondriów plemników po 5, 15 i 30 minutach inkubacji ( $p > 0,05$ ).

Bisfenol A w stężeniu końcowym  $10^{-10}$  mol/l nie powodował istotnych statystycznie zmian  $\Delta\Psi$  mitochondriów plemników po 5, 15 i 30 minutach inkubacji.

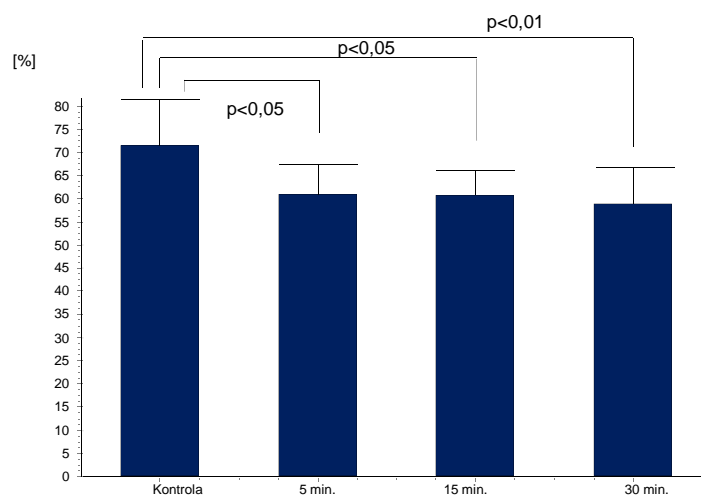
Inkubacja plemników z bisfenolem A w stężeniu końcowym  $10^{-8}$  mol/l powodowała istotny statystycznie wzrost odsetka plemników z wysokim  $\Delta\Psi$  mitochondriów ( $p = 0,01$ ) oraz istotny

statystycznie wzrost odsetka plemników z niskim  $\Delta\Psi$  mitochondriów ( $p<0,01$ ). Test wielokrotnych porównań wykazał, że istotny statystycznie wzrost odsetka plemników z wysokim  $\Delta\Psi$  mitochondriów wystąpił dla wszystkich analizowanych przedziałów czasowych (ryc. 30 A).

Bisfenol A w stężeniu końcowym  $10^{-6}$  mol/l powodował istotny statystycznie spadek odsetka plemników z wysokim  $\Delta\Psi$  mitochondriów ( $p=0,01$ ). Test wielokrotnych porównań wykazał, że istotny statystycznie spadek odsetka plemników z wysokim  $\Delta\Psi$  mitochondriów wystąpił dla wszystkich analizowanych przedziałów czasowych (ryc. 30 B).



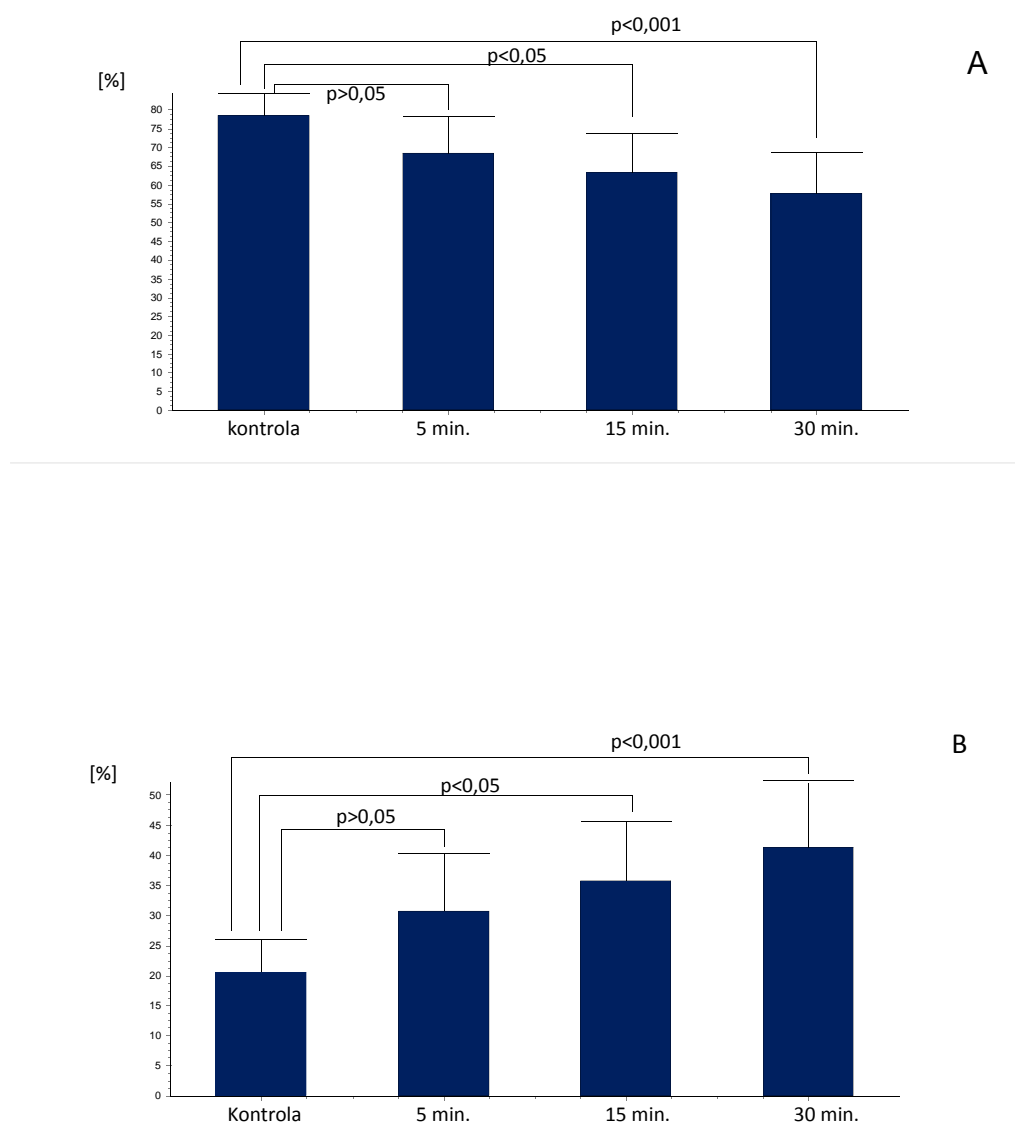
A



B

**Ryc. 30.** Wpływ bisfenolu A w stężeniu końcowym  $10^{-8}$  mol/l (A) i  $10^{-6}$  mol/l (B) na odsetek plemników z wysokim potencjałem mitochondrialnym.

Inkubacja plemników jednocześnie z  $17\beta$ -estradiolem, genisteiną i bisfenolem A w stężeniach końcowych  $10^{-10}$  mol/l powodowała istotny statystycznie spadek odsetka plemników z wysokim  $\Delta\Psi$  mitochondriów ( $p=0,0001$ ) oraz istotny statystycznie wzrost odsetka plemników z niskim  $\Delta\Psi$  mitochondriów ( $p<0,001$ ). Test wielokrotnych porównań wykazał, że istotne statystycznie różnice wystąpiły po 15 i 30 minutach inkubacji, zarówno dla odsetka plemników z wysokim jak i dla odsetka plemników z niskim  $\Delta\Psi$  (ryc. 31).

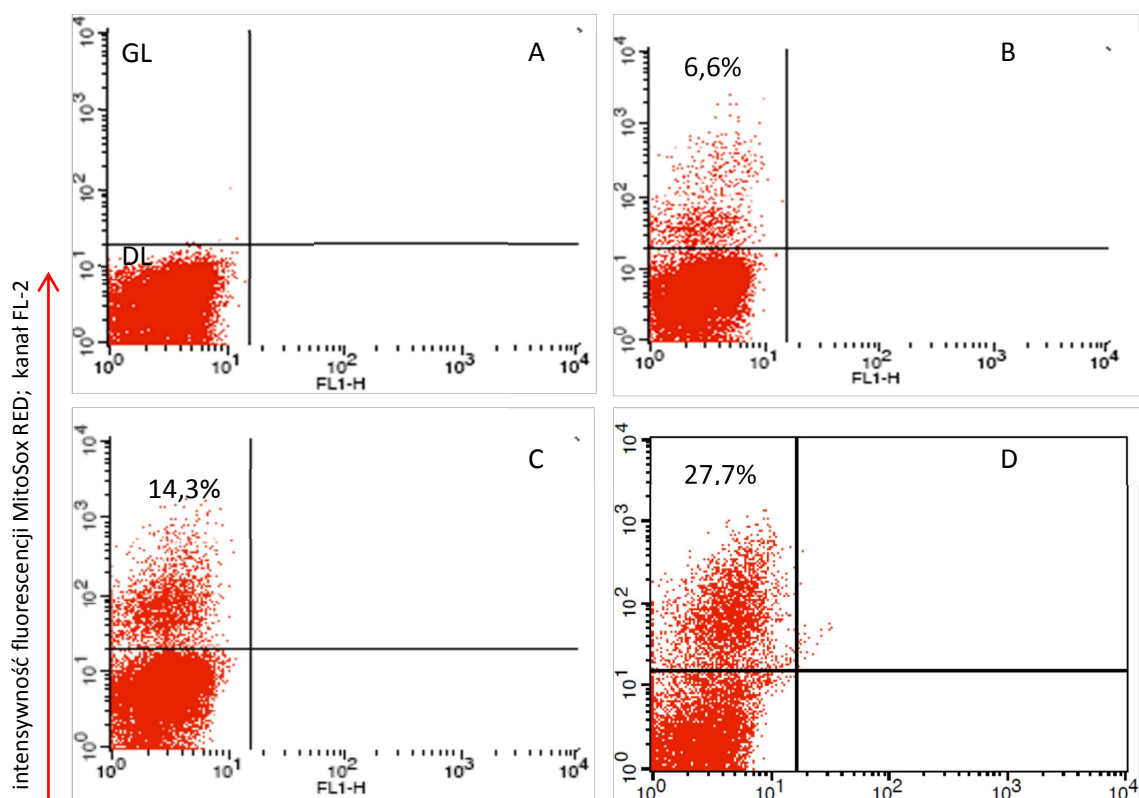


**Ryc. 31.** Wpływ jednoczesnej inkubacji plemników z  $17\beta$ -estradiolem, genisteiną i bisfenolem A w stężeniach końcowych  $10^{-10}$  mol/l na mitochondrialny potencjał błonowy. A. Zmiany odsetka plemników z wysokim potencjałem mitochondrialnym. B. Zmiany odsetka plemników z niskim potencjałem mitochondrialnym.

#### 4.5. Wpływ $17\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na poziom anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach plemników ludzkich

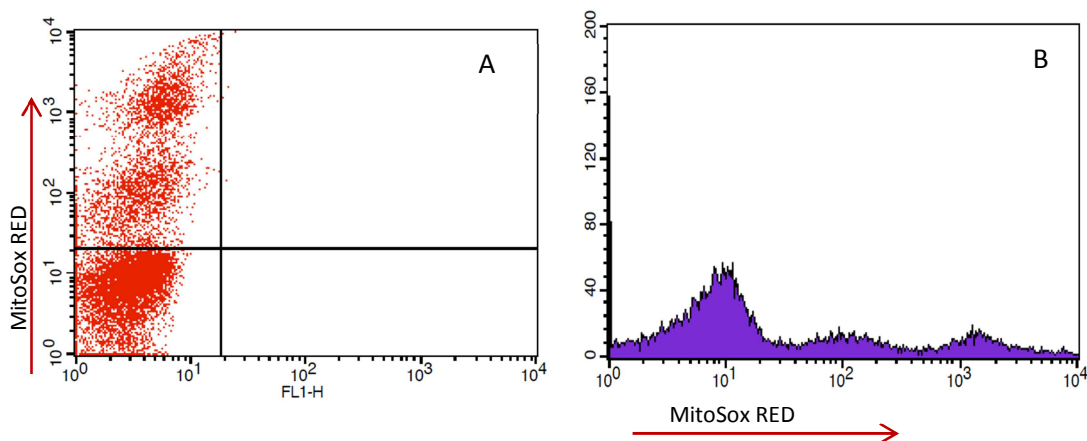
Ocenę wpływu  $17\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach plemników ludzkich wykonano techniką cytometrii przepływowej w oparciu o barwienie fluorochromem MitoSOX RED.

W badaniach cytometrycznych zarejestrowano obecność dwóch populacji plemników: plemniki, w których w kanale emisyjnym dla MitoSOX RED (kanał FL2) nie rejestrowano fluorescencji oraz komórki emitujące charakterystyczną dla fluorochromu fluorescencję czerwoną (ryc. 32). We frakcji plemników po izolacji techniką swim-up odsetek komórek MitoSox RED pozytywnych wahał się w granicach od 6,7 do 42%. W większości próbek populacje plemników, w których rejestrowano fluorescencję MitoSox RED, tworzyły homogenną grupę.



**Ryc. 32.** Ocena poziomu anionorodnika ponadtlenkowego w plemnikach ludzkich na podstawie barwienia fluorochromem MitoSox RED. A. ocena kontrolna komórek niebarwionych. B-D. analiza przeprowadzona dla trzech przekładowych nasień, po izolacji techniką swim-up. Oznaczenia: GL- kwadrat górny lewy – komórki wykazujące fluorescencję MitoSox RED rejestrowaną w kanale FL-2 (561-603 nm), DL – kwadrat dolny lewy - komórki nie wykazujące fluorescencji MitoSox RED, FL1-H – kanał fluorescencji o zakresie 515-545 nm.

W badanym materiale były również nasienia, w których po izolacji komórek techniką swim-up, występowały dwie subpopulacje plemników, znacznie różniące się rejestrowanym w kanale FL-2 poziomem fluorescencji, a więc poziomem mitochondrialnego stężenia anionorodnika ponadtlenkowego (ryc. 33).



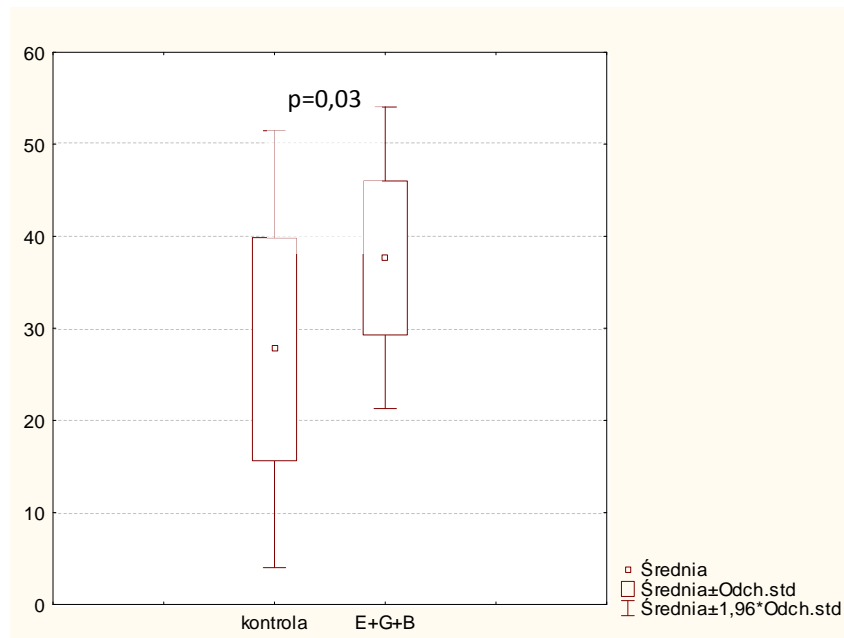
**Ryc. 33.** Przykładowe nasienie z wyraźnie zaznaczonymi dwoma subpopulacjami plemników różniącymi się poziomem anionorodnika ponadtlenkowego (A). B. Analiza intensywności fluorescencji rejestrowanej w kanale FL-2 plemników z wykresu A.

