

ESTROGENY W MĘSKIM UKŁADZIE PŁCIOWYM

ESTROGENS IN MALE REPRODUCTIVE SYSTEM

Anna KONDAREWICZ, Fabian URBAN, Mariola MARCHLEWICZ,
Barbara WISZNIEWSKA

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Pomorskiej Akademii Medycznej
w Szczecinie

Streszczenie: Obecność estrogenów w gonadzie męskiej jest dobrze udokumentowana, chociaż ich rola w regulacji funkcji męskiego układu płciowego nie jest w pełni wyjaśniona. Zastosowanie technik biologii molekularnej dostarczyło nowych dowodów, że komórki narządów męskiego układu płciowego są zdolne do produkcji estrogenów drogą aromatyzacji androgenów i są narządami docelowymi dla estrogenów. Aromataza cytochromu P450 oraz obydwie izoformy receptorów estrogenowych podlegają ekspresji nie tylko w komórkach Leydiga i Sertoliego, ale również w komórkach germinalnych, plemnikach oraz komórkach nabłonka przewodników odprowadzających i najądrza. Z uwagi na szeroką dystrybucję aromatazy i receptorów estrogenowych w komórkach męskiego układu płciowego, rola estrogenów w męskim rozrodzie wydaje się bardziej skomplikowana niż wcześniej przypuszczano.

Słowa kluczowe: aromataza, estrogeny, receptory estrogenowe, męski układ płciowy.

Summary: The presence of estrogens in the male gonad is now well documented, however the role of the hormones in regulation of function of male reproductive system is not fully understood. The using of molecular biology methods provided evidence that the cells of male reproductive system organs are able to produce estrogens via aromatization of androgens and are estrogen target. The cytochrome P450 aromatase and both isoform of estrogen receptors are expressed not only in Leydig and Sertoli cells, but also in germ cells, spermatozoa, the cells of epithelium in the efferent ductules and epididymis. In view of the widespread distribution of aromatase and estrogen receptors in the cells of male reproductive system, the role of estrogens in male reproduction is more complex than previously realized.

Key words: aromatase, estrogens, estrogen receptors, male reproductive system.

WSTĘP

Nie podlega dziś już wątpliwości fakt, że poza androgenami, również estrogeny odgrywają ważną rolę w regulacji funkcji wielu narządów w organizmie mężczyzn. Już w 1934 roku stwierdzono, że jednym z etapów syntezy estrogenów w układzie płciowym u samców i mężczyzn jest konwersja androgenów [95]. Jednakże przez

długi czas żeńskie hormony płciowe uważane były jedynie za produkt uboczny, powstający w trakcie syntezy testosteronu [30]. W przypadku receptorów estrogenowych założono, że są to białka pozostałe po tej fazie embriogenezy, w której dochodziło do różnicowania gonad [52]. Wątpliwości rozwiane zostały w 1986 roku, kiedy po raz pierwszy dokonano sklonowania cDNA receptora estrogenowego (ER) w komórkach człowieka i zwierząt. Niecałe dziesięć lat po tym wydarzeniu, w 1996 roku z komórek prostaty szczura sklonowano cDNA kolejnego receptora estrogenowego [66]. Pierwszy poznany receptor nazwano α ($ER\alpha$), natomiast drugiemu nadano nazwę β ($ER\beta$). Przez długi czas próbowano również odpowiedzieć na pytanie, jak estrogeny mogą funkcjonować w środowisku, w którym zdecydowanie przeważają androgeny [51, 52]. Dopiero zdiagnozowanie pacjentów z opornością na estrogeny i brakiem estrogenów dowiodło, jak ważną rolę w męskim organizmie odgrywają te hormony [30]. Dziś już też wiadomo, że zdolność do aromatyzacji androgenów do estrogenów jest stałą cechą gonad oraz innych tkanek mężczyzn i wielu gatunków zwierząt i że obecność tych hormonów oraz ich metabolizm są niezbędne na każdym etapie życia, łącznie z okresem rozwoju embrionalnego, gdzie hormony te prowadzą m.in. do prawidłowego różnicowania zachowań seksualnych [98, 114]. W funkcjonowaniu męskiego układu płciowego niezwykle ważna jest równowaga pomiędzy androgenami a estrogenami. Wzrost aromatyzacji androgenów może być jednym z powodów wystąpienia nowotworów, m.in. kory nadnerczy i jąder [30]. Do stanów patologicznych może prowadzić także sytuacja przeciwna. Myszy ArKO nie mające genu aromatazy charakteryzują się m.in. obniżoną płodnością, spowodowaną nieprawidłowościami w procesie spermatogenezy [23, 93], tendencją do akumulacji tkanki tłuszczowej w obrębie gonad oraz postępującym wraz z wiekiem stłuszczeniem wątroby [106].

ESTROGENY U MĘŻCZYŹN

Estrogeny powstają w reakcji aromatyzacji androgenów, która katalizowana jest przez enzym aromatazę cytochromu P450 (P450arom) [69]. Reakcja ta przeprowadzana jest w komórkach jądra, jak i innych narządów męskiego układu płciowego. Wysokie stężenie estrogenów, przewyższające niekiedy kilkakrotnie ich stężenie w surowicy krwi, występuje w nasieniu kilkunastu gatunków zwierząt, ale także wyższe niż w surowicy krwi stwierdza się u mężczyzn [53]. U niedojrzałych płciowo osobników męskich źródłem estrogenów są komórki Sertoliego, natomiast po osiągnięciu dojrzałości płciowej aktywność P450arom wykazują komórki Leydiga. Jak wykazały badania ostatnich lat, w produkcję estrogenów zaangażowane są również komórki germinalne nabłonka plemnikotwórczego mężczyzn i zwierząt [22, 27, 28, 49, 71], ale również komórki nabłonkowe przewodników odprowadzających [16, 53] i przewodu najądrza [16, 87, 112, 113].

Dodatkowym źródłem estrogenów u mężczyzn są także tkanki pozagonadalne, które mają zdolność aromatyzowania krążących androgenów do estrogenów.

Najbardziej aktywnym hormonem wśród estrogenów jest 17β -estradiol (E2). Powstaje poprzez konwersję testosteronu, katalizowaną przez aromatazę, a także poprzez przekształcenie estronu, przy udziale enzymu dehydrogenazy 17β -hydroksy-steroidowej (17β -HSD). U dorosłego mężczyzny całkowita dobową produkcją estradiolu wynosi 35–45 μ g, z czego blisko 15–20% produkowane jest bezpośrednio przez jądro [30]. Około 60% krążącego estradiolu pochodzi z obwodowej aromaty-zacji testosteronu, natomiast pozostałe około 20% jest efektem obwodowej konwersji estronu [30].

Estron – kolejny hormon z grupy estrogenów – jest produktem obwodowej aromaty-zacji androstendionu. Androstendion jest androgenem, produkowanym przez nadnercza lub powstającym w wyniku obwodowej konwersji testosteronu [30].

Zaledwie 2–3% z całkowitej puli estradiolu krążącego u dorosłego mężczyzny występuje w postaci wolnej. Większość cząsteczek związana jest z białkiem wiążącym hormony płciowe – SHBG (*Sex Hormone Binding Globulin*) [30], z β -globulinami lub w mniejszym stopniu z albuminami [96]. Uważa się, że jedynie te cząsteczki hormonu, które nie są związane z SHBG, wykazują aktywność biologiczną.

Badania przeprowadzone na dużej liczbie mężczyzn dowiodły, że stężenie estrogenów w osoczu nie jest stałe przez całe życie. Po ukończeniu 30. roku życia ilość krążących wraz z krwią estrogenów nieznacznie maleje. Poziom ten utrzymuje się do około 75. roku życia, po czym ulega znacznemu spadkowi [30].

Wydzielane przez jądra estrogeny mogą mieć działanie lokalne i oddziaływać bezpośrednio na same gonady, a także mogą wpływać na ilość uwalnianych przez przysadkę do krwi gonadotropin na zasadzie sprzężenia zwrotnego [7]. Estrogen jest w stanie hamować proces wydzielania FSH do krwi. W surowicy mężczyzn z mutacją genu *CYP 19* bądź genu *ER α* stężenie FSH i LH jest znacznie podwyższone [30].

