

Received: 2016.02.18  
Accepted: 2017.02.20  
Published: 2017.08.09

## Rola miedzi w procesie spermatogenezy\*

### Role of copper in the process of spermatogenesis

Mateusz Ogórek, Łukasz Gąsior, Olga Pierzchała, Regina Daszkiewicz, Małgorzata Lenartowicz

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Instytut Zoologii, Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu

#### Streszczenie

Miedź (Cu) jest niezbędnym mikroelementem potrzebnym do prawidłowego rozwoju organizmów żywych. Dzięki właściwościom oksydoredukcyjnym miedź jest kofaktorem wielu reakcji enzymatycznych. Pierwiastek ten znajduje się w centrach aktywnych enzymów biorących udział w podstawowych procesach metabolicznych w komórce. Niedobór miedzi powoduje znaczne ograniczenie lub brak aktywności enzymów miedziozależnych w organizmie, a to powoduje zahamowanie procesów życiowych komórek. Jednak miedź jest też bardzo reaktywnym pierwiastkiem i w wolnym stanie bardzo szybko doprowadza do wytwarzania dużej ilości wolnych rodników, a następnie do uszkodzeń białek i DNA. Dlatego też organizmy żywe wykształciły bardzo precyzyjnie działające mechanizmy regulacji stężenia tego pierwiastka w komórkach. Miedź odgrywa także bardzo ważną rolę w procesach podziałowych komórek – mitotycznych i mejotycznych. Jak wykazały wyniki badań, jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego procesu spermatogenezy. Białka miedziozależne, takie jak ceruloplazmina, dysmutaza ponadtlenkowa pierwsza i trzecia, grupa metalotionein oraz oksydaza cytochromu c, są obecne na wszystkich etapach gametogenezy, a także w komórkach somatycznych jądra i najądrza. Duże ilości miedzi znajdują się także we fluidach towarzyszących plemnikom w najądrzu oraz w płynach stercza. Miedź wpływa także na ważną w płodności gospodarkę androgenną na linii podwzgórze-przysadka-jądra. Nadmiar, jak i niedobór miedzi w organizmie zaburza procesy wytwarzania gamet i obniża płodność. Zmiany dotyczą zaburzeń na poziomie plemnika, gonady męskiej, wytwarzania męskich hormonów płciowych oraz gospodarki innych mikroelementów, takich jak cynk czy żelazo. Problem wpływu miedzi na procesy związane z wytwarzaniem gamet staje się coraz ważniejszy przez związek ze wzrastającym zanieczyszczeniem środowiska życia człowieka metalami ciężkimi.

#### Słowa kluczowe:

metabolizm miedzi • plemnik • spermatogeneza • jądro

#### Summary

Copper (Cu) is an essential trace element required for the normal development of living organisms. Due to its redox potential, copper is a cofactor in many enzymes responsible for important processes in cells. Copper deficiency has a significant influence on the reduction or the total eradication of copper-dependent enzymes in the body, thereby inhibiting cell life processes. On the other hand, copper is a very reactive element and in its free state, it can trigger the production of large amounts of free radicals, which will consequently lead to the damage of proteins and DNA. Because of those reasons, living organisms have developed precise mechanisms regulating the concentration of copper in cells. Copper also plays a very important role in male fertility. It is an essential element for the production of male gametes.

\*Praca finansowana z grantu NCN nr 2012/05/B/NZ4/02423 oraz z grantu DS/MND/WBiNoZ/IZ/25/2015.

The significant role of copper is also described in the processes of cell division – mitotic and meiotic. Copper-dependent enzymes such as ceruloplasmin, superoxide dismutase SOD1 and SOD3, group of metallothionein and cytochrome c oxidase are present at all stages of gametogenesis as well as in the somatic cells of the testis and in the somatic cells of epididymis. Substantial amounts of copper can also be found in liquids associated with sperm in the epididymis and prostate. Copper also affects the integral androgen distribution in terms of fertility on the line hypothalamic-pituitary-testis. Both copper increase and deficiency leads to a significant reduction in male fertility, which spans the entire spectrum of abnormalities at the sperm level, male gonad, production of hormones and distribution of micronutrients such as zinc and iron. Nowadays, the effects of copper on gametes production have become more important and are connected with the increasing levels of pollution with heavy metals in environment.

**Keywords:** Copper metabolism • sperm • spermatogenesis • testis

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1244814>

**DOI:** ???

**Word count:** 7404

**Tables:** 1

**Figures:** 4

**References:** 129

**Adres autorki:** dr hab. Małgorzata Lenartowicz, Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii UJ, ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków, e-mail: malgorzata.lenartowicz@gmail.com

**Wykaz skrótów:** **ATOX1** – białko chaperonowe wiążące jony miedzi (antioxidant 1 copper chaperone); **ATP7A** – ATPaza transportująca kationy miedziowe (ATPase copper transporting alpha protein); **ATP7B** – ATPaza transportująca kationy miedziowe (ATPase copper transporting beta protein); **CCO** – oksydaza cytochromu c (cytochrome c oxidase); **CCS** – białko chaperonowe wiążące jony miedzi (copper chaperone for superoxide dismutase); **COX II** – druga podjednostka kompleksu oksydazy cytochromu c; **COX17** – białko chaperonowe wiążące jony miedzi (cytochrome c oxidase copper chaperone); **CTR1** – błonowy transporter jonów miedzi 1 (copper transporter 1); **CTR2** – błonowy transporter jonów miedzi 2 (copper transporter 2); **CuA** – centrum miedziowe A oksydazy cytochromu c; **CuB** – centrum miedziowe B oksydazy cytochromu c; **Cyt cS** – wersja cytochromu c charakterystyczna dla komórek somatycznych; **Cyt cT** – gonadalna forma cytochromu c; **EC-SOD3/CuZn SOD3** – dysmutaza ponadtlenkowa zewnątrzkomórkowa (extracellular superoxide dismutase); **FSH** – hormon folikulotropowy (follicle-stimulating hormone); **GPI Cp** – forma błonowa ceruloplazminy; **HO-1** – oksigenaza hemowa pierwsza; **MT** – metalothioneina; **OS** – stresoksydacyjny (oxidative stress); **PIXE** – metoda badania pierwiastków śladowych (Particle-Induced X-ray Emission); **ROS** – wolne rodniki (reactive oxygen species); **sCp** – forma sekrecyjna ceruloplazminy; **SOD1** – dysmutaza ponadtlenkowa wewnątrzkomórkowa (superoxide dismutase 1).

## WPROWADZENIE

Miedź (Cu) jest metalem ciężkim, ale jednocześnie mikroelementem niezbędnym do prawidłowego metabolizmu wszystkich organizmów żywych. Ten aktywny metal wykazuje silne właściwości oksydoredukcyjne. W organizmie miedź występuje na dwóch stopniach utlenienia: Cu<sup>+</sup> i Cu<sup>2+</sup>. W stanie wolnym Cu występuje na drugim stopniu utlenienia (Cu<sup>2+</sup>), ponieważ w obecności tlenu bądź innego akceptora elektronów jon Cu<sup>+</sup> jest szybko utleniany do Cu<sup>2+</sup>. Pierwiastek ten dzięki właściwościom do przyjmowania i oddawania elektronów pełni bardzo ważną funkcję, gdyż jest wbudowy-

wany w centrum aktywne enzymów biorących udział w podstawowych reakcjach metabolicznych [114]. Jony miedzi wchodzi w skład około 30 białek enzymatycznych i nieenzymatycznych, wśród których znajdują się tak ważne proteiny jak: oksydaza cytochromu c (jedno z głównych białek oddychania komórkowego), ceruloplazmina, hefajstyna (oksydaza żelazowa), hydroksylaza β-dopaminy (wytwarzanie neuroprzekaźników), dysmutaza ponadtlenkowa (silny antyoksydant), tyrozylnaza (melaninogeneza), czy oksydaza lizylowa (wytwarzanie kolagenu i elastyny) [66,115]. Poza tym, miedź odgrywa ważną rolę w metabolizmie tłuszczu i węglowodanów [35]. Niedobór miedzi obniża poziom enzymów miedzi-

zależnych, ma to konsekwencje w postaci depigmentacji skóry, anemii, różnych zaburzeń neurologicznych, ataksji, osłabienia mięśni oraz zaburzeń ciśnienia krwi. Niski poziom miedzi jest cechą charakterystyczną dla chorób prionowych i choroby Parkinsona [110,113,116]. Nadmiar miedzi jest jednak toksyczny dla komórek. Jednym z głównych następstw zaburzeń homeostazy miedzi w organizmie jest powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS; reactive oxygen species). Nadtlenek ( $O_2^{\cdot-}$ ), nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), peroksyd ( $\bullet ROO$ ) i rodnik wodorotlenkowy ( $\bullet HO$ ) to typowe reaktywne formy tlenu wywołujące rozwój stresu oksydacyjnego (OS; oxidative stress) [32]. W obecności anionu nadtlenkowego i innych silnie redukujących czynników wewnątrzkomórkowych, takich jak glutation czy kwas askorbinowy [65], jon  $Cu^{2+}$  jest redukowany do  $Cu^+$ , który katalizuje reakcję tworzenia rodników hydroksylowych w reakcji Habera-Weissa [15]. W komórce proces ten może doprowadzić do uszkodzenia białek i lipidów, a tym samym struktur komórkowych oraz materiału genetycznego. Zaburzenie równowagi między ROS a antyoksydantami uszkadza komórki i wywołuje apoptozę [118]. Podwyższone stężenie miedzi odnotowano u chorych cierpiących na choroby Alzheimer, Huntingtona, w chorobach nowotworowych [20], a także u pacjentów z chorobą Wilsona [35]. Dlatego organizmy żywe wykształciły bardzo precyzyjny molekularny mechanizm regulacji metabolizmu miedzi zarówno na poziomie organizmu jak i pojedynczej komórki.

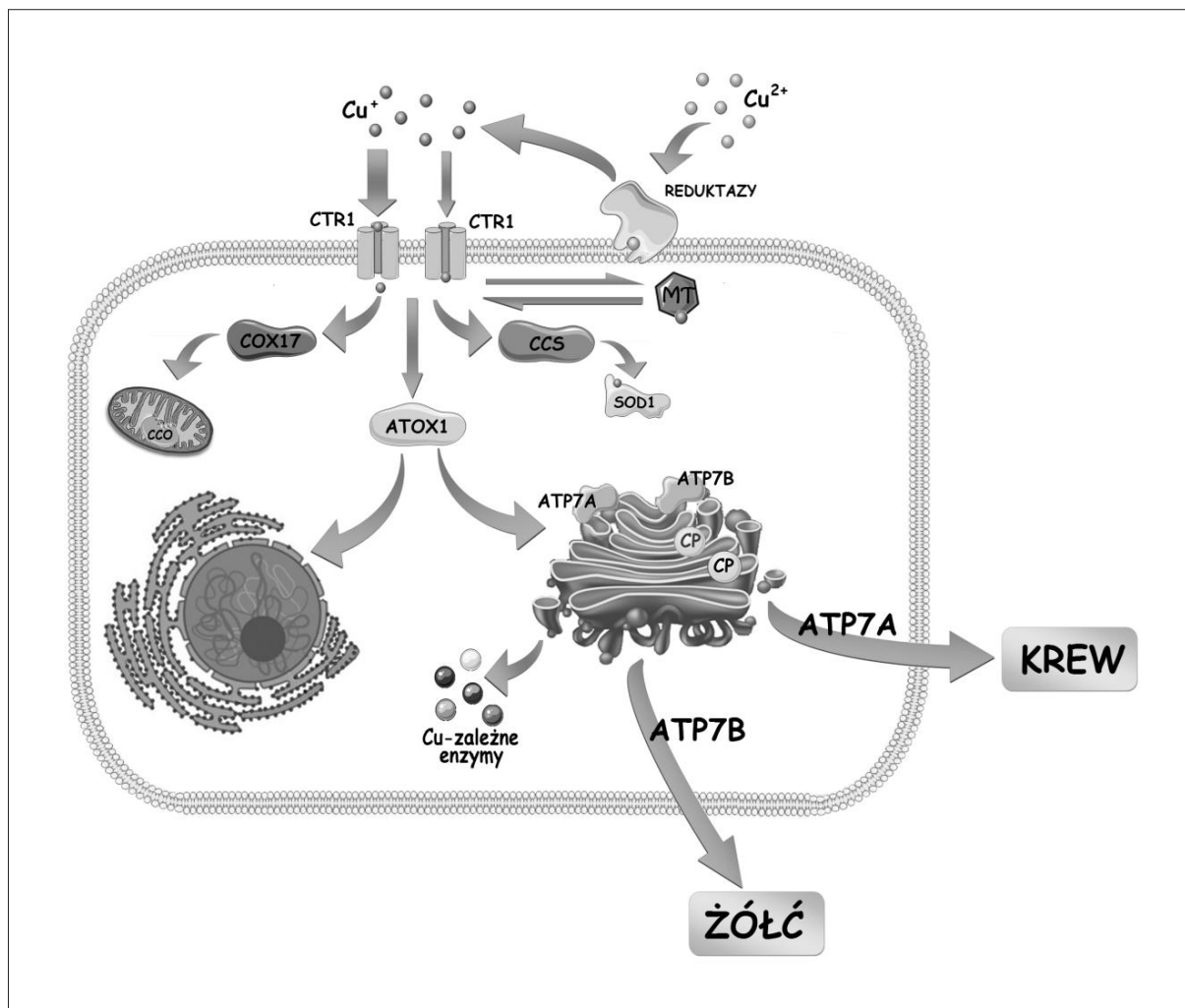
#### HOMEOSTAZA MIEDZI NA POZIOMIE ORGANIZMU I KOMÓRKI

Głównym źródłem miedzi dla dorosłego człowieka jest pokarm, a zapotrzebowanie na ten pierwiastek wynosi około 1-2 mg na dobę. Niewielka ilość miedzi zostaje przyswojona w jelitach (około 15%), reszta jest usuwana z kałem. Miedź absorbowana jest z pokarmu w jelicie cienkim, a zwłaszcza w jego pierwszym odcinku, w dwunastnicy, skąd trafia do krwiobiegu. Przypuszcza się, że proces transportu miedzi do enterocytów odbywa się z udziałem białka Ctr1 (copper transporter 1). Ekspresję tego białka znaleziono w błonie apikalnej komórek jelita [81]. Natomiast transport miedzi z komórek enterocytów do krwiobiegu zachodzi z udziałem białka ATP7A. W osoczu jony miedzi łączą się z białkami, peptydami i aminokwasami, m.in. albuminami, glutationem i histydyną [21,66]. W tej postaci miedź wraz z krwią jest rozprowadzana po całym organizmie. Głównym organem odpowiedzialnym za metabolizm miedzi jest wątroba, która gromadzi najwięcej tego pierwiastka [123]. W wątrobie następuje synteza ceruloplazminy oraz wytwarzanie żółci, w której miedź, oprócz żelaza, jest najliczniej reprezentowanym metalem. Miedź z wątroby wydzielana jest do krwi w kompleksie z ceruloplazminą. Kompleks ten stanowi 65-70% miedzi w osoczu i pełni rolę głównego czynnika utrzymującego homeostazę tego pierwiastka w organizmie. W wątrobie odbywa się również wytwarzanie metalotioneiny, drobnocząsteczkowego, bogatego w cysteinę białka [43] odwracalnie wiążącego miedź, a zwłaszcza jej nadmiar występujący w danej chwili

w organizmie. Do innych narządów miedź jest transportowana z krwią. Najważniejszymi białkami osocza wiążącymi jony miedzi są albuminy, które wiążą 12-18% tego pierwiastka. Pewną rolę odgrywają również inne białka np. transkuperyna, którą zalicza się do makroglobulin [21,64]. Do nerek miedź dociera z krwią, w procesie filtracji kłębuszkowej. Pierwiastek ten trafia do przesączu pierwotnego, jednak ponownie w kanalikach proksymalnych ulega reabsorpcji i trafia do krwiobiegu. Tylko 2% miedzi jest usuwane z moczem [60]. To wątroba bierze udział w usuwaniu nadmiaru jonów miedzi z organizmu. Miedź jest wydzielana do syntetyzowanej w wątrobie żółci i razem z nią do przewodu pokarmowego, w ten sposób usuwane jest 98% tego metalu z organizmu [21,59,123].