Ocena wpływu dwugodzinnej inkubacji plemników z 17 $\beta$ -estradiolem, genisteiną lub bisfenolem A, nie wykazała istotnych statystycznie zmian odsetka plemników MitoSox RED pozytywnych ( $p > 0,05$ ) (tabela 3).

**Tabela. 3.** Zmiany odsetek plemników MitoSox RED pozytywnych po dwugodzinnej inkubacji z 17 $\beta$ -estradiolem, genisteiną lub bisfenolu A [N=15]

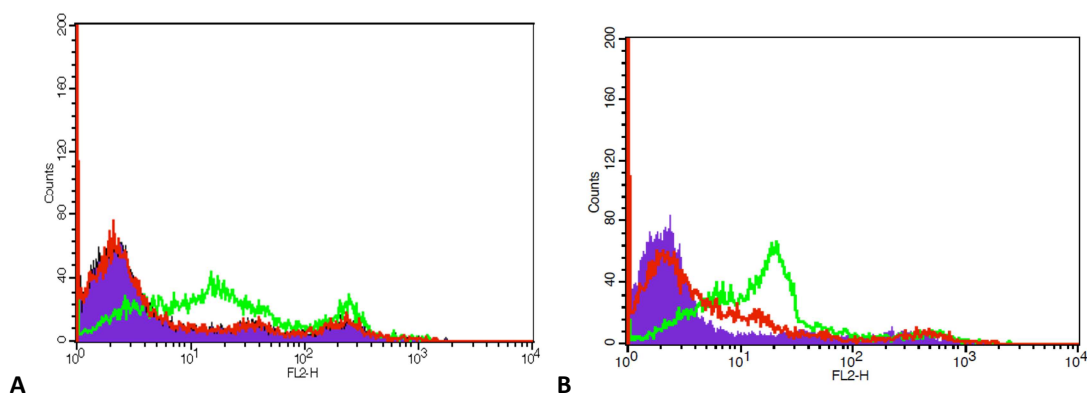
	Średnia	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe
$10^{-10}$ mol/l				
kontrola	27,7	6,7	42,0	12,1
17 $\beta$ -estradiol	25,4	13,1	41,7	12,5
genisteina	29,0	7,5	57,2	18,9
bisfenol A	35,3	22,8	45,7	6,9
p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
$10^{-8}$ mol/l				
kontrola	27,7	6,7	42,0	12,1
17 $\beta$ -estradiol	31,7	13,7	59,4	16,1
genisteina	33,1	13,5	68,3	19,8
bisfenol A	34,5	28,3	44,0	4,9
p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
$10^{-6}$ mol/l				
kontrola	27,7	6,7	42,0	12,1
17 $\beta$ -estradiol	24,3	4,5	39,1	10,0
genisteina	25,7	5,8	42,2	11,3
bisfenol A	37,5	24,5	54,7	9,5
p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Inkubacja plemników jednocześnie z wszystkimi analizowanymi związkami, w stężeniach końcowych  $10^{-10}$  mol/l, wykazała istotny statystycznie wzrost odsetka plemników ( $38,0 \pm 8,3\%$  vs  $27,7 \pm 12,1\%$ ;  $p=0,03$ ), u których stosowaną techniką rejestrowano charakterystyczną dla MitoSox RED fluorescencją (ryc. 34).



**Ryc. 34.** Odsetek plemników wykazujących fluorescencję MitoSOx RED w grupie kontrolnej i po 2 godzinach jednoczesnej inkubacji z  $17\beta$ -estradiolem, genisteiną i bisfenolem A w stężeniach końcowych  $10^{-10}$  mol/l. Oznaczenia: E+G+B -  $17\beta$ -estradioł + genisteina + bisfenolem-A; Odch. Std. – odchylenie standardowe.

Analiza intensywności fluorescencji rejestrowana w kanale FL-2 wykazała, że zmieniła się nie tylko odsetek komórek wykazujących fluorescencję MitoSOx RED, ale również intensywność fluorescencji (ryc. 35).



**Ryc. 35.** Zmiany intensywności fluorescencji rejestrowanej w kanale FL-2 (kanał emisji MitoSOX RED) plemników stymulowanych jednocześnie  $17\beta$ -estradiolem, genisteiną i bisfenolem A w stężeniach końcowych  $10^{-10}$  mol/l dla dwóch przykładowych nasień.

## 5. DYSKUSJA

### 5.1. Ekspresja receptorów ESR1 i ESR2 w plemnikach

Plemniki podczas transportu poprzez drogi męskiego i żeńskiego układu rozrodczego eksponowane są na działanie hormonów steroidowych takich jak estradiol, progesteron czy testosteron. Wykazano, że estrogeny biorą udział w regulacji procesu spermatogenezy, a także wpływają na dojrzewanie i transport plemników w obrębie najądrza. Ponieważ w plemnikach dochodzi do ekspresji aromatazy odpowiedzialnej za konwersję testosteronu do estradiolu, sugeruje się, iż komórki te są ruchomymi jednostkami endokrynnymi. Postuluje się, że wydzielany przez plemniki estradiol może na drodze autokrynowej i/lub parakrynowej wpływać na funkcjonowanie gamet męskich i innych elementów układu rozrodczego [56, 150]. Mechanizmy poprzez które estrogeny wywierają swój efekt w plemnikach nie są do końca poznane. Ze względu na specyficzną budowę gamet męskich postuluje się, że estrogeny działają na nie na drodze niegenomowej. Zakłada się, że w systemie transdukcji sygnału wykorzystują one receptory estrogenowe o strukturze podobnej do klasycznych receptorów jądrowych.

Przeprowadzone w pracy badania wykazały, że zarówno w plemnikach ludzkich, jak i w plemnikach knurów, obecne są ESR1 i ESR2. W plemnikach ludzkich ESR1 wykazywały najwyższy poziom ekspresji w części postakrosomowej główki oraz w okolicy wstawki. W pojedynczych plemnikach widoczna była słaba reakcja w głównej części witki oraz reakcja błonowa w części akrosomowej. Plemniki o nieprawidłowej morfologii główki często wykazywały ekspresję ESR1 na obszarze całej tej struktury, co było szczególnie widoczne w plemnikach o wydłużonej główce. W przypadku plemników knura widoczna była bardzo silna reakcja barwna w rejonie wstawki oraz dużo słabsza w obrębie głównej części witki. Duża część plemników knura wykazywała ekspresję ESR1 w błonie komórkowej części szczytowej główki. Ekspresja ESR2 była najsilniejsza w rejonie wstawki, zarówno w plemnikach ludzkich, jak i w plemnikach knurów. W obu badanych gatunkach nie stwierdzono natomiast reakcji błonowej na ESR2 w części szczytowej główki.

Dane z literatury dotyczące topografii ESR1 w plemnikach są niejednoznaczne. Badania grupy Solakidi i współpracowników wskazują, że ESR1 zlokalizowane są głównie w cytoplazmie witki oraz w regionie równikowym główki plemnika [231]. Autorzy, używając dwóch rodzajów polikonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko C-końcowej lub zawiasowej domenie ESR1, wykazali bardzo silną reakcję w rejonie równikowym główki.

W naszych badaniach zastosowaliśmy przeciwciała poliklonalne przeciwko domenie N-końcowej, a otrzymane wyniki są podobne do prezentowanych przez Aquilę i współpracowników. Badacze ci, stosując monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko domenie C-końcowej, stwierdzili obecność ESR1 głównie w obrębie wstawki, co potwierdza wcześniejsze doniesienia na temat lokalizacji tych receptorów [13, 71].

Rago i wsp. również wskazują na obecność ESR1 na terenie wstawki. W niedojrzałych plemnikach obecność ESR1 wykazywali na terenie kropli cytoplazmatycznej. W swoich badaniach nie stwierdzili ekspresji ESR1 na obszarze główki i głównej części wtki plemników [206].

Wskazywana przez Solakidi i wsp. lokalizacja ESR1 w równikowym segmencie główki sugeruje zaangażowanie tego receptora w proces fuzji błony komórkowej plemnika i oocytu. W tym rejonie zlokalizowane są białka takie jak ekwatoryna czy oscylina, które najprawdopodobniej są niezbędne dla prawidłowego przebiegu procesu aktywacji oocytu. Według autorów nie można więc wykluczyć, że estrogeny, poprzez ESR1 obecny w rejonie równikowym, też są zaangażowane w ten proces [231].

W naszych badaniach w licznych plemnikach knura stwierdziliśmy błonową lokalizację ESR1 w części szczytowej główki. Podobną reakcję obserwowano tylko w pojedynczych plemnikach ludzkich. Obraz taki może wynikać z różnic międzygatunkowych w ekspresji ESR. Ponieważ nie wszystkie plemniki knura wykazywały ekspresję ESR1 w tym rejonie, nie można wykluczyć, że obserwowane różnice wiążą się ze stopniem dojrzałości gamet i zmianami błonowymi, jakie zachodzą w plemnikach podczas procesu kapacytacji. W trakcie tego procesu dochodzi między innymi do kumulowania się tratw lipidowych w części szczytowej główki [28, 180]. Wskazuje się, że receptory estrogenowe kotwiczą się do błony komórkowej w miejscach występowania tratw [120]. Nie można więc wykluczyć, że obserwowana ekspresja ESR1 w części szczytowej główki jest związana z powyższym zjawiskiem.

W badaniach ultrastrukturalnych z zastosowaniem złota koloidalnego, przeprowadzonych na plemnikach uzyskanych od płodnych mężczyzn nie potwierdzono jednak lokalizacji ESR1 na terenie główki ani w głównej części wtki. Niski poziom ESR1 stwierdzono jedynie w rejonie wstawki (w mitochondriach oraz pomiędzy grubymi włóknami obwodowymi a aksonemą) [92].

Opisane powyżej różnice wyników badań dotyczących lokalizacji ESR1 w plemnikach ludzkich mogą wynikać z faktu użycia do analiz innych przeciwciał oraz zastosowanych metod utrwalania plemników. Może się to wiązać również z obecnością różnych izoform receptora



w plemnikach. Solakidi i wsp. wykazali w plemnikach obecność dwóch form ESR1 o masie 66 i 45 kDa [231]. Grupa Luconiego sugeruje, że w błonie komórkowej plemników obecne są różne izoformy ESR1, chroniące jedynie domenę wiążącą hormon, pośredniczącą w modulowaniu niegenomowego działania estrogenów. Autorzy ci opisali występujący w plemnikach ludzkich błonowy receptor estrogenowy o masie 29 kDa [21, 151]

Wyniki dotyczące topografii ESR2 w plemnikach są bardziej jednoznaczne. Podobnie jak to miało miejsce w naszych badaniach, większość autorów wskazuje na ich silną ekspresję w okolicy wstawek. O ile badania Solakidiego i współpracowników [231] wykazują ekspresję ESR2 tylko w okolicy wstawek, to analizy przeprowadzone przez Aquilę i wsp. [13] oraz Rago i wsp. [206] sugerują obecność tych receptorów również w głównej części witki. W naszych badaniach mimo, że poziom ekspresji ESR2 był największy w rejonie wstawek, również obserwowaliśmy jego obecność w głównej części witki i w tylnej części główki.

Silny poziom ekspresji ESR2 w regionie wstawki sugeruje możliwość lokalizacji receptorów w mitochondriach plemników. Słuszność takiej hipotezy potwierdzają badania z wykorzystaniem specyficznego mitochondrialnego markera CMX [231].

Badania ultrastrukturalne wykonane w transmisyjnym mikroskopie elektronowym wykazały obecność ESR2 w mitochondriach plemników zdrowych mężczyzn. Ponadto znakowanie złotem koloidalnym wskazywało na ich obecność w głównej części witki (zarówno w osłonce włóknistej jak i we włóknach gęstych zewnętrznych). Guido i wsp. wskazują ponadto na obecność w ESR2 błonie komórkowej plemników oraz ich brak na terenie główki [92].

Obecność receptorów estrogenowych w mitochondriach wymaga by miały one sygnał lokalizacji mitochondrialnej. Jak do tej pory nie stwierdzono w ESR2 obecności klasycznego, aminoterminalnego, amifatycznego,  $\alpha$ -helikalnego sygnału lokalizacji mitochondrialnej. W publikacjach donoszących o obecności receptorów estrogenowych w mitochondriach komórek MCF-7 stwierdzono w nich obecność sekwencji o właściwościach bardzo zbliżonych do sekwencji zaobserwowanych w białkach wewnętrznej błony mitochondrialnej, które są wycelowane w mitochondria właśnie poprzez takie wewnętrzne białkowe sygnały [50, 51]. Badania grupy Solakidiego i wsp. wykazały obecność podobnych sekwencji w receptorze androgenowym. Także w receptorze glukokortykoidowym, odkryto sekwencje aminokwasowe najprawdopodobniej odpowiedzialne za lokalizację mitochondrialną [231].

Potencjalna obecność ESR2 w mitochondriach plemników wskazuje, że estrogeny mogą być ważnym elementem regulującym pracę tego kluczowego organellum plemników. Możliwość wpływu estrogenów na metabolizm plemników nie musi wiązać się tylko z ich

mitochondrialną lokalizacją. Badania przeprowadzone przez Guido i współpracowników [92] wskazują, że 17 $\beta$ -estradiol wywołuje w plemnikach efekty lipolityczne. Stwierdzono również jego wpływ na metabolizm glukozy poprzez aktywację dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Obecność ESR2 w witce plemników prawdopodobnie potwierdza możliwość wpływu estrogenów na procesy energetyczne toczące się w tej domenie.

Mitochondria plemników są ich głównym źródłem ATP otrzymywanego w procesie oksydacyjnej fosforylacji. Sugeruje się jednak, że ze względu na długość witki (u człowieka ma około 50  $\mu$ m długości), plemniki nie są w stanie zabezpieczyć wystarczającej dyfuzji ATP z mitochondriów do dystalnych części tej struktury. W głównej części witki plemników obecne są enzymy glikolityczne takie jak: heksokinaza 1 (HK1S), dehydrogenaza aldehydu -3-fosfoglicerynowego (GAPDHS), A izoforma aldolazy 1 (ALDOA) oraz dehydrogenaza mleczanowa A (LDHA) [131]. Uważa się, że toczące się w tym rejonie przemiany glikolityczne odgrywają istotną rolę w ruchu plemników [78]. Nie można wykluczyć, że estrogeny, poprzez zlokalizowane w witce ESR, mogą wpływać na intensywność tych przemian.

Za słusznością powyższej hipotezy przemawiają obserwacje poczynione przez Guido i współpracowników na plemnikach pochodzących od mężczyzn z żylakami powrózka nasiennego. W przeprowadzonych badaniach, posługując się obserwacjami wykonanymi w transmisyjnym mikroskopie elektronowym z zastosowaniem złota koloidalnego, naukowcy ci stwierdzili, że plemniki mężczyzn z tym zaburzeniem wykazywały znacząco obniżoną liczbę ESR2 oraz całkowity brak ESR1 na terenie witki w stosunku do plemników pochodzących od zdrowych mężczyzn. O ile 17 $\beta$ -estradiol wywierał istotny wpływ na metabolizm lipidów i glukozy w plemnikach grupy kontrolnej, to w plemnikach pochodzących od mężczyzn z żylakami powrózka nasiennego odpowiedź na estradiol była znacznie obniżona lub nawet nieobecna [92].

## 5.2. Wpływ estrogenów i ksenoestrogenów na żywotność komórek

Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że w komórkach somatycznych estrogeny wpływają na proces proliferacji i śmierci komórki. Proces apoptozy jest bardzo ważnym elementem kontrolującym prawidłowy przebieg procesu spermatogenezy. Wskazuje się, że ponad 50% różnicujących się komórek gametogenicznych ginie na drodze apoptozy [183, 252].

