

SZKODLIWY WPŁYW FLUTAMIDU NA UKŁAD ROZRODCZY SSAKÓW

Krzysztof Jakub Lustofin (Kraków)

Streszczenie

Rozwój żeńskiego oraz męskiego układu rozrodczego regulowany jest przez szereg hormonów. Liczne związki chemiczne występujące powszechnie w środowisku mogą wykazywać działanie agonistyczne lub antagonistyczne względem tych hormonów, powodując występowanie zaburzeń w rozwoju oraz funkcjonowaniu narządów rozrodczych już na etapie prenatalnym. Flutamid, zaliczany do grupy związków o działaniu antyandrogenym, wykazuje duże powinowactwo do receptorów androgenowych. Jego wiązanie się z receptorem androgenowym uniemożliwia przyłączenie testosteronu, co powoduje zahamowanie aktywności biologicznej tego hormonu. Dzięki tej właściwości flutamid jest stosowany jako lek przy leczeniu androgenozależnego nowotworu prostaty oraz hirsutyizmu (hiperandrogenizm), występującego między innymi u kobiet cierpiących na zespół policystycznych jajników. Oprócz zastosowania w medycynie wykorzystywany jest również jako model badawczy związków pochodzenia środowiskowego o potencjalnym działaniu antyandrogenym. Wiele badań potwierdza szkodliwy wpływ flutamidu na funkcjonowanie żeńskiego oraz męskiego układu rozrodczego. Prowadzi on u samic do zaburzenia przebiegu folikulogenezy oraz zmniejszenia puli dojrzewających pęcherzyków jajnikowych, natomiast u samców powoduje zaburzenie spermatogenezy oraz aktywności steroidogennej komórek Leydiga. Takie działanie flutamidu oraz innych związków o charakterze antyandrogenym może skutkować obniżeniem płodności u zwierząt oraz ludzi.

Abstract

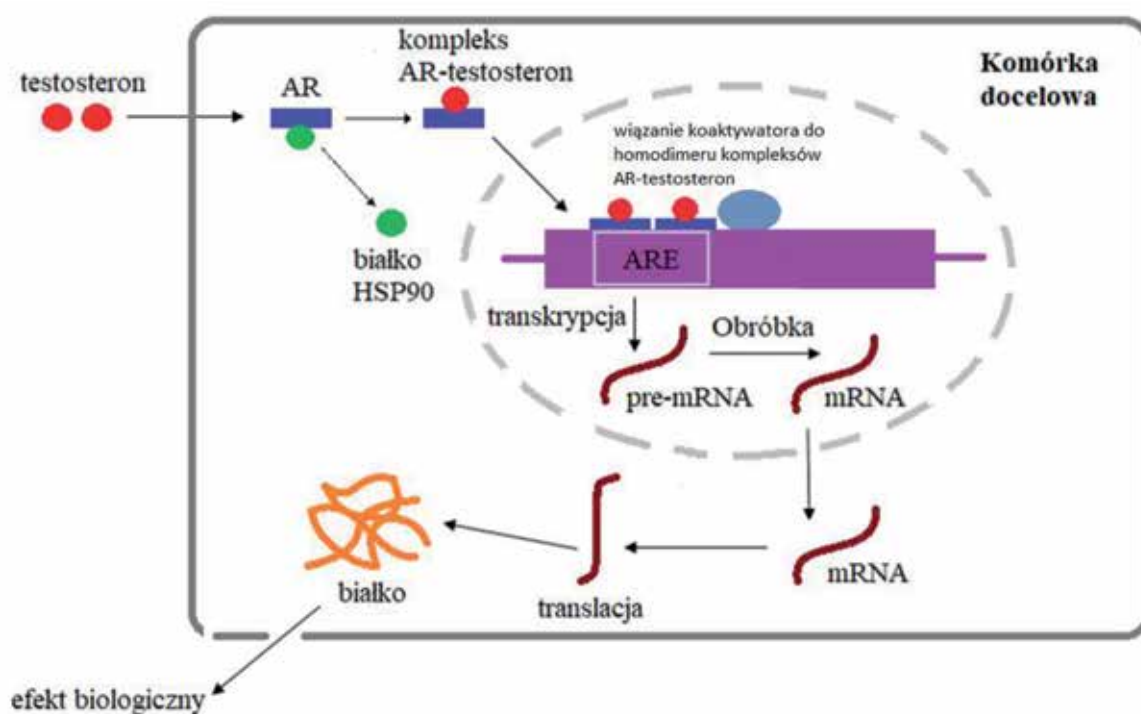
The development of female and male reproductive system is regulated by many hormones. Numerous chemical compounds commonly occurring in environment may demonstrate agonistic or antagonistic activity against these hormones, causing disturbances in growth and functioning of reproductive organs at the prenatal stage. Flutamide which belongs to the group of compounds with antiandrogenic activity, shows high affinity for androgen receptor. Once bound to the androgen receptor flutamide prevents the attachment of testosterone. As a result, the biological activity of this hormone is inhibited. Owing to this ability flutamide is used as a medicine for the treatment of androgen-dependent prostate cancer and hirsutism (hyperandrogenism) which occurs in women suffering from polycystic ovary syndrome. In addition to its use in medicine, it is also used as a research model of environmental compounds with potential antiandrogenic effects. Many studies confirm the harmful effect of flutamide on the functioning of the female and male reproductive system. In females it leads to disturbance of folliculogenesis and decrease the number of ovarian follicles, while in males it cause disturbance of spermatogenesis and steroidogenic activity of Leydig cells. Such action of flutamide and other antiandrogenic compounds may result in decreased fertility in animals and humans.