U mężczyzn estrogeny uważa się za czynnik przeciwdziałający apoptozie komórek germinalnych w obrębie kanalików nasiennych [7, 14, 32, 86]. Ekspresja P450arom oraz receptorów estrogenowych powiązana jest z rozpoczęciem kolejnych cykli spermatogenezy u nornicy rudej oraz u chomika. Estradiol może korzystnie wpływać na syntezę aromatazy także w przypadku komórek Leydiga u dorosłych szczurów, podczas gdy w spermatocytach pachytenowych oraz okrągłych spermatydach, te same dawki hormonu obniżają efektywność ekspresji genu aromatazy. Sugeruje to obecność w sekwencjach promotora genu aromatazy, elementów odpowiedzi estrogenowej [14]. Zdolność do syntezy estrogenów jest cechą gatunkową. Knur oraz ogier charakteryzują się znacznie większą produkcją tych hormonów niż samce innych gatunków [7]. Ponadto, u tych dwóch gatunków aromataza bierze udział także w syntezie innych steroidów, np. norandrogenów, których działanie nie jest do końca poznane [38]. W komórkach nabłonka jądra szczura w warunkach *in vitro*, estradiol działa jako inhibitor konwersji testosteronu do DHT [15]. U hypogonadalnych myszy hormon ten indukuje spermatogenezę [8, 34]. Jednakże, mechanizm tej indukcji nie został jeszcze całkowicie wyjaśniony, ponieważ w trakcie podawania estradiolu następował wzrost wydzielania FSH przez przysadkę mózgową. Istnienie takiej zależności nasuwa pytanie, czy estradiol działa bezpośrednio na jądra, czy pośrednio poprzez przysadkę i wydzielane przez nią hormony gonadotropowe [8].

Ważnym źródłem estrogenów u mężczyzn jest tkanka tłuszczowa. Konwersja androgenów w estrogeny jest skorelowana ze wzrostem indeksu masy ciała – BMI. U mężczyzn z dużą nadwagą obserwuje się znaczny wzrost stężenia estradiolu w osoczu, z jednoczesnym spadkiem poziomu testosteronu. Wraz z utratą masy ciała, zależność ta ulega odwróceniu. Sytuacja ta potwierdza udział tkanki tłuszczowej w procesach aromatyzacji estrogenów u mężczyzn [30]. Ponadto, źródłem estrogenów mogą być także komórki mięśniowe, mózg, gruczoł piersiowy, skóra oraz tkanka kostna [42].

Estrogeny oddziałują także na mózg poprzez obecność receptorów $ER\alpha$ i $ER\beta$ między innymi w korze mózdzku, podwzgórzu, przysadce czy układzie limbicznym [42]. W trakcie rozwoju zarodkowego estrogeny wywierają wpływ na różnicowanie płciowe specyficznych części mózgu, czego efektem jest dymorfizm płciowy obserwowany w jądrze brzuszno-przyśrodkowym podwzgórza, polu przedwzrokowym podwzgórza oraz jądrze migdałowatym [106]. Stymulują także różnicowanie i wykształcanie komórek nerwowych oraz tworzenie połączeń synaptycznych. Wpływ hormonów estrogenowych na komórki i struktury mózgowe nie kończy się jednak wraz z zakończeniem okresu płodowego, lecz trwa przez całe życie i obejmuje funkcje poznawcze, koordynację ruchu, stany psychiczne czy odczuwanie bólu. Poprzez oddziaływanie na struktury hipokampa, estrogeny wpływają na procesy zapamiętywania. Obecność estrogenów i ich receptorów w mózgu wiąże się także z protekcją przed wystąpieniem choroby Alzheimera oraz opóźnianiem jej rozwoju, poprzez zwiększanie wydzielania acetylotransferazy cholinowej [42].

Hormony estrogenowe poprzez swoje receptory obecne w tkance kostnej u mężczyzn wpływają na twardość mineralną kości (BMD). Fakt ten potwierdzony został badaniami mężczyzn z brakiem aromatazy cytochromu P450 lub zaburzeniami dotyczącymi białek receptorowych, u których wystąpiły zaburzenia w rozwoju i mineralizacji kości [42]. Ekspresję mRNA dla obu typów receptorów estrogenowych wykazano także w chrząstkach nasadowych kości długich [76].

Serce i naczynia wieńcowe również wykazują wrażliwość na działanie estrogenów. W ciągu ostatnich kilku lat przybyło dowodów na istnienie zależności pomiędzy poziomem tych hormonów i ryzykiem wystąpienia schorzeń układu wieńcowego. Spadek poziomu estrogenów we krwi u mężczyzny może być przyczyną wystąpienia dyslipidemii [42]. Korzystnym wpływem hormonów estrogenowych na serce i układ wieńcowy jest obniżenie poziomu cholesterolu. Wpływają one również na ścianę naczyń krwionośnych, płytki krwi, koagulację i produkcję czynników zapalnych [42].

AROMATAZA CYTOCHROMU P450 I JEJ LOKALIZACJA W MĘSKIM UKŁADZIE PŁCIOWYM

Aromatyzacja androgenów jest procesem nieodwracalnym, w który zaangażowana jest aromataza cytochromu P450 (P450arom). Enzym ten katalizuje konwersję androgenów (C19) do estrogenów (C18) [29, 60, 100].

P450arom stanowi kompleks enzymatyczny złożony z dwóch białek. Pierwszym z nich jest specyficzna mikrosomalna hemoglikoproteina – aromataza cytochromu P450, która w swojej budowie zawiera hem oraz miejsce wiążące steroidy i odpowiada za przyłączenie substratu, a w konsekwencji utworzenie fenolowego pierścienia, charakterystycznego dla estrogenów [29].

Drugim białkiem jest niespecyficzna ubikwitynowana reduktaza flawoproteinowa NADPH-cytochromu P450, która uczestniczy w przepływie elektronów z NADPH na cytochrom P450 [18, 22, 29, 100]. U człowieka P450arom jest kodowana przez pojedynczą kopię genu *CYP 19*, zlokalizowanego na chromosomie 15 [19, 29, 100, 102]. Gen *CYP 19* należy do dużej nadrodziny, liczącej około 500 genów, obejmującej 74 rodziny [101]. Składa się on z 9 kodujących sekwencji egzonowych oraz z niepodlegających translacji egzonów II–I5, leżących w górę od kodonu II [30, 101, 103]. Transkrypty aromatazy pochodzące z różnych tkanek różnią się zazwyczaj końcem 5', co wskazuje na istnienie w tkankach wykazujących ekspresję aromatazy specyficznych promotorów, z których każdy ma własny egzon I [30, 101, 102]. Egzon ten nie podlega transkrypcji, dlatego we wszystkich tkankach ekspresja genu *CYP 19* prowadzi do powstania cząsteczki białka o takiej samej budowie [14, 101, 102]. W gonadach obu płci, synteza P450arom jest regulowana przez proksymalny promotor II, zależny od cAMP i gonadotropin [101, 102]. W tkankach pozagonadalnych, np. w tkance tłuszczowej, ekspresja enzymu regulowana jest przez IL-6, onkostatynę M i IL-11 oraz TNF α . Wszystkie te czynniki działają poprzez promotor I.4 genu i wymagają glikokortykosteroidów, jako ko-aktywatora [101, 102].

Aktywność aromatazy została wykazana także w mózgu, mięśniach, skórze, tkance kostnej, naczyniach krwionośnych oraz sercu [30, 41, 115].

Fakt, że w gonadzie męskiej są obecne estrogeny, był znany i akceptowany już przed ponad 70 laty. Jednak, miejsce w gonadzie, w którym dochodzi do aromatyzacji androgenów, przez długi czas było tematem wielu badań i kontrowersji. Jak wykazały badania, dystrybucja P450arom w tkankach męskiego układu płciowego nie jest jednorodna i u wielu gatunków przedstawia się inaczej. Do aromatyzacji androgenów dochodzi przynajmniej w trzech populacjach komórek na terenie jądra – komórkach Leydiga, komórkach Sertoliego, komórkach germinalnych, ale także w komórkach nabłonkowych przewodów wyprowadzających plemniki i w plemnikach, uwolnionych z jądra.

U niedojrzałych płciowo samców, pierwotnym źródłem aromatazy są komórki Sertoliego, natomiast u osobników dorosłych ekspresję aromatazy wykazują komórki Leydiga [22, 47]. U ssaków, w tym także u mężczyzn, ekspresja aromatazy ma miejsce w komórkach Leydiga. W warunkach *in vitro* aromatazę są w stanie syntetyzować także komórki Sertoliego [25, 53, 69]. W przypadku szczura proces ten jest zależny od wieku.

W 1993 roku, Nitta i wsp. [78] wykazali po raz pierwszy obecność aromatazy w cytoplazmie spermatyd myszy, a kolejne badania potwierdziły jej obecność [10] i poszerzyły wiedzę na temat miejsc aromatyzacji w jądrze innych gatunków. Na ich podstawie wysunięto hipotezę, że komórki germinalne jądra są nowym źródłem estrogenów. Wykazano bowiem, że na terenie gonady szczura ekspresję aromatazy wykazują postmeiotyczne spermatocyty pachytenowe, okrągłe spermatydy i plemniki

[17, 20, 22, 48, 53, 71, 72]. Obecność aromatazy wykazano także w komórkach germinalnych jądra innych gatunków, takich jak: niedźwiedź brunatny [109], kogut [68], nornica [12, 39], ogier [46, 105], niedojrzałych i dojrzałych płciowo świń [38, 44], czy po raz pierwszy w komórkach germinalnych pstrąga tęczowego [65]. Przy okazji tych badań, ekspresję aromatazy wykazano nie tylko w komórkach germinalnych, ale także w komórkach Sertoliego i Leydiga myszy oraz nornic rudych, a także ogiera [10, 11, 12, 105].