Mishra i Shaha przeprowadzili badania ilustrujące możliwość wywoływania przez  $17\beta$ -estradiol apoptozy w różnych komórkach linii spermatogenicznej. Kluczowymi elementami zmian wywołanych przez estradiol był wzrost ekspresji FasL, nadmierna produkcja tlenku azotu i  $H_2O_2$  w spermatocytach, spermatydach i spermatogoniach, a także przejściowa mitochondrialna hyperpolaryzacja skutkująca uwalnianiem cytochromu c. Badacze ci wykazali, że w 75% komórek poddanych działaniu estradiolu dochodziło do błonowej translokacji fosfatydylseryny (w grupie kontrolnej taką reakcję prezentowało tylko 12% komórek). Zaobserwowano, iż równoczesne podawanie tamoksifenu redukowało w sposób istotny liczbę komórek wybarwionych aneksyną-V. Badania te sugerują mitochondrialne powiązania między działaniem estradiolu a indukcją procesu apoptozy komórek germinalnych [168].

Chaki i wsp. wykazali negatywny wpływ benzoesanu estradiolu na nabłonek plemnikotwórczy szczurów. Prawdopodobnie wpływ ten był spowodowany silnym stresem oksydacyjnym, pociągającym za sobą apoptozę i późniejszy spadek liczby komórek rozrodczych w nabłonku plemnikotwórczym. Badacze stwierdzili znaczący wzrost peroksydacji lipidów i współtowarzyszący mu spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy po 30 dniach podawania hormonu. Wykazali również spadek poziomu testosteronu, zarówno wewnątrzjądrowego, jak i w surowicy. Również liczba spermatocytów i okrągłych spermatyd była znacząco zredukowana. Dodatkowo po 10 dniach podawania estradiolu tkanka jądrowa wykazała trzykrotny wzrost aktywności kaspazy 8 [45].

Liczne badania potwierdzają niekorzystny wpływ ksenoestrogenów na funkcjonowanie gonady męskiej. Wskazuje się, że zwiększona ekspozycja płodów płci męskiej na fitoestrogeny w okresie prenatalnym może powodować patologie rozwojowe narządów płciowych np. niezstąpienie jąder, cysty najądrza czy pozostałości przewodów Müllera. Jest bardzo prawdopodobne, że ksenoestrogeny mogą wywołać bardzo istotne zmiany w samej gonadzie. W płodach eksponowanych na fitoestrogeny obserwowano między innymi znaczne podwyższenie ilości apoptotycznych komórek germinalnych [59, 16, 140, 161, 169, 263].

Wskazuje się, że nadmierna prenatalna ekspozycja na ftalany zaburza funkcjonowanie komórek Leydiga i może doprowadzić do dysgenezy gonad [102]. Herath i wsp. wskazują, że ekspozycja dojrzałych szczurów na oktyfenol i bisfenol A powoduje spadek stężenia testosteronu w osoczu oraz zmniejszenie liczby najądrzowych plemników, bez istotnego wpływu na ich ruch [96].

Murono i wsp., obserwując w warunkach *in vitro* wpływ  $17\beta$ -estradiolu, oktyfenolu, endosulfanu i bisfenolu A na komórki Leydiga dojrzałych szczurów dowiedli pośrednio

ekspozycja tych komórek na badane związki była zależna od ich rodzaju. Autorzy wykazali, że spośród wyżej wymienionych związków tylko oktyfenol wpływał na poziom testosteronu syntetyzowanego w komórkach Leydiga. Autorzy postulują, że wywołwany przez oktyfenol efekt biologiczny nie jest wywierany za pośrednictwem receptorów estrogenowych [174].

Z kolei Kotula-Balak i wsp. zaobserwowali zależne od dawki i czasu ekspozycji na oktyfenol zmiany zarówno morfologii, jak i przebiegu procesu steroidogenezy w nowotworowych komórkach Leydiga myszy [125].

Badania przeprowadzone przez Piotrowską i wsp., w których ciężarnym szczurzycom podawano doustnie genisteinę i daidzeinę, wykazały relatywnie niewielkie zmiany morfologii jąder i najądrzy oraz ilości plemników najądrzowych, pomimo zastosowania wysokich stężeń fitohormonów (200 mg/kg/dobę) [196].

Ye i wsp. stwierdzili, że bisfenol A powoduje zależny od dawki spadek syntezy testosteronu w ludzkich i szczurzych komórkach Leydiga [272]. Badania Cai i współpracowników przeprowadzone na myszach wykazały, że polichlorek bisfenolu powoduje hamowanie procesu proliferacji oraz indukcję procesu apoptozy komórek germinalnych. Autorzy nie zanotowali istotnych zmian w poziomie testosteronu ani w ekspresji jego receptorów, natomiast wykazali zależny od dawki spadek stężenia estradiolu i wzrost ekspresji ESR1 i ESR2 w gonadzie. Autorzy postulują, że polichlorek bisfenolu działa toksycznie na gonadę, wykorzystując do transdukcji sygnału receptory estrogenowe [36].

W dostępnej literaturze mało jest analiz badających wpływ estrogenów i ksenoestrogenów na żywotność i apoptozę dojrzałych plemników. W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach oceniano, czy dwugodzinna inkubacja plemników z  $17\beta$ -estradiolem, genisteiną i bisfenolem A wpływa na żywotność i proces błonowej translokacji fosfatydyloseryny. Wyniki przeprowadzonych badań nie wykazały istotnych statycznie zmian odsetka plemników żywych, niezależnie od badanego związku i stosowanej dawki. Podobnie w stosunku do procesu błonowej translokacji fosfatydyloseryny, będącej wczesnym wykładnikiem procesu apoptozy, nie zanotowano istotnego wpływu badanych związków ani na odsetek plemników z translokacją PS, ani na miejsca jej występowania. Inkubacja plemników z wszystkimi czynnikami jednocześnie również nie stymulowała istotnych zmian. Można by więc założyć, że poddane ocenie związki nie wpływają na żywotność plemników ludzkich. Należy jednak podkreślić, że w przeprowadzonych badaniach zastosowano dwugodzinny okres inkubacji. Aby być pewnym słuszności proponowanej tezy,

należy przeprowadzić dalsze badania, w których plemniki będą ekspozycje na badane czynniki przez dłuższy czas. Plemnikom, ze względu na charakterystyczną strukturę komórki, trudno jest skutecznie przeciwdziałać elementom stresującym czy toksycznym, co skutkuje bardzo szybkimi zmianami w ich biologii. Przykładem tego są badania przeprowadzone przez Kotwicką i współpracowników, w których plemniki ludzkie stymulowane  $H_2O_2$  odpowiadały zależnym od dawki spadkiem żywotności, wzrostem ilości plemników z translokacją PS i aktywną formą kaspazy 3. już po kilkunastu minutach inkubacji [126, 127, 129]. Wydaje się więc, że jeżeli estrogeny endogenne i zastosowane ksenoestrogeny miałyby wpływać na żywotność plemników, to chociażby przy wysokich stężeniach powinniśmy obserwować istotne zmiany.

Hipotezę, że ksenoestrogeny nie wpływają w istotny sposób na żywotność plemników, potwierdzają wyniki badań uzyskane przez Hinscha i współpracowników [98]. Badali oni wpływ genisteiny na izolowane techniką swim-up plemniki buhajów. Przeprowadzone analizy nie wykazały istotnego wpływu tego fitoestrogenu na żywotność i ruchliwość plemników. Inkubacja komórek z genisteiną o niskim stężeniu prowadziła jednak do znaczącego, zależnego od dawki, spadku odsetka plemników zdolnych do penetracji osłonki przejrzystej. Autorzy sugerują, że stymulacja plemników genisteiną mimo, że nie zmienia ich żywotności, może stanowić ważny czynnik wpływający niekorzystnie na wartość zapładniającą gamet [98].

Wydaje się, że w dużej mierze efekty wywoływane przez genisteinę na plemniki będą zależne od jej dawki i najprawdopodobniej występują różnice międzygatunkowe. Świadczyć o tym mogą między innymi wyniki badań przeprowadzonych przez Martinez-Soto i wsp. którzy założyli, że genisteina wykazuje działanie antyoksydacyjne i może ochronić DNA plemników przed uszkodzeniami będącymi efektem stresu oksydacyjnego. Badacze postanowili zbadać wpływ suplementacji genisteiną (w stężeniu końcowym  $10 \mu\text{mol/l}$ ) medium użytego do zamrażania plemników na ich jakość. Oceniając plemniki po rozmrożeniu autorzy stwierdzili niewielką poprawę parametrów ruchu, spadek zaburzeń struktury lipidów błonowych oraz zmniejszony stopień uszkodzenia DNA w stosunku do plemników mrożonych bez suplementacji genisteiną. Wyniki te są zgodne z doniesieniami innych autorów poczynionymi na komórkach somatycznych, że genisteina wykazuje działanie antyoksydacyjne i chroni DNA przed uszkodzeniami indukowanymi stresem oksydacyjnym [226]. Autorzy konkludują, że powyższe obserwacje mogą być wykorzystane przy preparatyce nasienia stosowanego do metod rozrodu wspomaganego [159].

### 5.3. Wpływ estrogenów i ksenoestrogenów na wewnątrzkomórkowe stężenie wolnych jonów wapniowych

W komórkach eukariotycznych wykryto wiele wtórnych przekaźników sygnału takich jak cykliczne nukleotydy, produkty rozpadu niektórych fosfolipidów błonowych (np.  $IP_3$  i DAG) czy jony wapnia. Jednym z najważniejszych wtórnych przekaźników sygnału w komórkach są wolne jony wapniowe. Stężenie jonów wapniowych w cytoplazmie komórek spoczynkowych waha się w granicach od kilkudziesięciu do około 200 nmol/l. W przestrzeni zewnątrzkomórkowej ich poziom jest około dziesięć razy wyższy niż w cytoplazmie podstawowej. Komórki eukariotyczne posiadają organelle, które mają zdolność gromadzenia jonów wapniowych. Zaliczamy do nich siateczkę edoplazmatyczną, mitochondria oraz jądro komórkowe. W czasie aktywacji komórki często obserwowany jest szybki, przemijający, kilkukrotny wzrost stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych. Po okresie pobudzenia komórki następuje stopniowy powrót do stanu wyjściowego, a więc niskiego cytoplazmatycznego stężenia jonów wapnia. W proces ten zaangażowane są systemy kanałów i pomp wapniowych, związki wiążące jony  $Ca^{2+}$  oraz organelle buforujące. Sprawne funkcjonowanie tego systemu warunkuje działanie jonów  $Ca^{2+}$  jako wtórnego przekaźnika informacji. Utrzymywanie podwyższonego stężenia jonów wapniowych w komórce może stać się sygnałem do ich śmierci na drodze apoptozy.

Jony wapniowe są bardzo ważnym czynnikiem kontrolującym przebieg procesu kapacytacji i reakcji akrosomowej. Plemnik posiada systemy kanałów i pomp wapniowych umożliwiających utrzymywanie właściwej homeostazy wapniowej. W przeciwieństwie do komórek somatycznych, plemniki mają znacznie mniejsze możliwości buforowania jonów  $Ca^{2+}$  w organelach komórkowych. Do magazynowania jonów wapniowych w plemnikach wykorzystywane są głównie mitochondria, akrosom oraz tylna część jądra, gdzie „nadmiary” błony jądrowej tworzą pofałdowany obszar pełniący między innymi rolę magazynu  $Ca^{2+}$  [20, 75, 126].

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że  $17\beta$ -estradiol stymuluje przemijający wzrost stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych w plemnikach. Reakcja była zależna od dawki, a czas reakcji (początek już po kilku sekundach od stymulacji) wskazuje na reakcję błonową. Stymulacja plemników genisteiną powodowała niewielki wzrost stężenia wolnych jonów wapniowych, utrzymujący się na podwyższonym poziomie przez dłuższy okres czasu (w przeprowadzonych badaniach do 15 minut). Natomiast po stymulacji bisfenolem A

przemijający wzrost stężenia wolnych jonów wapniowych obserwowano tylko w pojedynczych komórkach.

Otrzymane wyniki badań są zgodne z doniesieniami innych autorów. Luconi i wsp., stosując w swoich badaniach inny fluorochrom (wskaźnik Fura-2/AM) pozwalający monitorować wewnątrzkomórkowe zmiany stężenia jonów  $Ca^{2+}$ , zaobserwowali podobną kinetykę reakcji plemników na  $17\beta$ -estradiol. Ponadto podobnie jak w prezentowanych w niniejszej pracy wynikach, nie zaobserwowali oni istotnych zmian stężenia jonów wapniowych po stymulacji bisfenolem A [149].

Można więc przypuszczać, że wywoływane  $17\beta$ -estradiolem szybkie zmiany w plemnikach związane są z jego wpływem na receptory błonowe, a za ich pośrednictwem na kanały wapniowe. Za słusznością takiej hipotezy przemawiają badania wskazujące, że  $17\beta$ -estradiol, połączony z dużą cząsteczką białka (najczęściej z albuminą surowicy wołowej), która ma zapobiegać wnikaniu kompleksu do wnętrza komórki, stymuluje podobne zmiany stężenia jonów  $Ca^{2+}$  jak sama cząsteczka  $17\beta$ -estradiolu [21]. Udział kanałów wapniowych w szybkiej odpowiedzi komórki na  $17\beta$ -estradiol potwierdza fakt braku reakcji przy zastosowaniu medium inkubacyjnego pozbawionego jonów  $Ca^{2+}$  [215].

Zdania na temat udziału klasycznych receptorów estrogenowych w szybkiej odpowiedzi komórki na  $17\beta$ -estradiol są podzielone. Luconi i wsp. zaobserwowali, że preinkubacja plemników z antyestrogenami (tamoksifen lub ICI 164 384) znacznie redukuje wapniową odpowiedź plemników na  $17\beta$ -estradiol, co sugeruje udział klasycznych ESR w tym zjawisku [149]. Z kolei wyniki badań Rossato i wsp. wskazują, że tamoksifen nie wpływa na wywoływaną  $17\beta$ -estradiolem kinetykę zmian stężenia jonów  $Ca^{2+}$ , co ma być dowodem braku zaangażowania ESR w opisaną reakcję [215]. Badania przeprowadzone przez Wang i wsp. wskazują, że raloksifen (selektywny modulator receptorów estrogenowych) powoduje hamowanie kanałów wapniowych typu T w komórkach spermatogenicznych, ale w mechanizmie niezależnym od klasycznych estrogenów [262].

Przyjmuje się, że jednym z kluczowych stymulatorów reakcji akrosomowej jest zawarty w płynie pęcherzykowym progesteron. Wykazano, że w części akrosomowej błony komórkowej plemników obecne są receptory progesteronowe. Ich stymulacja powoduje szybki wzrost stężenia wolnych jonów wapniowych na terenie główki. Reakcja jest bardzo dynamiczna i często ma charakter iglicowy [128]. Sugeruje się, że obserwowany po stymulacji progesteronem napływ jonów wapniowych związany jest z aktywacją kanałów wapniowych typu T. Zaobserwowano, że preinkubacja plemników z  $17\beta$ -estradiolem znacznie obniża ich

reakcję na progesteron [150]. Postuluje się, że  $17\beta$ -estradiol wykazuje cechy inhibitora kanałów wapniowych typu T. Podobne obserwacje poczyniono w badaniach prowadzonych na komórkach mięśni gładkich, a także w odniesieniu do kanałów typu L w neuronach oraz miocytach serca i mięśni gładkich [75]. Dowiedziono, że również genisteina posiada hamujący wpływ na wapniowe kanały typu L poprzez inhibicję kinazy tyrozynowej w miocytach kocih i na kanały wapniowe Cav2.2 typu N w komórkach NG 108-15 [244]. Tao i wsp., badając wpływ genisteiny na funkcjonowanie kanałów wapniowych w komórkach spermatogenetycznych myszy nie potwierdzili wcześniejszych doniesień na temat roli fosforylacji tyrozyny w regulacji kanałów wapniowych typu T [244].

Postuluje się, że  $17\beta$ -estradiol pełni rolę modulatora niegenomowego działania progesteronu podczas procesu zapłodnienia. Podobne wnioski wyciąga się w stosunku do genisteiny [21, 244]. Zaczęto się nią interesować w kontekście metod rozrodu wspomaganego, ponieważ wywołuje zmiany stężenia jonów  $Ca^{2+}$ , korzystnie wpływa na przebieg procesu kapacytacji oraz przypuszczalnie posiada działanie antyoksydacyjne [159].