Pobieranie i transport miedzi w komórce jest również procesem podlegającym ścisłej kontroli przez odpowiednie geny i białka. Miedź jest pobierana przez komórki tylko w postaci zredukowanej ( $Cu^+$ ), a transport takich kationów zachodzi z udziałem białek z rodziny CTR [66,115]. U człowieka opisano dwa takie białka, wbudowane w błonę komórkową: CTR1, które odpowiada za pompowanie jonów miedzi do wnętrza komórki oraz umiejscowione wewnątrzkomórkowo CTR2 (copper transporter 2), które jest wbudowane w błony lizosomów i endosomów w komórce [31,83]. Miedź po przejściu przez błonę komórkową trafia do cytoplazmy, gdzie nie występuje w postaci wolnych jonów, lecz pierwiastek ten jest natychmiast wychwytywany przez cytoplazmatyczne białka opiekuńcze (metalochaperony). W zależności od białka docelowego, do którego miedź ma być dostarczona, w procesie tym uczestniczą różne przenośniki [66].

Tak połączona z metalochaperonem CCS (copper chaperone for superoxide dismutase) miedź zostaje przeniesiona w region cytoplazmy, gdzie zachodzi synteza monomerów białka SOD1 (superoxide dismutase 1) [78,82]. Inny z metalochaperonów COX17 (cytochrome c oxidase copper chaperone) transportuje miedź do mitochondriom, gdzie następuje jej wbudowanie w białko oksydazę cytochromu c (CCO; cytochrome c oxidase) [31]. Natomiast po związaniu się z białkiem opiekuńczym ATOX1 (antioxidant 1 copper chaperone), miedź wędruje do aparatu Golgiego, gdzie przekazywana jest dwóm ATPazom typu P: ATP7A i ATP7B. Białko ATOX1 pełni również w komórce funkcję silnego przeciwutleniacza, a także bierze udział w regulacji transkrypcji genów [33]. Główną funkcją białka ATP7A jest włączanie miedzi do cząsteczek miedziozależnych enzymów oraz usunięcie jonów miedzi z komórki, gdy ich stężenie przewyższa poziom fizjologiczny [56]. Rola ATP7B polega na wbudowaniu jonów miedzi do apoceruloplazminy oraz w wątrobie na usuwaniu nadmiaru miedzi do żółci [66,123]. Schemat metabolizmu miedzi na poziomie komórki przedstawiono na ryc. 1. Uwarunkowania genetyczne, choroby metaboliczne, a także zanieczyszczenie środowiska, to główne przyczyny prowadzące do zaburzenia homeostazy miedzi w organizmie [61].



**Ryc. 1.** Transport miedzi w obrębie komórki. 1) Zredukowane jony miedzi ( $\text{Cu}^+$ ) są pobierane przez komórkę z udziałem transportera błonowego, białka CTR1. 2) W cytoplazmie jony miedzi są wiązane przez cząsteczki metalotioneiny (MT) lub białka opiekuńcze (COX 17, CCS czy ATOX1) i w połączeniu z nimi transportowane do różnych organelli komórkowych np. mitochondriów czy aparatu Golgiego. 3) W połączeniu z białkiem ATOX1 kationy miedziowe transportowane są do aparatu Golgiego gdzie są przyłączone przez białka ATP7A i ATP7B. Białka ATP7A i ATP7B pośredniczą w przyłączaniu kationów miedziowych do cząsteczek apoenzymów. Nadmiar jonów miedzi jest usuwany z komórki w procesie egzocytozy za pośrednictwem białka ATP7A bądź w komórkach wątroby wydzielane do żółci z udziałem białka ATP7B

Powszechnie znane są plemnikobójcze właściwości miedzi, jak również szerokie ich wykorzystywanie w metodach współczesnej antykoncepcji [9,50,68]. Druć miedziany, dołączony do nieaktywnej wkładki wewnątrzmacicznej, zwiększa jej działania antykoncepcyjne, m.in. przez działanie plemnikobójcze. Jony tego metalu mają właściwości miejscowo drażniące, poza tym gromadzą się w śluzie szyjki macicy i w endometrium. Nagromadzenie miedzi zaburza przemianę glikogenu w plemniku lub utrudnia jego ruch [9,68]. Mimo plemnikobójczych właściwości pierwiastek ten w stężeniach fizjologicznych jest jednak konieczny do prawidłowego procesu spermatogenezy. Zawartość miedzi w gonadzie męskiej jest bardzo mała w porównaniu do innych mikroelementów, takich jak cynk, żelazo czy selen. Dla porównania stężenie jonów cynku oznaczane metodą ASA w jądrze dorosłego samca myszy wynosi około 22,5  $\mu\text{g}$  na 1 g mokrej tkanki,

a stężenie jonów miedzi w gonadzie u tych samych osobników jest znacznie niższe i wynosi około 1  $\mu\text{g}$  na gram mokrej tkanki [48]. Badania prowadzone z użyciem rentgenowskiej mikroskopii fluorescencyjnej oraz metody PIXE (Particle-Induced X-ray Emission) wykazały, że w jądrze wyższe stężenie miedzi obserwuje się w kanałkach nasiennych niż w tkance interstycjalnej, natomiast w kanalicie plemnikotwórczym jony miedzi występują we wszystkich stadiach rozwojowych komórek germinalnych. Zaawansowane techniki obrazowania komórki pozwoliły również uwidocznić rozkład miedzi w pojedynczej gamecie męskiej. W dojrzałym plemniku miedź gromadzi się głównie we wstawce, natomiast mniejsza jej ilość znajduje się w główce plemnika [42,49].

W gonadzie męskiej, miedź obecna w komórkach germinalnych jest niezbędnym składnikiem enzymów mie-

dziozależnych na wszystkich etapach rozwoju gamety. Jest również potrzebna do prawidłowego funkcjonowania komórek somatycznych gonady męskiej, pełniących funkcję podporową i odżywczą komórek Sertoliego oraz wytwarzających testosteron – komórek Leydiga. Miedź odgrywa ważną rolę także na etapie dojrzewania plemnika w najądrzu oraz w samej wędrowce dojrzałej gamety w drogach rodnych kobiety. Wiele badań potwierdza ważną rolę miedzi w procesach podziału komórek, zwłaszcza w procesie spermatogenezy. Szczególną rolę w procesie rozwoju i funkcjonowania gamet pełnią miedziozależne białka enzymatyczne, takie jak oksydaza cytochromowa i dysmutaza ponadtlenkowa SOD1 i SOD3. Na uwagę jednak zasługuje to że, białka te, powszechnie występujące we wszystkich komórkach organizmu, w gonadzie męskiej występują w postaci izoenzymów swoistych tylko dla tego organu. Metalotioneiny chronią komórki układu rozrodczego przed toksycznym działaniem metali ciężkich, a ceruloplazmina pełni rolę ferrokasydazy i jest niezbędna do prawidłowego metabolizmu żelaza. Do prawidłowego przebiegu spermatogenezy ważne są nie tylko białka enzymatyczne, ale również białka transportujące jony miedzi przez błonę, jak i w obrębie komórki (metalochaperony), także białka o budowie ATPaz regulujące poziom tego pierwiastka w komórkach.

#### **BIĄŁKA MIEDZIOZALEŻNE W PROCESIE SPERMATOGENEZY**

##### **Oksydaza cytochromu c**

Funkcją plemnika, jako ruchliwej komórki, jest dostarczenie materiału genetycznego do komórki jajowej. Wiąże się to z aktywnym ruchem na duże odległości, często przekraczające 1000-krotnie rozmiary plemnika [41]. Dlatego plemnik zużywa olbrzymie ilości energii w postaci ATP [41]. Ruchliwość plemników w dużej mierze zależy od fosforylacji oksydacyjnej zachodzącej w mitochondriach, mimo że w czasie procesu spermatogenezy dochodzi do 10-krotnej redukcji liczby mitochondriów w komórkach gamet męskich w porównaniu do komórek somatycznych [34]. W plemnikach zmienia się nie tylko liczba mitochondriów, ale również kształt. Za zmianę kształtu mitochondriów znajdujących się w spermatach odpowiada białko – aktywina A wydzielana przez komórki Sertoliego. Organelle te stają się bardziej zwarte przyjmują kształt półksiężycowaty z wieloma ciasno upakowanymi grzebieniami [34,77,90]. W czasie procesu spermatogenezy w mitochondriach zachodzi ekspresja niektórych swoistych tkankowo białek, m.in. cytochromu c. W gonadzie męskiej u gryzoni odkryto, że w komórkach germinalnych, oprócz występowania charakterystycznej dla komórek somatycznych postaci tego białka (Cyt cS), obecna jest również swoista tkankowo forma cytochromu c, tzw. gonadalny cytochrom (Cyt cT) [34,45]. U myszy białka te, mimo wysokiego stopnia homologii (84%), są kodowane przez dwa różne autosomalne geny. Swoista jądrowo forma cytochromu jest kodowana przez gen umiejscowiony na chromosomie 2, natomiast Cyt cS przez gen położony w chromosomie

6. Geny te, podobnie jak białka, wykazują wysoki stopień podobieństwa na poziomie sekwencji nukleotydów (74%), jednak znacznie różnią się budową [77]. U myszy w gonadzie męskiej zachodzi ekspresja obydwu postaci cytochromu c. Rodzaj ekspresjonowanej postaci cytochromu c zależy od stadium rozwoju komórek germinalnych. W spermatogoniach stwierdzono ekspresję tylko Cyt cT, natomiast w spermato cytach pierwszorzędowych zachodzi ekspresja zarówno Cyt cS, jak i Cyt cT. W spermato cytach pierwszorzędowych począwszy od form preleptotenyowych, aż do pachytenowych spada stopień ekspresji Cyt cS, a wzrasta Cyt cT. W komórkach postmejozycznych i plemnikach dochodzi tylko do ekspresji Cyt cT [77]. Występowanie dwóch form cytochromu c jest swoiste gatunkowo. Na przykład stwierdzono, że w gonadzie człowieka występuje tylko jedna postać cytochromu c [36], prawidłowe działanie łańcucha oddechowego nie jest możliwe bez głównego w tym procesie enzymu – oksydazy cytochromu c (CCO) [36]. Oksydaza cytochromu c jest dużym kompleksem białkowym złożonym z 13 podjednostek, wbudowanym w wewnętrzną błonę mitochondrialną. Kompleks ten jest ostatnim białkiem łańcucha oddechowego, a podjednostki I–III zawierają centra katalityczne tego enzymu, w których główną rolę odgrywają dwie cząsteczki hemu (a i a<sub>3</sub>) oraz dwa centra miedziowe (CuA i CuB). Rola tego białka polega na odebraniu elektronów z cytochromów c i przeniesieniu ich na cząsteczkę tlenu [104]. Właściwa reakcja redukcji tlenu zachodzi dzięki współpracy grup hemowych i centrów miedziowych oksydazy cytochromu c. W trakcie cyklu katalitycznego atom miedzi wbudowany w podjednostkę II (CuA) jest akceptorem elektronów ze zredukowanego cytochromu c. Następnie jony przenoszone są na cząsteczkę hemu związaną z podjednostką I i dalej na bimetaliczne centrum a<sub>3</sub>/CuB, a następnie na cząsteczkę tlenu O<sub>2</sub> redukując go do wody. Przeniesieniu dwóch elektronów, przez związane z enzymem kofaktory, towarzyszy wypompowanie z matryksu do przestrzeni międzybłonowej 4 kationów H<sup>+</sup>, co powoduje zwiększenie potencjału chemiosmotycznego niezbędnego do syntezy ATP [104]. Jak wykazały badania na myszach z wyłączonym genem (KO) kodującym jądrowo swoistą postać cytochromu c, samce homozygotyczne KO, u których nastąpiło znaczące obniżenie ekspresji białka CCO charakteryzowały się atrofią gonad, znacznym obniżeniem ruchliwości plemników, koncentracją ATP w komórce, a także podniesieniem poziomu apoptozy w jądrach. Myszy te były płodne, jednak w znacznie mniejszym stopniu niż samce kontrolne [77], co może wskazywać, że zaspokojenie zapotrzebowania plemnika na ATP zależy nie tylko od fosforylacji oksydacyjnej, ale także od beztlenowego katabolizmu zgromadzonych przez plemnik materiałów zapasowych, takich jak glukoza [75]. Co więcej, glikoliza wydaje się odgrywać większą rolę w dostarczaniu energii do ruchu witki niż fosforylacja oksydacyjna. Niektóre badania wskazują na rolę miedzi w procesie glikolizy, co może także wpływać na wytwarzanie ATP, a przez to na jakość i ruchliwość plemników [101]. Najwyższe stężenie miedzi w układzie rozrodczym u samca występuje właśnie w najądrzu, gdzie plemniki

nabywają zdolności do ruchu [94]. Mimo wszystko proces fosforylacji oksydacyjnej wciąż odgrywa istotną rolę w metabolizmie plemników. Wykazano też, że oksydaza cytochromowa, a dokładnie COX II – czyli druga podjednostka kompleksu CCO, wykazuje silną ekspresję już we wcześniejszych stadiach spermatogenezy, a mianowicie w pierwszorzędownych spermatocytach pachytenowych, co tłumaczy się dużym zapotrzebowaniem energetycznym komórki będącej już w procesie mejozy [62]. Również wysoki, choć niższy niż w spermatocytach, poziom ekspresji CCO stwierdzono w komórkach Sertoliego [62,99]. Podobnie jak w przypadku cytochromu c, zidentyfikowano również charakterystyczną tylko dla gonady męskiej postać CCO. Swoista jądrowo forma tego enzymu zawiera podjednostkę VIb-2 różniącą się składem aminokwasowym od podjednostki VIb-1 występującej w pozostałych tkankach [36]. Ekspresję CCO-VIb-2 stwierdzono we wszystkich rodzajach komórek w obrębie gonady. Analiza ekspresji CCO-VIb-2 i CCO-VIb-1 u różnych gatunków wykazała, że w jądrach szczura występuje tylko podjednostka CCO-VIb-2, natomiast u buhaja i człowieka stwierdzono ekspresję obydwu postaci białka. Występowanie dodatkowej postaci CCO w jądrach ma prawdopodobnie regulować oddychanie tlenowe, zwłaszcza w zaawansowanych stadiach spermatogenezy [36].