W jądrze dojrzałego płciowo mężczyzny P450arom zlokalizowana jest w komórkach Leydiga i komórkach germinalnych [70]. We wczesnych okresach życia postnatalnego (1–21 dnia życia i 1–7 miesięcy) immunoekspresję P450arom wykazują komórki Leydiga i germinalne, natomiast od 1. do 5. roku życia aromataza lokalizowana jest w komórkach germinalnych [9]. W jądrze płodowym człowieka obecność aromatazy stwierdzono w komórkach Leydiga, komórkach Sertoliego i komórkach germinalnych od 13. tygodnia rozwoju, po 22. tygodniu ekspresja ulega obniżeniu i w 35. tygodniu zanika [13].

Aktywność aromatazy w gonadzie może ulegać zmianie u zwierząt rozmnażających się sezonowo, u człowieka i zwierząt z zaburzeniami genetycznymi czy niezstąpionymi jądrami. W przypadku nornic rudych, zwierząt rozmnażających się sezonowo, aktywność aromatazy zależy od długości fotoperiodu [11, 40]. U ogiera natomiast, w przypadku niezstąpionych jąder, występuje nadekspresja P450arom [46], a u człowieka i myszy z zaburzeniami genetycznymi wystąpiło zdecydowane nasilenie ekspresji aromatazy w komórkach jądra [62, 63, 64].

Jak wskazano powyżej, potwierdzono także obecność transkryptu P450arom w komórkach nabłonkowych przewodów wyprowadzających nasienie. Transkrypt P450arom stwierdzono w komórkach nabłonkowych najądrza szczura [113], ekspresję P450arom wykazano także w komórkach nabłonkowych najądrza małp *Rhesus* [87]. Zastosowanie metod immunohistochemicznych pozwoliło na stwierdzenie, że transkrypty P450arom występują nie tylko u samców zwierząt, lecz także u mężczyzn. Enzym ten po raz pierwszy zlokalizowano w cytoplazmie urzęsionych oraz pozbawionych rzęsek komórek nabłonka przewodników odprowadzających w głowie najądrza, a także w cytoplazmie głównych i podstawnych komórek nabłonka wyściełającego początkowy odcinek przewodu najądrza [16]. Podobne procedury, z wykorzystaniem odpowiednich przeciwciał, pozwoliły stwierdzić, że u ogierów P450arom obecna jest w cytoplazmie komórek nabłonkowych wyściełających najądrze na całej jego długości. Największą siłą ekspresji enzymu przejawiają główne i podstawne komórki nabłonkowe głowy najądrza, podczas gdy w ogonie transkrypcja zachodzi w znacznie mniejszym stopniu. Komórki nabłonkowe trzonu najądrza wykazują pośrednią siłą ekspresji enzymu [46].

Ekspresję i aktywność aromatazy wykazują także plemniki mężczyzn i zwierząt, po opuszczeniu jądra [26, 27, 48, 58, 59, 89, 90]. Stąd, określa się je mianem ruchomych jednostek sekrecyjnych. Zdolność ludzkich plemników do konwersji pregnenolonu do testosteronu i uwalniania estrogenów jasno wskazywała na obecność aromatazy cytochromu P450 [43]. Pierwsze doniesienia wskazywały, że aktywność aromatazy w plemnikach myszy i szczura ulega zmniejszeniu podczas transportu przez najądrze, ale nie ulega całkowitemu zanikowi [58, 59]. Badania Aquila i wsp. [4] wykazały po

raz pierwszy, a potem potwierdzone przez innych, że nie tylko te w najądrzu, ale również ejakulowane ludzkie plemniki są potencjalnym miejscem syntezy estrogenów [26, 70, 90]. W wielokrotnie powtarzanym doświadczeniu, z zastosowaniem RT-PCR, analizy *Western blot* oraz pomiarów enzymatycznej aktywności wykazano obecność mRNA P450arom oraz aktywnego biologicznie białka. Wyższą immunoreaktywność wykazywał obszar wstawka-witka niż główka plemnika. Badania te zostały potwierdzone przez Lambard i wsp. [70], a wykazały ponadto, że w plemnikach pozbawionych ruchu aktywność P450arom jest znacznie niższa niż w plemnikach prawidłowych. W pionierskich badaniach na plemnikach knura, przy zastosowaniu immunofluorescencji powtarzanej sześciokrotnie, P450arom wykrywano w obszarze wstawki, przy braku ekspresji w witce i główce, a analizą *Western blot* także białko aromatazy o masie około 55 kDa [89].

Pozytywny wpływ na ekspresję genu aromatazy u szczurów wywierają androgeny. W komórkach mózgu tych zwierząt, a także u małp *Rhesus* testosteron jest w stanie regulować ekspresję aromatazy na poziomie transkrypcyjnym oraz poprzez obecność receptorów androgenowych. U mężczyzny obecność testosteronu jest pozytywnie skorelowana ze wzrostem ilości transkryptu P450arom w komórkach germinalnych, podczas gdy podawanie estradiolu wywołuje efekt przeciwny [14].

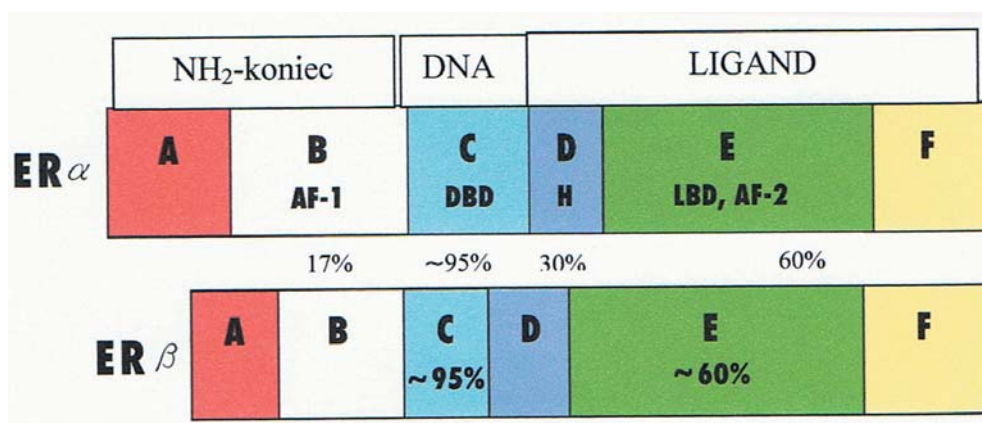
RECEPTORY ESTROGENOWE

Estrogeny wywierają swój efekt biologiczny poprzez specyficzne receptory estrogenowe (ERs). U człowieka gen $ER\alpha$ znajduje się na długim ramieniu chromosomu 6, natomiast gen $ER\beta$ zlokalizowany jest w prażku q22-24 chromosomu 14 [96]. Receptory estrogenowe należą do licznej rodziny jądrowych receptorów hormonów steroidowych. Charakteryzują się one podobną budową, w której wyróżnić można trzy niezależne, lecz współgrające ze sobą domeny: domenę N-końca (A/B domena), domenę wiążącą DNA (domena C) oraz domenę wiążącą ligand (domena D/E/F). Przyłączenie liganda do ER pociąga za sobą dimeryzację receptora i jego interakcję z DNA, w której pośredniczą sekwencje ERE (*estrogen-response-elements*) – elementy odpowiedzi estrogenowej oraz aktywację czynników transkrypcyjnych, czego konsekwencją jest utworzenie kompleksu reinicjacyjnego (ryc. 1). Koekspresja $ER\alpha$ i $ER\beta$ w tej samej komórce powoduje powstanie homodimerów ($ER\alpha/ER\alpha$ i $ER\beta/ER\beta$) lub heterodimerów ($ER\alpha/ER\beta$), które zwiększają specyficzność liganda [1]. Większy wpływ na aktywację transkrypcji wykazują homodimery $ER\alpha$ niż homodimery $ER\beta$. Heterodimery natomiast mają aktywność porównywalną z aktywnością homodimerów $ER\alpha$ jedynie w środowisku wysyconym hormonem [82].

Pomiędzy C domenami $ER\alpha$ i $ER\beta$ istnieje wysoki poziom homologii (około 95% sekwencji identycznych). Z kolei stopień homologii domen wiążących ligand obu receptorów jest znacznie mniejszy i wynosi około 60%. Różnice domen wiążących ligand w powiązaniu z innymi czynnikami wpływają na zmianę aktywności procesu transkrypcji, w której uczestniczy receptor estrogenowy [1] (ryc.1). Receptory estrogenowe mogą występować w różnych izoformach, jednakże ich znaczenie biologiczne nie zostało dotychczas poznane.