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano, że genisteina powoduje w plemnikach niewielki, ale długo się utrzymujący wzrost stężenia jonów  $Ca^{2+}$ . Sugeruje się, że ta zmiana przyczynia się do aktywacji procesu kapacytacji. Badania przeprowadzone przez Adeoya-Osiguwę i współpracowników wskazują, że 30 minutowa inkubacja plemników z genisteiną w stężeniu końcowym  $0,001 \mu\text{mol/l}$  w sposób istotny stymuluje proces kapacytacji i reakcję akrosomową plemników. Ponieważ jednak reakcja ta nie była blokowana przez tamoksifen autorzy sugerują, że klasyczne ESR nie są w nią zaangażowane [1]. Podobne wyniki, wskazujące, że genisteina wpływa korzystnie na proces kapacytacji, uzyskali Mohamed i wsp. [170]. Wydaje się, że nie jest to jednak typowa cecha ksenoestrogenów. O ile prokapacytacyjny efekt stwierdzono również w stosunku do nonylfenolu [1], to bifenol A i oktyfenol nie wpływały w sposób istotny na przebieg procesu kapacytacji i reakcji akrosomowej [149, 170]. Obserwowany w niniejszej pracy brak zmian stężenia jonów  $Ca^{2+}$  pod wpływem bisfenolu A potwierdza słuszność tej hipotezy.

Mechanizmy, poprzez które  $17\beta$ -estradiol i genisteina wpływają na zmiany stężenia jonów  $Ca^{2+}$ , wymagają jednak dalszych badań. Trudno jest jednoznacznie stwierdzić, które z licznych kanałów wapniowych obecnych w błonie komórkowej plemników biorą udział w tym procesie.



#### 5.4. Wpływ estrogenów i ksenoestrogenów na mitochondria

Mitochondria są organellami zaangażowanymi w kluczowe procesy komórkowe takie jak: 1. oddychanie komórkowe, 2. fosforylacja oksydacyjna, 3. proces apoptozy, 4. synteza lipidów, hemu, aminokwasów, nukleotydów, hormonów steroidowych czy 5. homeostaza jonowa komórki. Przyjmuje się, że struktury te są komórkowym rezerwuarem estrogenów. Ponadto w mitochondriach licznych komórek somatycznych wykazano obecność ESR1 i ESR2. W świetle aktualnego stanu wiedzy sugeruje się, że estrogeny biorą czynny udział w regulowaniu pracy tych organelli. W komórkach somatycznych wykazano, że estrogeny wywołują wzrost mitochondrialnego poziomu mRNA białek zakodowanych na mtDNA, co wskazuje na ich wpływ na poziom ekspresji genów [85, 200, 240].

Przeprowadzone badania wykazały, że w plemnikach ludzkich i plemnikach knura ekspresja receptorów estrogenowych była bardzo wysoka we wstawkach. Ponieważ w tym rejonie plemnika zlokalizowane są mitochondria, można przypuszczać, że podobnie jak to ma miejsce w komórkach somatycznych, również w mitochondriach plemników są obecne receptory estrogenowe. Badania Solakidi i wsp. z wykorzystaniem specyficznego mitochondrialnego markera CMX potwierdzają słuszność takiej hipotezy [231]. Również badania ultrastrukturalne z zastosowaniem złota koloidalnego przeprowadzone przez Guido i wsp. wskazują na obecność ESR1 i ESR2 w mitochondriach plemników pochodzących od płodnych mężczyzn. Należy podkreślić, że mitochondrialna ekspresja ESR2 była znacznie silniejsza niż ESR1. Ponadto w badaniach przeprowadzonych na plemnikach pochodzących od mężczyzn z żylakami powrózka nasiennego autorzy ci stwierdzili znaczny spadek lub nawet brak ekspresji ESR we wstawkach i w głównej części witki [92].

Jeśli w mitochondriach plemników istotnie znajdują się receptory estrogenowe, należy się spodziewać, że estrogeny będą wpływać na ich funkcje. W przeprowadzonych badaniach poddano ocenie wpływ  $17\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A na błonowy potencjał mitochondrialny oraz powstawanie mitochondrialnego anionorodnika ponadtlennego. Wykazano, że  $17\beta$ -estradiol powoduje zależne od dawki zmiany potencjału błonowego mitochondriów. Przy stymulacji  $17\beta$ -estradiolem w stężeniu końcowym  $10^{-10}$  mol/l zmiany były nieistotne statystycznie, przy stężeniu  $10^{-8}$  mol/l obserwowano znamienne wzrost odsetka plemników z wysokim  $\Delta\Psi_m$ , natomiast przy stężeniu  $10^{-6}$  mol/l spadek odsetka plemników z wysokim  $\Delta\Psi_m$  był istotny statystycznie.  $\Delta\Psi_m$  jest wskaźnikiem energetycznego potencjału mitochondrium i określa funkcjonalnie nienaruszone mitochondria. Wiele badań udowodniło

korelację między obniżoną efektywnością mitochondriów, wyrażającą się spadkiem potencjału mitochondrialnego a gorszą ruchliwością plemników i ich zdolnością do zapłodnienia [187]. Przyjmuje się, że wykrycie zmian  $\Delta\Psi_m$  w plemnikach ludzkich jest jedną z najskuteczniejszych metod szacujących zdolności zapładniające plemników pod kątem ich wykorzystania w procedurach technik rozrodu wspomaganego [156, 187]. Dotychczasowe analizy badające zmiany  $\Delta\Psi_m$  dowiodły, że zastosowany w niniejszej pracy marker JC-1, w stosunku do Mitotracker Green i Mitotracker Red, jest najbardziej miarodajnym i specyficznym związkiem obrazującym zmiany tego parametru [187, 253].

Badania przeprowadzone na komórkach somatycznych wskazują, że estrogeny mogą wpływać na potencjał mitochondrialny plemników. Efekt w dużej mierze jest zależny od dawki hormonu i rodzaju komórki. Wykazano, że estrogeny wpływają na transport jonów wapnia do mitochondriów [101, 194]. Sugeruje się, że wywoływany estrogenami wzrost stężenia jonów  $Ca^{2+}$  może aktywować mitochondrialną fosfatazę białkową, która defosforyluje oksydazę cytochromu c. To z kolei może wpływać na wzrost błonowego potencjału mitochondrialnego i wytwarzanie reaktywnych form tlenu [240]. Sugeruje się, że estrogeny powodując wzrost mitochondrialnego cAMP, wpływają na fosforylację kompleksów białkowych łańcucha oddechowego i w konsekwencji modulują  $\Delta\Psi_m$  [240]. Można przypuszczać, że wywoływane przez estradiol zmiany  $\Delta\Psi_m$  plemników mogą być spowodowane napływem jonów wapniowych do mitochondriów. Nadmierny wzrost mitochondrialnego stężenia jonów  $Ca^{2+}$  wiąże się ze znacznym spadkiem potencjału błony mitochondrialnej, co aktywuje megakanaly i może powodować uwolnienie do cytoplazmy cytochromu c [35]. Wskazuje się, że estradiol, wpływając na obniżenie hyperpolaryzacji błony mitochondrialnej, indukuje apoptozę komórek spermatogenicznych szczurów [168]. W dostępnej literaturze nie znaleziono prac oceniających wpływ  $17\beta$ -estradiolu na  $\Delta\Psi_m$  plemników.

Zmiany  $\Delta\Psi_m$  mitochondrium ściśle wiążą się z zagadnieniem stresu oksydacyjnego i jego wpływu na funkcjonowanie komórki. Stres oksydacyjny pojawia się w momencie, w którym antyoksydacyjne systemy obronne zawodzą i kiedy poziom enzymatycznych i nieenzymatycznych cząsteczek o właściwościach antyoksydacyjnych jest niski. Sugeruje się, że stres oksydacyjny jest czynnikiem etiologicznym wielu chorób, w tym m.in. choroby sercowo-naczyniowej, nowotworów, cukrzycy, chorób mózgu (np. Alzheimer), czy męskiej i żeńskiej niepłodności [86, 124]. Co ciekawe, to właśnie plemniki były pierwszymi komórkami, u których udowodniono potencjalną podatność na uszkodzenia o charakterze oksydacyjnym. Plemniki są szczególnie wrażliwe na stres oksydacyjny między innymi ze względu na fakt, iż zawierają wielonienasycone kwasy tłuszczowe, w szczególności kwas

dokozaheksaenowy, które dzięki sześciu podwójnym wiązaniom przypadającym na cząsteczkę sprawiają, że plemniki są swoistymi elektronowymi agregatorami podatnymi na oksydację i inne strukturalne modyfikacje. Wynikające z działania RFT modyfikacje błony komórkowej plemników zaburzają jej płynność, powodując zmniejszenie ruchliwości i zakłócając procesy związane z reakcją akrosomową czy fuzją plemnika z oocytem [86, 121]. Poza tym plemniki są narażone na stres oksydacyjny także w związku z ograniczoną objętością oraz określonym umiejscowieniem wewnątrzkomórkowych antyoksydacyjnych enzymów i ograniczoną zdolnością do naprawy DNA [86, 124]. RFT są uważane za szkodliwe produkty uboczne metabolizmu komórkowego lub ekspozycji komórek na ksenobiotyki [124]. Ponadto dowiedziono, iż mitochondrialna produkcja RFT w komórkach somatycznych może unicestwić ich mechanizmy obronne i prowadzić do stresu oksydacyjnego. Udowodniono, iż mitochondria plemników szczurów i królików produkują RFT, jednak w odniesieniu do ludzkich gamet wciąż brak wyczerpujących danych na ten temat [124]. RFT bezpośrednio uszkodzają plemnikowe DNA, zarówno jądrowe, jak i mitochondrialne, narażając bezpieczeństwo transferu prawidłowej informacji genetycznej potomstwu [121]. Stopień i spektrum uszkodzeń plemników wynikające z narażenia na stres oksydacyjny zależy od otoczenia komórki, a także od natury endogennych bądź egzogennych czynników go wywołujących.

W prawidłowych warunkach mitochondria produkują na tyle niewielkie ilości RFT, że są one skutecznie neutralizowane przez komórkowe antyoksydanty. Niskie stężenia mitochondrialnych RFT pozwalają im pełnić rolę cząsteczek sygnałowych. Wskazuje się, że estrogeny wpływają na mitochondrialny poziom RFT. Przez długi czas hormony te były postrzegane tylko jak antyoksydanty skutecznie chroniące na przykład przed chorobami neurodegeneracyjnymi. W wielu pracach wskazuje się, że 17 $\beta$ -estradiol zabezpiecza mitochondria przed stresem oksydacyjnym [148, 261].

Sugeruje się, że działanie antyoksydacyjne wykazuje również genisteina. Borrás i wsp. w badaniach przeprowadzonych na mitochondriach izolowanych z wątroby i mózgu szczurów zaobserwowali, że genisteina, podobnie jak 17 $\beta$ -estradiol, indukuje wzrost potencjału błonowego mitochondriów, obniża mitochondrialny poziom wolnych rodników i zabezpiecza te struktury przed wpływem cytochromu c [31]. Sierens i wsp. wykazali, że genisteina w stężeniu końcowym 0,01 -100  $\mu$ mol/l skutecznie chroni plemniki przed stresem oksydacyjnym. Autorzy sugerują, że jej antyoksydacyjne działanie jest silniejsze niż kwasu askorbinowego czy  $\alpha$ -tokoferolu [227]. W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach nie stwierdzono istotnego wpływu genisteiny na mitochondrialny potencjał błonowy ani na poziom mitochondrialnego anionorodnika ponadtelenkowego. Należy jednak zaznaczyć, że

w naszych badaniach stosowaliśmy stymulację komórek genisteiną, której najwyższe stężenie wynosiło 1  $\mu\text{mol/l}$ . Tym faktem można wytłumaczyć otrzymane różnice. Ponadto powyżsi autorzy oceniali potencjał antyoksydacyjny genisteiny na podstawie wielkości uszkodzeń DNA, co również utrudnia porównanie otrzymanych wyników badań. W dostępnej literaturze nie znaleziono prac, w których autorzy oceniliby stymulowane estrogenami lub ksenoestrogenami zamiany poziomu mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego w plemnikach ludzkich. Badania prowadzone na komórkach somatycznych z zastosowaniem użytego również w niniejszej pracy markera MitoSOX Red wskazują, że w komórkach endotelialnych mózgu 17 $\beta$ -estradiol powoduje istotny statystycznie spadek mitochondrialnego poziomu anionorodnika, a reakcja jest blokowana przez antagonistę ESR. Reakcji takiej nie obserwowano po stymulacji 17 $\alpha$ -estradiolem [212].

Mimo, że w prezentowanych badaniach genisteina nie wywoływała istotnego spadku poziomu mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego, nie można wykluczyć, że do niego doszło. Należy bowiem pamiętać, że ze względu na ilość występujących w plemnikach mitochondriów oraz ze względu na fakt, że badania prowadzono na plemnikach izolowanych techniką swim-up z nasień z normozoospermią, stężenie badanego rodniaka, a przez to rejestrowane poziomy fluorescencji, były zbyt niskie, by można je było zaobserwować stosowaną techniką.

Z analizy dostępnego piśmiennictwa wynika, że estrogeny mogą doprowadzić do wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu w mitochondriach poprzez indukcję syntazy tlenu azotu czy hamowanie oksydazy cytochromu c. Również wzrost mitochondrialnego poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  promuje powstawanie RFT. Bennetts i wsp. zaobserwowali, że pewne metabolity estradiolu i ksenoestrogeny wywołują w plemnikach ludzkich stres oksydacyjny. Intensywna reakcja występowała po stymulacji np. dietylsilbestrolem i katecholowymi pochodnymi estrogenów, a po genisteinie tylko przy zastosowaniu wysokich dawek. Nie zanotowano natomiast istotnych zmian pod wpływem 17 $\beta$ -estradiolu, nonyfenolu czy bisfenolu A [23]. Wyniki badań opublikowane przez Wang i wsp. wskazują jednak, że bisfenol A, wpływając na mitochondria, indukuje proces apoptozy komórek gametogenicznych myszy [261]. W przeprowadzonych badaniach mimo, że bisfenol A nie indukował procesu śmierci plemników, to jednak przy stężeniu  $10^{-6}$  mol/l istotnie obniżał potencjał błonowy mitochondriów.

Podsumowując należy stwierdzić, że estrogeny i poddane ocenie ksenoestrogeny wpływają na funkcje mitochondriów. Obserwowany efekt jest zależny od rodzaju związku i jego stężenia. Wydaje się, że estrogeny i genisteina, występując w fizjologicznych dawkach, biorą

udział w regulacji pracy mitochondriów i mogą pełnić funkcję czynnika antyoksydacyjnego. Zaprezentowane wyniki badań, w których plemniki stymulowano wszystkimi badanymi związkami jednocześnie (w niskich stężeniach oraz efekty stymulacji plemników  $17\beta$ -estradiolem lub bisfenolem A w wysokich stężeniach) sugerują, że nadmierna ekspozycja plemników na ten rodzaj związków może niekorzystnie wpłynąć na ich biologię. Wyrazem tego zjawiska był spadek potencjału błonowego mitochondriów oraz wzrost poziomu mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego. Można się więc spodziewać, że długotrwała ekspozycja mężczyzn na ksenoestrogeny prawdopodobnie znacznie obniża potencjał zapładniający gamet. Pierwsze obserwacje mężczyzn ekspozowanych na bisfenol A w miejscu pracy zdają się potwierdzać tę hipotezę [144, 152, 162, 271].

Ponieważ wyniki badań nad wpływem estrogenów i ksenoestrogenów na plemniki ludzkie są często sprzeczne, niezbędne jest ich kontynuowanie. Pomoże to oszacować potencjalne znaczenie tych związków w diagnostyce i profilaktyce niepłodności męskiej.