Prawidłowy rozwój zarówno żeńskiego, jak i męskiego układu rozrodczego, regulowany jest ściśle przez szereg czynników, w tym także przez hormony, już na etapie rozwoju płodowego. Do grupy tych związków zaliczamy androgeny, a ściślej ujmując testosteron. Jest to hormon steroidowy, który wykazuje działanie anaboliczne. Oznacza to, że wzmacnia on procesy metaboliczne w komórkach docelowych, które związane są ze stymulowaniem podziałów komórkowych oraz wzrostem tkanek. Androgeny pełnią kluczową rolę w regulacji prawidłowego rozwoju

oraz funkcjonowania męskiego układu rozrodczego, co wiąże się z produkcją zdrowych oraz zdolnych do zapłodnienia plemników. Niewielkie ilości androgenów są także produkowane w jajnikach ssaków. Stanowią one przede wszystkim substrat do syntezy estrogenów, które obok progesteronu są głównym hormonem regulującym funkcje jajnika. Liczne badania dowodzą, że androgeny również pełnią ważną rolę w inicjacji oraz regulacji przebiegu folikulogenezy, która jest niezbędna do wytworzenia prawidłowych żeńskich komórek rozrodczych [12, 14].

Zatem androgeny zaangażowane są w utrzymanie prawidłowych funkcji męskiego oraz żeńskiego układu rozrodczego, zapewniając płodność oraz sukces rozrodczy ssaków. Jednakże istotny wpływ na zdrowie człowieka mają przedostające się do środowiska liczne związki chemiczne, które mogą powodować zaburzenia związane z rozwojem układu rozrodczego. Zaburzenia te mogą występować już w okresie płodowym i tym samym znacząco obniżać płodność w życiu dorosłym. Substancje te określane są jako związki zaburzające funkcje hormonalne (EDC, ang. *endocrine disrupting chemicals*). EDC zaliczane są do ksenobiotyków. Pojawienie się EDC w środowisku jest wywołane przede wszystkim działalnością człowieka. Związki chemiczne zaliczane do EDC można podzielić na trzy grupy: syntetyzowane oraz

poziomach. Jedną z wielu grup związków wykazujących takie cechy są polibromowane difenyletery (PBDE, ang. *polybrominated diphenyl ether*), które są powszechnie stosowane jako środki ogniochronne, czyli substancje chemiczne dodawane do tworzyw sztucznych oraz innych materiałów, aby zmniejszyć ich palność. Przeprowadzone zostało badanie w celu wykrycia stężenia PBDE w wątrobach pobranych od dziko żyjących w środowisku wydr kanadyjskich oraz bielików amerykańskich. Badania wykazały zakres zawartości PBDE w wątrobie u wydr w wysokości 16,3-16,4 ng/g oraz 74,3-266,7 ng/g u bielików. Wyniki wskazują jednoznacznie na ekspozycję tych zwierząt na PBDE w środowisku oraz zdolność do bioakumulowania tego związku w organizmie [7]. Z kolei inne badanie wykazało obecność PBDE



Ryc.1 Schemat działania androgenów przez receptor androgenowy (opracowanie własne). Testosteron wnika swobodnie do komórki docelowej przez błonę komórkową i wiąże się z AR zlokalizowanym w cytoplazmie. Związanie się testosteronu powoduje oddysocjowanie białka HSP90 oraz dochodzi do dimeryzacji kompleksów testosteron-AR. Homodimer wędruje do jądra komórkowego, gdzie wiąże się do odpowiedniej sekwencji nukleotydowej ARE w obrębie DNA i następuje rekrutacja koaktywatorów. Dochodzi do inicjacji procesu transkrypcji, na skutek czego powstaje cząsteczka mRNA. W cytoplazmie w obrębie rybosomów ulega syntezie odpowiednie białko, którego sekwencja aminokwasowa jest zgodna z sekwencją nukleotydową mRNA. Nowo powstałe białko spełnia ściśle określoną funkcję biologiczną.