#### Dysmutaza ponadtlenkowa pierwsza

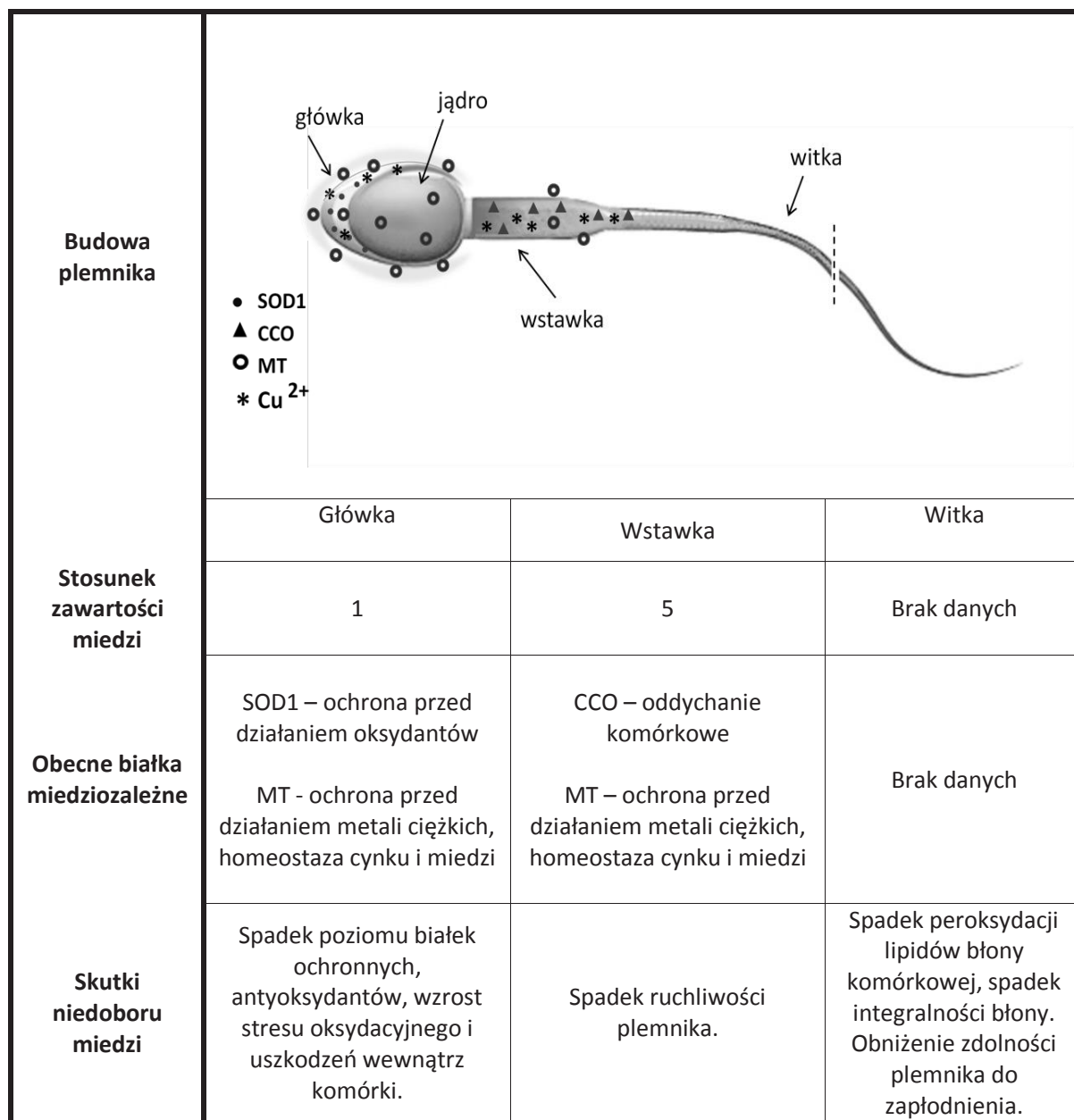
Męskie komórki germinalne mają znacznie niższy poziom mutacji niż komórki somatyczne [119]. Jednym z czynników uszkadzających komórki są reaktywne formy tlenu, które powstają w wyniku prawidłowych przemian metabolicznych. Reaktywne formy tlenu łatwo reagują z takimi składnikami komórki jak lipidy, białka i DNA, powodując niszczenie błon komórkowych, niewłaściwą aktywność lub inaktywację enzymów oraz powstawanie mutacji. Komórki wykształciły jednak system ochrony przed stresem oksydacyjnym obejmujący białka sekwestrujące metale, związki drobnocząsteczkowe, witaminy A, C i E oraz wyspecjalizowane enzymy o aktywności antyoksydacyjnej [102]. Plemniki są komórkami szczególnie narażonymi na uszkodzenia wolnorodnikowe, gdyż ich błony komórkowe zawierają dużo nienasyconych kwasów tłuszczowych, które mogą ulegać procesowi peroksydacji, a niewielka ilość cytoplazmy zawiera niewiele białek o charakterze antyoksydacyjnym [118]. W procesie gametogenezy komórka począwszy od spermatogonium, a skończywszy na wykształconym plemniku jest chroniona przed szkodliwym działaniem wolnych rodników przez wiele białek. Bariera antyoksydacyjna w gonadzie męskiej składa się głównie z białek enzymatycznych, takich jak dysmutazy ponadtlenkowe (CuZn SOD1, CuZn SOD3, Mn SOD2), katalazy czy peroksydazy glutationowej [102]. W pracy skupiono się na miedziozależnych dysmutazach SOD1 i SOD3.

Jednym z głównych białek ochronnych plemnika jest dysmutaza ponadtlenkowa pierwsza (SOD1). Jak wykazały

badania poziom ekspresji genu SOD1 w gonadzie męskiej jest bardzo wysoki w porównaniu do innych tkanek, wyższy nawet niż w płucach [40]. SOD1 jest antyoksydantem występującym w komórce w cytosolu, jądrze komórkowym, peroksisomach i mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej [25]. Ludzkie białko SOD1 jest homodimerem wielkości 32 kDa z dwoma miejscami wiązania miedzi i dwoma miejscami wiązania cynku. Atom miedzi położony jest w centrum cząsteczki SOD1 aktywnej enzymatycznie, która katalizuje reakcję neutralizacji wolnych rodników [25]. Reakcja ta przebiega następująco:



Metalochaperon CCS odpowiada za transport miedzi do miejsca syntezy SOD1 i wbudowania tych jonów w nowo powstające monomery [78,82]. Badania nad ekspresją SOD1 w procesie gametogenezy wykazały, że wysoki poziom mRNA genu SOD1 utrzymuje się w czasie całego procesu spermatogenezy – od spermatogonium, aż po dojrzały plemnik [22]. Ekspresję białka SOD1 stwierdzono natomiast tylko w spermatogoniach, w późniejszych stadiach komórek germinalnych ekspresja SOD1 na poziomie białka jest wręcz niewykrywalna, aż do etapu plemnika. Potwierdziły to badania przeprowadzone na różnych gatunkach zwierząt, nawet odległych taksonomicznie, takich jak węgorz japoński czy szczur [12,22]. To wskazuje, że mimo ciągłej obecności transkryptu, translacja SOD1 następuje dopiero na ostatnim etapie rozwoju gamety męskiej, gdy ta dojrzewa w najądrzu. Białko SOD1 jest kodowane jednym genem, ale badania nad jego ekspresją u myszy wykazały, że powstaje z niego kilka rodzajów transkryptów o różnej wielkości [29,40]. W gonadzie męskiej wykryto trzy rodzaje mRNA dla genu SOD1, były to fragmenty o wielkości 0,73, 0,80 i 0,93 kb. Okazało się, że forma 0,73 kb została również znaleziona w innych tkankach natomiast 0,80 i 0,93 kb są transkryptami swoistymi tylko dla gonady męskiej. Specyficzny jest też wzór ekspresji poszczególnych transkryptów w różnych stadiach spermatogenezy. Transkrypt 0,73 kb występuje w komórkach somatycznych gonady oraz w stadiach przedmejotycznych komórek germinalnych. Natomiast transkrypty 0,80 i 0,93 kb występowały w spermatocytach drugorzędowych i spermatydach okrągłych, w których przeważała postać 0,93 kb [29]. Okazało się, że 0,93 kb mRNA zawiera dodatkową sekwencję 114-120 bp umiejscowioną w odcinku 5'UTR, która pozwala na formowanie struktury „szpilki do włosów”, prawdopodobnie służy też do regulacji translacji tego transkryptu. Znaleziono również białko o masie 60 kD (SOD-RBP), które wiąże się do sekwencji 5'UTR postaci 0,93 kb mRNA opóźniając jego translację [29]. Opóźnienie translacji 0,93 kb SOD1 ma na celu ochronę przed uszkodzeniem przez wolne rodniki zaawansowanych stadiów spermatogenezy. Wysoką ekspresję białka SOD1 wykryto w poszczególnych odcinkach najądrza, gdzie uformowane gamety przechodzą proces dojrzewania. Stwierdzono też, że ilość białka SOD1, jak i jego



**Ryc. 2.** Schemat budowy plemnika z podziałem na trzy główne elementy strukturalne – główkę, wstawkę i witkę. Na schemacie zaznaczono umiejscowienie białek miedziozależnych występujących w poszczególnych elementach plemnika oraz informację o roli tych białek w prawidłowym funkcjonowaniu gamety. Najwyższa zawartość miedzi w plemniku występuje we wstawce i jest pięciokrotnie wyższa niż w główce [37]

aktywność wzrasta, gdy plemnik przechodzi od głowy, przez trzon, aż do ogona najądrza [86]. Odpowiedni poziom miedzi w organizmie jest konieczny do właściwego funkcjonowania enzymu SOD1, który ma podstawowe znaczenie w naturalizacji poziomu wolnych rodników (ROS) powstających w procesach metabolicznych [71]. Plemniki są niemal pozbawione możliwości transkrypcji i zawierają małe ilości enzymów chroniących je przed stresem oksydacyjnym.

Dużą aktywność białka SOD1 stwierdzono również w płynie nasiennym [88,118]. Prawdopodobnie, dla-

tego aktywność SOD1 jest pozytywnie skorelowana, z jakością nasienia związaną z ruchliwością plemników, ich żywotnością, a także z ich koncentracją [70]. Celino i wsp. wykazali, że dodawanie miedzi do hodowli komórek jądra podnosi enzymatyczną aktywność Cu/Zn SOD [12]. W wielu przypadkach azoospermii u ludzi wykazano znaczne obniżenie zawartości Cu w ejakulacie oraz jednoczesny spadek aktywności SOD1. Podobne zjawiska związane z zaburzeniami w funkcjonowaniu SOD1 również obserwowano w wielu stanach patologicznych związanych z niepłodnością [76]. Tak więc, niskie stężenie miedzi w gametach męskich wywołuje wzrost poziomu

ROS wynikające głównie z nieprawidłowości w funkcjonowaniu SOD1. Tym bardziej ważnym wydaje się to, że samce myszy, u których w wyniku inżynierii genetycznej wyłączono gen SOD1 (SOD1<sup>-/-</sup> KO) są płodne. Jednak samce SOD1<sup>-/-</sup> KO mają mniejsze jądra, mniej plemników w najądrzu [112], a ich gamety wykazują mniejsze zdolności penetracji osłonki przejrzystej oocytu [28]. Całkowity brak białka SOD1 u takich samców skutkuje obniżeniem ruchliwości plemników i spadkiem efektywności zapłodnienia *in vitro* [28]. W gonadach samców SOD1<sup>-/-</sup> KO nie stwierdzono podniesienia poziomu innych białek antyoksydacyjnych, takich jak katalaza czy peroksydaza glutationu [112]. Nie badano jednak u nich ekspresji drugiej dysmutazy ponadtlenkowej zawierającej jony miedzi i cynku – białka SOD3. Wiadomo bowiem, że w ludzkiej spermie aktywność dysmutazy SOD1 wynosi aż 75% w stosunku do 25% aktywności dysmutazy SOD3 [88].

### Metalotioneiny

Metalotioneiny (MTs) to grupa niskocząsteczkowych białek miedziozależnych. Tworzy ją kilka rodzin i podrodzin metalotionein różniących się strukturą i rolą biologiczną. MTs kręgowców są wielkości 6-7 kDa [116]. Są to proteiny odpowiedzialne głównie za ochronę organizmu przed działaniem takich metali ciężkich jak kadm, ołów czy rtęć. Ponadto metalotioneiny są współodpowiedzialne za utrzymanie homeostazy pierwiastków śladowych: cynku czy miedzi. Metalotioneiny są zbudowane zwykle z dwóch domen bogatych w reszty cysteinowe i zawierających kolejno 11 (domena  $\alpha$ ) i 9 (domena  $\beta$ ) reszt cystein. Reszty te umożliwiają MTs wiązanie 4 jonów metali dwuwartościowych lub 6 jonów metali jednowartościowych do domeny  $\alpha$  i 3 jonów metali dwuwartościowych lub 6 metali jonów jednowartościowych do domeny  $\beta$ . Jony są upakowane w formie dwóch oddalonych od siebie klastrów [116]. MTs mogą też tworzyć luźne, mieszane kompleksy z jonami metali. To, jakie z dostępnych metali zostaną związane przez metalotioneinę zależy od ich dostępności oraz powinowactwa. W stanie fizjologicznym MTs wiążą w znacznej ilości jony cynku. Te jednak mogą bardzo łatwo oddysocjować, a ich miejsce zastępują inne metale np. jony miedzi [116]. U człowieka opisano metalotioneiny z czterech różnych rodzin MT1-MT4. MT-1 i MT-2 są syntetyzowane we wszystkich komórkach organizmu i uznaje się je za MT podstawowe [89]. MTs są białkami wewnątrzkomórkowymi, jednak mają także aktywność pozakomórkową. W komórce, metalotioneiny występują głównie w mitochondrium i cytoplazmie, mogą się także przemieszczać przez pory otoczki jądrowej do jądra komórkowego. MT-1 i MT-2 obserwowano w jądrze komórkowym komórek poddanych działaniu stresu oksydacyjnego, podczas fazy S oraz komórek traktowanych wysokimi stężeniami miedzi, cynku czy żelaza [23]. Biologiczną funkcją MTs są: detoksyfikacja w przypadku nadmiaru metali ciężkich, utrzymanie homeostazy pierwiastków śladowych (w tym miedzi), transport pierwiastków śladowych oraz neutralizacja toksycznych związków elektrofilowych [23].