## 6. WNIOSKI

1.  $17\beta$ -estradiol, genisteina i bisfenol A wpływają na biologię plemników ludzkich.
2. Czas reakcji na badane związki wskazuje na niegenomowy mechanizm działania, a reakcja jest zależna od stężenia i rodzaju związku.
3. Ekspresja receptorów estrogenowych w okolicy wstawki oraz obserwowane pod wpływem badanych związków zmiany w mitochondriach sugerują, że są one organellami docelowymi dla estrogenów i ksenoestrogenów.
4. Silna reakcja mitochondriów na równoczesną stymulację  $17\beta$ -estradiolem, genisteiną i bisfenolem A sugeruje synergizm ich działania.

## 7. PIŚMIENICTWO

1. Adeoya-Osiguwa S. A., Markoulaki S., Pocock V., Milligan S.R., Fraser L.R.: 17beta-Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. *Hum. Reprod.* 2003, 18, 100-107.
2. Ahlbory-Dieker D.L., Stride B.D., Leder G., Schkoldow J., Trolenberg S., Seidel H., Otto C., Sommer A., Parker M.G., Schutz G., Wintermantel T.M.: DNA binding by estrogen receptor-alpha is essential for the transcriptional response to estrogen in the liver and the uterus. *Mol. Endocrinol.* 2009, 23, 1544-1555.
3. Aitken R.J., Baker M.A., De Iuliis G.N., Nixon B.: New Insights into Sperm Physiology and Pathology. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2010, 198, 99-115.
4. Aitken R.J., Fisher H.: Reactive oxygen species generation and human spermatozoa. The balance benefit risk, *Bioassay*, 1994, 16, 259-267.
5. Aitken R.J., Koppers A.J.: Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J. Androl.* 2011, 13, 36-42.
6. Aitken R.J., Wingate J.K., De Iuliis G.N., Koppers A.J., McLaughlin E.A.: Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 2006, 91:4154-4163.
7. Aitken R.J.: Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995, 7, 659-68.
8. Aitken R.J.: The human spermatozoon – a cell in crisis? *J. Reprod. Fertil.* 1999, 115, 1-7.
9. Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y.: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol. Chem.* 1987, 262, 5592-5595.
10. Alonso-Magdalena P., Quesada I., Nadal A.: Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2011, 7, 346-53.
11. Amanai M., Brahmajosyula M., Perry A.C., A restricted role for sperm-borne microRNAs in mammalian fertilization. *Biol.Reprod.* 2006, 75, 877-884.
12. Amso N.N., Crow J., Shaw R.W.: Comparative immunohistochemical study of oestrogen and progesterone receptors in the fallopian tube and uterus at different stages of the menstrual cycle and the menopause., *Hum. Reprod.* 1994, 9, 1027-37.
13. Aquila S., Sisci D., Gentile M., Middea E., Catalano S., Carpino A., Rago V., Andò S.: Estrogen receptor (ER) alpha and ER beta are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 2004, 89, 1443-51.
14. Aronica S.M., Kraus W.L., Katzenellenbogen B.S.: Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994, 91, 8517-8521.
15. Asano A., Selvaraj V., Buttke D.E., Nelson J.L., Green K.M., Evans J.E., Travis AJ.: Biochemical characterization of membrane fractions in murine sperm: Identification of three distinct subtypes of membrane rafts. *J Cell Physiol.* 2009, 218, 537-548.
16. Atanassova N., McKinnell C., Walker M., Turner K.J., Fisher J.S., Morley M., Millar M.R., Groome N.P., Sharpe R.M.: Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. *Endocrinology*, 1999, 140, 5364-73.
17. Badowska-Kozakiewicz A.M., Malicka E.: Ocena immunohistochemiczna ekspresji receptorów estrogenowych w nowotworach gruczołu sutkowego suk. *Życie Weterynaryjne*, 2009, 84, 548-553.

18. Bai Y., Gigue'ré V.: Isoform-selective interactions between estrogen receptors and steroid receptor coactivators promoted by estradiol and ErbB-2 signaling in living cells. *Mol. Endocrinol.* 2003, 17, 589-99.
19. Baker M.E.: Insights from the structure of estrogen receptor into the evolution of estrogens: implications for endocrine disruption. *Biochem. Pharmacol.* 2011, 82, 1-8.
20. Baldi E., Luconi M., Muratori M., Marchiani S, Tamburrino L, Forti G.: Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions, *Mol. Cell. Endocrinol.* 2009, 308, 39-46.
21. Baldi E., Luconi M., Muratori M., Forti G.: A novel functional estrogen receptor on human sperm membrane interferes with progesterone effects: *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000, 161, 31-5.
22. Baquedano M.S., Saraco N., Berensztein E., Pepe C., Bianchini M., Levy E., Goñi J., Rivarola M.A., Belgorosky A.: Identification and developmental changes of aromatase and estrogen receptor expression in prepubertal and pubertal human adrenal tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007, 92, 2215-22.
23. Bennetts L.E., De Iuliis G.N., Nixon B., Kime M., Zelski K., McVicar C.M., Lewis S.E., Aitken R.J.: Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: evidence for cross-linking and redox cycling activities. *Mutat. Res.* 2008, 641, 1-11.
24. Bettini E., Maggi A.: Estrogen induction of cytochrome c oxidase subunit III in rat hippocampus. *J. Neurochem.* 1992, 58, 1923-1929.
25. Bilińska B., Wiszniewska B., Kosiniak-Kamysz K., Kotula-Balak M., Gancarczyk M., Hejmej A., Sadowska J., Marchlewicz M., Kolasa A., Wenda-Różewicka L.: Hormonal status of male reproductive system: androgens and estrogens in the testis and epididymis. In vivo and in vitro approaches. *Reprod. Biol* 2006, 4, 43-58.
26. Björnström L., Sjöberg M.: Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol.* 2005, 19, 833-842.
27. Blackmore P.F.: Thapsigargin elevates and potentiates the ability of progesterone to increase intracellular free calcium in human sperm: possible role of perinuclear calcium. *Cell Calcium.* 1993, 14, 53-60.
28. Boerke A., Tsai P.S., Garcia-Gil N., Brewis I.A., Gadella B.M.: Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology* 2008, 70, 1188-1196.
29. Boorjian S.A., Sheinin Y., Crispen P.L., Lohse C.M., Kwon E.D., Leibovich B.C.: Hormone receptor expression in renal angiomyolipoma: clinicopathologic correlation. *Urology* 2008, 72, 927-932.
30. Bord S., Horner A., Beavan S., Compston J.: Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001, 86, 2309-2314.
31. Borrás C., Gambini J., López-Grueso R., Pallardó F.V., Viña J.: Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010, 1802, 205-211.
32. Brand H., Kos M., Denger S., Flouriot G., Gromoll J., Gannon F., Reid G.: A novel promoter is involved in the expression of estrogen receptor alpha in human testis and epididymis. *Endocrinology* 2002, 143, 3397-3404.
33. Bratton M.R., Duong B.N., Elliott S., Weldon C.B., Beckman B.S., McLachlan J.A., Burow M.E.: Regulation of ERalpha-mediated transcription of Bcl-2 by PI3K-AKT crosstalk: implications for breast cancer cell survival. *Int. J. Oncol.* 2010, 37, 541-550.
34. Breitbart H., Cohen G., Rubinstein S.: Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* 2005, 129, 263-268.
35. Breitbart H., Rubinstein S., Gruberger M.: Calcium efflux mechanism in sperm mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1996, 1312, 79-84.



36. Cai J., Wang C., Wu T., Moreno J.M., Zhong Y., Huang X., Chen Y., Zuo Z.: Disruption of spermatogenesis and differential regulation of testicular estrogen receptor expression in mice after polychlorinated biphenyl exposure. *Toxicology* 2011, 287, 21-28.
37. Caldon C.E., Sergio C.M., Schütte J., Boersma M.N., Sutherland R.L., Carroll J.S., Musgrove E.A.: Estrogen regulation of cyclin E2 requires cyclin D1 but not c-Myc. *Mol. Cell Biol.* 2009, 29, 4623-4639.
38. Campbell-Thompson M.L.: Estrogen receptor alpha and beta expression in upper gastrointestinal tract with regulation of trefoil factor family 2 mRNA levels in ovariectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 240, 478-483.
39. Carlson A.E., Quill T.A., Westenbroek R.E., Schuh S.M., Hille B., Babcock D.F.: Identical phenotypes of CatSper1 and CatSper2 null sperm. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 32238-3244.
40. Carmell M.A., Girard A., van de Kant H.J., Bourc'his D., Bestor T.H., de Rooij D.G., Hannon G.J.: MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell.* 2007, 12, 503-514.
41. Carreau S., Silandre D., Bois C., Bouraima H., Galeraud-Denis I., Delalande C.: Estrogens: a new player in spermatogenesis. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2007, 45, S5-10.
42. Carreau S., Wolczynski S., Galeraud-Denis I.: Aromatase, oestrogen and human male reproduction. Review. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2010, 365, 1571-1579.
43. Castro-Rivera E., Samudio I., Safe S.: Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 30853-30861.
44. Cavaco J.E., Laurentino S.S., Barros A., Sousa M., Socorro S.: Estrogen receptors alpha and beta in human testis: both isoforms are expressed. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2009, 55, 137-144.
45. Chaki S.P., Misro M.M., Gautam D.K., Kaushik M., Ghosh D., Chainy G.B.: Estradiol treatment induces testicular oxidative stress and germ cell apoptosis in rats. *Apoptosis.* 2006, 11, 1427-1437.
46. Chambliss K.L., Yuhanna I.S., Anderson R.G., Mendelsohn M.E., Shaul P.W.: ER beta has nongenomic action in caveolae. *Mol. Endocrinol.* 2002, 16, 938-946.
47. Chambliss K.L., Yuhanna I.S., Mineo C., Liu P., German Z., Sherman T.S., Mendelsohn M.E., Anderson R.G., Shaul P.W.: Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ. Res.* 2000, 87, E44-E52.
48. Chang M.: Dual roles of estrogen metabolism in mammary carcinogenesis. *BMB Rep.* 2011, 44, 423-434.
49. Chen G.G., Zeng Q., Tse G.M.: Estrogen and its receptors in cancer. *Med. Res. Rev.* 2008, 28, 954-974.
50. Chen J.Q., Delannoy M., Cooke C., Yager J.D.: Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004, 286, E1011-E1022.
51. Chen J.Q., Eshete M., Alworth W.L., Yager J.D.: Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements. *J. Cell Biochem.* 2004, 93, 358-73.
52. Chen Z., Yuhanna I.S., Galcheva-Gargova Z., Karas R.H., Mendelsohn M.E., Shaul P.W.: Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 401-406.
53. Chu S., Nishi Y., Yanase T., Nawata H., Fuller P.J.: Transrepression of estrogen receptor  $\beta$  signaling by nuclear factor-kappa b in ovarian granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 2004, 18, 1919-1928.

54. Conde S.J., Luvizotto R.A., Sıbio M.T., Katayama M.L., Brentani M.M., Nogueira C.R.: Tamoxifen inhibits transforming growth factor-alpha gene expression in human breast carcinoma samples treated with triiodothyronine. *J. Endocrinol. Invest.* 2008, 31, 1047-1051.
55. Corcoran M.P., Lichtenstein A.H., Meydani M., Dillard A., Schaefer E.J., Lamon-Fava S.: The effect of 17 $\beta$ -estradiol on cholesterol content in human macrophages is influenced by the lipoprotein milieu. *J. Mol. Endocrinol.* 2011, 47, 109-117.
56. Correia J.N., Conner S.J., Kirkman-Brown J.C.: Non-genomic steroid actions in human spermatozoa. "Persistent tickling from a laden environment". *Semin. Reprod. Med.* 2007, 25, 208-219.
57. Cotroneo M.S., Fritz W.A., Lamartiniere C.A.: Dynamic profiling of estrogen receptor and epidermal growth factor signaling in the uteri of genistein- and estrogen-treated rats. *Food Chem. Toxicol.* 2005, 43, 637-645.
58. Curry E., Ellis S.E., Pratt S.L.: Detection of porcine sperm microRNAs using a heterologous microRNA microarray and reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Mol. Reprod. Dev.* 2009, 76, 218-219.
59. Czupryńska K., Marchlewicz M., Wiszniewska B.: Wpływ ksenoestrogenów na męski układ płciowy. *Post. Biol. Kom.* 2007, 34, 317-333.
60. Dai S.Y., Burris T.P., Dodge J.A., Montrose-Rafizadeh C., Wang Y., Pascal B.D., Chalmers M.J., Griffin P.R.: Unique ligand binding patterns between estrogen receptor alpha and beta revealed by hydrogen-deuterium Exchange. *Biochemistry* 2009, 48, 9668-9676.
61. Davis P.J., Lin H.Y., Mousa S.A., Luidens M.K., Hercbergs A.A., Wehling M., Davis F.B.: Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids. *Steroids* 2011, 76, 829-833.
62. De Lamirande E., Gagnon C.: Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med.* 1995, 18, 487-495.
63. Dębska S., Potemski P., Budowa I funkcja receptorów hormonalnych oraz mechanizm ich współdziałania z receptorami dla czynników wzrostu, *Współcz. Onkol.* 2010, 14, 347-354.
64. Depalo R., Lorusso F., Bettocchi S., Selvaggi L., Cavallini A., Valentini A.M., Caruso M.L., Lippolis C.: Assessment of estrogen receptors and apoptotic factors in cryopreserved human ovarian cortex. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2009, 55, 236-243.
65. Deschamps A.M., Murphy E., Sun J.: Estrogen receptor activation and cardioprotection in ischemia reperfusion injury. *Trends Cardiovasc. Med.* 2010, 20, 73-78.
66. Donnelly B.J., Lakey W.H., McBlain W.A.: Estrogen receptor in human benign prostatic hyperplasia. *J. Urol.* 1983, 130, 183-187.
67. Dragileva E., Rubinstein S., Breitbart H.: Intracellular Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1999, 61, 1226-1234.
68. Duan R., Porter W., Safe S.: Estrogen-induced c-fos protooncogene expression in MCF-7 human breast cancer cells: role of estrogen receptor Sp1 complex formation. *Endocrinology* 1998, 139, 1981-1990.
69. Duffy M.J.: Estrogen receptors: Role in breast cancer. *Clin. Lab. Sci.* 2006, 43, 325-347.
70. Dundar S.O., Ozcura F., Cetin E.D., Beder N., Dundar M.: Effects of estrogen replacement therapy on vascular endothelial growth factor expression in choroidal and retinal vasculature. *Bratisl. Lek. Listy.* 2010, 111, 473-476.
71. Durkee T.J., Mueller M., Zinaman M.: Identification of estrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid in human spermatozoa. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1998, 178, 1288-1297.
72. Endoh H., Sasaki H., Maruyama K., Takeyama K., Waga I., Shimizu T., Kato S., Kawashima H.: Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 235, 99-102.