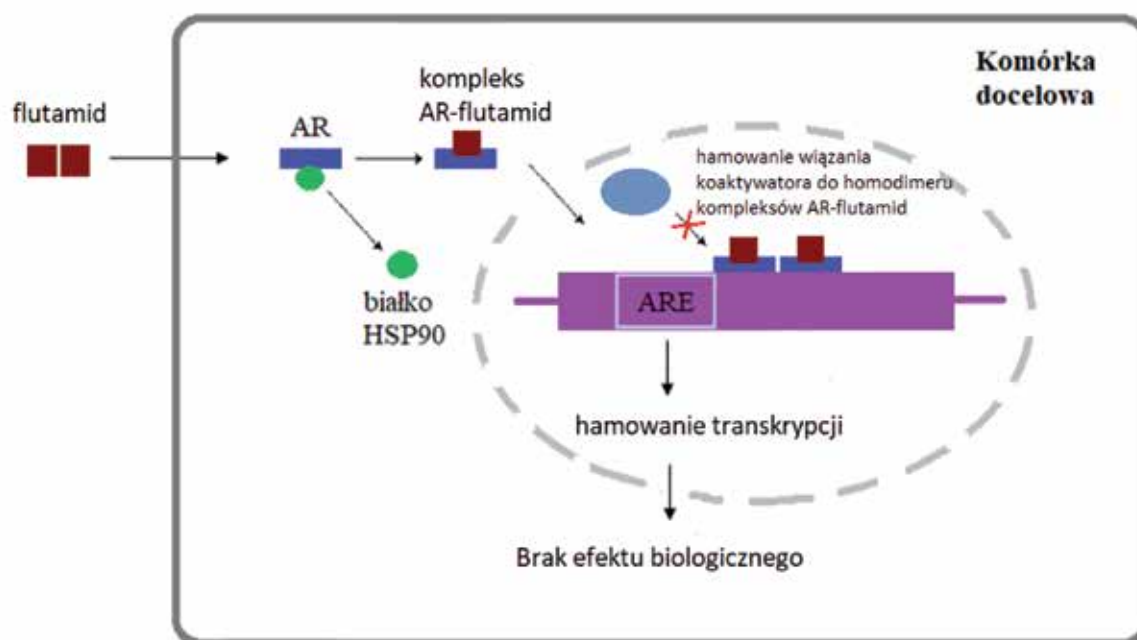
wykorzystywane w przemyśle, rolnictwie (środki ochrony roślin, pestycydy oraz fungicydy) oraz jako produkty codziennego użytku; związki syntetyczne wytwarzane w przemyśle farmaceutycznym; związki chemiczne pochodzenia naturalnego, znajdujące się w produktach spożywczych (fitoestrogeny) [5]. Związki EDC trafiające do środowiska charakteryzują się w większości wysoką trwałością oraz zdolnością do bioakumulacji w organizmach zwierzęcych, trafiając do łańcucha troficznego na różnych jego

i dwóch innych grup związków zaliczanych do EDC, takich jak: polichlorowane bifenyle (PCB, ang. *polychlorinated biphenyl*) oraz ftalan dwu-2-etyloheksylu (DEHP, ang. *bis(2-ethylhexyl) phthalate*) w jądrach pobranych od psów żyjących w warunkach domowych. Ponadto głównym aspektem tego badania była długoterminowa analiza jakościowa nasienia. Wykazała ona tendencję do obniżenia liczby plemników o prawidłowej morfologii oraz zmniejszenia ich ruchliwości, co skutkuje obniżeniem płodności u bada-

nych zwierząt. Dodatkowo obserwowano u potomstwa zwiększoną częstotliwość wnetrostwa, a także spadek proporcji narodzin samców względem samic, wskazując na aktywność ksenoestrogenną tych związków [20]. Ksenoestrogeny wykazują aktywność pochodną do estrogenów i podobnie jak one mogą się wiązać z receptorami estrogenowymi, modulując czynności układu hormonalnego. Przeprowadzono również badania kliniczne, w których to wykryto obecność ftalanu dibutyłu (DPB, ang. *dibutyl phthalate*) oraz DEHP w nasieniu pacjentów. Badania wykazały, że im większe było stężenie tych związków w nasieniu, tym mniejsza była liczba plemników. Zwiększał się także procent plemników o nieprawidłowej morfologii [26]. Dodatkowo badania prowadzone w ostatnich latach na samicach myszy dowiodły szkodliwego

przemysłowej, niemniej jednak istnieje duże prawdopodobieństwo wytwarzania nowych związków o takim samym mechanizmie działania i wprowadzania ich na rynek. W związku z tym od wielu lat prowadzone są badania mające na celu ustalić szkodliwe działanie związków chemicznych na żeński oraz męski układ rozrodczy. Jedną z powszechnie wykorzystywanych substancji w badaniach nad antyandrogenowym mechanizmem działania EDC jest flutamid, który, poprzez stworzenie środowiska odwzorowującego deficyt androgenów, pozwala ocenić ich rolę w rozwoju oraz funkcjonowaniu gonady żeńskiej oraz męskiej [2].

Zanim zostanie opisany charakter flutamidu oraz jego szkodliwy wpływ na gonadę żeńską i męską, należy wspomnieć o ogólnym działaniu hormonów.