Prowadzono wiele badań nad rolą metalotioneiny w męskim układzie rozrodczym. Ekspresja MTs na poziomie mRNA jest stwierdzona w jądrach szczura w pierwszorzędowych i drugorzędowych spermatocytach oraz spermatydach. Brak mRNA MTs wykazano w spermatogoniach oraz komórkach Sertoliego i Leydiga. Natomiast na poziomie białka, metalotioneina jest obecna zarówno w komórkach germinalnych, gdzie wykryto wysoki poziom transkryptu oraz w komórkach Sertoliego i w plemnikach [111]. Natomiast u myszy ogólny poziom ekspresji mRNA MTs w jądrach był bardzo niski w czasie dwóch pierwszych tygodni życia osobnika, poziom ten rośnie stopniowo aż do osiągnięcia dorosłości (9 tydzień życia). Wysoki poziom mRNA MTs u myszy zlokalizowano w komórkach germinalnych: spermatocytach I i II rzędu oraz spermatydach. Komórki Sertoliego, spermatogonia i spermatozoa wykazywały niską ekspresję mRNA MT-1 i MT-2 [17]. W najądrzu szczura komórki bazalne wykazują wysoką ekspresję wszystkich trzech transkryptów metalotioneiny (MT-1, MT-2, MT-3). Poziom ekspresji oraz rodzaj transkryptu zależy od regionu najądrza. Metalotioneina wykazuje także dużą aktywność w plazmie najądrza [1,16]. Metalotioneina wydzielana przez prostatę jest głównym białkiem płynu prostaty wiążącym cynk. MTs wpływa stabilizującą na chromatynę plemników, a jego ekspresja rośnie w przypadku zapalenia pęcherzyków nasiennych lub samej prostaty [106]. Sugerowaną rolą metalotioneiny w jądrach jest regulacja proliferacji i różnicowania komórek oraz dostarczanie i magazynowanie jonów cynku [79]. Ekspresja metalotioneiny w jądrach zwiększa się podczas ekspozycji organizmu na działanie kadmu. MTs pełnią tam rolę ochronną przed działaniem tego szkodliwego metalu ciężkiego [49,126].

### Dysmutaza ponadtlenkowa trzecia

Odkryte w 1982 r. białko CuZn SOD3 w literaturze oznaczane też jako EC-SOD (extracellular superoxide dismutase – EC-SOD), jest glikoproteiną o całkowitej masie cząsteczkowej 135 kD. Białko to formuje homotetramer, a każda z 4 podjednostek ma wbudowany w centrum aktywne jeden atom miedzi i jeden atom cynku [69,102]. Istnieje 50% podobieństwa na poziomie sekwencji aminokwasów między białkami SOD1 i SOD3. W przeciwieństwie do wewnątrzkomórkowej ekspresji SOD1, białko SOD3 występuje w macierzy pozakomórkowej i na powierzchni komórek. Jednak enzym ten, podobnie jak SOD1, katalizuje reakcję dysmutacji rodnika ponadtlenowego do nadtlenu wodoru i cząsteczki tlenu. SOD3 jest głównym enzymem antyoksydacyjnym, unieczyniającym anionorodnik ponadtlenkowy, w przestrzeni pozakomórkowej. EC-SOD nie tylko katalizuje dysmutację O<sub>2</sub><sup>-</sup> do nadtlenu wodoru, ale podobnie jak CuZnSOD1 wykazuje również aktywność peroksydazową [102]. Jest to szczególnie ważne, gdyż w przestrzeni międzykomórkowej nie działają takie enzymy jak katalaza czy peroksydaza glutationowa, które wewnątrz komórki prowadzą rozkład nadtlenu wodoru [69,102]. W gonadzie męskiej ekspresja SOD3 na poziomie mRNA jest wysoka, a stwier-

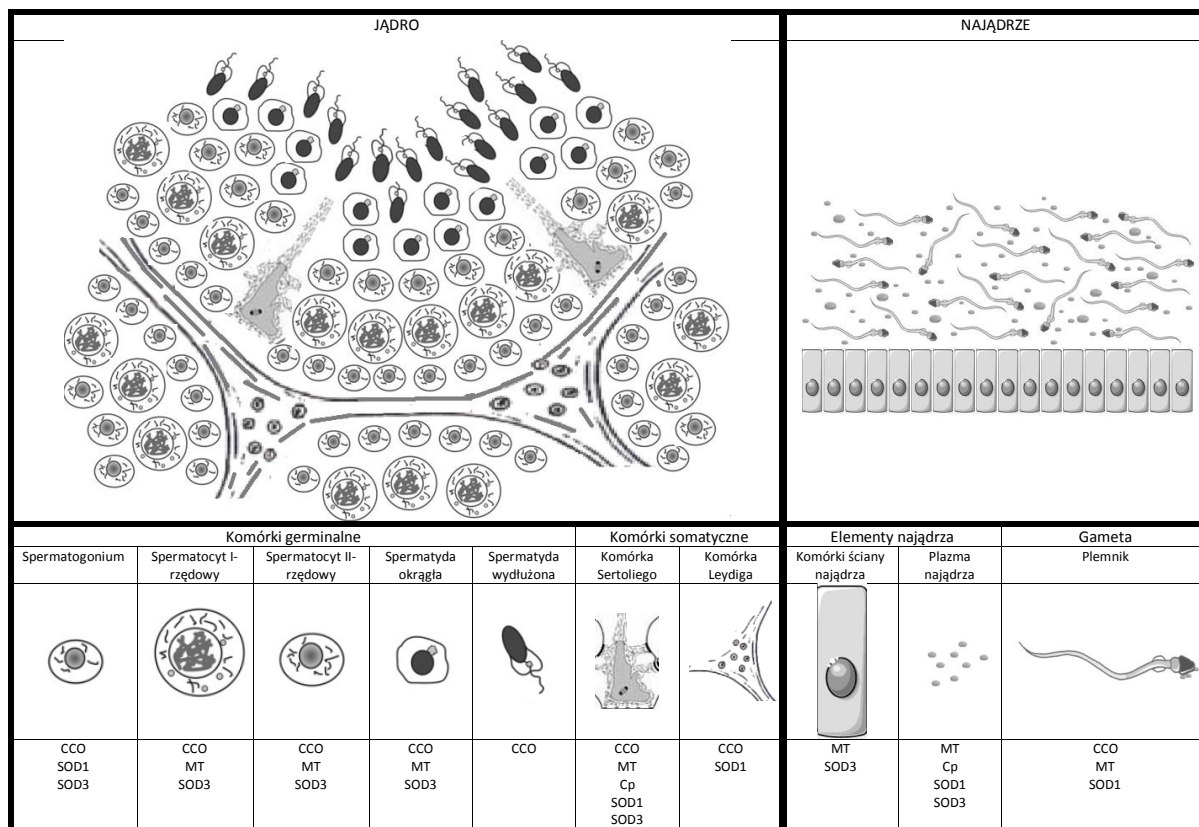


dzono ją głównie w komórkach Sertoliego i w mniejszym stopniu w komórkach germinalnych: spermatogoniach, spermatocytach i okrągłych spermatydach [74]. Wysoką ekspresję SOD3 wykazano również w komórkach epitelialnych najądrza, a jego dużą aktywność w płynie nasiennym [3]. Nie tylko aktywność, ale pośrednio również ekspresja SOD3 są zależne od zawartości jonów miedzi. Ekspresja SOD3 na poziomie transkrypcji jest regulowana przez metalochaperon ATOX1, który jest zarówno białkiem transportującym jony miedzi do aparatu Golgiego, gdzie łączy się z ATP-azami ATP7A i ATP7B, jak również pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego. W odcinku promotorowym genu SOD3 stwierdzono sekwencje GAAAGA, do której przyłącza się białko ATOX1. Przyłączenie białka ATOX1 do sekwencji promotorowej jest możliwe tylko wtedy, gdy jest połączone z atomem miedzi [33,39]. Białko SOD3 jest wydzielane na zewnątrz komórki, dlatego jego obróbka potranslacyjna zachodzi w aparacie Golgiego gdzie do formy apo – tego enzymu są przyłączane jony metali. Wyniki badań wykazały, że za przyłączenie jonów miedzi do centrum aktywnego SOD3 jest odpowiedzialne inne miedziozależne białko: ATP7A [33,92]. Jak wskazują wyniki licznych badań niedobór miedzi w organizmie prowadzi do obniżenia aktywności i niedoboru białka SOD1 [52,58,121] i SOD3 [92]. Miedź jest więc pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego działania obu dysmutaz, a tym samym do skutecznej ochrony komórek rozrodczych przed działaniem wolnych rodników. W badaniach przeprowadzonych na myszach wykazano, że u zwierząt, u których eksperymentalnie wywołano uszkodzenie jąder działaniem silnego stresu oksydacyjnego (indukcja stresu cyklofosfamidem) występował znaczny spadek liczby i ruchliwości plemników, mniejsza była również masa gonad [129]. U takich myszy zastosowanie mieszanki flawonoidów z roślin z rodzaju *Epimedium* poprawiało wszystkie wymienione wyżej parametry. Autorzy pracy, jako jedną z przyczyn takiego stanu wskazują na wzrost ekspresji SOD3 w jądrach po podaniu flawonoidów [129].

### Ceruloplazmina

W gonadzie męskiej stwierdzono również ekspresję innego miedziozależnego białka ceruloplazminy. Ceruloplazmina jest białkiem zawierającym 6-8 atomów miedzi, jest jedną z oksydaz multimiedziowych – białek potrafiących wiązać cząsteczkę tlenu i redukować ją do cząsteczki wody, utleniając przy tym dany substrat [122]. Jony miedzi są wbudowane w centrum aktywne ceruloplazminy. Grupa prostetyczna tego enzymu składa się z trzech centrów miedziowych T1, T2 i T3 [122]. Centra te różnią się właściwościami magnetycznymi, spektralnymi oraz funkcją. Centrum T1 jest akceptorem elektronów, dwa pozostałe, centra T2 i T3, są niezbędne w procesie redukcji cząsteczki tlenu do cząsteczki wody [122]. Obecnie znane są dwie postaci ceruloplazminy: sekrecyjna wydzielana do osocza krwi oraz błonowa. Obydwie formy tego białka są kodowane przez jeden gen i powstają w wyniku alternatywnego splicingu mRNA [87]. Zmiana dotyczy 19 i 20 eksonu genu kodującego

ceruloplazminę. Jeżeli rekrutowany zostaje 19 ekson, wtedy powstaje krótsza forma ceruloplazminy – sekrecyjna (sCp). Natomiast w przypadku rekrutacji eksonu 20, powstaje cząsteczka dłuższa o 20 aminokwasów na końcu C-białka w obrębie, której znajduje się sygnał lokalizacji dla kotwicy GPI (glikozylofosfatydiloinozytolowej kotwicy lipidowej). Przyłączenie glikozylofosfatydiloinozytolowej kotwicy lipidowej następuje w czasie obróbki potranslacyjnej białka. Synteza GPI odbywa się w retikulum endoplazmatycznym i jest kontrolowana aż przez 20 genów [67]. Ceruloplazmina znajdująca się w osoczu krwi jest syntetyzowana głównie w wątrobie, w hepatocytach. Ceruloplazmina jest białkiem złożonym z 1040 aminokwasów o masie około 132 kDa i jest głównym białkiem wiążącym miedź w osoczu krwi (95%) [11]. Pełni także funkcję antyoksydanta dzięki zdolności do wiązania potencjalnie niebezpiecznych dla wzrostu stresu oksydacyjnego, bardziej reaktywnych jonów miedziowych  $Cu^+$  i utlenieniu ich do jonów miedziowych  $Cu^{2+}$ . Otrzymane w ten sposób jony mogą zostać wykorzystane przez ceruloplazminę do utlenienia jonów innego pierwiastka – żelaza. W obrębie czwartej i szóstej domeny cząsteczki ceruloplazminy zlokalizowano miejsca wiązania jonów Fe. Miejsca te są położone niedaleko miejsc wiążących jony miedzi [11,63]. Utlenienie jonów żelaza  $Fe^{2+}$  do jonów  $Fe^{3+}$  umożliwia ich związanie przez cząsteczkę transferyny – głównego transportera żelaza w organizmie. Ceruloplazmina pełni więc bardzo ważną rolę w metabolizmie żelaza, które jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego przebiegu procesu spermatogenezy. Żelazo jest funkcjonalnym komponentem grup prostetycznych, takich jak: hem, centra żelazowo-siarkowe [Fe-S] oraz 1 – lub 2-atomowe centra żelazowe, które determinują aktywności i funkcje wielu białek niezbędnych do prawidłowego przebiegu głównych procesów biologicznych [63]. Białka zawierające jony żelaza biorą udział w licznych procesach biologicznych, takich jak: transport elektronów, transport i magazynowanie tlenu, kataliza biochemiczna, detekcja stężenia gazów biologicznych ( $O_2$ ,  $NO$ ,  $CO$ ), regulacja ekspresji genów, regulacja rytmu dobowego oraz synteza microRNA [63]. W gonadach żelazo jest potrzebne dzieląc się mitotycznie spermatogoniom do syntezy DNA, wzrostu komórki, formowania mitochondriów oraz działania wielu enzymów zawierających atomy żelaza. Jony żelazowe znajdują się we wszystkich stadiach komórek germinalnych męskich oraz komórek somatycznych jądra. Ze względu jednak na ogromną wrażliwość gamet męskich na działanie stresu oksydacyjnego, podobnie jak w przypadku miedzi, metabolizm żelaza musi być precyzyjnie regulowany [2]. Jony żelazowe muszą przebyć długą drogę od jądrowych kapilar z tkanki interstycjalnej do późnych stadiów komórek germinalnych w kanalikule plemnikotwórczym. Do kanaliku plemnikotwórczego jony żelaza są transportowane głównie z naczyń krwionośnych znajdujących się w tkance interstycjalnej oraz z otaczających kanaliki plemnikotwórcze komórek mioidalnych [54]. Na komórkach endotelium naczyń oraz komórkach mioidalnych wykryto ekspresję ferroportyny, błonowego białka, które jest nazywane



Ryc. 3. Schemat budowy kanalika nasiennego i najądrza wraz z lokalizacją białek miedziozależnych w poszczególnych typach komórek germinalnych i somatycznych

eksporterem żelaza, gdyż jego zadaniem jest usuwanie jonów tego pierwiastka przez błonę bazolateralną z wnętrza komórki do krwiobiegu. Ferroportyna transportuje jony  $Fe^{2+}$ , które aby mogły być związane przez transferynę (białko odpowiedzialne za transport jonów żelazowych) muszą być utlenione do postaci  $Fe^{3+}$ . Proces utleniania jest prowadzony przez GPI ceruloplazminy umiejscowioną na błonie komórkowej razem z ferroportyną. Kolokalizację tych dwóch białek stwierdzono w komórkach astrocytów. Ponadto wykazano, że brak GPI-Cp w komórce prowadzi do degradacji ferroportyny [18]. Utlenione przez ceruloplazminę żelazo jest wiązane w osoczu do transferyny [73,107]. W przypadku jądra, wykazano eksperymentalnie, że transferyna jest w dużej ilości umiejscowiona w tkance interstycjalnej jądra i części bazalnej komórek Sertoliego [54]. Komórki Sertoliego są też miejscem syntezy transferyny w kanaliku plemnikotwórczym. Związane z transferyną żelazo przekracza następnie barierę krew-jądro kierując się do części środkowej komórek Sertoliego [54,108]. Z komórek Sertoliego żelazo związane z transferyną trafia do spermatocytów pierwszorzędowych, a po przekroczeniu bariery krew-jądro do późniejszych stadiów komórek germinalnych – spermatyd. Potwierdzają to doświadczenia, w których obecność transferyny wykazano w spermatocytach i spermatydach w jądrach szczura [107] oraz w spermatocytach w jądrach myszy [54]. Tak więc, transport jonów żelazowych przez transferynę w komórkach

germinalnych jest uzależniony jednak od właściwości ferrooksydacyjnych miedziozależnej ceruloplazminy.