73. Enmark E., Pelto-Huikko M., Grandien K., Lagercrantz S., Lagercrantz J., Fried G., Nordenskjöld M., Gustafsson J.A.: Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997, 82, 4258-4265.
74. Enns D.L., Tiidus P.M.: The influence of estrogen on skeletal muscle: sex matters. *Sports Med.* 2010, 40, 41-58.
75. Espinosa F., López-González I., Muñoz-Garay C., Felix R., De la Vega-Beltrán J.L., Kopf G.S., Visconti P.E., Darszon A.: Dual regulation of the T-type  $Ca^{2+}$  current by serum albumin and beta-estradiol in mammalian spermatogenic cells. *FEBS Lett.* 2000, 475, 251-256.
76. Felty Q., Roy D.: Estrogen, mitochondria and growth of cancer and non-cancer cells. *J. Carcinog.*, 2005; 4, 1.
77. Flouriot G., Griffin C., Kenealy M., Sonntag-Buck V., Gannon F.: Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor-alpha gene are generated by alternative splicing and promoter usage. *Mol. Endocrinol.* 1998, 12, 1939-1954.
78. Ford W.C.: Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum. Reprod. Update.* 2006, 12, 269-274.
79. Fox E.M., Andrade J., Shupnik M.A.: Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids.* 2009, 74(7):622-7.
80. Frączek M., Kurpisz M.: System redoks w nasieniu męskim i peroksydacyjne uszkodzenia plemników. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2005, 59, 523-534 .
81. Fraser L.R., McDermott C.A.:  $Ca^{2+}$ -related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for  $Ca^{2+}$ -ATPase. *J. Reprod. Fertil.* 1992, 96, 363-377.
82. Friend K.E., Chiou Y.K., Lopes M.B., Laws Jr E.R., Hughes K.M., Shupnik M.A.: Estrogen receptor expression in human pituitary: correlation with immuno- histochemistry in normal tissue, and immunohistochemistry and morphology in macroadenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994, 78, 1497–1504.
83. Furuya F., Lu C., Guigon C.J., Cheng S.Y.: Nongenomic activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by thyroid hormone receptors. *Steroids.* 2009, 74, 628-634.
84. Garrido N., Meseguer M., Simon C., Pellicer A., Remohi J.: Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J. Androl.* 2004, 6, 59-65.
85. Gavrilova-Jordan L.P., Price T.M.: Actions of steroids in mitochondria. *Semin Reprod Med.* 2007, 25, 154-164.
86. Gharagozloo P, Aitken RJ.: The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum. Reprod.* 2011, 26, 1628-1640.
87. Gori I., Pellegrini C., Staedler D., Russell R., Jan C., Canny G.O.: Tumor necrosis factor- $\alpha$  activates estrogen signaling pathways in endometrial epithelial cells via estrogen receptor  $\alpha$ . *Mol. Cell Endocrinol.* 2011, 345, 27-37.
88. Grandjean V., Gounon P., Wagner N., Martin L., Wagner K.D., Bernex F., Cuzin F., Rassoulzadegan M.: The miR-124-Sox9 paramutation: RNA-mediated epigenetic control of embryonic and adult growth. *Development* 2009, 136, 3647–3655.
89. Greenspan F.S., Gardner D.G.: *Endokrynologia ogólna i kliniczna.* Wydawnictwo Czelej, Lublin 2004, 487-496.
90. Grohé C., Kahlert S., Löbber K., Stimpel M., Karas R.H., Vetter H., Neyses L.: Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett* 1997, 416, 107–112.
91. Gryniewicz G, Gadzikowska M.: Fitoestrogeny jako selektywne modulatory aktywności receptorów estrogenowych. *Post. Fitoter.* 2003, 1, 28-35.

92. Guido C., Perrotta I., Panza S., Middea E., Avena P., Santoro M., Marsico S., Imbrogno P., Andò S., Aquila S.: Human sperm physiology: estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) influence sperm metabolism and may be involved in the pathophysiology of varicocele-associated male infertility. *J. Cell Physiol.* 2011, 226, 3403-3412.
93. Gur Y., Breitbart H.: Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev.* 2006, 20, 411-416.
94. Guthrie H.D., Welch G.R.: Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J. Anim. Sci.* 2006, 84, 2089-2100.
95. Heldring N., Pike A., Andersson S., Matthews J., Cheng G., Hartman J., Tujague M., Ström A., Treuter E., Warner M., Gustafsson J.A.: Estrogen Receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol. Rev.* 2007, 87, 905-931.
96. Herath C.B., Jin W., Watanabe G., Arai K., Suzuki A.K., Taya K.: Adverse effects of environmental toxicants, octylphenol and bisphenol A on male reproductive functions in pubertal rats. *Endocrine* 2004, 25, 163-72.
97. Hess R.A., Carnes K.: The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Anim. Reprod. Sci.* 2004, 1, 5-30.
98. Hinsch K.D., Aires V., Hägele W., Hinsch E.: In vitro tests for essential sperm functions using the phyto-oestrogen genistein as a test substance. *Andrologia* 2000, 32, 225-231.
99. Ho H.C., Suarez S.S.: Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol. Reprod.* 2003, 68, 1590-1596.
100. Ho S.M., Lee M.T., Lam H.M., Leung Y.K.: Estrogens and prostate cancer: etiology, mediators, prevention, and management. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 2011, 40, 591-614.
101. Horvat A., Nikezić G., Petrović S., Kanazir D.T.: Binding of estradiol to synaptosomal mitochondria: physiological significance. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2001, 58, 636-644.
102. Hu G.X., Lian Q.Q., Ge R.S., Hardy D.O., Li X.K.: Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. *Trends Endocrinol. Metab.* 2009, 20, 139-145.
103. Improta-Brears T., Whorton A.R., Codazzi F., York J.D., Meyer T., McDonnell D.P.: Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 4686-4691.
104. Ishii H., Shoda Y., Yomogida K., Hamada T., Sakuma Y.: Identification of C-terminally and N-terminally truncated estrogen receptor  $\alpha$  variants in the mouse. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2011, 124, 38-46.
105. Islam K.M., Dilcher M., Thurow C., Vock C., Krimmelbein I.K., Tietze L.F., Gonzalez V., Zhao H., Gatz C.: Directed evolution of estrogen receptor proteins with altered ligand-binding specificities. *Protein Eng. Des. Sel.* 2009, 22, 45-52.
106. Jessop H.L., Sjöberg M., Cheng M.Z., Zaman G., Wheeler-Jones C.P., Lanyon L.E.: Mechanical strain and estrogen activate estrogen receptor alpha in bone cells. *J. Bone Miner. Res.* 2001, 16, 1045-1055.
107. Joffe M.: Are problems with male reproductive health caused by endocrine disruption? *Occup Environ. Med.* 2002, 58, 281-290.
108. Jones R., Howes E., Dunne P.D., James P., Bruckbauer A., Klenerman D.: Tracking diffusion of GM1 gangliosides and zona pellucida binding molecules in sperm plasma membranes following cholesterol efflux. *Dev. Biol.* 2010, 339, 398-406.
109. Jung C.H., Hansen M.A., Makunin I.V., Korbie D.J., Mattick J.S.: Identification of novel non-coding RNAs using profiles of short sequence reads from next generation sequencing data. *BMC Genomics* 2010, 11:77.

110. Kalita K., Lewandowski S., Skrzypczak M., Szymczak S., Tkaczyk M., Kaczmarek L. Receptory estrogenowe. w: Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. Red. Nowak J.Z., Zawilska J.B., PWN, Warszawa 2004: 604-616.
111. Kang J.S., Jung N.J., Kim S., Kim D.J., Jang D.D., Yang K.H.: Downregulation of estrogen receptor alpha and beta expression in carcinogen-induced mammary gland tumors of rats. *Eksp. Onkol.* 2004, 26, 31-35.
112. Kapus A., Szaszi K., Kaldi K., Ligeti E.: Fonyo A.: Is mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter a voltage-modulated transport pathway? *FEBS Lett.* 1991, 282, 61-61.
113. Kariab S., Fox S.W.: Phytoestrogens directly inhibit TNF- $\alpha$ -induced bone resorption in RAW264.7 cells by suppressing c-fos-induced NFATc1 expression. *J. Cell Biochem.* 2011, 112, 476-87.
114. Kawaji H., Hayashizaki Y.: Exploration of small RNAs. *PLoS Genet.* 2008, 4, e22.
115. Kawaji H., Nakamura M., Takahashi Y., Sandelin A., Katayama S., Fukuda S., Daub C.O., Kai C., Kawai J., Yasuda J., Carninci P, Hayashizaki Y.: Hidden layers of human small RNAs. *BMC Genomics* 2008, 9, 157.
116. Kelly M.J., Qiu J.: Estrogen signaling in hypothalamic circuits controlling reproduction. *Brain Res.* 2010, 10, 1364, 44-52.
117. Kelly M.J., Wagner E.J.: Estrogen modulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 1999, 10, 369-374.
118. Khraiwesh B., Arif M.A., Seumel G.I., Ossowski S., Weigel D., Reski R., Frank W.: Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell* 2010, 140, 111–122.
119. Kim D.H., Saetrom P., Snove O. Jr., Rossi J.J.: MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 16230–16235.
120. Kim H.P., Lee J.Y., Jeong J.K., Bae S.W., Lee H.K., Jo I.: Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 16, 263, 257-62.
121. Kim S.H., Yu D.H., Kim Y.J.: Apoptosis-like change, ROS and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. *Anim. Reprod. Sci.* 2010, 119, 106-14.
122. Kirichok Y., Krapivinsky G., Clapham D.E.: The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 2004, 427, 360-364.
123. Koehler K.F., Helguero L.A., Haldosén L.A., Warner M., Gustafsson J.A.: Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr. Rev.* 2005, 26, 465-78.
124. Koppers A.J., De Iuliis G.N., Finnie J.M., McLaughlin E.A., Aitken R.J.: Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008, 93, 3199-207.
125. Kotula-Balak M., Pocheć E., Hejmej A., Duda M., Bilinska B.: Octylphenol affects morphology and steroidogenesis in mouse tumor Leydig cells. *Toxicol. In Vitro.* 2011, 25, 1018-1026.
126. Kotwicka M.: Błonowa translokacja fosfatydyloseryny jako wykładnik biologicznych procesów zachodzących w plemnikach ludzkich. Rozprawa habilitacyjna. Poznań 2008.
127. Kotwicka M., Jendraszak M., Skibińska I., Jędrzejczak P., Pawelczyk L.: Decreased motility of human spermatozoa presenting phosphatidylserine membrane translocation-cells selection with the swim-up technique. *Hum. Cell.* 2011, PMID: 21725868.
128. Kotwicka M., Filipiak K., Jędrzejczak P., Pawelczyk L., Warchoń J.B.: Evaluation of free calcium ions concentration in individual human spermatozoa expose to progesterone and human follicular fluid after ovarian stimulation. *Arch. Perinat. Med.* 2002, 6, 12-18.

129. Kotwicka M., Filipiak K., Jedrzejczak P., Warchol J.B.: Caspase-3 activation and phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: is there a relationship? *Reprod. Biomed. Online*. 2008, 16, 657-663.
130. Krawetz S.A.: Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat. Rev. Genet.* 2005, 6, 633-42.
131. Krisfalusi M., Miki K., Magyar P.L., O'Brien D.A.: Multiple glycolytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 2006, 75, 270-278.
132. Kurpisz M., Szczygieł M.: Molekularne podstawy interakcji pomiędzy plemnikiem a komórką jajową. w: *Andrologia*, red. Semczuk M., Kurpisz M., Wydawnictwa Lekarskie PZWL, Warszawa, 2006: 119-130.
133. Lachowicz-Ochędalska A.: Nowe aspekty działania estrogenów poprzez receptory błonowe. IV konferencja Sekcji Endokrynologii Molekularnej PTE, Poznań, 2-3.10.2004
134. Lalancette C., Miller D., Li Y., Krawetz S.A.: Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA. *J. Cell Biochem.* 2008, 104, 1570-1579.
135. Lam S.H., Lee S.G., Lin C.Y., Thomsen J.S., Fu P.Y., Murthy K.R., Li H., Govindarajan K.R., Nick L.C., Bourque G., Gong Z., Lufkin T., Liu E.T., Mathavan S.: Molecular conservation of estrogen-response associated with cell cycle regulation, hormonal carcinogenesis and cancer in zebrafish and human cancer cell lines. *BMC Med. Genomics* 2011, 4, 41.
136. Lambert K.C., Curran E.M., Judy B.M., Milligan G.N., Lubahn D.B., Estes D.M.: Estrogen receptor alpha (ERalpha) deficiency in macrophages results in increased stimulation of CD4+ T cells while 17beta-estradiol acts through ERalpha to increase IL-4 and GATA-3 expression in CD4+ T cells independent of antigen presentation. *J. Immunol.* 2005, 175, 5716-5723.
137. Le Mellay V., Grosse B., Lieberherr M.: Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 11902-11907.
138. Le Mellay V., Lasmoles F., Lieberherr M.: Ga(q/11) and Gbg proteins and membrane signaling of calcitriol and estradiol. *J. Cell. Biochem.* 1999, 75, 138-146.
139. Lee J., Sharma S., Kim J., Ferrante R.J., Ryu H.: Mitochondrial nuclear receptors and transcription factors: who's minding the cell? *J. Neurosci. Res.* 2008, 86, 961-971.
140. Lehraiki A., Messiaen S., Berges R., Canivenc-Lavier M.C., Auger J., Habert R., Levacher C.: Antagonistic effects of gestational dietary exposure to low-dose vinclozolin and genistein on rat fetal germ cell development. *Reprod. Toxicol.* 2011, 4, 424-430.
141. Levin ER.: Membrane oestrogen receptor alpha signalling to cell functions. *J. Physiol.* 2009, 587, 5019-5023.
142. Lewis J.S., Meeke K., Osipo C., Ross E.A., Kidawi N., Li T., Bell E., Chandel N.S., Jordan V.C.: Intrinsic mechanism of estradiol-induced apoptosis in breast cancer cells resistant to estrogen deprivation. *J. Natl. Cancer. Inst.* 2005, 97, 1746-1759.
143. Li C., Briggs M.R., Ahlborn T.E., Kraemer F.B., Liu J.: Requirement of Sp1 and estrogen receptor alpha interaction in 17β-estradiol-mediated transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene expression. *Endocrinology* 2001, 142, 1546-1553.
144. Li D., Zhou Z., Qing D., He Y., Wu T., Miao M., Wang J., Weng X., Ferber J.R., Herrinton L.J., Zhu Q., Gao E., Checkoway H., Yuan W.: Occupational exposure to bisphenol A (BPA) and the risk of self-reported male sexual dysfunction. *Hum. Reprod.* 2010, 25, 519-527.
145. Liu H.B., Loo K.K., Palaszynski K., Ashouri J., Lubahn D.B., Voskuhl R.R.: Estrogen receptor alpha mediates estrogen's immune protection in autoimmune disease. *J. Immunol.* 2003, 171: 6936-6940.
146. Liu M.M., Albanese C., Anderson C.M., Hilty K., Webb P., Uht R.M., Price Jr. R.H., Pestell R.G., Kushner P.J.: Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem* 2002, 277, 24353-24360.

147. Lizotte E., Grandy S.A., Tremblay A., Allen B.G., Fiset C.: Expression, distribution and regulation of sex steroid hormone receptors in mouse heart. *Cell Physiol. Biochem.* 2009, 23, 75–86.
148. Lu A., Frink M., Choudhry M.A., Schwacha M.G., Hubbard W.J., Rue L.W., Bland K.I., Chaudry I.H.: Mitochondria play an important role in 17beta-estradiol attenuation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced rat endothelial cell apoptosis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007, 292, E585-E93.
149. Luconi M., Bonaccorsi L., Forti G., Baldi E.: Effects of estrogenic compounds on human spermatozoa: evidence for interaction with a nongenomic receptor for estrogen on human sperm membrane. *Mol. Cell Endocrinol.* 2001, 178, 39-45.
150. Luconi M., Francavilla F., Porazzi I., Macerola B., Forti G., Baldi E.: Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids* 2004, 69, 553-559.
151. Luconi M., Muratori M., Forti G., Baldi E.: Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999, 84, 1670-1678.
152. Maffini M.V., Rubin B.S., Sonnenschein C., Soto A.M.: Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol A. *Mol. Cell Endocrinol.* 2006, 25, 79-86.
153. Maggiolini M., Vivacqua A., Fasanella G., Recchia A.G., Sisci D., Pezzi V., Montanaro D., Musti A.M., Picard D., Andò S.: The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 27008-27016.
154. Malinowska-Kołodziej I., Marcol W., Lewin-Kowalik J.: Czyj jeszcze zaskoczą nas estrogeny? *Wiad. Lek.* 2006, 59, 527-533.
155. Mao A., Paharkova-Vatchkova V., Hardy J., Miller M.M., Kovats S.: Estrogen selectively promotes the differentiation of dendritic cells with characteristics of Langerhans cells. *J. Immunol.* 2005, 175, 5146-51.
156. Marchetti P., Ballot C., Jouy N., Thomas P., Marchetti C.: Influence of mitochondrial membrane potential of spermatozoa on in vitro fertilisation outcome. *Andrologia.* 2011, PMID: 21714802.
157. Mark-Kappeler C.J., Martin D.S., Eyster K.M.: Estrogens and selective estrogen receptor modulators regulate gene and protein expression in the mesenteric arteries. *Vascul. Pharmacol.* 2011, 55, 42-49.
158. Marquez B., Ignatz G., Suarez S.S.: Contributions of extracellular and intracellular Ca<sup>2+</sup> to regulation of sperm motility: Release of intracellular stores can hyperactivate CatSper1 and CatSper2 null sperm. *Dev. Biol.* 2007, 303, 214-221.
159. Martinez-Soto J.C., de DiosHourcade J., Gutiérrez-Adán A., Landeras J.L., Gadea J.: Effect of genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa. *Asian J. Androl.* 2010, 12, 431-441.
160. Matthews J., Gustafsson J.A., Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv.* 2003, 3, 281-92.
161. McLachlan J.A.: Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr. Rev.* 2001, 22, 319-341.
162. Meeker J.D., Ehrlich S., Toth T.L., Wright D.L., Calafat A.M., Trisini A.T., Ye X., Hauser R.: Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod. Toxicol.* 2010, 30, 532-539.
163. Meyer M.R., Clegg D.J., Prossnitz E.R., Barton M.: Obesity, insulin resistance and diabetes: sex differences and role of oestrogen receptors. *Acta Physiol. (Oxf).* 2011, 203, 259-269.
164. Migliaccio A., Di Domenico M., Castoria G., de Falco A., Bontempo P., Nola E., Auricchio F.: Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* 1996, 15, 1292–1300.