Odpowiedź komórek na estrogeny, a także na związki agonistyczne oraz antagonistyczne, zależy od stężenia receptorów estrogenowych w tkance. Na interakcję pomiędzy ERs i EREs mogą wpływać m.in. takie czynniki, jak zdolność $ER\beta$ do modulacji aktywności transkrypcyjnej $ER\alpha$, a także możliwość indukcji białkowych koaktywatorów i korepresorów przez oba typy receptorów estrogenowych. Ponadto, ER oraz receptory innych steroidów mogą modulować efekt biologiczny działania hormonów w drodze pozagenomowej. Mechanizm ten opiera się na interakcji pomiędzy ERs i czynnikami wzrostu, np. IGF-1 czy EGF. Ostatnio przybywa dowodów na to, że receptory specyficzne dla steroidów mogą znajdować się także w błonie komórkowej. Ich działanie polega na przekazywaniu sygnału poprzez wiązanie białek zależnych od GTP oraz przez generowanie wtórnych przekazywaczy (np. wapnia) i aktywacji kaskady kinaz. Efekt działania estrogenów na poszczególne tkanki i narządy jest zatem wynikiem współgrających ze sobą mechanizmów, odbywających się w drodze zarówno genomowej, jak i pozagenomowej [1].

Receptory estrogenowe zarówno $ER\alpha$, jak i $ER\beta$ są w różnych stężeniach szeroko rozpowszechnione w narządach męskiego układu płciowego. Jednak dystrybucja REs jest zróżnicowana i niekiedy odmienna gatunkowo. Według większości danych zebranych na podstawie przeprowadzonych dotychczas badań dotyczących rozwoju układu płciowego u samców gryzoni, ekspresja receptorów estrogenowych α zachodzi w komórkach Leydiga oraz w komórkach okołokanalikowych jądra [1]. $ER\alpha$ pojawiają się jako pierwsze receptory w rozwoju gonad u płodów samców gryzoni. Ich ekspresja rozpoczyna się we wczesnych etapach rozwoju, bowiem jeszcze przed syntezą receptorów androgenowych [96, 114]. $ER\beta$ natomiast zlokalizowane są w komórkach germinalnych, komórkach Sertoliego, a także w



RYCINA 1. Schemat struktury receptorów estrogenowych α i β , z zaznaczeniem domen oraz stopnia ich homologii. NH₂-koniec obejmuje domeny A i B; domena C tworzy domenę wiążącą się z DNA (DBD); domeny D, E, F stanowią miejsce wiązania liganda (LBD). AF-1 zawarta w domenie B i AF-2 w domenie E są czynnikami aktywującymi transkrypcję (wg [1], zmieniony)

FIGURE 1. Schema of structure of the estrogen receptors α and β , including domains and percent of homology. The NH₂-terminal consists of the A/B domains; C domain is the DNA-binding domain (DBD); D/E/F domains constitute the ligand-binding domains (LBD). The AF-1 within B domain and AF-2 in E domain are factors activating transcription (according to [1], alternating)

najądrzu, prostaty oraz pęcherzykach nasiennych [1], z których najwyższym poziomem ekspresji tych receptorów charakteryzują się komórki germinalne. Wskazuje to na udział estrogenów w dojrzewaniu komórek szlaku spermatogenezy. Szczególnym przypadkiem okazał się być szczur, u którego ekspresja ER β zachodzi także w przewodach Wolffa [96]. W gonadzie mężczyzn ER β wykrywane były w jądrach spermatogoniów, spermatocytów i spermatyd na wczesnych stopniach różnicowania, przy czym nie wykrywano ich w spermatydach wydłużonych i dojrzałych, komórkach Sertoliego i komórkach Leydiga [75]. Z kolei badania Pentikäinen i wsp. [86] wykorzystujące poliklonalne przeciwciała królicze przeciw receptorom estrogenowym α i β oraz monoklonalne przeciwciała mysie przeciw ER α dowiodły, że u mężczyzn oba podtypy receptorów obecne są w zygotenowych i pachytenowych stadiach spermatocytów I rzędu, a także we wczesnych stadiach spermatyd wydłużonych. Inne badania wskazują natomiast, że ER α lokalizowano w jądrach komórek Leydiga, spermatocytach i owalnych spermatydach gonady mężczyzn, podczas gdy ER β obecne były w jądrach komórek Sertoliego gonady szczura [84, 85]. W komórkach Leydiga i na terenie kanalików nasiennych gonady normicy zlokalizowano natomiast ER β [11, 12].

Już w latach 70. ubiegłego wieku wiadomo było, że również w najądrzu znajdują się receptory estrogenowe [51, 53]. Ich obecność wykazano u takich gatunków, jak: pies, żółw, małpa, baran, świnka morska, szczur oraz u człowieka. Używając metod autoradiograficznych potwierdzono obecność tych cząsteczek także w przewodnikach odprowadzających oraz w początkowym odcinku najądrza. Analizy te okazały się jednak nieskuteczne w przypadku identyfikacji podtypów receptorów. Dopiero zastosowanie metod immunocytochemicznych (ICC), hybrydyzacji *in situ* oraz analizy *Northern blot* pozwoliło na identyfikację receptorów estrogenowych α i β [51]. U ssaków receptory androgenowe oraz ER β rozmieszczone są na całej długości najądrza, sugerując ich udział w utrzymaniu homeostazy procesów zachodzących w najądrzu. ER α znajdują się natomiast głównie w przewodnikach odprowadzających. Jednak w tym przypadku rozmieszczenie to jest zależne od gatunku, a także może być zmienne w jego obrębie, np. u szczura [81]. W przypadku 90-dniowych myszy, po zastosowaniu odpowiednich przeciwciał przeciwko ER α , wykazano ich znaczne stężenie w nabłonku przewodników odprowadzających oraz mniejszą ilość w najądrzu [53]. Badania Kolasy i wsp. [61] dotyczące lokalizacji receptorów estrogenowych w najądrzu mężczyzny i szczura potwierdziły ich obecność w jądrach komórek w określonych odcinkach przewodu. Zarówno u mężczyzny, jak i u szczura w jądrach komórek nabłonkowych głowy najądrza uzyskano wynik pozytywny po zastosowaniu przeciwciał skierowanych przeciwko ER α . Natomiast w jądrach komórek nabłonka wyścielającego ogon najądrza receptory tego podtypu były obecne tylko u szczura. Receptory typu β wykryte zostały jedynie w jądrach komórek nabłonkowych ogona najądrza u mężczyzn (tab.1) [61]. W najądrzu knura ekspresję ER α odnotowano w większości komórek głównych nabłonka głowy, słabą w trzonie i całkowity jej brak w ogonie najądrza. Komórki bazalne nabłonka oraz komórki mięśniowe gładkie ściany własnej nie wykazywały ekspresji ER α na całej długości najądrza. Ekspresję ER β natomiast wykazywały komórki główne nabłonka oraz komórki mięśniowe gładkie we wszystkich badanych segmentach najądrza [83]. Według wcześniejszych badań [61] pozytywnym wynikiem po zastosowaniu

TABELA 1. Rozmieszczenie receptorów estrogenowych α i β ($ER\alpha$ i $ER\beta$) w najądrzu mężczyzny i szczura (wg [61])TABLE 1. Localization of estrogen receptors α and β ($ER\alpha$ and $ER\beta$) in the human and rat epididymal duct (according to [61])

	Głowa najądrza <i>Caput epididymis</i>		Ogon najądrza <i>Cauda epididymis</i>		Komórki mięśni gładkich Smooth muscle cells		Komórki tkanki interstycjalnej Interstitial tissue cells	
	Mężczyzna Man	Szczur Rat	Mężczyzna Man	Szczur Rat	Mężczyzna Man	Szczur Rat	Mężczyzna Man	Szczur Rat
$ER\alpha$	+	+	-	+	-	-	-	-
$ER\beta$	-	-	+	-	-	+	-	+

przeciwiał przeciw $ER\beta$ charakteryzowały się jądra komórek mięśniowych gładkich przewodu najądrza u szczura, a także komórki tkanki interstycjalnej (tab.1).

Ekspresję receptorów estrogenowych wykazują także plemniki mężczyzny i zwierząt [26, 89]. Aquila i wsp. [3] w swoich badaniach wykazali obecność zarówno obu izoform ERs, jak i białka w ludzkich ejakulowanych plemnikach. Przy zastosowaniu mikroskopii konfokalnej, immunobarwienie $ER\alpha$ zlokalizowano w segmencie równikowym i górnej okolicy postakrosomalnej główki oraz słabą reakcją w witce plemników ludzkich. $ER\beta$ odnotowano natomiast w mitochondriach wstawki plemnika, które identyfikowano przy użyciu specyficznych markerów [104]. W ejakulowanych ludzkich niedojrzałych plemnikach $ER\alpha$ lokalizowano w cytoplazmie resztkowej, przy czym główki oraz witki były immunonegatywne. W prawidłowych plemnikach immunofluorescencją wskazującą ekspresję $ER\alpha$ odnotowano jedynie we wstawce plemników. $ER\beta$ natomiast lokalizowano w cytoplazmie resztkowej oraz witce niedojrzałych plemników, w plemnikach prawidłowych immunofluorescencją odnotowano na całej długości witki [91]. W obu doświadczeniach potwierdzono obecność białek receptorów, przy zastosowaniu immunoblotingu [91, 104].