Badania prowadzone już w latach 80 i 90 ub. w. wykazały, że w jądrze ssaków komórki Sertoliego wytwarzają duże ilości ceruloplazminy [84,125]. Potwierdziły to również badania przeprowadzone na komórkach Sertoliego hodowanych *in vitro* [54,125]. Okazało się, że w jądrach dochodzi do syntezy zarówno formy błonowej jak i sekrecyjnej ceruloplazminy [24]. Tak wysoki poziom wytwarzania ceruloplazminy przez komórki Sertoliego wiąże się z ich funkcją troficzną wobec komórek germinalnych, transportem miedzi i pośrednio żelaza do komórek kanalika plemnikotwórczego. Możliwe, że białko to pełni także po części inne funkcje w gonadzie męskiej. W prowadzonych eksperymentach wykazano, że ceruloplazmina bierze udział w formowaniu naczyń krwionośnych [24,125]. Pełni także rolę jądrowego antyoksydanta, który chroni komórki germinalne przed działaniem wolnych rodników. Przyjmuje się też, że ceruloplazmina stanowi swoisty magazyn jonów miedzi w nieaktywnej katalitycznej formie. Wytwarzanie ceruloplazminy w komórkach Sertoliego jest regulowana wieloma czynnikami. Regulacja ta odbywa się m.in. przez interakcje komórek Sertoliego ze spermatocytami pierwszorzędowymi i okrągłymi spermatydami. Regulacja sekrecji ceruloplazminy jest wzmacniana dodatkowym działaniem FSH (follicle-stimulating hormone). Sekrecję ceruloplazminy pobudza

także wzrost stężenia metali w jądrze. Białko to może być czułym biomarkerem stanu zapalnego w układzie rozrodczym [100]. W ostatnich latach prowadzono także badania nad korelacją stężenia ceruloplazminy w osoczu krwi, plazmie nasienia a płodnością samca. Nie znaleziono jednak korelacji między stężeniem ceruloplazminy a parametrami plazmy nasienia (m.in. stężeniem oksydantów i antyoksydantów) [5,44] oraz samej kondycji nasienia (ilość, ruchliwość, stężenie i procent komórek martwych spermy) [44].

### WOLNE RODNIKI W PŁODNOŚCI MĘSKIEJ

Wolne rodniki nie zawsze są szkodliwe dla komórki, gdyż jak wiadomo niewielkie stężenie wolnych rodników jest ważne dla komórek w procesach ochrony przed mikroorganizmami, sygnalizacji międzykomórkowej czy proliferacji. W komórkach rozrodczych niewielkie stężenie wolnych rodników jest wymagane do prawidłowego przebiegu kondensacji chromatyny, czy procesu transformacji w plemniku umożliwiającym zapłodnienie, tzw. kapacytacji plemników [19,103,124]. Ejakulowany plemnik jest pokryty glikokoniugatami tworzącymi charakterystyczny glikokaliks na powierzchni główki. Warstwa ta przysłania receptory plemnika niezbędne w procesie jego połączenia z komórką jajową. W procesie kapacytacji plemnik zostaje przygotowany do zapłodnienia przez:





- przygotowanie plemnika do reakcji akrosomalnej,
- zmiany składu błony komórkowej plemnika,
- zwiększenie jego ruchliwości.

Proces kapacytacji plemnika zachodzi w drogach rodnych samicy, gdzie wydzielane przez komórki śluzówki hydrolazy rozkładają glikokaliks osłaniający główkę plemnika i umożliwiają odsłonięcie enzymów biorących udział w reakcji akrosomalnej. Zmienia się także struktura i skład lipidowy błony komórkowej plemnika, co umożliwia zlanie się błony biologicznej gamety męskiej z błoną komórki jajowej [19]. Jednym ze skutków działania ROS jest peroksydacja lipidów. Błony lipidowe plemników są szczególnie podatne na oksydację ze względu na dużą zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Jednak okazuje się, że peroksydacja błon lipidowych w przypadku plemników może odgrywać ważną rolę w ich zdolności do ruchu i zapłodnienia komórki jajowej. Przypuszcza się, że peroksydacja błon plemnika wiąże się z podniesieniem stężenia c-AMP w ich wnętrzu, co stymuluje ruch plemników [46]. Ponadto umiarkowana peroksydacja błon lipidowych plemnika podnosi ponad 4-krotnie ich zdolność do wiązania się z osłonką przejrzystą oocytu bez negatywnego wpływu na jakość samych komórek [46]. Zarówno wysokie jak i za niskie stężenie miedzi zmniejsza peroksydację błony komórkowej plemników, dlatego tak ważne jest utrzymanie stałego fizjologicznego stężenia tego pierwiastka w układzie rozrodczym. Wiadomo bowiem, że miedź również może spowodować wzrost stresu oksydacyjnego, istnieje jednak grupa białek, które chronią komórki przed stresem oksydacyjnym wywołanym przez metale ciężkie.

### SKUTKI NADMIARU MIEDZI W MĘSKIM UKŁADZIE ROZRODCZYM

Jak wynika z przytoczonych wyżej badań miedź jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego przebiegu procesu spermatogenezy, ale jednocześnie nadmiar tego pierwiastka może prowadzić do wzrostu stresu oksydacyjnego. Nadmiar miedzi indukuje powstawanie wolnych form tlenu za pośrednictwem tzw. reakcji Fentona i Habera-Weissa [25], co może skutkować spadkiem płodności. Wyniki licznych badań przeprowadzonych na modelach zwierzęcych potwierdzają, że nadmiar miedzi prowadzi do uszkodzenia struktury jądra oraz upośledzenia funkcjonowania gamet. Stwierdzono, że u szczurów podawanie dootrzewnowo przez kilkadziesiąt dni odpowiednio wysokich dawek miedzi powoduje spadek masy gonad oraz gruczołów dodatkowych. U zwierząt takich dochodziło również do redukcji aktywności enzymów, takich jak dehydrogenazy delta(5)-3-beta-hydroksysteroidowej czy dehydrogenazy 17-beta-hydroksysteroidowej biorących udział w wytwarzaniu hormonów oraz spadku stężenia i aktywności samego testosteronu w plazmie krwi [13]. Toksyczny skutek nadmiaru miedzi we krwi lub nasieniu objawia się zmniejszeniem liczby ruchliwych plemników, zaburzeniami w ich morfologii, koncentracji i żywotności zarówno u ludzi jak i u zwierząt [4,97,98]. Przykładem mogą być wyniki badań prowadzonych na samcach nornicy rudej. Wykazano, że podawanie odpowiednio wysokich dawek miedzi samcom nornicy przez 12 tygodni, wywołuje u nich znaczne zmiany w morfologii i fizjologii plemników. Tak traktowane samce miały mniejszą liczbę plemników w ejakulacie, gamety takie były mniej ruchliwe i żywotne, zaobserwowano też wyższy procent plemników ze zmianami morfologicznymi oraz z zaburzeniami integralności witki. Mniejsze dawki miedzi powodowały wzrost masy i wielkości gonad, co może świadczyć o pozytywnym wpływie suplementacji miedzią, ale w odpowiednich, niewielkich dawkach [72]. Wiele ważnych informacji o wpływie nadmiaru miedzi na budowę i funkcjonowanie gonady męskiej otrzymano z badań na myszach mutantach mosaic (*Atp7a<sup>mo-ms</sup>*) z genetycznie uwarunkowanym defektem w metabolizmie, które jednocześnie są zwierzęcym modelem choroby Menkesa (mutacja genu *ATP7A*). Gen *ATP7A* jest umiejscowiony na chromosomie X i koduje białko ATP7A, które odpowiada za utrzymanie stałego poziomu miedzi w komórkach. W warunkach fizjologicznego stężenia Cu w komórce białko to jest umiejscowione w aparacie Golgiego, jednak gdy stężenie miedzi przekroczy barierę fizjologiczną, ATP7A wiąże jony miedzi i transportuje je w pęcherzykach do błony komórkowej, gdzie są usuwane z komórki [56]. U myszy mutantów brak aktywności białka ATP7A prowadzi do gromadzenia miedzi w komórkach jelita cienkiego, komórkach epithelialnych kanalików nerkowych oraz w gonadach, natomiast w pozostałych narządach u mutantów stwierdzono duży niedobór tego pierwiastka, co prowadzi do ich letalności w drugim tygodniu życia [57]. Jednak podawanie miedzi samcom mutantom znosi efekt letalny i osobniki takie osiągają dojrzałość [48]. Badania przeprowadzone na dojrz-

Tabela 1. Skutki nadmiaru miedzi w męskim układzie rozrodczym.

Przyczyna nadmiaru miedzi	Badany organizm	Zmiany na poziomie pierwiastków	Zmiany na poziomie gonady	Zmiany na poziomie plemnika	Zmiany na poziomie hormonów
Iniekcje roztworów miedzi, suplementacja miedzią	Człowiek  Szczur 	<ul style="list-style-type: none"> <li>Wzrost poziomu miedzi w krwi, gonadzie i nasieniu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Uszkodzenie struktury jądra</li> <li>Atrezja jądra</li> <li>Spadek liczby spermatogoniów i komórek Sertoliego</li> <li>Wzrost poziomu apoptozy komórek</li> <li>Spadek masy gonad, prostaty i nasieniowodów</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ilości ruchliwych plemników</li> <li>koncentracji plemników</li> <li>żywności plemników</li> <li>wydajności reakcji akrosomowej</li> <li>zaburzeń morfologii plemnika</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Obniżenie aktywności enzymów zaangażowanych w produkcję androgenów</li> <li>Obniżenie aktywności i ilości testosteronu w plazmie krwi</li> </ul>
Choroba Menkesa – mutacje genu <i>ATP7A</i>	Mysz 	<ul style="list-style-type: none"> <li>Wzrost poziomu miedzi w gonadzie</li> <li>Akumulacja miedzi wzrasta wraz z wiekiem</li> <li>Spadek poziomu cynku</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Uszkodzenie struktury jądra</li> <li>Degeneracja kanalików</li> <li>Spadek liczby komórek Leydiga</li> <li>Wzrost poziomu apoptozy komórek</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ilości ruchliwych plemników</li> <li>koncentracji plemników</li> <li>żywności plemników</li> <li>integralności błony plemnika</li> <li>zaburzeń morfologii plemnika</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Wzrost poziomu estrogenów i spadek poziomu testosteronu</li> </ul>
Choroba Wilsona – mutacje genu <i>ATP7B</i>	Człowiek 	<ul style="list-style-type: none"> <li>Wzrost poziomu miedzi w gonadzie</li> <li>Akumulacja miedzi wzrasta wraz z wiekiem</li> <li>Powiązana z metabolizmem żelaza w gonadzie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hypogonadyzm</li> <li>Zaburzenia spermatogenezy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ilości ruchliwych plemników</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Zaburzenia hormonalne na linii podwzgórze – przysadka - jądro</li> </ul>

W tabeli przedstawiono skutki nadmiaru miedzi dla poszczególnych elementów: gospodarki innych pierwiastków, zmian na poziomie gonady, zmian na poziomie plemnika (♂ oznacza spadek, ♀ oznacza wzrost danego parametru) oraz zmian hormonalnych. Opisane skutki nadmiaru miedzi podzielono według trzech przyczyn nadmiaru miedzi w organizmie: sztucznie wywołanego nadmiaru miedzi, choroby Menkesa i choroby Wilsona