Ryc. 2. Schemat działania flutamidu (opracowanie własne). Flutamid, wykazujący budowę lipofilną, swobodnie przechodzi przez błonę komórkową do wnętrza komórki docelowej i wiąże się z AR zlokalizowanym w cytoplazmie. Związanie się flutamidu powoduje oddysocjowanie białka HSP90 oraz następuje dimeryzacja kompleksów flutamid-AR. Homodimer wędruje do jądra komórki, gdzie wiąże się z DNA poza obszarem ARE i w konsekwencji rekrutacja koaktywatorów jest hamowana. Brak kompletnego kompleksu transkrypcyjnego uniemożliwia inicjację transkrypcji.

wpływu DEHP na proces dojrzewania pęcherzyków jajnikowych, zwany folikulogenezą. Zaburzenia obejmowały: zwiększoną apoptozę oocytów, zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu, zmniejszoną produkcję hormonów płciowych przez pęcherzyki jajnikowe, a także hamowanie wzrastania pęcherzyków na poszczególnych etapach dojrzewania [25]. Związki EDC, oprócz aktywności estrogenowej, mogą również wykazywać aktywność antyandrogeną. Związki te hamują biologiczną aktywność androgenów i skutkują wystąpieniem licznych patologii w rozwoju układu rozrodczego [13]. Duża część związków o takim szkodliwym działaniu została usunięta z produkcji

Hormony steroidowe, w tym także androgeny, posiadają budowę lipofilną i dobrze rozpuszczają się w tłuszczu, natomiast źle w wodzie. Takie cząsteczki z łatwością przenikają przez błonę komórkową do wnętrza komórki w procesie dyfuzji prostej. Receptor androgenowy (AR, ang. *androgen receptor*) zlokalizowany jest w cytoplazmie komórek docelowych, gdzie jest związany między innymi z białkiem szoku cieplnego 90 (Hsp90, ang. *heat shock protein 90*). AR tworzący kompleks z białkiem Hsp 90 przyjmuje konformację, która wykazuje duże powinowactwo do liganda, zaś małe do DNA. Testosteron lub dihydrotestosteron dostając się do wnętrza komórki docelowej

wiąże się z AR, co skutkuje inicjacją szeregu zdarzeń wewnątrzkomórkowych. takich jak: odłączenia się białka Hsp90 od AR, fosforylację AR oraz dimeryzację dwóch AR. Kompleksy homodimerów AR wędrują z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie następnie odszukują specyficzną sekwencję nukleotydową ARE (ARE, ang. *androgen response element*) i wiążą się z DNA. Wiązanie się kompleksów homodimerów AR z sekwencją ARE może powodować indukcję lub hamowanie transkrypcji poszczególnych genów [15].

Flutamid jest związkiem chemicznym zaliczanym do grupy niesteroidowych antyandrogenów (NSAA, ang. *nonsteroidal antiandrogen*). Jest to grupa związków, która wykazuje działanie antagonistyczne względem androgenów. NSAA stanowią grupę związków, które posiadają bardzo podobną budowę strukturalną względem testosteronu, dlatego też mogą one z nimi skutecznie konkurować o miejsce wiązania się z AR. Antyandrogeny wiążą się z AR, tworząc tym samym kompleks receptor-antyandrogen. Taki kompleks nie jest zdolny do wiązania się z DNA w regionie ARE i tym samym funkcja biologiczna testosteronu jest zahamowana poprzez zablokowanie miejsca wiążącego AR. Taka blokada powoduje brak indukcji procesu transkrypcji poszczególnych genów i zahamowanie syntezy odpowiednich białek [4].

Właściwości antyandrogenne NSAA, w tym także flutamidu, znalazły szerokie zastosowanie w medycynie. Są one wykorzystywane głównie w leczeniu androgenozależnego nowotworu prostaty występującego u mężczyzn oraz hirsutyizmu – powikłania pojawiającego się między innymi u kobiet cierpiących na zespół policystycznych jajników (PCOS, ang. *polycystic ovary syndrome*). Jedną z metod zapobiegania niekontrolowanego rozrostu gruczołu krokowego jest blokada AR przez podanie flutamidu. Uniemożliwia to tym samym stymulowanie przez androgeny komórek nowotworowych do podziałów za pośrednictwem tych receptorów. Z kolei kobietom dotkniętym PCOS towarzyszy zaburzona gospodarka hormonalna, która objawia się nieregularnym cyklem miesięczkowym lub nawet jego zahamowaniem oraz nadmierną produkcją androgenów. Zaburzony cykl miesięczkowy przeważnie skutkuje brakiem płodności u pacjentek. Natomiast zbyt duża ilość androgenów w organizmie w konsekwencji może prowadzić do hirsutyizmu, objawiającego się nadmiernym owłosieniem typu męskiego m.in. na twarzy, klatce piersiowej, pod pachami, w okolicach podbrzusza oraz nadbrzusza.