Obecność $ER\alpha$ nie jest ograniczona jedynie do układu płciowego, ponieważ zlokalizowane one zostały także w przysadce mózgowej, podwzgórzu, tkance tłuszczowej, mięśniach szkieletowych, wątrobie [82]. Receptory estrogenowe β wykryto licznie w tkance śródmiąższowej jądra, w kanalikach prostych [51] i prostaty, a poza układem płciowym w układzie limbicznym, mózdzku, korze mózgowej i płucach. Natomiast kości, układ krwionośny, tarczyca, nadnercza i nerki wykazują obecność obu typów receptorów estrogenowych.

FUNKCJA ESTROGENÓW

Badania ostatnich lat wykazały, że estrogeny odgrywają większą rolę w funkcjonowaniu męskiego układu płciowego, niż pierwotnie przypuszczano. Wskazuje na to zdolność różnych populacji komórek gonady (w tym germinalnych) oraz przewodów wyprowadzających plemniki do ekspresji aktywnej aromatazy cytochromu P450, jak i szeroka dystrybucja receptorów estrogenowych α i β . Niemniej, fizjolo-

giczna rola estrogenów w regulacji procesów dotyczących powstawania (spermatogenezy i spermiogenezy), dojrzewania, magazynowania i uwalniania plemników, a także ich udział w regulacji ruchu plemników, procesu kapacytacji i przeprowadzania reakcji akrosomowej, wymaga dalszego wyjaśnienia.

Początkowe badania wskazywały, że estrogeny odgrywają nieznaczną rolę w regulacji funkcji dojrzałego jądra, to w rozwijającej się gonadzie w znacznej mierze uczestniczą w ustalaniu funkcji komórek Sertoliego [79], a także tworzeniu adhezji pomiędzy komórkami Sertoliego i germinalnymi [74]. Badania prowadzone na modelu mysim wykazały jednak, że stosowanie antyestrogenów hamuje w warunkach *in vitro* funkcję komórek Leydiga [2]. Z kolei, przy całkowitym braku syntezy estrogenów, jak u myszy ArKO, obserwuje się prawidłową spermatogenezę, ale wraz z wiekiem występują zaburzenia dotyczące tworzenia owalnych spermatyd [63, 94]. Jednak, samce myszy β ERKO nie mają zdolności rozrodczych, pomimo tego że do czasu osiągnięcia dojrzałości płciowej gonady nie wykazują nieprawidłowości. Wraz z pierwszym cyklem spermatogenezy jądra zaczynają degenerować, a ilość wytwarzanych plemników ulega znacznej redukcji w porównaniu z ilością u samców mających geny receptorów estrogenowych. Zmiany degeneracyjne gonady związane są z zaburzeniami funkcji resorbcyjnej komórek nabłonka przewodników odprowadzających i gromadzeniem płynu na terenie gonady [50]. Samce myszy ERKO, z brakiem funkcjonalnego receptora ER wykazują prawidłową morfologię jądra i są płodne [33, 50].

Chociaż estrogeny mogą nie mieć zasadniczego wpływu na przebieg spermatogenezy, to wydaje się, że przynajmniej dwa etapy tego procesu mogą być w części regulowane przez estrogeny: liczba macierzystych komórek germinalnych oraz dojrzewanie spermatyd [21, 24, 82]. Badania *in vitro* dostarczyły dowodów, że estrogeny wywierają pozytywną rolę w procesie odnowy spermatogoniów, a podawanie estradiolu stymuluje wzrost liczby spermatogoniów typu A u szczurów [21, 67, 77]. Istnieją też doniesienia wskazujące, że u myszy z genetycznie zmienioną sekrecją gonadotropin (myszy hpg) podawanie estradiolu wznawia spermatogenezę [34], a także pojawienie się pierwszej fali spermatogenicznej u szczurów regulowane jest przez estrogeny [6]. Wykazano ponadto u naczelnych, że iniekcja inhibitorów aromatazy skutkuje obniżeniem liczby spermatyd i zaburza ich dojrzewanie [99]. W czasie spermatogenezy, w warunkach fizjologicznych liczne komórki germinalne przechodzą proces apoptozy, który podlega głównie kontroli przez FSH i testosteron [32]. Badania prowadzone na hodowanych *in vitro* fragmentach kanalików nasiennych gonady mężczyzn wskazały jednak na bezpośredni wpływ 17β -estradiolu na przeżywanie komórek germinalnych. Gdy kanaliki nasienne hodowano w pożywce bez czynników promujących przeżywanie komórek (surowica i hormony), wprowadzenie do pożywki estradiolu w stężeniach takich, jakie występują fizjologicznie w żyłce jądrowej mężczyzn i tkance jądra, znacznie redukowało liczbę spermatocytów i spermatyd wstępujących w proces apoptozy [86]. Zatem, jak wskazują badania, estrogeny działając poprzez swoje receptory wywierają bezpośredni i pośredni wpływ na przebieg spermatogenezy.

Najlepiej udokumentowana jest rola estrogenów w przewodnikach odprowadzających jądra, które łączą sieć jądra z przewodem najądrza [37, 51, 53, 56]. Przewodniki odprowadzające stanowią u człowieka większą część głowy najądrza i podobnie jak u innych ssaków są drogą transportu plemników zawieszonych w płynie kanalikowym do najądrza, miejsca ich dojrzewania [50]. Estrogeny, działając przez ER α , kontrolują w przewodnikach odprowadzających reabsorpcję ponad 90% płynu kanalikowego jądra, zagęszczając plemniki przed ich wejściem do najądrza [54, 81, 106, 110]. Proces reabsorpcji płynu kanalikowego oraz synteza białek biorących udział w tym procesie pozostają pod kontrolą estrogenów [51, 52, 80, 88, 97]. Badania nad myszami α ERKO, bez funkcjonalnych receptorów estrogenowych α , udokumentowały znaczenie estrogenów w tym odcinku dróg wyprowadzających nasienie. Zaburzenia w reabsorpcji płynu są następstwem morfologicznych zmian komórek nabłonka przewodników odprowadzających. Rozproszeniu oraz redukcji ulegają organella cytoplazmatyczne oraz aparat endocytarny. Nabłonek jest niższy, rąbek szczoteczkowy ulega skróceniu, a na niektórych komórkach zanika całkowicie [51]. Szlak informacyjny estrogen/ER α jest zatem niezbędny do utrzymania fizjologicznej funkcji przewodników odprowadzających.

Badania z lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku wskazują, że estrogeny włączone są nie tylko w rozwój najądrza królika [108] i szczura [31], ale także w regulację syntezy niektórych białek przez komórki nabłonka najądrza niedojrzałych i dojrzałych płciowo królików [107, 108]. Produkt sekrecyjny komórek nabłonkowych najądrza dostarcza niezbędnego środowiska dla dojrzewających plemników. Pośród wielu białek, taką rolę pełni cystatyna 12 (Cst12), której ekspresja u myszy regulowana jest przez estrogeny [73]. Ekspresja cystatyny 12 jest ograniczona do komórek nabłonka proksymalnej części głowy najądrza, gdzie jest syntetyzowana i uwalniana do światła tego odcinka przewodu, a następnie absorbowana przez plemniki i lokalizowana w kropli cytoplazmatycznej. Sugeruje się ważną rolę cystatyny w dojrzewaniu i ochronie plemników, a także i/lub zapłodnieniu komórki jajowej przez plemnik [73].

Chociaż ekspresja genów w najądrzu kontrolowana jest głównie przez T i DHT, to jednak badania ostatnich lat wskazują, że wiele genów pozostaje pod kontrolą estradiolu. Pośród 11 059 genów, których ekspresja została zahamowana po orchidektomii, 13 genów podlegało ekspresji po zastosowaniu estradiolu [92].

W komórkach nabłonkowych najądrza produkowane są, oprócz steroidów, również neurohormony. Z wykorzystaniem immunohistochemii w komórkach nabłonkowych najądrza ludzkiego i zwierząt wykazano oksytocynę (OT) oraz neurofizynę I [5, 36, 45, 57], a także receptory dla OT (OTR). Analiza *Northern* i *Western blot* wykazała jednoznacznie, że ekspresja zarówno genu, jak i białka receptora OT regulowana jest przez estradiol [35].

Jak wynika z powyższych danych, estrogeny regulując funkcję nabłonka przewodników odprowadzających i właściwego przewodu najądrza, oddziałują na procesy związane z dojrzewaniem plemników, obejmujące nabywanie przez nie zdolności do ruchu, kompetencji do zapłodnienia komórki jajowej i przeprowadzania reakcji akrosomowej. Obecność aktywnej aromatazy oraz obu izoform receptorów estrogenowych w plemnikach wskazywać może na oddziaływanie autokrynne estrogenów

na dojrzałe gamety męskie. Różnice w stężeniu transkryptu i białka aromatazy w plemnikach wykazujących ruch i pozbawionych ruchu mogłyby być markerem ruchliwości plemników ludzkich [70]. Już we wcześniejszych badaniach wskazywano, że estradiol wzmacnia ruch plemników, metabolizm tlenowy oraz zdolność penetracji oocytu [55]. W badaniach *in vitro* wykazano, że estradiol w wyższych stężeniach hamuje indukowaną progesteronem reakcją akrosomową [111]. Stąd też, estrogeny produkowane przez najądrze oraz same plemniki mogłyby zabezpieczać gamety męskie przed przedwczesną reakcją akrosomową, zanim osiągną komórkę jajową.