łych myszach z mutacją *Atp7a*, którym wstrzykiwano chlorek miedzi wykazały, że w gonadach takich samców dochodzi do akumulacji miedzi przy jednoczesnym niedoborze cynku [48]. Bardzo istotne jest także to, że u samców o genotypie dzikim, które były poddawane identycznej terapii, zawartość miedzi w gonadach była taka jak u myszy o genotypie dzikim nieotrzymujących iniekcji chlorku miedzi, co wskazuje, że w gonadach istnieje bardzo sprawny mechanizm kontroli poziomu tego pierwiastka. Analiza histologiczna jąder myszy z mutacją *Atp7a<sup>mo-ms</sup>* wskazuje na występowanie zdegenerowanych kanalików nasiennych i nasilenie procesu apoptozy [47,48]. Patologiczne zmiany w gonadzie nasilały się z wiekiem mutantów [47]. Możliwe, że to właśnie podwyższony poziom miedzi u mutantów powodował przyspieszenie fizjologicznej fali apoptotycznej lub zwiększał jej intensywność. Można również przypuszczać, że podwyższony poziom miedzi, z powodu toksyczności, powodował degenerację kanalików nasiennych, a zwłaszcza znajdujących się tam komórek germinalnych. U mutantów zaburzenia w metabolizmie miedzi mogą być przyczyną niedoboru cynku, gdyż akumulacja miedzi w komórkach jelita prowadzi do podniesienia poziomu metalotioneiny, która wykazuje większe powinowactwo do cynku niż do miedzi i wiąże kationy cynkowe [57]. Natomiast niski poziom cynku jest induktorem procesu apoptozy przez wytwarzanie wolnych rodników [10,80]. Z badań prowadzonych na szczurach wiadomo, że apoptoza komórek germinalnych może być również regulowa-

wana przez tlenek węgla 1 (HO-1) wytwarzaną w komórkach Leydiga. W badaniach tych udowodniono, że w jądrach szczurów, którym podawano odpowiednio wysokie dawki  $CdCl_2$  (silny stresor prowadzący do oligozoospermii) komórki Leydiga wykorzystują tlenek węgla, zatrzymywany dzięki HO-1, do indukcji procesu apoptozy komórek germinalnych w stadiach premejotycznych w warunkach stresowych [85]. U dorosłych samców mutantów *Atp7a<sup>mo-ms</sup>* zachodzi pełny proces spermatogenezy, jednak samce te wytwarzają plemniki znacznie gorszej jakości. W porównaniu z myszami dzikimi, u mutantów plemniki wykazywały znacznie mniejszą ruchliwość i żywotność, znacznie więcej z nich wykazywało także anomalie morfologiczne, gamety mutantów charakteryzowały się również niewielką integralnością błony. W efekcie bardzo nieduża liczba samców z mutacją *mosaic* była zdolna do rozrodu [48]. U mutantów dochodziło też do degradacji komórek Leydiga znajdujących się w tkance interstycjalnej. Już u 23-dniowych myszy z mutacją *mosaic* liczba komórek Leydiga jest znacznie niższa niż u samców o genotypie dzikim. Analiza histologiczna wykazała, że u dorosłych myszy mutantów patologiczne zmiany w obrębie gonady były jeszcze bardziej nasilone niż u myszy młodych. Znacznie spadła u nich również liczba komórek Leydiga, a w tkance interstycjalnej były widoczne puste przestrzenie po zniszczonych komórkach. Wyizolowane z gonad pochodzących od mutantów i hodowane *in vitro* komórki Leydiga trudniej przyczepiały się do podłoża, miały mniejsze jądra

komórkowe, często zawierały wiele wakuoli, wolniej proliferowały i wytwarzały mniejszą liczbę krócej żyjących komórek potomnych niż komórki pochodzące od myszy dzikich [47]. Poza tym w hodowlach komórek Leydiga, osoczu krwi i całej gonadzie zaobserwowano znacznie niższy poziom testosteronu i wyższy poziom estrogenów w porównaniu z grupą kontrolną [47]. Wiadomo że duże ilości estrogenu działają destruktywnie na proces spermatogenezy [27] i mogą dodatkowo potęgować negatywne skutki wysokiego poziomu miedzi w jądrach. Inne badania przeprowadzone na szczurach, które otrzymywały nadmiar miedzi w pokarmie wykazały, że w gonadach u takich zwierząt stwierdzono zwiększony poziom apoptozy, ponadto stwierdzono u nich atrezję jąder oraz spadek liczby spermatogoniów i komórek Sertoliego [6].

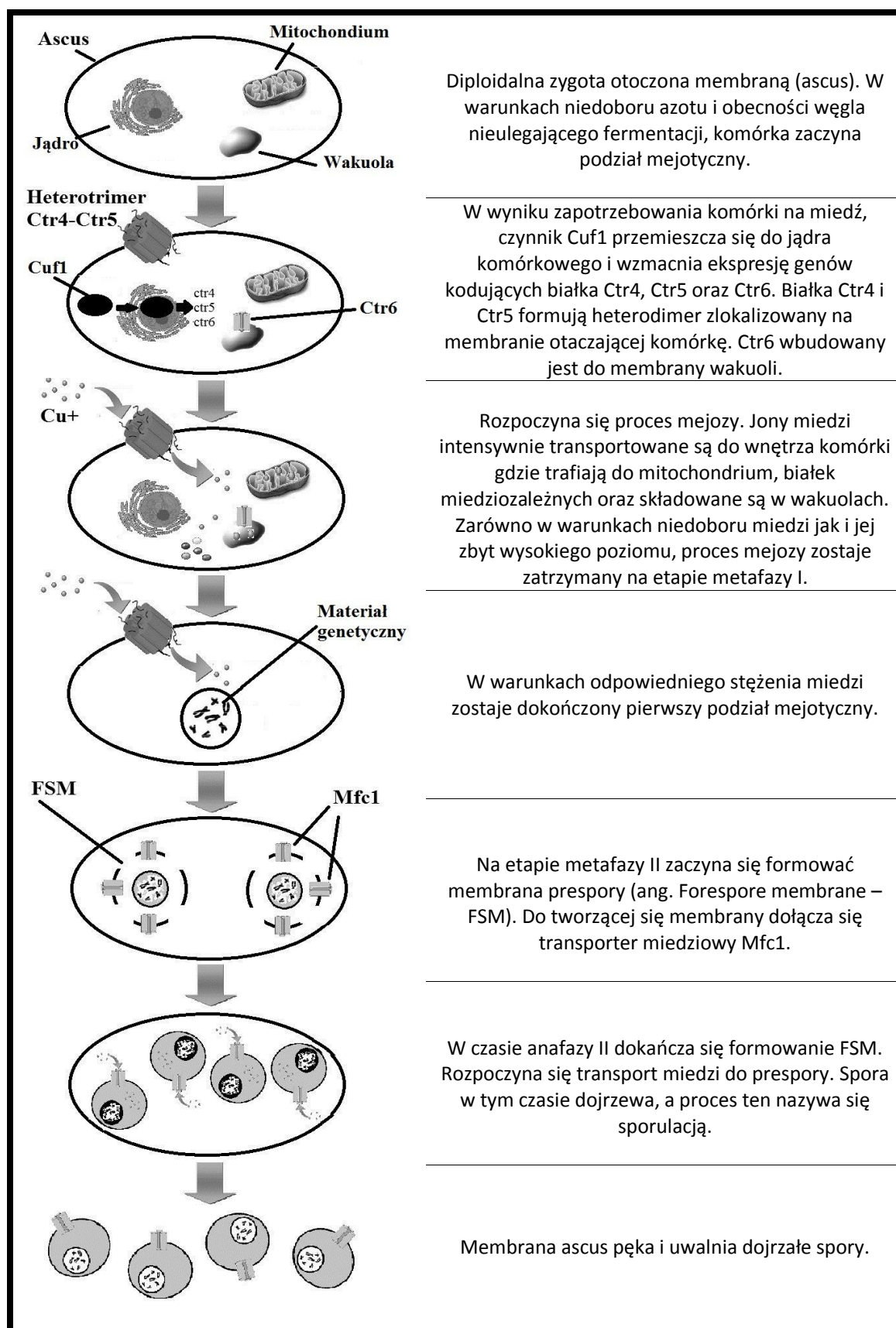
Problemy z płodnością występują również u pacjentów z chorobą Wilsona, u tych chorych zaburzenia metabolizmu miedzi są wywołane przez mutacje genu *ATP7B*, kodującego białko ATP7B. Białko to ma wysoką ekspresję w wątrobie, gdzie w komórkach hepatocytów usuwa nadmiar jonów miedzi do żółci, a także pełni jeszcze jedną bardzo ważną funkcję, włącza jony miedzi do apoceruloplazminy – nieaktywnej postaci białka, prowadzi to do powstania holoceruloplazminy, w pełni funkcjonalnej proteiny. Po przyłączeniu 6-8 atomów miedzi w aparacie Golgiego przez białko ATP7B do ceruloplazminy, białko to znacznie wydłuża swój okres półtrwania (z 5 h do 5,5 dnia), zyskuje właściwości ferooksydacyjne lub też zostaje przetransportowana do osocza [122]. U chorych nadmiar miedzi jest magazynowany w wątrobie, mózgu, jądrach i gałkach ocznych [109]. U mężczyzn z chorobą Wilsona obserwowano hipogonadyzm, impotencję i zaburzenia spermatogenezy [109]. U pacjentów tych dochodzi także do znacznego uszkodzenia mitochondriów, co zmniejsza ruchliwość plemników. Z badań prowadzonych przez Frydmana i wsp. wynika, że wielu chorych na chorobę Wilsona ma zaburzenia poziomu hormonów na linii podwzgórze-przysadka-jądro [26]. Wykazano, że u człowieka stężenie miedzi (1,5 mM) zaburza nie tylko ruchliwość plemników, ale również hamuje reakcję akrosomową [45,93,94].

### **ROLA MIEDZI W PROCESACH PODZIAŁOWYCH KOMÓREK**

Miedź jest nie tylko niezbędna do ochrony komórki przed stresem oksydacyjnym, ale jak wykazały najnowsze badania jest również konieczna do proliferacji komórek [33]. Wyniki tych badań wskazują, że pierwiastek ten jest także bardzo ważnym regulatorem procesów podziałowych w męskich komórkach germinalnych [7,8]. Konieczna obecność miedzi do prawidłowego przebiegu mejozy została udokumentowana w czasie prac przeprowadzonych na komórkach drożdży (*Schizosaccharomyces pombe*). W cyklu życiowym drożdży haploidalne komórki rozmnażają się przez pączkowanie w wyniku podziałów mitotycznych. Przez połączenie dwóch komórek haploidalnych o różnych znakach koniugacyjnych powstaje heterozygota, która daje początek diploidalnemu potomstwu. Komórki diploidalne, podobnie jak haplo-

idalne, mogą się rozmnażać przez podziały mitotyczne. Drożdże nie mają wykształconych gonad, jednak w ich cyklu życiowym zachodzi proces mejozy, który przebiega bardzo podobnie u wszystkich *Eucaryota*. W warunkach głodu azotowego i w obecności źródła węgla nieulegającego fermentacji, diploidalne komórki ulegają podziałom mejotycznym (sporulacja). W wyniku mejozy powstają cztery haploidalne spory, dając początek pokoleniu haploidalnemu [95]. Wykazano, że u drożdży niedobór miedzi powodował zatrzymanie procesu mejozy na etapie metafazy I [7,8]. W komórkach drożdży miedź jest pompowana do komórek premejotycznych z udziałem 3 białek błonowych z rodziny CTR. Podstawową biologiczną funkcją białek z rodziny CTR jest transport miedzi przez błonę komórkową i związanie kationów tego pierwiastka, a następnie udostępnienie go następnej grupie białek – metalochaperonom i innym cząsteczkom, takim jak np. glutation czy metalotioneina [30]. Białka te zawierają charakterystyczne sekwencje, określone jako motywy Mets (Mets motifs) bogate w reszty metioninowe i histydynowe. Motywy Mets odgrywają ważną rolę w niezależnym od ATP procesie przyłączania miedzi i transportu kationów  $Cu^+$  do wnętrza komórki. U *S. pombe* w komórkach wchodzących na drogę mejozy białka Ctr4 i Ctr5 wykazują wysoką ekspresję we wczesnych stadiach mejozy (między 1 a 3 h tego procesu) i lokalizację membranową [91]. Po 3 godzinach białka te znikają z błony komórkowej, jednak w tym samym czasie dochodzi do ekspresji białka Mcf1 [8]. Białko to jest charakterystyczne tylko dla komórek, które przechodzą proces mejozy, nie stwierdzono jego ekspresji w komórkach dzielących się mitotycznie. Mcf1 jest nowo odkrytym białkiem błonowym zbudowanym z 495 aminokwasów o masie 55,3 kD bogatym w reszty metioninowe i cysteinowe, co umożliwia mu wiązanie jonów miedzi i ich transport do wnętrza tworzących się aukso-spor [7]. Ekspresja tego białka jest szczególnie wysoka w stanach niedoboru miedzi. Jednak zbyt duże stężenie jonów miedzi uzyskane przez dodanie do pożywki  $CuSO_4$  w stężeniu przekraczającym poziom fizjologiczny powodowało zatrzymanie procesów podziałowych [37]. Natomiast trzecie białko – Ctr6, znajduje się w wakuolach i dopiero w późniejszych etapach procesu mejozy przemieszcza się do błony komórkowej, biorąc udział w transporcie miedzi do wnętrza komórki. Po podziale mejotycznym białka te znikają z błony komórkowej. Ekspresja tych genów Ctr4 i Ctr5 pozostaje pod ścisłą kontrolą zależnych od miedzi czynników transkrypcyjnych Cuf1 i Cuf2. Natomiast ekspresja genu *Mcf1* jest regulowana niezależnie od tych czynników [8,37].

Jak wynika z badań przeprowadzonych na drożdżach miedź jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego przebiegu procesu mejozy, co potwierdzają również wyniki badań prowadzonych na *Drosophila melanogaster*. Wykazano, że brak białka Ctr1C – swoistego transportera miedziowego w procesie spermatogenezy, prowadzi do sterility samców [105]. U samców myszy proces spermatogenezy zaczyna się zaraz po urodzeniu. Przez pierwszy tydzień życia samca dochodzi do zgromadze-

Ryc. 4. Rola miedzi w podziale mejotycznym drożdży *Schizosaccharomyces pombe*

nia puli macierzystych komórek plemnikotwórczych – jest to okres intensywnych podziałów spermatogoniów. W wyniku podziału powstaje jedno spermatogonium zajmujące miejsce dzielącej się komórki oraz drugie spermatogonium, które dalej dojrzewa i się różnicuje. Dzięki tej zdolności do samoodnowy liczba spermatogoniów utrzymuje się na stałym poziomie. Komórki macierzyste spermatogenezy mają ogromny potencjał proliferacyjny. Specjalne cechy spermatogoniów są utrzymywane dzięki charakterystycznemu mikrośrodkowisku – niszy komórek macierzystych. Po opuszczeniu niszy komórki tracą unikalne cechy i zaczynają się różnicować [128], tworząc pulę komórek, z których powstają gamety męskie. W podziałach mitotycznych ważną rolę odgrywa, zależny od miedzi, metalochaperon ATOX1. Naukowcy długo uważali, że ATOX1 pełni tylko jedną funkcję – jest transporterem wewnątrzkomórkowym jonów miedzi. Jednak późniejsze badania wykazały, że ten metalochaperon jest zdolny do migracji do jądra komórkowego i regulacji ekspresji genów. Jednym z jego celów jest promotor genu cykliny D1. Cyklina D1 jest zaangażowana w proces proliferacji komórkowej i kontroluje przejście z fazy G0 do S cyklu podziałowego. Wykazano, że dodanie miedzi do pożywki hodowlanej fibroblastów wzmacnia ich proliferację, a komórki z knock outem genu ATOX1 dzielą się znacznie wolniej [38]. Spermatogonia różnicują się w spermatocyty pierwszorzędowe i wchodzą następnie w proces mejozy. Miedź jest niezbędnym mikroelementem potrzebnym do zajścia procesu mejozy, dlatego pierwiastek ten jest obecny w dużej ilości w komórkach premeiotycznych: spermatogoniach i spermatocytach pierwszorzędowych [91]. Wskazuje to jednoznacznie, że w komórkach dzielących się w procesie mejozy muszą istnieć mechanizmy ściśle kontrolujące poziom tego pierwiastka.