Istnieje wiele badań mówiących o szkodliwym wpływie flutamidu na rozwój układu rozrodczego, zarówno żeńskiego jak i męskiego. Badania prowadzone przez Durlej i wsp. (2011) [8] wykazały negatywny

wpływ flutamidu podanego w okresie prenatalnym u świń na proces folikulogenezy. Flutamid powodował obniżenie poziomu koneksyny 43 w pęcherzykach jajnikowych. Koneksyna jest białkiem budującym połączenia szczelinowe, czyli kanały umożliwiające kontakt oraz wymianę związków pomiędzy komórkami ziarnistymi pęcherzyka jajnikowego. Obniżona ilość takich połączeń wiązała się z zaburzeniem komunikacji pomiędzy komórkami ziarnistymi, czyli zakłóconym transportem substancji przez koneksyny. Nieprawidłowości te prowadziły do zmniejszenia podziałów komórek ziarnistych ściany pęcherzyków (spowalniało to wzrastanie oraz rozwój tych pęcherzyków) oraz obserwowano zwiększoną ilość pęcherzyków atretycznych (pęcherzyk, który nie osiąga dojrzałości, lecz ulega degradacji) [8]. Flutamid w ten sposób powoduje obniżenie płodności, jako że folikulogeneza jest procesem wzrastania pęcherzyków jajnikowych, zapewniających hermetyczne środowisko dla dojrzewających w ich obrębie oocytów. Prawidłowy przebieg tego procesu zakończony jest owulacją, czyli uwolnieniem zdrowej oraz zdolnej do zapłodnienia komórki jajowej do jajowodu. Podobne wyniki badań uzyskali Lenie S. i Smithz J. (2009)[21], którzy wykazali opóźnienie w rozwoju mysich pęcherzyków jajnikowych hodowanych w warunkach *in vitro* po podaniu flutamidu oraz bikalutamidu, który również jest antyandrogenem [21]. Wyniki te potwierdził także Laird i wsp. (2017) [19], którzy prowadzili badania nad wpływem testosteronu oraz DHT na rozwój pęcherzyków jajnikowych preantralnych, ze zwróceniem uwagi na ich interakcję z transformującym czynnikiem wzrostu (TGF- β , ang. *transforming growth factor- β*), które odgrywają ważną rolę we wzroście pęcherzyków na wczesnym etapie rozwoju. W tym celu wyizolowano pęcherzyki od niedojrzałych płciowo 15–16-dniowych myszy i następnie przeniesiono na płytkę z 96-dołkami, po jednym pęcherzyku na dołek. Badania wykazały, że zarówno testosteron, jak i DHT, stymulował wzrost pęcherzyków; znacznie zwiększał liczbę pęcherzyków, u których dochodziło do formowania się jamki antralnej (jamka powstająca w warstwie ziarnistej pęcherzyka na skutek przesącza osocza oraz sekrecji płynu pęcherzykowego przez komórki ziarniste; płyn wypełniający jamkę antralną zawiera: aminokwasy, białka, w tym enzymy, glikozoaminoglikany, cukry, sole oraz hormony; jamka pojawia się w dojrzewającym pęcherzyku). Natomiast wszystkie pozytywne efekty działania androgenów były hamowane w pęcherzykach hodowanych z dodatkiem flutamidu. Kluczowymi zmianami indukowanymi przez androgeny poprzez ścieżkę sygnalizacyjną TGF- β było obniżenie

nie ekspresji białek takich jak: hormon anty-Müllerowski (AMH, ang. *anti-Müllerian hormone*), białko morfogenetyczne kości-15 (BMP-15, ang. *bone morphogenetic protein-15*) oraz ich receptorów [19]. AMH jest białkiem, które wykazuje hamujące działanie na wzrost pęcherzyków preantralnych [9], natomiast BMP-15 wykazuje efekt dwufazowy. Na początku wzrastania BMP-15 stymuluje wzrost pęcherzyków, aczkolwiek w późniejszym czasie prowadzi do apoptozy oraz obniżenia tempa wzrostu pęcherzyków preantralnych u myszy [10]. Wyniki te wskazują na szeroki zakres działania androgenów na wzrost oraz funkcje pęcherzyków jajnikowych preantralnych. Przeprowadzone zostały również badania na myszach z usuniętym genem AR (ARKO, ang. *androgen receptor knockout*), które umożliwiły zbadanie roli androgenów w regulacji funkcji jajnika. U myszy ARKO obserwowano przede wszystkim mniejszą liczbę młodych w poszczególnych miotach, w porównaniu z osobnikami żyjącymi dziko w naturze, posiadającymi gen AR. Analiza histologiczna 8-tygodniowych dojrzałych płciowo myszy wykazała zwiększoną liczbę pęcherzyków atretycznych oraz zmniejszoną liczbę ciałek żółtych, co świadczyło o mniejszej liczbie pęcherzyków owulujących [23]. Zatem deficyt AR u tych myszy, analogicznie jak u traktowanych flutamidem, dowodzi, że zaburzenie sygnalizacji androgenowej prowadzi do poważnych nieprawidłowości w przebiegu folikulogenezy.