PODSUMOWANIE

Biologiczny efekt wywierany w męskim układzie płciowym przez estrogeny oceniany był przez długi czas jako nieznaczny i dotyczył głównie sekrecji gonadotropin. Jednak, w świetle doniesień o szerokiej dystrybucji obu izoform receptorów estrogenowych oraz występowaniu aktywnej aromatazy cytochromu P450 w komórkach somatycznych i germinalnych gonady i dróg wyprowadzających nasienie, fizjologiczna rola estrogenów w procesach przebiegających na terenie gonady i podczas dojrzewania plemników w najądrzu, jest bardziej złożona niż wcześniej przypuszczano. Stąd, zachowanie równowagi hormonalnej androgeny/estrogeny, nie tylko na terenie gonady, wydaje się mieć szczególne znaczenie.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AKINGBEMI BT, GE R, ROSENFELD CS, NEWTON LG, HARDY DO, CATTERALL JF, LUBAHN DB, KORACH KS, HARDY MP. Estrogen receptor-alpha gene deficiency enhances androgen biosynthesis in the mouse Leydig cell. *Endocrinology* 2003; **144**: 84–93.
- [2] AKINGBEMI BT. Estrogen regulation of testicular function. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; **27**: 3–51.
- [3] AQUILA S, SISI D, GENTILE M, MIDDEA E, CATALANO S, CARPINO A, RAGO V, ANDÓ 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**: 1443–1451.
- [4] AQUILA S, SISI D, GENTILE M, MIDDEA E, CATALANO S, SCILIANO, ANDÓ S. Human ejaculated spermatozoa contain active P450 aromatase. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 3385–3390.
- [5] ASSINDER SJ, CAREY M, PARKINSON T, NICHOLSON HD. Oxytocin and vasopressin expression in the ovine testis and epididymis: changes with the onset of spermatogenesis. *Biol Reprod* 2000; **63**: 448–456.
- [6] ATANASSOVA N, MCKINNELL C, TURNER KJ, WALKER M, FISHER JS, MORLEY M, MILLAR MR, GROOME NP, SHARPE RM. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 2000; **141**: 3898–3907.
- [7] AT-TARAS EE, BERGER T, MCCARTHY MJ, CONLEY AJ, NITTA-ODA BJ, ROSER JF. Reducing estrogen synthesis in developing boars increases testis size and total sperm production. *J Androl* 2006; **27**: 552–559.
- [8] BAINES H, NWAGWU MO, HASTIE GR, WILES RA, MAYHEW TM, EBLING FJ. Effects of estradiol and FSH on maturation of the testis in the hypogonadal (hpg) mouse. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; **29**: 4.
- [9] BERENSZTEIN EB, BAQUEDANO MS, GONZALES CR, SARACO NI, RODRIGUEZ J, PONZIO R, RIVAROLA MA, BELGOROSKY A. Expression of aromatase, estrogen receptor α and β , androgen receptor, and cytochrome P-450scc in the human early prepubertal testis. *Pediatr Res* 2006; **60**: 740–744.

- [10] BILIŃSKA B, KOTULA-BALAK M, GANCARCZYK M, SADOWSKA J, TABAROWSKI Z, WOJTUSIAK A. Androgen aromatization in cryptorchid mouse testes. *Acta Histochem* 2003; **105**: 57–65
- [11] BILIŃSKA B, SCHMALTZ-FRĄCZEK B, KOTULA-BALAK M, CARREAU S. Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogen in the bank vole testis visualized by means of immunohistochemistry. *Mol Cell Endocrinol* 2001; **178**: 189–198.
- [12] BILIŃSKA B, SCHMALTZ-FRĄCZEK B, SADOWSKA J, CARREAU S. Immunolocalization of cytochrome P450 aromatase and estrogen receptors α and β in bank vole testicular cells. *Acta Histochem* 2000; **102**: 167–181.
- [13] BOUKARI K, CIAMPI ML, GUIOCHON-MANTEL A, YOUNG J, LOMBES M, MEDURI G. Human fetal testis: source of estrogen and target of estrogen action. *Hum Reprod* 2007; **22**: 1885–1892.
- [14] BOURGUIBA S, LAMBARD S, CARREAU S. Steroids control the aromatase gene expression in purified germ cells from the adult male rat. *J Mol Endocrinol* 2003; **31**: 83–94.
- [15] BROWN DV, AMANN RP. Inhibition of testosterone metabolism in cultures rat epididymal principal cells by dihydrotestosterone and progesterone. *Biol Reprod* 1984; **30**: 67–73.
- [16] CARPINO A, ROMEO F, RAGO V. Aromatase immunolocalization in human ductuli efferentes and proximal ductus epididymis. *J Anat* 2004; **204**: 217–220.
- [17] CARPINO A, PEZZI V, RAGO V, BILINSKA B, ANDÓ S. Immunolocalization of cytochrome P450 aromatase in rat testis during postnatal development. *Tissue Cell* 2001; **33**: 349–353.
- [18] CARREAU S, BILINSKA B, LEVALLET J. Male germ cells. A new source of estrogens in the mammalian testis. *Ann Endocrinol (Paris)* 1998; **59**: 79–92.
- [19] CARREAU S, BOURGUIBA S, LAMBARD S, SILANDRE D, DELALANDE C. The promoter(s) of the aromatase gene in male testicular cells. *Reprod Biol* 2004; **4**: 23–34.
- [20] CARREAU S, BOURGUIBA S, LAMBARD S, GALERAUD-DENIS I, GENISSEL C, BILIŃSKA B, BENAHMED M, LEVALLET J. Aromatase expression in male germ cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; **79**: 203–208.
- [21] CARREAU S, BOURGUIBA S, LAMBARD S, GALERAUD-DENIS I, GENISSEL C, LEVALLET J. Reproductive system: aromatase and estrogens. *Mol Cell Endocrinol* 2002; **193**: 137–143.
- [22] CARREAU S, GENISSEL C, BILIŃSKA B, LEVALLET J. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of male. *Int J Androl* 1999; **22**: 211–223.
- [23] CARREAU S, LAMBARD S, DELALANDE C, DENIS-GALERAUD I, BILINSKA B, BOURGUIBA S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; **1**: 35.
- [24] CARREAU S, SILANDRE D, BOIS C, BOURAIMA H, GALERAUD-DENIS I, DELALANDE C. Estrogens: a new player in spermatogenesis. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; **45** Suppl. 1: 5–10.
- [25] CARREAU S, SILANDRE D, BOURGUIBA S, HAMDEN K, SAID L, LAMBARD S, GALERAUD-DENIS I, DELALANDE C. Estrogens and male reproduction: a new concept. *Braz J Med Biol Res* 2007; **40**: 761–768.
- [26] CARREAU S, ISABELLE GD. Transcripts of aromatase and estrogen receptors and significance of other RNAs in human spermatozoa. *Arch Androl* 2007; **53**: 249–255.
- [27] CARREAU S, LEVALLET J. Cytochrome P450 aromatase in male germ cells. *Folia Histochem Cytobiol* 1997; **35**: 195–202.
- [28] CARREAU S. Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. *Mol Cell Endocrinol* 2001; **178**: 65–72.
- [29] CONLEY A, HINSHELWOOD M. Mammalian aromatases. *Reproduction* 2001; **121**: 685–695.
- [30] DE RONDE, POLS HA, VAN LEEUWEN JP, DE JONG FH. The importance of oestrogens in males. *Clin Endocrinol* 2003; **58**: 529–542.
- [31] DHAR JD, MISHRA R, SETTY BS. Estrogen, androgen and antiestrogen responses in the accessory organs of male rats during different phases of life. *Endocr Res* 1998; **24**: 159–169.
- [32] DUNKEL L, HIRVONEN V, ERKKILÄ K. Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis. *Cell Death Differ* 1997; **4**: 171–179.
- [33] DUPONT S, KRUST A, GANSMULLER A, DIERICH A, CHAMBON P, MARK M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 2000; **127**: 4277–4291.
- [34] EBLING FJP, BROOKS AN, CRONIN AS, FORD H, KERR JB. Estrogenic induction of spermatogenesis in the hypogonadal mouse. *Endocrinology* 2000; **141**: 2861–2869.
- [35] FILIPPI S, LUCONI M, GRANCHI S, VIGNOZZI L, BETTUZI S, TOZZI P, LEDDA F, FORTI G, MAGGI M. Estrogens, but not androgens, regulate expression and functional activity of oxytocin receptor in rabbit epididymis. *Endocrinology* 2002; **143**: 4271–4280.