## PODSUMOWANIE

Zagadnienie dotyczące nadmiaru miedzi w organizmie oraz jej destrukcyjny wpływ na proces gametogenezy i płodność jest obecnie bardzo aktualny. Problem dotyczy nie tylko mężczyzn cierpiących na dziedziczne zaburzenia metabolizmu tego pierwiastka, ale może być przyczyną obniżenia płodności osób pracujących w hutach, kopalniach rudy miedzi lub tych narażonych

na długotrwałą ekspozycję na związki miedzi. Zaburzenia w metabolizmie miedzi, a zwłaszcza te, które prowadzą do jej nadmiaru w organizmie pociągają za sobą problemy związane z gospodarką innymi pierwiastkami śladowymi, m.in. z cynkiem czy żelazem. Nadmiar miedzi w organizmie prowadzi do niedoboru cynku, którego zawartość w gonadzie męskiej jest bardzo duża [14,127]. Stwierdzono, że niedobór cynku może doprowadzić do uszkodzenia struktury kanalików nasiennych, zatrzymania procesu różnicowania komórek germinalnych [14,127], gdyż fizjologiczne stężenie cynku jest podstawowym czynnikiem w procesach proliferacji, mejozy i syntezy DNA w czasie gametogenezy [127], co potwierdzono w badaniach na szczurach i myszach. Obniżone stężenie cynku w gonadzie męskiej nasila proces apoptozy komórek germinalnych [48,127]. Niedobory cynku u ludzi chorych na chorobę Crohna wywołują zmiany patologiczne w procesie spermatogenezy [127].

Duże zainteresowanie metabolizmem miedzi jest także skutkiem problemów z leczeniem nowotworów męskiego układu rozrodczego. W terapii nowotworów stosuje się leki zawierające platynę, np. cisplatyna, karboplatyna czy oksaliplatyna. Leki te są wykorzystywane m.in. w terapii nowotworów jądra czy stercza [51]. Wielokrotnie już udowodniono, że leki antynowotworowe na bazie platyny przenikają do komórki w bardzo podobny sposób jak atomy miedzi. Leki te są transportowane do wnętrza komórek za pomocą transporterów błonowych, takich jak CTR1 i CTR2 [51], które jednocześnie są białkami odpowiadającymi za pobieranie jonów miedzi przez komórki. Wykazano korelację między poziomem ekspresji białka CTR1 i CTR2, a rokowaniami chorych poddanych terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem leków zawierających jony platyny [53,83,96,120]. Białka ATP7A i ATP7B natomiast uczestniczą w procesie rozwoju lekooporności w czasie procesu chemioterapii biorąc udział w usuwaniu leków zawierających jony platyny z komórek [56,96]. Tak więc badania dotyczące roli miedzi w układzie rozrodczym nie ograniczają się tylko do badania wpływu tego pierwiastka na proces spermatogenezy, ale jednocześnie są bardzo ważne ze względu na możliwość użycia leków antynowotworowych w terapii nowotworów męskiego układu rozrodczego.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Agrawal R., Bedwal R.S.: Effect of dietary zinc deficiency on metallothionein concentration of epididymal luminal fluids of weanling Wistar albino rats. *Indian J. Exp. Biol.*, 2003; 41: 118-122
- [2] Aitken R.J., Curry B.J.: Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid. Redox Signal.*, 2011; 14: 367-381
- [3] Aitken R.J., Roman S.D.: Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2008; 636: 154-171
- [4] Aydemir B., Kiziler A.R., Onaran I., Alici B., Ozkara H., Akyolcu M.C.: Impact of Cu and Fe concentrations on oxidative damage in male infertility. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2006; 112: 193-203
- [5] Aydılek N., Varisli O., Kocyigit A., Taskin A., Kaya M.S.: Effect of dietary restriction on sperm characteristic and oxidative status on testicular tissue in young rats exposed to long-term heat stress. *Andrologia*, 2015; 47: 1055-1061
- [6] Babaei H., Kheirandish R., Ebrahimi L.: The effects of copper toxicity on histopathological and morphometrical changes of the rat testes. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2012; 2: S1615-S1619
- [7] Beaudoin J., Ioannoni R., López-Maury L., Bähler J., Ait-Mohand S., Guérin B., Dodani S.C., Chang C.J., Labbé S.: Mfc1 is a novel forespore membrane copper transporter in meiotic and sporulating cells. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 34356-34372
- [8] Beaudoin J., Ioannoni R., Mailloux S., Plante S., Labbé S.: Tran-

scriptional regulation of the copper transporter Mfc1 in meiotic cells. *Eukaryot. Cell.*, 2013; 12: 575-590

- [9] Benagiano G., Gabelnick H., Farris M.: Contraceptive devices: intravaginal and intrauterine delivery systems. *Expert Rev. Med. Devices*, 2008; 5: 639-654
- [10] Bonda E., Włostowski T., Krasowska A.: Testicular toxicity induced by dietary cadmium is associated with decreased testicular zinc and increased hepatic and renal metallothionein and zinc in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Biometals*, 2004; 17: 615-624
- [11] Brown M.A., Stenberg L.M., Mauk A.G.: Identification of catalytically important amino acids in human ceruloplasmin by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.*, 2002; 520: 8-12
- [12] Celino F.T., Yamaguchi S., Miura C., Ohta T., Tozawa Y., Iwai T., Miura T.: Tolerance of spermatogonia to oxidative stress is due to high levels of Zn and Cu/Zn superoxide dismutase. *PLoS One*, 2011; 6: e16938
- [13] Chattopadhyay A., Sarkar M., Sengupta R., Roychowdhury G., Biswas N.M.: Antitesticular effect of copper chloride in albino rats. *J. Toxicol. Sci.*, 1999; 24: 393-397
- [14] Chia S.E., Ong C.N., Chua L.H., Ho L.M., Tay S.K.: Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *J. Androl.*, 2000; 21: 53-57
- [15] Culotta V.C., Klomp L.W.J., Strain J., Casareno R.L.B., Krems B., Gitlin J.D.: The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 23469-23472
- [16] Cyr D.G., Dufresne J., Pillet S., Alfieri T.J., Hermo L.: Expression and regulation of metallothioneins in the rat epididymis. *J. Androl.*, 2001; 2: 124-135
- [17] De S.K., Enders G.C., Andrews G.K.: High levels of metallothionein messenger RNAs in male germ cells of the adult mouse. *Mol. Endocrinol.*, 1991; 5: 628-636
- [18] De Domenico I., Ward D.M., di Patti M.C.B., Jeong S.Y., David S., Musci G., Kaplan J.: Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J.*, 2007; 26: 2823-2831
- [19] de Lamirande E., Leclerc P., Gagnon C.: Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol. Hum. Reprod.*, 1997; 3: 175-194
- [20] Desai V., Kaler S.G.: Role of copper in human neurological disorders. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008; 88: 855S-858S
- [21] DiDonato M., Sarkar B.: Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997; 1360: 3-16
- [22] Esakky P., Hansen D.A., Drury A.M., Moley K.H.: Molecular analysis of cell type-specific gene expression profile during mouse spermatogenesis by laser microdissection and qRT-PCR. *Reprod. Sci.*, 2012; 20: 238-252
- [23] Formigari A., Irato P., Santon A.: Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 2007; 146: 443-459
- [24] Fortna R.R., Watson H.A., Nyquist S.E.: Glycosyl phosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is expressed by rat Sertoli cells and is concentrated in detergent-insoluble membrane fractions. *Biol. Reprod.*, 1999; 61: 1042-1049
- [25] Fridovich I.: Superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 18515-18517
- [26] Frydman M., Kauschansky A., Bonne-Tamir B., Nassar F., Homberg R.: Assessment of the hypothalamic-pituitary-testicular function in male patients with Wilson's disease. *J. Androl.*, 1991; 12: 180-184
- [27] Gancarczyk M., Paziewska-Hejmej A., Carreau S., Tabarowski Z., Bilińska B.: Dose – and photoperiod-dependent effects of 17 $\beta$ -estradiol and the anti-estrogen ICI 182,780 on testicular structure, acceleration of spermatogenesis, and aromatase immunoppression in immature bank voles. *Acta Histochem.*, 2004; 106: 269-278
- [28] Garratt M., Bathgate R., de Graaf S.P., Brooks R.C.: Copper-zinc superoxide dismutase deficiency impairs sperm motility and *in vivo* fertility. *Reproduction*, 2013; 146: 297-304
- [29] Gu W., Hecht N.R.: Translation of a testis-specific Cu/Zn superoxide dismutase (SOD-1) mRNA is regulated by a 65-kilodalton protein which binds to its 5' untranslated region. *Mol. Cell. Biol.*, 1996; 16: 4535-4543
- [30] Guo Y., Smith K., Lee J., Thiele D.J., Petris M.J.: Identification of methionine-rich clusters that regulate copper-stimulated endocytosis of the human Ctr1 copper transporter. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 17428-17433
- [31] Gupta A., Lutsenko S.: Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential. *Future Med. Chem.*, 2009; 1: 1125-1142
- [32] Halliwell B.: Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.*, 2007; 35: 1147-1150
- [33] Hatori Y., Lutsenko S.: An expanding range of functions for the copper chaperone/antioxidant protein Atox1. *Antioxid. Redox Signal.*, 2013; 19: 945-957
- [34] Hecht N.B.: Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays*, 1998; 20: 555-561
- [35] Huster D., Lutsenko S.: Wilson disease: not just a copper disorder. Analysis of a Wilson disease model demonstrates the link between copper and lipid metabolism. *Mol. Biosyst.*, 2007; 3: 816-824
- [36] Hüttemann M., Jaradat S., Grossman L.I.: Cytochrome c oxidase of mammals contains a testes-specific isoform of subunit VIb – the counterpart to testes-specific cytochrome c? *Mol. Reprod. Dev.*, 2003; 66: 8-16
- [37] Ioannoni R., Beaudoin J., Lopez-Maury L., Codlin S., Bahler J., Labbe S.: Cuf2 is a novel meiosis-specific regulatory factor of meiosis maturation. *PLoS One*, 2012; 7: e36338
- [38] Itoh S., Kim H.W., Nakagawa O., Ozumi K., Lessner S.M., Aoki H., Akram K., McKinney R.D., Ushio-Fukai M., Fukai T.: Novel role of antioxidant-1 (Atox1) as a copper-dependent transcription factor involved in cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 9157-9167
- [39] Itoh S., Ozumi K., Kim H.W., Nakagawa O., McKinney R.D., Folz R.J., Zelko I.N., Ushio-Fukai M., Fukai T.: Novel mechanism for regulation of extracellular SOD transcription and activity by copper: role of antioxidant-1. *Free Radic. Biol. Med.*, 2009; 46: 95-104
- [40] Jow W.W., Schlegel P.N., Cichon Z., Phillips D., Goldstein M., Bardin C.W.: Identification and localization of copper-zinc superoxide dismutase gene expression in rat testicular development. *J. Androl.*, 1993; 14: 439-447
- [41] Kantsler V., Dunkel J., Blayney M., Goldstein R.E.: Rheotaxis facilitates upstream navigation of mammalian sperm cells. *Elife*, 2014; 3: e02403
- [42] Kehr S., Malinouski M., Finney L., Vogt S., Labunsky V.M., Kasakina M.V., Carlson B.A., Zhou Y., Hatfield D.L., Gladyshev V.N.: X-ray fluorescence microscopy reveals the role of selenium in spermatogenesis. *J. Mol. Biol.*, 2009; 389: 808-818
- [43] Kelly E.J., Palmiter R.D.: A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein. *Nat. Genet.*, 1996; 13: 219-222
- [44] Khan R.U., Laudadio V., Tufarelli V.: Semen traits and seminal plasma biochemical parameters in white leghorn layer breeders. *Reprod. Domest. Anim.*, 2012; 47: 190-195
- [45] Knazicka Z., Tvrdá E., Bardos L., Lukac N.: Dose – and time-dependent effect of copper ions on the viability of bull spermatozoa



in different media. *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.*, 2012; 47: 1294-1300