Badano także wpływ flutamidu na rozwój oraz funkcjonowanie męskiego układu rozrodczego. Badania prowadzone przez Anahara i wsp. (2004) [1] wykazały negatywny wpływ flutamidu na przebieg procesu spermatogenezy, odpowiedzialnego za wytwarzanie zdrowych i zdolnych do zapłodnienia plemników. U myszy nastrzykiwanych flutamidem w okresie neonatalnym zaobserwowano zaburzenia w obrębie spermatyd, które posiadały zdeformowany akrosom oraz kształt jądra komórkowego. Flutamid powodował również degenerację specjalizacji powierzchniowych, występujących pomiędzy komórkami Sertoliego a spermatydami. Specjalizacje powierzchniowe są to struktury specyficzne dla jądra, tworzące połączenia zakotwiczone. Umożliwiają one między innymi zakotwiczenie spermatyd w nabłonku plemnikotwórczym, zapewniając tym samym prawidłowy przebieg spermiogenezy, czyli przekształcenia spermatyd w plemniki [1]. Podobnie Kopera i wsp. (2011) [16] wykazali, że prenatalne oraz neonatalne podanie flutamidu powoduje nieprawidłowości w strukturze gonady męskiej knurów. Antyandrogen także powodował zahamowanie produkcji plemników oraz obserwowano wzmożoną ilość komórek

rozrodczych ulegających apoptozie [16]. Dodatkowo Kotula-Balak i wsp. (2012) [17] dowiedli w swoich badaniach, że prenatalne oraz neonatalne podanie flutamidu u knurów pociąga za sobą zaburzenia w strukturze oraz funkcjonowaniu komórek Leydiga, odpowiedzialnych w gonadzie męskiej za produkcję testosteronu [17].

W prowadzonych przeze mnie badaniach potwierdziłem szkodliwy wpływ flutamidu na rozwój żeńskiego układu rozrodczego w okresie płodowym u nornicy rudej (*Clethrionomys glareolus S.*) I pokolenia. Nornice rude zaliczane są do gatunków rozmnażających się sezonowo. Ich okres rozrodczy w warunkach naturalnych jest determinowany przez wiele czynników klimatycznych oraz dietę. Najważniejszym czynnikiem wydaje się być fotoperiod, czyli proporcja dnia oraz nocy w ciągu doby. Okres rozmnażania u tego gatunku rozpoczyna się wczesną wiosną na początku marca i trwa aż do końca września, podczas gdy w okresie późnojesiennym oraz w zimie zwierzęta nie wykazują aktywności seksualnej. Ciąża u nornicy rudej jest bardzo krótka i trwa zaledwie od 19 do 20 dni, natomiast potomstwo osiąga dojrzałość płciową już w przeciągu 8-9 tygodni, zarówno w przypadku samców, jak i samic. Dzięki temu w ciągu pojedynczego sezonu rozrodczego samica nornicy rudej jest w stanie wydać na świat 4 mioty liczące od 3 do 5 młodych. W laboratorium istnieje możliwość utrzymywania optymalnych warunków rozrodczych, dzięki czemu nornice rude mogą rozmnażać się i wydawać potomstwo przez cały rok [6, 18]. Cechy gatunkowe, takie jak krótki okres ciąży, duża ilość młodych w miocie oraz szybki czas dojrzewania płciowego czyni ten gatunek bardzo dobrym modelem badawczym. Zwierzęta te umożliwiają badanie wpływu różnych związków na rozwój organizmu nawet w kilku następujących po sobie pokoleniach w przeciągu krótkiego okresu. Dlatego też w swoim doświadczeniu wykorzystałem jako model badawczy nornicę rudą. W celu przeprowadzenia eksperymentu część samic ciężarnych, stanowiących grupę doświadczalną, nastrzyknięto w V dniu ciąży flutamidem, podczas gdy nornice rude grupy kontrolnej nastrzyknięto jedynie olejem lnianym. Następnie, po uzyskaniu dojrzałości płciowej przez potomstwo, zebrano jajniki do dalszych badań. Uzyskane wyniki badań dowodzą szkodliwego wpływu flutamidu na prawidłowy rozwój oraz funkcjonowanie gonady żeńskiej. Przede wszystkim zaburzony został przebieg procesu folikulogenezy. U nornic traktowanych flutamidem obserwowano zdecydowanie mniejszą liczbę pęcherzyków jajnikowych w poszczególnych stadiach rozwojowych, w tym także pęcherzyków