- [36] FILIPPI S, MORELLI A, VIGNOZZI L, VANNELLI GB, MARINI M, FERRUZZI P, MANCINA R, CRESCIOLI C, MONDAINI N, FORTI G, LEDDA F, MAGGI M. Oxytocin mediates the estrogen-dependent contractile activity of endothelin-1 in human and rabbit epididymis. *Endocrinology* 2005; **146**: 3506–3517.
- [37] FISHER JS, TURNER KJ, FRASER HM, SAUNDERS PTK, BROWN D, SHARPE RM. Immunoeexpression of aquaporin-1 in the efferent ducts of the rat and marmoset monkey during development, its modulation by estrogens, and its possible role in fluid resorption. *Endocrinology* 1998; **139**: 3935–3945.
- [38] FRĄCZEK B, KOTULA-BALAK M, WOJTUSIAK A, PERŚCINIŃSKA A, BILIŃSKA B. Cytochrome P450 aromatase in the testis of immature and mature pigs. *Reprod Biol* 2001; **1**: 51–59.
- [39] GANCARCZYK M, KUKLIŃSKA M, SADOWSKA J, STRZEŻEK J, BILIŃSKA B. Aromatization and antioxidant capacity in the testis of seasonally breeding bank voles: Effects of LH, PRL and IGF-1. *Theriogenology* 2006; **65**: 1376–1391.
- [40] GANCARCZYK M, PAZIEWSKA-HEJMEJ A, CARREAU S, TABAROWSKI Z, BILIŃSKA B. Dose- and photoperiod-dependent effect of 17 β -estradiol or ICI 182,780 administration on testicular structure, acceleration of spermatogenesis, and aromatase immunoeexpression in immature bank voles. *Acta Histochem* 2004; **106**: 296–278.
- [41] GENNARI L, NUTI R, BILEZIKIAN JP. Aromatase activity and bone homeostasis in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 5898–5907.
- [42] GOOREN LJ, TOORIANS AW. Significance of oestrogens in male (patho)physiology. *Ann Endocrinol* 2003; **64**: 126–135.
- [43] GUNASEGARAM R, CHEW PC, LOGANATHA, PEH KL, RATNAM SS. A delta 4-3-keto pathway for testosterone synthesis in the human spermatozoa. *Arch Androl* 1998; **40**: 49–57.
- [44] HAEUSSLER S, WAGNER A, WELTER H, CLAUS R. Changes of testicular aromatase expression during fetal development in male pigs (*Sus scrofa*). *Reproduction* 2007; **133**: 323–330.
- [45] HARRIS GC, FRAYNE J, NICHOLSON HD. Epididymal oxytocin in the rat: its origin and regulation. *Int J Androl* 1996; **19**: 278–286.
- [46] HEJMEJ A, GORAZD M, KOSINIAK-KAMYSZ K, WISZNIEWSKA B, SADOWSKA J, BILIŃSKA B. Expression of aromatase and oestrogen receptors in reproductive tissues of the stallion and a single cryptorchid visualised by means of immunohistochemistry. *Domest Anim Endocrinol* 2005; **29**(3): 534–547.
- [47] HESS RA, BUNICK D, BAHR J. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract – a review. *Mol Cell Endocrinol* 2001; **178**: 29–38.
- [48] HESS RA, BUNICK D, BAHR JM. Sperm, a source of estrogen. *Environ Health Perspect* 1995; **103** (Suppl. 7): 59–62.
- [49] HESS RA, BUNICK D, LEE KH, BAHR J, TAYLOR JA, KORACH KS, LUBAHN DB. A role for oestrogens in the male reproductive tract. *Nature* 1997; **390**: 509–512.
- [50] HESS RA, CARNES K. The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Anim Reprod* 2004; **1**: 5–30.
- [51] HESS RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; **1**: 52.
- [52] HESS RA. Estrogen in the adult male: from a curiosity to absolute necessity. *Ann Rev Biomed Sci* 2004; **6**: 1–12.
- [53] HESS RA. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Rev Reprod* 2000; **5**(2): 84–92.
- [54] HUHTANIEMI I, BARTKE A. Perspective: male reproduction. *Endocrinology* 2001; **142**: 2178–2183.
- [55] IDAOMAR M, GUERIN JF, LORNAGE J, CZYBA J C. Stimulation of motility and energy metabolism of spermatozoa from asthenozoospermic patients by 17 beta-estradiol. *Arch Androl* 1989; **22**: 197–202.
- [56] ILIO KY, HESS RA. Structure and function of the ductuli efferentes: a review. *Microsc Res Tech* 1994; **29**: 432–467.
- [57] IVELL R, ADASHI EY, HSUEH AJ. Oxytocin and male reproductive function. *Adv Exp Med Biol* 1997; **424**: 253–264.
- [58] JANULIS L, BAHR JM, HESS RA, JANSSEN S, OSAWA Y, BUNICK D. Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. *J Androl* 1998; **19**: 65–71.
- [59] JANULIS L, HESS RA, BUNICK D, NITTA H, JANSSEN S, ASAWA Y, BAHR JM. Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase which decreases as sperm traverse the epididymis. *J Androl* 1996; **17**: 111–116.
- [60] KAO YC, KORZEKWA KR, LAUGHTON CA, CHEN S. Evaluation of the mechanism of aromatase cytochrome P450. A site-directed mutagenesis study. *Eur J Biochem* 2001; **268**: 243–251.

- [61] KOLASAA, WISZNIEWSKA B, MARCHLEWICZ M, WENDA-RÓŻEWICKA L. Localisation of estrogen receptors (ER α i ER β) in the human and rat epididymides. *Folia Morphol* 2003; **62**: 467–469.
- [62] KOTULA-BALAK M, BABLOK L, FRĄCKI S, JANKOWSKA A, BILIŃSKA B. Immunoexpression of androgen receptors and aromatase in testes of patient with Klinefelter's syndrome. *Folia Histochem Cytobiol* 2004; **42**: 215–220.
- [63] KOTULA-BALAK M, GRZMIL P, STYRNA J, BILIŃSKA B. Immunodetection of aromatase in mice with a partial deletion in the long arm of the Y chromosome. *Acta Histochem* 2004; **106**: 55–64.
- [64] KOTULA-BALAK M, LENARTOWICZ M, KOWAL M, STYRNA J, BILIŃSKA B. Testicular morphology and expression of aromatase in testes of mice with the mosaic mutation (*Atp 7 α mo-ms*). *Theriogenology* 2007; **67**: 423–434.
- [65] KOTULA-BALAK M, ZIELIŃSKA R, GŁOGOWSKI J, KOWALSKI RK, SAROSIEK B, BILIŃSKA B. Aromatase expression in testes of XY, YY, and XX rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Comp Biochem Physiol Part A* 2008; **149**: 188–196.
- [66] KUIPER GGJM, ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, NILSSON S, GUSTAFFSON JA. Cloning a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 5925–5930.
- [67] KULA K. Induction of precocious maturation of spermatogenesis in infant rats by human menopausal gonadotropin and inhibition by simultaneous administration of gonadotropins and testosterone. *Endocrinology* 1988; **122**: 34–39.
- [68] KWON S, HESS RA, BUNICK D, NITTA H, JANULIS L, OSAWA Y, BAHR JM. Rooster testicular germ cells and epididymal sperm contain P450 aromatase. *Biol Reprod* 1995; **53**: 1259–1264.
- [69] LAMBRAD S, CARREAU S. Aromatase and oestrogens in human male germ cells. *Int J Androl* 2005; **28**: 254–259.
- [70] LAMBARD S, GALERAUD-DENIS I, BOURAIMA H, BOURGUIBA S, CHOCAT A, CARREAU S. Expression of aromatase in human ejaculated spermatozoa: a putative marker of motility. *Mol Hum Reprod* 2003; **9**: 117–124.
- [71] LEVALLET J, BILIŃSKA B, MITTRE H, GENISSEL C, FRESNEL J, CARREAU S. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol Reprod* 1998; **58**: 919–926.
- [72] LEVALLET J, CARREAU S. Aromatase gene expression in rat testicular cells *in vitro*. *CR Acad Sci Paris* 1997; **320**: 123–129.
- [73] LI Y, PUTNAM-LAWSON CA, KNAPP-HOCH H, FRIEL PJ, MITCHELL D, HIVELEY R, GRISWOLD MD. Immunolocalization and regulation of cystatin 12 in mouse testis and epididymis. *Biol Reprod* 2005; **73**: 872–880.
- [74] MACCALMAN CD, GETSIOS S, FAROOKHIR, BLASCHUK OW. Estrogens potentiate the stimulatory effects of follicle-stimulating hormone on N-cadherin messenger ribonucleic acid levels in cultured mouse Sertoli cells. *Endocrine* 1997; **138**: 41–48.
- [75] MAKINEN S, MAKELA S, WEIHUA Z, WARNER M, ROSENLUND B, SALMI S, HOVATTA O, GUSTAFSSON JA. Localization of oestrogen receptors alpha and beta in human testis. *Mol Hum Reprod* 2001; **7**: 497–503.
- [76] MICHAEL H, HÄRKÖNEN PL, VÄÄNÄNEN HK, HENTUNEN TA. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *J Bone Miner Res* 2005; **20**: 2224–2232.
- [77] MIURA T, MIURA C, OHTA T, NADER MR, TODO T, YAMAUCHI K. Estradiol-17beta stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **264**: 230–234.
- [78] NITTA H, BUNICK D, HESS RA, JANULIS L, NEWTON SC, MILLETTE CF, OSAWA Y, SHIZUTA Y, TODA K, BAHR JM. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology* 1993; **132**: 1396–1401.
- [79] O'DONNELL L, ROBERTSON KM, JONES ME, SIMPSON ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001; **22**: 289–318.
- [80] OLIVEIRA CA, CAARNES K, FRANCALR, HERMOL, HESS RA. Aquaporin-1 and -9 are differentially regulated by oestrogen in the efferent ductile epithelium and initial segment of the epididymis. *Biol Cell* 2005; **97**: 385–395.
- [81] PARLEVLIET JM, PEARL CA, HESS MF, FAMULA TR, ROSER JF. Immunolocalization of estrogen and androgen receptors and steroid concentrations in the stallion epididymis. *Theriogenology* 2006; **66**: 755–765.
- [82] PAZIEWSKA A, BILIŃSKA B. Estrogeny i ich rola w regulacji spermatogenezy. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 461–481.