165. Miller D., Ostermeier G.C.: Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? *Gynecol. Obstet. Fertil.* 2006, 34, 840-846.
166. Miller D., Ostermeier G.C.: Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum. Reprod. Update.* 2006, 12, 757-767.
167. Miller D.: Ensuring continuity of the paternal genome: potential roles for spermatozoal RNA in mammalian embryogenesis. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 2007, 65, 373-389.
168. Mishra D.P., Shaha C.: Estrogen-induced spermatogenic cell apoptosis occurs via the mitochondrial pathway: role of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 2005, 80, 6181-6196.
169. Mitchell J.H., Cawood E., Kinniburgh D., Provan A., Collins A.R., Irvine D.S.: Effect of a phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males. *Clin. Sci. (Lond).* 2001, 100(6):613-8.
170. Mohamed el-S.A., Park Y.J., Song W.H., Shin D.H., You Y.A., Ryu B.Y., Pang M.G.: Xenoestrogenic compounds promote capacitation and an acrosome reaction in porcine sperm. *Theriogenology* 2011, 75, 1161-1169.
171. Mollerup S., Jørgensen K., Berge G., Haugen A.: Expression of estrogen receptors alpha and beta in human lung tissue and cell lines. *Lung Cancer* 2002, 37, 153-159.
172. Moran A.L., Nelson S.A., Landisch R.M., Warren G.L., Lowe D.A.: Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *J. Appl. Physiol.* 2007, 102, 1387-1393.
173. Morito K., Hirose T., Kinjo J., Hirakawa T., Okawa M., Nohara T., Ogawa S., Inoue S., Muramatsu M., Masamune Y.: Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol. Pharm. Bull.* 2001, 24, 351-356.
174. Murono E.P., Derk R.C., de León J.H.: Differential effects of octylphenol, 17beta-estradiol, endosulfan or bisphenol A on the steroidogenic competence of cultured adult rat Leydig cells. *Reprod. Toxicol.* 2001, 15, 551-560.
175. Naaby-Hansen S., Diekman A., Shetty J., Flickinger C.J., Westbrook A., Herr J.C.: Identification of calcium-binding proteins associated with the human sperm plasma membrane. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2010, 8, 6.
176. Nakada K., Sato A., Yoshida K., Morita T., Tanaka H., Inoue S., Yonekawa H., Hayashi J.: Mitochondria-related male infertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103(41):15148-53.
177. Nelson C.C., Hendy S.C., Shukin R.J., Cheng H., Bruchofsky N., Koop B.F., Rennie P.S.: Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: evidence for differential steroid receptor response elements. *Mol. Endocrinol.* 1999, 13, 2090-2107.
178. Ni M.J., Hu Z.H., Liu Q., Liu M.F., Lu M.H., Zhang J.S., Zhang L., Zhang Y.L.: Identification and characterization of a novel non-coding RNA involved in sperm maturation. *PLoS One.* 2011, 6, e26053.
179. Nixon B., Aitken R.J. The biological significance of detergent-resistant membranes in spermatozoa. *J. Reprod. Immunol.* 2009, 83, 8-13.
180. Nixon B., Bielanowicz A., McLaughlin E.A., Tanphaichitr N., Ensslin M.A., Aitken R.J.: Composition and significance of detergent resistant membranes in mouse spermatozoa. *J. Cell Physiol.* 2009, 218, 122-34.
181. Norfleet A.M., Thomas M.L., Gametchu B., Watson C.S.: Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry. *Endocrinology* 1999, 140, 3805-3814.
182. Nynca A., Kraszewska O., Słomczyńska M., Ciereszko R.: Fitoestrogeny. II. Wewnątrzkomórkowy mechanizm działania w układzie rozrodczym samicy. *Post. Biol. Kom.* 2007, 1, 207-222.



183. O'Donnell L., Robertson K.M., Jones M.E., Simpson E.R.: Estrogen and spermatogenesis. *Endocr. Rev.* 2001, 22, 289-318.
184. Omoto Y., Kobayashi Y., Nishida K., Tsuchiya E., Eguchi H., Nakagawa K., Ishikawa Y., Yamori T., Iwase H., Fujii Y., Warner M., Gustafsson J.A., Hayashi S.I.: Expression, function and clinical implications of the estrogen receptor beta in human lung cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 285, 340-347.
185. Ostermeier G.C., Goodrich R.J., Moldenhauer J.S., Diamond M.P., Krawetz S.A.: A suite of novel human spermatozoal RNAs. *J. Androl.* 2005, 26, 70-74.
186. Pakulski C.: Neuroprotective properties of sex hormones. *Anestezjol. Intens. Ter.* 2011, 43, 102-106.
187. Paoli D., Gallo M., Rizzo F., Baldi E., Francavilla S., Lenzi A., Lombardo F., Gandini L.: Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertil. Steril* 2011, 95, 2315-2319.
188. Park Y., Kwon H.Y., Shimi M.K., Rhyu M.R., Lee Y.: Improved lipid profile in ovariectomized rats by red ginseng extract. *Pharmazie* 2011, 66, 450-453.
189. Parrington J., Jones M.L., Tunwell R., Devader C., Katan M., Swann K.: Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa: potential components of the sperm factor that causes Ca<sup>2+</sup> release in eggs. *Reproduction* 2002, 123, 31-39.
190. Pedram A., Razandi M., Levin E.R.: Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol. Endocrinol.* 2006, 20, 1996-2009.
191. Pelletier G., El-Alfy M.: Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000, 85, 4835-4840.
192. Pelletier G., Labrie C., Labrie F.: Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J. Endocrinol.* 2000b, 165, 359-370.
193. Peri A., Serio M.: Estrogen receptor-mediated neuroprotection: The role of the Alzheimer's disease-related gene seladin-1. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2008, 4, 817-824.
194. Petrović S., Demajo M., Horvat A.: Estradiol affects calcium transport across mitochondrial membrane in different brain regions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005, 1048, 341-343.
195. Pietras R.J., Szego C.M.: Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 1977, 265, 69-72.
196. Piotrowska K., Baranowska-Bosiacka I., Marchlewicz M., Gutowska I., Nocoń I., Zawisłak M., Chlubek D., Wiszniewska B.: Changes in male reproductive system and mineral metabolism induced by soy isoflavones administered to rats from prenatal life until sexual maturity. *Nutrition* 2011, 27, 372-379.
197. Price R.H. Jr., Handa R.J.: Expression of estrogen receptor-beta protein and mRNA in the cerebellum of the rat. *Neurosci. Lett.* 2000, 288, 115-118.
198. Prins G.S., Marmer M., Woodham C., Chang W., Kuiper G., Gustafsson J.A., Birch L.: Estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats. *Endocrinology* 1998, 139, 874-883.
199. Psarra A.M., Sekeris C.E.: Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochim. Biophys. Acta* 2008, 1783, 1-11.
200. Psarra A.M., Solakidi S., Sekeris C.E.: The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2006, 246, 21-33.
201. Qi H., Moran M.M., Navarro B., Chong J.A., Krapivinsky G., Krapivinsky L., Kirichok Y., Ramsey I.S., Quill T.A., Clapham D.E.: All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104, 1219-1223.

202. Qi W., Weber C.R., Wasland K., Savkovic S.D.: Genistein inhibits proliferation of colon cancer cells by attenuating a negative effect of epidermal growth factor on tumor suppressor FOXO3 activity. *BMC Cancer* 2011, 11, 219.
203. Qin C., Samudio I., Ngwenya S., Safe S.: Estrogen-dependent regulation of ornithine decarboxylase in breast cancer cells through activation of nongenomic cAMP-dependent pathways. *Mol. Carcinog.* 2004, 40, 160-70.
204. Quill T.A., Ren D., Clapham D.E., Garbers D.L.: A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 12527-12531.
205. Rachamim N., Latter H., Malinin N., Asher C., Wald H., Garty H.: Dexamethasone enhances expression of mitochondrial oxidative phosphorylation genes in rat distal colon. *Am. J. Physiol.* 1995, 269, C1305-C310.
206. Rago V., Siciliano L., Aquila S., Carpino A.: Detection of estrogen receptors ER-alpha and ER-beta in human ejaculated immature spermatozoa with excess residual cytoplasm. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2006, 4, 36.
207. Rajender S., Rahul P., Mahdi A.A.: Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. *Mitochondrion* 2010, 10, 419-428.
208. Rassoulzadegan M., Grandjean V., Gounon P., Vincent S., Gillot I., Cuzin F.: RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 2006, 441, 469-474.
209. Ray A., Prefontaine K.E., Ray P.: Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 12940-12946.
210. Razandi M., Alton G., Pedram A., Ghonshani S., Webb D., Levin E.R.: Identification of structural determinant for the membrane localization of ER alpha. *Mol. Cell Biol* 2003, 23, 1633-1646.
211. Razandi M., Pedram A., Greene G.L., Levin E.R.: Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 1999, 13, 307-319.
212. Razmara A., Sunday L., Stirone C., Wang X.B., Krause D.N., Duckles S.P., Procaccio V.: Mitochondrial effects of estrogen are mediated by estrogen receptor alpha in brain endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008, 325, 782-790.
213. Ren D., Navarro B., Perez G., Jackson A.C., Hsu S., Shi Q., Tilly J.L., Clapham D.E.: A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 2001, 413, 603-639.
214. Ríos M., Hermoso M., Sánchez T.M., Croxatto H.B., Villalón M.J.: Effect of oestradiol and progesterone on the instant and directional velocity of microsphere movements in the rat oviduct: gap junctions mediate the kinetic effect of oestradiol. *Reprod. Fertil. Dev.* 2007, 19, 634-40.
215. Rossato M., Ferigo M., Galeazzi C., Foresta C.: Estradiol inhibits the effects of extracellular ATP in human sperm by a non genomic mechanism of action. *Purinergic Signal* 2005, 1, 369-375.
216. Sabbah M., Courilleau D., Mester J., Redeuilh G.: Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96, 11217-11222.
217. Safe S., Abdelrahim M.: Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J. Cancer.* 2005, 41, 2438-2448.
218. Sampey B.P., Lewis T.D., Barbier C.S., Makowski L., Kaufman D.G.: Genistein effects on stromal cells determines epithelial proliferation in endometrial co-cultures. *Exp. Mol. Pathol.* 2011, 90, 257-263.
219. Sar M., Welsch F.: Oestrogen receptor alpha and beta in rat prostate and epididymis. *Andrologia* 2000, 32, 295-301.
220. Saradha B., Mathur P.P.: Effect of environmental contaminants on male reproduction. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2006, 21, 34-41.

221. Saunders P.T.K., Maguire S.M., Gaughan J., Millar M.R. : Expression of oestrogen receptor beta (ER  $\beta$ ) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *J. Endocrinol.* 1997, 154, R13-R16.
222. Selvaraj V., Asano A., Buttke D.E., Sengupta P., Weiss R.S., Travis A.J.: Mechanisms underlying the micron-scale segregation of sterols and GM1 in live mammalian sperm. *J. Cell Physiol.* 2009, 218, 522–536.
223. Selvaraj V., Asano A., Buttke D.E., McElwee J.L., Nelson J.L., Wolff C.A., Merdiushev T., Fornes M.W., Cohen A.W., Lisanti M.P., Rothblat G.H., Kopf G.S., Travis A.J.: Segregation of microscale membrane sub-domains in live murine sperm. *J. Cell Physiol.* 2006, 206, 636–646.
224. Selvaraj V., Buttke D.E., Asano A., McElwee J.L., Wolff C.A., Nelson J.L., Klaus A.V., Hunnicutt G.R., Travis A.J.: GM1 dynamics as a marker for membrane changes associated with the process of capacitation in murine and bovine spermatozoa. *J. Androl.* 2007, 28, 588–599.
225. Shang Y., Hu X., DiRenzo J., Lazar M. A., Brown M.: Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 2000, 103, 843-852 .
226. Sierens J., Hartley J.A., Campbell M.J., Leathem A.J., Woodside J.V.: Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. *Mutat. Res.* 2001, 485, 169-176.
227. Sierens J., Hartley J.A., Campbell M.J., Leathem A.J., Woodside J.V.: In vitro isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in sperm. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 2002, 22, 227-234.
228. Sierens J.E., Sneddon S.F., Collins F., Millar M.R., Saunders P.T.: Estrogens in testis biology. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2005, 1061, 65-76.
229. Skalska J., Dębska-Vielhaber G., Głąb M., Kulawjak B., Malińska D., Koszela-Piotrowska I., Bednarczyk P., Dołowy K., Szewczyk A.: Mitochondrialne kanały jonowe. *Postępy Biochem.* 2006, 52, 137-144.
230. Snijders M.P., de Goeij A.F., Debets-Te Baerts M.J., Rousch M.J., Koudstaal J., Bosman F.T.: Immunocytochemical analysis of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human uterus throughout the menstrual cycle and after the menopause. *J. Reprod. Fertil.* 1992, 94, 363-371.
231. Solakidi S., Psarra A.M., Nikolaropoulos S., Sekeris C.E.: Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum. Reprod.* 2005, 20, 3481-3487.
232. Spiropoulos J., Turnbull D.M., Chinnery P.F.: Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol. Hum. Reprod.* 2002, 8, 719-721.
233. St John J.C., Sakkas D., Barratt C.L.: A role for mitochondrial DNA and sperm survival. *J. Androl.* 2000, 21, 189-199.
234. Steger K.: Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat. Embryol. (Berl)* 2001, 203, 323-334.
235. Stirone C., Duckles S.P., Krause D.N., Procaccio V.: Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol. Pharmacol.* 2005, 68, 959-965.
236. Suckling J., Lethaby A., Kennedy R., Local oestrogen for vaginal atrophy in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2006, 4, CD001500.
237. Szczygieł M., Kurpisz M.: Plemniki. w: *Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych ssaków.* red. Kurpisz M., Termedia Wydawnictwa Medyczne, Poznań, 2002: 191-205.
238. Szczygieł M., Maleszewski M., Kurpisz M.: Molekularne podstawy interakcji pomiędzy plemnikiem a komórką jajową. w: *Molekularne podstawy rozrodczości człowieka i innych ssaków.* red. Kurpisz M., Termedia Wydawnictwa Medyczne, Poznań, 2002: 205-215.