- [46] Kodama H., Kuribayashi Y., Gagnon C.: Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J. Androl.*, 1996; 17: 151-157
- [47] 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 (*Atp7a<sup>mo-ms</sup>*). *Theriogenology*, 2007; 67: 423-434
- [48] Kowal M., Lenartowicz M., Pecio A., Gołas A., Błaszkiwicz T., Styrna J.: Copper metabolism disorders affect testes structure and gamete quality in male mice. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 2010; 56: 431-444
- [49] Kusakabe T., Nakajima K., Suzuki K., Nakazato K., Takada H., Satoh T., Oikawa M., Kobayashi K., Koyama H., Arakawa K., Nagamine T.: The changes of heavy metal and metallothionein distribution in testis induced by cadmium exposure. *Biometals*, 2008; 21: 71-81
- [50] Lara-Torre E., Spotswood L., Correia N., Weiss P.M.: Intrauterine contraception in adolescents and young women: a descriptive study of use, side effects, and compliance. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.*, 2011; 24: 39-41
- [51] Larson C.A., Blair B.G., Safaei R., Howell S.B.: The role of the mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of platinum-based drugs. *Mol. Pharmacol.*, 2009; 75: 324-330
- [52] Lassi K.C., Prohaska J.R.: Erythrocyte copper chaperone for superoxide dismutase is increased following marginal copper deficiency in adult and postweanling mice. *J. Nutr.*, 2012; 142: 292-297
- [53] Lee Y.Y., Choi C.H., Do I.G., Song S.Y., Lee W., Park H.S., Song T.J., Kim M.K., Kim T.J., Lee J.W., Bae D.S., Kim B.G.: Prognostic value of the copper transporters, CTR1 and CTR2, in patients with ovarian carcinoma receiving platinum-based chemotherapy. *Gynecol. Oncol.*, 2011; 122: 361-365
- [54] Leichtmann-Bardoogo Y., Cohen L.A., Weiss A., Marohn B., Schubert S., Meinhardt A., Meyron-Holtz E.G.: Compartmentalization and regulation of iron metabolism proteins protect male germ cells from iron overload. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2012; 302: E1519-E1530
- [55] Lenartowicz M., Grzmil P., Shoukier M., Starzyński R., Marciniak M., Lipiński P.: Mutation in the CPC motif-containing 6th transmembrane domain affects intracellular localization, trafficking and copper transport efficiency of ATP7A protein in *mosaic* mutant mice – an animal model of Menkes disease. *Metallomics*, 2012; 4: 197-204
- [56] Lenartowicz M., Krzeptowski W.: Structure and function of ATP7A and ATP7B proteins – Cu-transporting ATPases. *Postępy Biochem.*, 2010; 56: 317-327
- [57] Lenartowicz M., Sasuła K.: Altered copper metabolism in the mosaic mutant mice. *Nutr. Res.*, 2000; 20: 1467-1471
- [58] Lenartowicz M., Starzyński R.R., Krzeptowski W., Grzmil P., Bednarz A., Ogórek M., Pierzchała O., Staroń R., Gajowiak A., Lipiński P.: Haemolysis and perturbations in the systemic iron metabolism of suckling, copper-deficient mosaic mutant mice – an animal model of Menkes disease. *PLoS One*, 2014; 9: e107641
- [59] Lenartowicz M., Wiczerzak K., Krzeptowski W., Dobosz P., Grzmil P., Starzyński R., Lipiński P.: Developmental changes in the expression of the *Atp7a* gene in the liver of mice during the postnatal period. *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.*, 2010; 313: 209-217
- [60] Lenartowicz M., Windak R., Tylko G., Kowal M., Styrna J.: Effects of copper supplementation on the structure and content of elements in kidneys of mosaic mutant mice. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2010; 136: 204-220
- [61] Letelier M.E., Sánchez-Jofré S., Peredo-Silva L., Cortés-Troncoso J., Aracena-Parks P.: Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects. *Chem. Biol. Interact.*, 2010; 188: 220-227
- [62] Liang G., Zhang X.D., Wang L.J., Sha Y.S., Zhang J.C., Miao S.Y., Zong S.D., Wang L.F., Koide S.S.: Identification of differentially expressed genes of primary spermatocyte against round spermatid isolated from human testis using the laser capture microdissection technique. *Cell Res.*, 2004; 14: 507-512
- [63] Lindley P.F., Card G., Zaitseva I., Zaitsev V., Reinhammar B., Selin-Lindgren E., Yoshida K.: An X-ray structural study of human ceruloplasmin in relation to ferroxidase activity. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1997; 2: 454-463
- [64] Liu N., Lo L.S., Askary S.H., Jones L., Kidane T.Z., Trang T., Nguyen M., Goforth J., Chu Y.H., Vivas E., Tsai M., Westbrook T., Linder M.C.: Transcuprein is a macroglobulin regulated by copper and iron availability. *J. Nutr. Biochem.*, 2007; 18: 597-608
- [65] Løvstad R.A.: Copper catalyzed oxidation of ascorbate (vitamin C). Inhibitory effect of catalase, superoxide dismutase, serum proteins (ceruloplasmin, albumin, apotransferrin) and amino acids. *Int. J. Biochem.*, 1987; 19: 309-313
- [66] Lutsenko S., Barnes N.L., Bartee M.Y., Dmitriev O.Y.: Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol. Rev.*, 2007; 87: 1011-1046
- [67] Maeda Y., Kinoshita T.: Structural remodeling, trafficking and functions of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Prog. Lipid Res.*, 2011; 50: 411-424
- [68] Mansour D., Gemzell-Danielsson K., Inki P., Jensen J.T.: Fertility after discontinuation of contraception: a comprehensive review of the literature. *Contraception*, 2011; 84: 465-477
- [69] Marklund S.L.: Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem. J.*, 1984; 222: 649-655
- [70] Marzec-Wróblewska U., Kamiński P., Lakota P., Szymański M., Wasilow K., Ludwikowski G., Kuligowska-Prusińska M., Odroważ-Sypniewska G., Stuczyński T., Michałkiewicz J.: Zinc and iron concentration and SOD activity in human semen and seminal plasma. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2011; 143: 167-177
- [71] Milani P., Gagliardi S., Cova E., Cereda C.: SOD1 transcriptional and posttranscriptional regulation and its potential implications in ALS. *Neurol. Res. Int.*, 2011; 2011: 458427
- [72] Miska-Schramm A., Kruczek M., Kapusta J.: Effect of copper exposure on reproductive ability in the bank vole (*Myodes glareolus*). *Ecotoxicology*, 2014; 23: 1546-1554
- [73] Morales C., Sylvester S.R., Griswold M.D.: Transport of iron and transferrin synthesis by the seminiferous epithelium of the rat in vivo. *Biol. Reprod.*, 1987; 37: 995-1005
- [74] Mruk D., Cheng C.H., Cheng Y.H., Mo M.Y., Grima J., Silvestrini B., Lee W.M., Cheng C.Y.: Rat testicular extracellular superoxide dismutase: its purification, cellular distribution, and regulation. *Biol. Reprod.*, 1998; 59: 298-308
- [75] Mukai C., Travis A.J.: What sperm can teach us about energy production. *Reprod. Domest. Anim.*, 2012; 47: 164-169
- [76] Murawski M., Saczko J., Marcinkowska A., Chwiłkowska A., Gryboś M., Banaś T.: Evaluation of superoxide dismutase activity and its impact on semen quality parameters of infertile men. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2007; 45: S123-S126
- [77] Narisawa S., Hecht N.B., Goldberg E., Boatright K.M., Reed J.C., Millán J.L.: Testis-specific cytochrome c-null mice produce functional sperm but undergo early testicular atrophy. *Mol. Cell. Biol.*, 2002; 22: 5554-5562
- [78] Nevitt T., Ohrvik H., Thiele D.J.: Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1823: 1580-1593
- [79] Nishimura H., Nishimura N., Tohyama C.: Localization of metallothionein in the genital organs of the male rat. *J. Histochem. Cytochem.*, 1990; 38: 927-933

- [80] Nodera M., Yanagisawa H., Wada O.: Increased apoptosis in a variety of tissues of zinc-deficient rats. *Life Sci.*, 2001; 69: 1639-1649
- [81] Nose Y., Rees E.M., Thiele D.J.: Structure of the Ctr1 copper trans'PORE'ter reveals novel architecture. *Trends Biochem. Sci.*, 2006; 31: 604-607
- [82] O'Halloran T.V., Culotta V.C.: Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 25057-25060
- [83] Öhrvik H., Thiele D.J.: The role of Ctr1 and Ctr2 in mammalian copper homeostasis and platinum-based chemotherapy. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2015; 31: 178-182
- [84] Orlando C., Caldini A.L., Barni T., Wood W.G., Strasburger C.J., Natali A., Maver A., Forti G., Serio M.: Ceruloplasmin and transferrin in human seminal plasma: are they an index of seminiferous tubular function? *Fertil. Steril.*, 1985; 43: 290-294
- [85] Ozawa N., Goda N., Makino N., Yamaguchi T., Yoshimura Y., Sumatsu M.: Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. *J. Clin. Invest.*, 2002; 109: 457-467
- [86] Park K., Jeon S., Song Y.J., Yi L.S.: Proteomic analysis of boar spermatozoa and quantity changes of superoxide dismutase 1, glutathione peroxidase, and peroxiredoxin 5 during epididymal maturation. *Anim. Reprod. Sci.*, 2012; 135: 53-61
- [87] Patel B.N., Dunn R.J., David S.: Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 4305-4310
- [88] Peekker R., Abramsson L., Marklund S.L.: Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, 1997; 3: 1061-1066
- [89] Penkowa M., Florit S., Giral M., Quintana A., Molinero A., Carasco J., Hidalgo J.: Metallothionein reduces central nervous system inflammation, neurodegeneration, and cell death following kainic acid-induced epileptic seizures. *J. Neurosci. Res.*, 2005; 79: 522-534
- [90] Piasecka M., Gaczarzewicz D., Kurzawa R., Laszczyńska M., Kram A.: Diagnostic evaluation of oxidoreductive capability of sperm mitochondria. *Rocz. Akad. Med. w Białymst.*, 2004; 49: 108-110
- [91] Plante S., Ioannoni R., Beaudoin J., Labbé S.: Characterization of Schizosaccharomyces pombe copper transporter proteins in meiotic and sporulating cells. *J. Biol. Chem.*, 2014; 289: 10168-10181
- [92] Qin Z., Itoh S., Jeney V., Ushio-Fukai M., Fukai T.: Essential role for the Menkes ATPase in activation of extracellular superoxide dismutase: implication for vascular oxidative stress. *FASEB J.*, 2005; 20: 334-336
- [93] Roblero L., Guadarrama A., Lopez T., Zegers-Hochschild F.: Effect of copper ion on the motility, viability, acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1996; 8: 871-874
- [94] Roy D., Dey S., Majumder G.C., Bhattacharyya D.: Copper: a biphasic regulator of caprine sperm forward progression. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 2014; 60: 52-57
- [95] Rytka J., Palamarczyk G.: Yeast model of an eucaryotic organism in molecular biology. *Postępy Biochem.*, 1993; 39: 152-155
- [96] Safaei R.: Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett.*, 2006; 234: 34-39
- [97] Sakhaee E., Abshenas J., Emadi L., Azari O., Kheirandish R., Samaneh A.: Effects of vitamin C on epididymal sperm quality following experimentally induced copper poisoning in mice. *Comp. Clin. Path.*, 2014; 23: 181-186
- [98] Salsabili N., Mehraei A.R., Jalaie S.: Concentration of blood and seminal plasma elements and their relationships with semen parameters in men with spinal cord injury. *Andrologia*, 2009; 41: 24-28
- [99] Saunders P.T., Millar M.R., West A.P., Sharpe R.M.: Mitochondrial cytochrome C oxidase II messenger ribonucleic acid is expressed in pachytene spermatocytes at high levels and in a stage-dependent manner during spermatogenesis in the rat. *Biol. Reprod.*, 1993; 48: 57-67
- [100] Sharma M.C., Joshi C., Pathak N.N., Kaur H.: Copper status and enzyme, hormone, vitamin and immune function in heifers. *Res. Vet. Sci.*, 2005; 79: 113-123
- [101] Skandhan K.P.: Review on copper in male reproduction and contraception. *Rev. Fr. Gynecol. Obstet.*, 1992; 87: 594-598
- [102] Skrzycki M., Czeczot H.: Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) – structure, properties and functions. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 301-311
- [103] Sohal R.S., Toy P.L., Allen R.G.: Relationship between life expectancy, endogenous antioxidants and products of oxygen free radical reactions in the housefly, *Musca domestica*. *Mech. Ageing Dev.*, 1986; 36: 71-77
- [104] Srinivasan S., Avadhani N.G.: Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012; 53: 1252-1263
- [105] Steiger D., Fetchko M., Vardanyan A., Atanesyan L., Steiner K., Turski M.L., Thiele D.J., Georgiev O., Schaffner W.: The Drosophila copper transporter Ctr1C functions in male fertility. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 17089-17097
- [106] Suzuki T., Nakajima K., Yamamoto A., Yamanaka H.: Metallothionein binding zinc inhibits nuclear chromatin decondensation of human spermatozoa. *Andrologia*, 1995; 27: 161-164
- [107] Sylvester S.R., Griswold M.D.: Localization of transferrin and transferrin receptors in rat testes. *Biol. Reprod.*, 1984; 31: 195-203
- [108] Sylvester S.R., Griswold M.D.: The testicular iron shuttle: a "nurse" function of the Sertoli cells. *J. Androl.*, 1994; 15: 381-385
- [109] Tarnacka B., Rodo M., Cichy S., Członkowska A.: Procreation ability in Wilson's disease. *Acta Neurol. Scand.*, 2000; 101: 395-398
- [110] Telianidis J., Hung Y.H., Materia S., La Fontaine S.: Role of the P-type ATPases, ATP7A and ATP7B in brain copper homeostasis. *Front. Aging Neurosci.*, 2013; 5: 44
- [111] Tohyama C., Nishimura N., Suzuki J.S., Karasawa M., Nishimura H.: Metallothionein mRNA in the testis and prostate of the rat detected by digoxigenin-labeled riboprobe. *Histochemistry*, 1994; 101: 341-346
- [112] Tsunoda S., Kawano N., Miyado K., Kimura N., Fujii J.: Impaired fertilizing ability of superoxide dismutase 1-deficient mouse sperm during *in vitro* fertilization. *Biol. Reprod.*, 2012; 87: 121
- [113] Tümer Z., Møller L.B.: Menkes disease. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2010; 18: 511-518
- [114] Uriu-Adams J.Y., Keen C.L.: Copper, oxidative stress, and human health. *Mol. Aspects Med.*, 2005; 26: 268-298
- [115] van den Berghe P.V., Klomp L.W.: Posttranslational regulation of copper transporters. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2010; 15: 37-46
- [116] Vasák M.: Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2005; 19: 13-17
- [117] Vonk W.I., Klomp L.W.: Role of transition metals in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Soc. Trans.*, 2008; 36: 1322-1328
- [118] Walczak-Jedrzejowska R., Wolski J.K., Slowikowska-Hilczar J.: The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent. Eur. J. Urol.*, 2013; 66: 60-67
- [119] Walter C.A., Intano G.W., McCarrey J.R., McMahan C.A., Walter R.B.: Mutation frequency declines during spermatogenesis in young mice but increases in old mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 10015-10019
- [120] Wee N.K., Weinstein D.C., Fraser S.T., Assinder S.J.: The mam-

malian copper transporters CTR1 and CTR2 and their roles in development and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2013; 45: 960-963

[121] West E.C., Prohaska J.R.: Cu,Zn-superoxide dismutase is lower and copper chaperone CCS is higher in erythrocytes of copper-deficient rats and mice. *Exp. Biol. Med.*, 2004; 229: 756-764

[122] Wierzbicka D., Gromadzka G.: Ceruloplasmin, hephaestin and zyklopen: the three multicopper oxidases important for human iron metabolism. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68: 912-924

[123] Wijmenga C., Klomp L.W.: Molecular regulation of copper excretion in the liver. *Proc. Nutr. Soc.*, 2004; 63: 31-39

[124] Williams M.S., Kwon J.: T cell receptor stimulation, reactive oxygen species, and cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 37: 1144-1151

[125] Wright W.W., Musto N.A., Mather J.P., Bardin C.W.: Sertoli cells secrete both testis-specific and serum proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981; 78: 7565-7569

[126] Xia B., Chen H., Hu G., Wang L., Cao H., Zhang C.: The co-induced effects of molybdenum and cadmium on the trace elements and the mRNA expression levels of CP and MT in duck testicles. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2016; 169: 331-340

[127] Yamaguchi S., Miura C., Kikuchi K., Celino F.T., Agusa T., Tanabe S., Miura T.: Zinc is an essential trace element for spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 10859-10864

[128] Yamashita Y.M., Fuller M.T., Jones D.L.: Signaling in stem cell niches: lessons from the *Drosophila germline*. *J. Cell Sci.*, 2005; 118: 665-672

[129] Yuan D., Wang H., He H., Jia L., He Y., Wang T., Zeng X., Li Y., Li S., Zhang C.: Protective effects of total flavonoids from epimedium on the male mouse reproductive system against cyclophosphamide-induced oxidative injury by up-regulating the expressions of SOD3 and GPX1. *Phytother. Res.*, 2014; 28: 88-97

---

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.