pierwotnych oraz zdolnych do owulacji. Zmniejszona pula pęcherzyków pierwotnych, od których inicjowana jest folikulogeneza, ustalana jest jeszcze na etapie rozwoju płodowego u samic [24]. Zmniejszenie liczby tych pęcherzyków po podaniu flutamidu powoduje obniżenie płodności u tych osobników. Ciekawym zjawiskiem, jakie zostało opisane, jest atrezja (degradacja) pęcherzyków w jajniku. Wykazano, że u osobników niedojrzałych występuje ona fizjologicznie w wysokim stopniu, jeszcze zanim samica osiągnie swoją dojrzałość płciową, co zaobserwowano na szczurach. Stwierdzono, że pierwsza fala pęcherzyków w ogóle nie dojrzewa, lecz zostaje skierowana na drogę atrezji [11]. Wzmoczoną atrezię pęcherzyków jajnikowych natomiast obserwowano u dojrzałych nornic rudych po podaniu flutamidu. W analizie histologicznej wykazano również obecność ciałek żółtych, których pojawienie się jest zaskakujące, bowiem owulacja u tych zwierząt zachodzi w sposób indukowany. Ciało żółte jest przekształconym pęcherzykiem jajnikowym, które wykształca się po owulacji. Aby doszło do owulacji u nornic rudych, najpierw musi dojść do kopulacji z samcem, dzięki czemu zachodzą zmiany w wydzielaniu lutropiny (LH) przez część gruczołową przysadki mózgowej. Nagły wyrzut dużej ilości LH umożliwia inicjację owulacji [3]. Samice nornicy I pokolenia, wykorzystane w przedstawionych tu badaniach, pozostawały w izolacji od samców przez cały okres życia. Również radioimmunologiczna analiza zawartości progesteronu w homogenatach jajników wykazała znacznie wyższy poziom tego hormonu u nornic nastrzykiwanych flutamidem w porównaniu z grupą kontrolną. Tak więc w jajnikach nornic rudych traktowanych *in utero* flutamidem zaobserwowano obecność ciałek żółtych oraz wyższy poziom progesteronu, w przeciwieństwie do grupy kontrolnej, sugerując ewentualne działanie flutamidu jako czynnika indukującego owulację [22].

Podsumowując, flutamid może wpływać szkodliwie na płodność, zarówno samic, jak i samców, poprzez zaburzenie podstawowych funkcji gonad. Blokowanie AR pociąga za sobą zahamowanie aktywności biologicznej androgenów, które są niezbędne do

prawidłowego przebiegu kluczowych procesów prowadzących do wytworzenia zdolnych do zapłodnienia komórek rozrodczych. Zatem flutamid, wykorzystywany jako modelowy związek do badań mechanizmu działania antyandrogenów, sugeruje potencjalnie szkodliwy wpływ EDC o podobnej aktywności. Biorąc pod uwagę wysoki stopień zanieczyszczenia środowiska związkami EDC, charakteryzującymi się długim okresem rozpadu oraz zdolnością do bioakumulacji w organizmach żywych, stanowią one realne zagrożenie dla zdrowia oraz płodności, zarówno zwierząt żyjących dziko w naturze, jak i domowych, a także przede wszystkim dla ludzi. Pomimo wzrastającej świadomości zagrożenia ze strony EDC, wciąż istnieje problem niewystarczającej skuteczności usuwania tych związków w klasycznych procesach oczyszczania ścieków. Obiecująca wydaje się być bioremediacja ksenobiotyków, która polega na wykorzystywaniu mikroorganizmów oraz enzymów wydzielanych przez nie do metabolizowania szkodliwych związków do metabolitów mniej toksycznych lub całkowicie nieszkodliwych. Niemniej jednak ciągła akumulacja szkodliwych ksenobiotyków w ekosystemach wskazuje, iż metoda ta może nie być wystarczająca do skutecznej ochrony środowiska przed zanieczyszczeniami. Należy także uświadamiać społeczeństwu problem obecności EDC w środowisku, w którym żyjemy, gdyż związki te mogą powodować obniżenie parametrów nasienia u mężczyzn oraz zaburzać cykl miesięczkowy u kobiet. Procesy te mogą w przyszłości wywołać niż demograficzny.

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować Pani prof. dr hab. Barbarze Bilińskiej (Kierownikowi Zakładu Endokrynologii UJ w Krakowie) za możliwość wykonania pracy magisterskiej w Jej Zakładzie.

Chciałbym także gorąco podziękować Pani dr hab. Małgorzacie Kotuli-Balak oraz Panu dr hab. Jerzemu Galasowi za opiekę naukową oraz wszelką pomoc, zarówno przy wykonywaniu mojej pracy, jak i pisanii artykułu.

Bibliografia

1. Anahara R., Toyama Y., Mori C. (2004) Flutamide induces ultrastructural changes in spermatids and the ectoplasmic specialization between the Sertoli cell and spermatids in mouse testes. *Reproductive Toxicology*, 18: 589-596.
-