239. Szego C.M., Davis J.S.: Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 1967, 58, 1711-1718.
240. Świtalska M., Strządała L.: Niegenomowe działanie estrogenów. *Post. Hig. Med. Dosw.* (online) 2007, 61: 541-547, data wejścia 18.04.2011.
241. Taft R.J., Glazov E.A., Cloonan N., Simons C., Stephen S., Faulkner G.J., Lassmann T., Forrest A.R., Grimmond S.M., Schroder K., Irvine K., Arakawa T., Nakamura M., Kubosaki A., Hayashida K., Kawazu C., Murata M., Nishiyori H., Fukuda S., Kawai J., Daub C.O., Hume D.A., Suzuki H., Orlando V., Carninci P., Hayashizaki Y., Mattick J.S.: Tiny RNAs associated with transcription start sites in animals. *Nat. Genet.* 2009, 41, 572-578.
242. Taft R.J., Pang K.C., Mercer T.R., Dinger M., Mattick J.S.: Non-coding RNAs: regulators of disease. *J. Pathol.* 2010, 220, 126-139.
243. Tanphaichitr N., Carmona E., Bou Khalil M., Xu H., Berger T., Gerton G.L.: New insights into sperm-zona pellucida interaction: Involvement of sperm lipid rafts. *Front. Biosci.* 2007, 12, 1748-1766.
244. Tao J., Zhang Y., Li S., Sun W., Soong T.W.: Tyrosine kinase-independent inhibition by genistein on spermatogenic T-type calcium channels attenuates mouse sperm motility and acrosome reaction. *Cell Calcium.* 2009, 45, 133-143.
245. Tatoyan A., Giulivi C.: Purification and characterization of a nitricoxide synthase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 11044-11048.
246. Tavares R.S., Martins F.C., Oliveira P.J., Ramalho-Santos J., Peixoto F.P.: Parabens in male infertility-is there a mitochondrial connection? *Reprod. Toxicol.* 2009, 27, 1-7.
247. Taylor A.H., Al-Azzawi F.: Immunolocalization of oestrogen receptor beta in human tissues. *J. Mol. Endocrinol.* 2000, 24, 145- 155.
248. Tessier C., Deb S., Prigent-Tessier A., Ferguson-Gottschall S., Gibori G.B., Shiu R.P., Gibori G.: Estrogen receptors alpha and beta in rat decidua cells: cell-specific expression and differential regulation by steroid hormones and prolactin. *Endocrinology* 2000, 141, 3842-3851.
249. Thomas P., Pang Y., Filardo E.J., Dong J.: Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 2005, 146, 624-632.
250. Toran-Allerand C.D., Guan X., MacLusky N.J., Horvath T.L., Diano S., Singh M., Connolly Jr E.S., Nethrapalli I.S., Tinnikov A.A.: ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J. Neurosci.* 2002, 22, 8391-8401.
251. Tremellen K.: Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Hum. Reprod Update* 2008,14, 243-458.
252. Tres L.L., Rosselot C., Kierszenbaum A.L.: Caspase activity inhibition delays programmed spermatogenic cell death in vitro. *Arch. Histol. Cytol.* 2004, 67, 315-324.
253. Troiano L., Granata A.R., Cossarizza A., Kalashnikova G., Bianchi R., Pini G., Tropea F., Carani C., Franceschi C.: Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Exp. Cell Res.* 1998, 241, 384-393.
254. Ullah M.F., Ahmad A., Zubair H., Khan H.Y., Wang Z., Sarkar F.H., Hadi S.M.: Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011, 55, 553-559.
255. Umayahara Y., Kawamori R., Watada H., Imano E., Iwama N., Morishima T., Yamasaki Y., Kajimoto Y., Kamada T.: Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 16433-16442.
256. Valeri N., Vannini I., Fanini F., Calore F., Adair B., Fabbri M.: Epigenetics, miRNAs, and human cancer: a new chapter in human gene regulation. *Mamm. Genome* 2009, 20, 573-580.

257. Vanderhorst V.G., Gustafsson J.Å., Ulfhake B.: Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  immunoreactive neurons in the brainstem and spinal cord of male and female mice: relationships to monoaminergic, cholinergic, and spinal projection systems. *J. Comp. Neurol.* 2005, 488, 152-179.
258. Vanderschueren D., Vandenput L., Boonen S., Lindberg M.K., Bouillon R., Ohlsson C.: Androgens and bone. *Endocr. Rev.* 2004, 25, 389– 425.
259. Verma M.K., Miki Y., Sasano H.: Sex steroid receptors in human lung diseases. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2011, PMID: 21856418.
260. Walensky L.D., Snyder S.H: Inositol 1,4,5-triphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J. Cell. Biol.* 1995, 130, 857-869.
261. Wang J, Green PS, Simpkins JW. Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 2001, 77, 804-811.
262. Wang Q., Lu L., Gao X., Wang C., Wang J., Cheng J., Gao R., Xiao H.: Effects of raloxifene on voltage-dependent T-type  $Ca^{2+}$  channels in mouse spermatogenic cells. *Pharmacology* 2011, 87, 70-80.
263. Wang Q., Zhao X.F., Ji Y.L., Wang H., Liu P., Zhang C., Zhang Y., Xu D.X.: Mitochondrial signaling pathway is also involved in bisphenol A induced germ cell apoptosis in testes. *Toxicol. Lett.* 2010, 199, 129-135.
264. Ward M.A., Ward W.S.: A model for the function of sperm DNA degradation. *Reprod. Fertil. Dev.* 2004, 16, 547-554.
265. Watters J.J., Chun T.Y., Kim Y.N., Bertics P.J., Gorski J.: Estrogen modulation of prolactin gene expression requires an intact mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in cultured rat pituitary cells. *Mol. Endocrinol.* 2000, 14, 1872-1881.
266. Webb P., Lopez G.N., Uht R.M., Kushner P.J.: Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol. Endocrinol* 1995, 9, 443–456.
267. Weiser M.J., Foradori C.D., Handa R.J.: Estrogen receptor beta in the brain: from form to function. *Brain Res. Rev.* 2008, 57, 309-320.
268. Wykes S.M., Krawetz A.: The structural organization of sperm chromatin. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 29471–29477.
269. Xiang Q., Lin G., Fu X., Wang S., Wang T.: The role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and estrogen receptors in genistein-induced regulation of vascular tone in female rat aortas. *Pharmacology* 2010, 86, 117-124.
270. Yang L., Hu Y., Hou Y.: Effects of 17 $\beta$ -estradiol on the maturation, nuclear factor kappa B p65 and functions of murine spleen CD11c-positive dendritic cells. *Mol. Immunol.* 2006, 43, 357-366.
271. Yang Y.J., Lee S.Y., Kim K.Y., Hong Y.P.: Acute testis toxicity of bisphenol A diglycidyl ether in Sprague-Dawley rats. *J. Prev. Med. Public Health* 2010, 43, 131-137.
272. Ye L., Zhao B., Hu G., Chu Y., Ge R.S.: Inhibition of human and rat testicular steroidogenic enzyme activities by bisphenol A. *Toxicol. Lett.* 2011, 207, 137-142.
273. Zhu S.Y., Li Y.H., Ma H.M., Huang T.T., Luo H.B., Dou J., Du M.L.: Stanozolol regulates proliferation of growth plate chondrocytes via activation of ER $\alpha$  in GnRH $\alpha$ -treated adolescent rats. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2011, 24, 275-281.

## 8. STRESZCZENIE

Postuluje się, że wśród czynników wpływających niekorzystnie na wartość biologiczną nasienia ważną rolę odgrywa ekspozycja mężczyzny na ksenoestrogeny (estrogeny obcego pochodzenia). Sugeruje się, że związki te, wykorzystując szlaki transdukcji sygnału endogennych hormonów, mogą zaburzać funkcjonowanie męskiego układu rozrodczego. Przyjmuje się, że komórkami docelowymi dla działania estrogenów i ksenoestrogenów mogą być plemniki ludzkie, jednak molekularne mechanizmy ich działania nie są do końca poznane.

**Cel badań.** Celem pracy było poznanie mechanizmów, poprzez które 17 $\beta$ -estradiol i wybrane ksenoestrogeny (genisteina i bisfenol A) wpływają na biologię plemników ludzkich oraz zbadanie, czy analizowane związki wykazują synergizm działania.

**Materiał.** Nasienie 115 mężczyzn z normozoospermią (według kryteriów WHO z 2010 roku) oraz nasienie 5 knurów.

**Metody badawcze.** Oceniono ekspresję receptorów estrogenowych typu 1. i 2. w plemnikach ludzkich i w plemnikach knura z zastosowaniem pierwszorzędowych poliklonalnych króliczych przeciwciał skierowanych przeciwko ESR1 i ESR2. Zbadano wpływ 17 $\beta$ -estradiolu, genisteiny i bisfenolu A w stężeniach końcowych 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-8</sup> i 10<sup>-6</sup> mol/l na: 1) żywotność plemników ludzkich (barwienie jodkiem propidionowym), 2) proces błonowej translokacji fosfatydyloseryny (barwienie aneksyną-V znakowaną fluoresceiną), 3) kinetykę zmian stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych (metoda z wykorzystaniem markera fluorescencyjnego Fluo-3), 4) błonowy potencjał mitochondrialny (metoda z wykorzystaniem fluorochromu JC-1) oraz 5) powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach plemników ludzkich (metoda z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego MitoSOX RED). W przeprowadzonych badaniach wykorzystano: mikroskop konfokalny LSM 510 (Zeiss, Niemcy) z obiektywem Plan APOCHROMAT 63x/1.4 Oil DIC, mikroskop fluorescencyjny Axioskop 2 (Zeiss, Niemcy) oraz cytometr przepływowy FACSCalibur (Becton-Dickinson, USA).

**Wyniki.** Badania immunohistochemiczne wykazały, że zarówno w plemnikach ludzkich, jak i w plemnikach knurów, obecne są receptory estrogenowe typu 1. i typu 2. W plemnikach ludzkich o prawidłowej morfologii receptory ESR1 lokalizowane były głównie we wstawkach plemników oraz w części postakrosomowej główki. W pojedynczych plemnikach ludzkich i licznych plemnikach knura widoczna była reakcja błonowa w domenie akrosomowej. ESR2

zarówno w plemnikach ludzkich, jak i w plemnikach knura, wykazywały najsilniejszą ekspresję w rejonie wstawek.

Stwierdzono, że dwugodzinna inkubacja plemników z  $17\beta$ -estradiolem, genisteiną lub bisfenolem A nie wpływała w istotny sposób na żywotność i proces błonowej translokacji fosfatydyloseryny, niezależnie od zastosowanej dawki.

Zaobserwowano, że stymulacja plemników ludzkich  $17\beta$ -estradiolem i genisteiną powoduje zależny od dawki, szybki wzrost stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych. Reakcja rozpoczęła się już po kilku sekundach od stymulacji. W ponad 95% komórek bisfenol A nie wpływał na stężenie wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych, niezależnie od zastosowanego stężenia. Przejściowy wzrost stężenia wolnych, wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych występował tylko w pojedynczych plemnikach stymulowanych bisfenolem A w stężeniu końcowym  $10^{-6}$  mol/l

Stwierdzono, że  $17\beta$ -estradiol oraz bisfenol A, jak również inkubacja plemników z trzema ligandami jednocześnie ( $17\beta$ -estradiol, genisteina i bisfenol A), wpływają na błonowy potencjał mitochondrialny, a reakcja jest zależna od dawki.

Ocena wpływu dwugodzinnej inkubacji plemników z  $17\beta$ -estradiolem, genisteiną lub bisfenolem A, nie wykazała istotnych zmian poziomu mitochondrialnego anionorodnika nadadtlenkowego. Inkubacja plemników jednocześnie z wszystkimi analizowanymi związkami, w stężeniach końcowych  $10^{-10}$  mol/l, wykazała istotny statystycznie wzrost poziomu mitochondrialnego anionorodnika nadadtlenkowego.

**Wnioski.**  $17\beta$ -estradiol, genisteina i bisfenol A wpływają na biologię plemników ludzkich. Czas reakcji na badane związki wskazuje na niegenomowy mechanizm działania, a reakcja jest zależna od stężenia i rodzaju związku. Poziom ekspresji receptorów estrogenowych w okolicy wstawki oraz obserwowane pod wpływem badanych związków zmiany w mitochondriach sugerują, że w plemnikach ludzkich są one organellami docelowymi dla estrogenów i ksenoestrogenów. Silna reakcja mitochondriów na równoczesną stymulację  $17\beta$ -estradiolem genisteiną i bisfenolem A sugeruje synergizm ich działania lub że ksenoestrogeny zwiększają wrażliwość plemników na  $17\beta$ -estradiol.

## 9. ABSTRACT

It is hypothesized that exposure of men on xenoestrogens may negatively influence the biological value of the semen. Xenoestrogens are supposed to act via endogenous hormones pathways. Spermatozoa are possible target cells, however the biological mechanisms are unclear.

**The aim of the study.** The aim of the study was to investigate the mechanisms of the action of  $17\beta$ -estradiol and two xenoestrogens (genistein and bisphenol A) on human spermatozoa.

**Material.** Semen of 115 normozoospermic men (WHO 2010 criteria) and semen of 5 boars.

**Methods.** Expression of estrogen receptors type 1 and type 2 in human and boar spermatozoa was checked with rabbit polyclonal antibodies. The effects of  $17\beta$ -estradiol, genistein and bisphenol A ( $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  and  $10^{-6}$  mol/l) to spermatozoa were studied regarding the following phenomena: 1) spermatozoa motility (propidium iodide staining), 2) phosphatidilserine membrane translocation (staining with annexin V marked with fluorescein), 3) kinetics of intracellular free calcium ions changes (using Fluo-3 marker), 4) mitochondrial membrane potential (using JC-1 fluorochrome), and 5) production of superoxide anion in mitochondria (using MitoSOX RED fluorescent dye). The tools used in the study were: confocal microscope LSM 510 (Zeiss) with Plan Apochromat objective 63x/1.4 Oil DIC, fluorescent microscope Axioskop 2 (Zeiss) and flow cytometer FACSCalibur (Becton-Dickinson, USA).

**Results.** Immunohistochemistry revealed the presence of ESR1 and ESR2 in both human and boar spermatozoa. The location of ESR1 in morphologically normal spermatozoa was detected in post-acrosomal part of the head and in the midpiece. The location in the acrosome area was found in few human and most boar spermatozoa. For the ESR2, the location was in the midpiece for both human and boar cells.

Two-hour incubation of spermatozoa with  $17\beta$ -estradiol, genistein and bisphenol A ( $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  and  $10^{-6}$  mol/l) did not alter cells vitality nor phosphatidilserine membrane translocation.

Stimulation of human spermatozoa with  $17\beta$ -estradiol and genistein provoked rapid (within a few seconds), dose dependent increase of free intracellular calcium ions concentration. Although over 95% of spermatozoa stimulated with bisphenol A ( $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  and  $10^{-6}$  mol/l) did not present changes in free intracellular calcium ions concentration, single cells



with temporary increase of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations after stimulation with this ligand ( $10^{-6}$  mol/l) could be found.

Incubation of spermatozoa with separately  $17\beta$ -estradiol or bisphenol A, as well as incubation with three ligands ( $17\beta$ -estradiol, genistein and bisphenol A) resulted in altered mitochondrial membrane potential in a dose-dependent pattern.

Two-hour incubation of spermatozoa with separately:  $17\beta$ -estradiol, genistein or bisphenol A did not result in alteration of the level of mitochondrial superoxide anion while the incubation with the three ligands together ( $10^{-10}$  mol/l) did significantly increase the mitochondrial superoxide anion level.

**Conclusions.**  $17\beta$ -estradiol, genistein or bisphenol A influenced the biology of human spermatozoa. Short time of reaction indicated non-genomic mechanism; the reaction was dose-dependent. Considering estrogen receptors expression in the midpiece and mitochondrial alteration after ligands application, it may be supposed that mitochondria are the target cell structures for estrogens and xenoestrogens. Type of spermatozoa reaction for the three ligands applied suggests synergistic mechanism. It can be also assumed that xenoestrogens increase the sensitivity of spermatozoa toward  $17\beta$ -estradiol.