- [83] PEARL CA, BERGER T, ROSER JT. Estrogen and androgen receptor expression in relation to steroid concentrations in the adult boar epididymis. *Domest Anim Endocrinol* 2007; **33**: 451–459.
- [84] PELLETIER G, EL-ALFY M: Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 4835–4840.
- [85] PELLETIER G, LABRIE C, LABIE F. Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptor in the rat reproductive organs. *J Endocrinol* 2000; **165**: 359–370.
- [86] PENTIKÄINEN V, ERKKILÄ K, SUOMALAINEN L, PARVINEN M, DUNKEL L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 2057–2067.
- [87] PEREIRA-MARTINEZ AC, ROSELLI CE, STADELMAN HL, RESKO JA. Cytochrome P450 aromatase in testis and epididymis of male *Rhesus* monkeys. *Endocrine* 2001; **16**: 15–19.
- [88] PICCIARELLI-LIMAP, OLIVEIRAAG, REIS AM, KALAPOTHAKIS E, MAHECHA GAB, HESS RA, OLIVEIRA CA. Effects of 3-beta-diol, an androgen metabolite with intrinsic estrogen-like effects, in modulating the quaporin-9 expression in the rat efferent ductules. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; **4**:51.
- [89] RAGO V, AQUILA S, PANZA R, CARPINO A. Cytochrome P450arom, androgen and estrogen receptors in pig sperm. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; **5**: 23.
- [90] RAGO V, BILIŃSKA B, PALMAA, ANDO S, CARPINO A. Evidence of aromatase localization in cytoplasmic droplet of human immature ejaculated spermatozoa. *Folia Histochem Cytobiol* 2003; **41**: 23–29.
- [91] 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.
- [92] ROBAIRE B, SEENUNDUN S, HAMZEH M, LAAMOUR SA. Androgenic regulation of novel genes in the epididymis. *Asian J Androl* 2007; **9**: 545–553.
- [93] ROBERTSON KM, O'DONNELL L, JONES ME, MEACHEM SJ, BOON WC, FISHER CR, GRAVES KH, MCLACHLAN RI, SIMPSON ER. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (*cyp 19*) gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7986–7991.
- [94] ROBERTSON KM, O'DONNELL L, SIMPSON ER, JONES ME. The phenotype of the aromatase knockout mouse reveals dietary phytoestrogens impact significantly on testis function. *Endocrinology* 2002; **143**: 2913–2921.
- [95] ROCHIRA V, GRANATA ARM, MADEO B, ZIRILLI L, ROSSI G, CARANI C. Estrogens in males: what have we learned in the last 10 years? *Asian J Androl* 2005; **7**: 3–20.
- [96] ROCHIRA V, MADEO B, FABBI M, VALASSI E, CARANI C. Estrogens and male reproduction. *Endo-text.com* 2005; Chapter 17.
- [97] RUZ R, GREGORY M, SMITH CE, CYR DG, LUBAHN DB, HESS RA, HERMO L. Expression of aquaporins in the efferent ductules, sperm counts, and sperm motility in estrogen receptor- α deficient mice fed lab chow versus casein. *Mol Reprod Dev* 2006; **73**: 226–237.
- [98] SHARPE RM. The roles of oestrogen in the male. *Trends Endocrinol Metab* 1998; **9**: 371–377.
- [99] SHETTY G, KRISHNAMURTHY H, KRISHNAMURTHY HN, BHATNAGAR S, MOUDGAL RN. Effect of estrogen deprivation on the reproductive physiology of male and female primates. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; **61**: 157–166.
- [100] SIMPSON ER, MAHENDROO MS, MEANS GD, KILGORE MW, HINSHELWOOD MM, GRAHAM-LORENCE A, AMERNEH B, IT Y, FISHER CR, DODSON MM, MENDELSON CR, BULUN SE. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 1994; **15**: 342–355.
- [101] SIMPSON ER, DAVIS SR. Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis – some new perspectives. *Endocrinology* 2001; **142**: 4589–4591.
- [102] SIMPSON ER, MICHAEL MD, AGARWAL VR, HINSHELWOOD MM, BULUN SE, ZHAO Y. Cytochromes P450 11. Expression of the CYP 19 (aromatase) gene: an usual case of alternative promoter usage. *FASEB J* 1997; **11**: 29–36.
- [103] SIMPSON ER, MISSO M, HEWITT KN, HILL RA, BONN WC, JONES ME, KOVACIC A, ZHOU J, CLYNE CD. Estrogen – the good, the bad, and the unexpected. *Endocr Rev* 2005; **26**: 322–330.
- [104] SOLAKIDI S, PSARRAAMG, NIKOPAROPOULOS S, SEKERIS CE. Estrogen receptors α and β (ER α and ER β) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ER β and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum Reprod* 2005; **20**: 3481–3487.
- [105] SOPAHUTAR H, SOURDAINEP, MOSLEMI S, PLAINFOSSE B, SERALINI GE. Immunolocalization of aromatase in stallion Leydig cells and seminiferous tubules. *J Histochem Cytochem* 2003; **51**: 311–318.

- [106] TODA K, OKADA T, TAKEDA K, AKIRA S, SAIBARA T, SHIRAISHI M, ONISHI S, SHIZUTA Y. Oestrogen at the neonatal stage is critical for the reproductive ability of male mice as revealed by supplementation with 17beta-oestradiol to aromatase gene (Cyp19) knockout mice. *J Endocrinol* 2001; **168**: 455–463.
- [107] TONEY TW, DANZO BJ. Androgen and estrogen effects on protein synthesis by the adult rabbit epididymis. *Endocrinology* 1989; **125**: 243–249.
- [108] TONEY TW, DANZO BJ. Estrogen and androgen regulation of protein synthesis by the immature rabbit epididymis. *Endocrinology* 1989; **125**: 231–242.
- [109] TSUBOTA T, NITTA H, OGAWA Y, MASON I, KITA I, TIBA T, BAHR J. Immunolocalization of steroidogenic enzymes, P450scc, 3β-HSD, P450c17, and P450arom in the Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*) testis. *Gen Comp Endocrinol* 1993; **92**: 439–444.
- [110] TURNER KJ, MORLEY M, ATANASSOVA N, SWANSTON ID, SHARPE RM. Effect of chronic administration of an aromatase inhibitor to adult male rats on pituitary and testicular function and fertility. *J Endocrinol* 2000; **164**: 225–238.
- [111] VIGIL P, TORO A, GODOY A. Physiological action of oestradiol on the acrosome reaction in human spermatozoa. *Andrologia* 2007; **40**: 146–151.
- [112] WISZNIEWSKA B. Steroidogenic characteristics of *in vitro* cultured epididymal epithelial cells of the rat. *Reprod Biol* 2001; **1**: 60–66.
- [113] WISZNIEWSKA B. Primary culture of the rat epididymal epithelial cells as a source of oestrogen. *Andrologia* 2002; **34**: 180–187.
- [114] WISZNIEWSKA B, MARCHLEWICZ M, KOLASA A. Zaburzenia rozwojowe i dysfunkcja gonad spowodowana nieprawidłowym działaniem hormonów warunkujących rozwój męskiego układu płciowego. *Post Biol Kom* 2004; **31**: 127–141.
- [115] ZOUBOULIS CC, CHEN W-C, THORNTON MJ, QIN K, ROSENFELD R. Sexual hormones in human skin. *Horm Metab Res* 2007; **39**: 85–95.

Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz

Otrzymano: 15.07 2008 r.

Przyjęto: 18.11. 2008 r.

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii PAM

Al. Powstańców Wlkp. 72 , 70-111 Szczecin

e-mail: anna_kondarewicz@poczta.onet.eu