2. Ankley G.T., Defoe D.L., Kahl M.D., Jensen K.M., Makynen E.A., Miracle A., Hartig P., Gray L.E., Cardon M., Wilson V. (2004) Evaluation of the Model Anti-androgen Flutamide for Assessing the Mechanistic Basis of Responses to an Androgen in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Science & Technology*, 38: 6322-6327.
 3. Bakker J., Baum M.J. (2000) Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21: 220-262.
 4. Berrevoets C.A., Umar A., Brinkmann A.O. (2002) Antiandrogens: selective androgen receptor modulators. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 198: 97-103.
 5. Brevini T.A., Zanetto S.B., Cillo F. (2005) Effects of endocrine disruptors on developmental and reproductive functions. *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 5: 1-10.
 6. Clarke J.R. (1985) The reproductive biology of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*). *Zoological Symposium*, 55: 33-59.
 7. Dornbos P., Chernyak S., Rutkiewicz J., Cooley T., Strom S., Batterman S., Basu N. (2015) Hepatic polybrominated diphenyl ether (PBDE) levels in Wisconsin river otters (*Lontra canadensis*) and Michigan bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*). *Journal of Great Lakes Research*, 41: 222-227.
 8. Durliej M., Knapczyk-Stwora K., Duda M., Kopera-Sobota I., Hejmej A., Bilińska B., Słomczyńska M. (2011) Prenatal and neonatal exposure to the antiandrogen flutamide alters connexin 43 gene expression in adult porcine ovary. *Domestic Animal Endocrinology*, 40: 19-29.
 9. Durlinger A.L., Gruijters M.J., Kramer P., Karels B., Ingraham H.A., Nachtigal M.W., Uilenbroek J.T., Grootegoed J.A., Themmen A.P. (2002) Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, 143: 1076-1084.
 10. Fenwick M.A., Mora J.M., Mansour Y.T., Baithun C., Franks S., Hardy K. (2013) Investigations of TGF- β signaling in preantral follicles of female mice reveal differential roles for bone morphogenetic protein 15. *Endocrinology*, 154: 3423-3436.
 11. Galas J., Słomczyńska M., Knapczyk-Stwora K., Durliej M., Starowicz A., Tabarowski Z., Rutka K., Szołtys M. (2012) Steroid levels and the spatiotemporal expression of steroidogenic enzymes and androgen receptor in developing ovaries of immature rats. *Acta Histochemica*, 114: 207-216.
 12. Gervásio C.G., Bernuci M.P., Silva-de-Sá M.F., Rosa-E-Silva A.C. (2014) The role of androgen hormones in early follicular development. *ISRN Obstetrics and Gynecology*, 2014: 818010.
 13. Kelce W.R., Gray L.E., Wilson E.M. (1998) Antiandrogens as environmental endocrine disruptors. *Reproduction, Fertility and Development*, 10: 105-111.
 14. Kimura S., Matsumoto T., Matsuyama R., Shiina H., Sato T., Takeyama K., Kato S. (2007) Androgen receptor function in folliculogenesis and its clinical implication in premature ovarian failure. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 18: 183-189.
 15. Klein A. (2002) Molekularne podstawy regulacji hormonalnej. Wydane przez: Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 28-31.
 16. Kopera I., Durliej M., Hejmej A., Knapczyk-Stwora K., Duda M., Słomczyńska M., Bilińska B. (2011) Differential expression of connexin 43 in adult pig testes during normal spermatogenic cycle and after flutamide treatment. *Reproduction in Domestic Animals*, 46: 1050-1060.
 17. Kotula-Balak M., Hejmej A., Kopera I., Łydka M., Bilińska B. (2012) Prenatal and neonatal exposure to flutamide affects function of Leydig cells in adult boar. *Domestic Animal Endocrinology*, 42: 142-154.
 18. Kruczek M. (1986) Seasonal effects on sexual maturation of male bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Journal of Reproduction & Fertility*, 76: 83-89.
 19. Laird M., Thomson K., Fenwick M., Mora J., Franks S., Hardy K. (2017) Androgen Stimulates Growth of Mouse Preantral Follicles In Vitro: Interaction With Follicle-Stimulating Hormone and With Growth Factors of the TGF β Superfamily. *Endocrinology*, 158: 920-935.
 20. Lea R.G., Byers A.S., Sumner R.N., Rhind S.M., Zhang Z., Freeman S.L., Moxon R., Richardson H.M., Green M., Craigmiles J., England G.C. (2016) Environmental chemicals impact dog semen quality in vitro and may be associated with a temporal decline in sperm motility and increased cryptorchidism. *Scientific Reports*, 6: 31281.
 21. Lenie S., Smits J. (2009) Functional AR signaling is evident in an in vitro mouse follicle culture bioassay that encompasses most stages of folliculogenesis. *Biology of Reproduction*, 80: 685-695.
-

22. Lustofin Krzysztof (2018) Immunoekspresja białek szlaku steroidogenezy po prenatalnej ekspozycji na flutamid samic nornicy rudej. Praca magisterska wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Małgorzaty Kotuli-Balak oraz Pana dr hab. Jerzego Galasa w Zakładzie Endokrynologii, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii UJ w Krakowie.
23. Matsumoto T., Shiina H., Kawano H., Sato T., Kato S. (2008) Androgen receptor functions in male and female physiology. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109: 236-241.
24. Pepling M.E., Spradling A.C. (2001) Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental Biology*, 234: 339-351.
25. Tripathi A., Dubey P.K., Pandey V.K., Tripathi G., Hazarika S., Sairam K., Sahu A.N. (2018) Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and ovarian physiology: A brief review of therapeutic potential of *Asparagus racemosus* on DEHP-induced toxicity. *Journal of Medicinal Plant and Herbal Therapy Research*, 6: 9-18.
26. Wang Y.X., You L., Zeng Q., Sun Y., Huang Y.H., Wang C., Wang P., Cao W.C., Yang P., Li Y.F., Lu W.Q. (2015) Phthalate exposure and human semen quality: Results from an infertility clinic in China. *Environmental Research*, 142: 1-9.