

AUTOREFERAT

1. Imię i Nazwisko: António Galvão

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne:

lipiec 2007 – grudzień 2011 – tytuł doktora nauk weterynaryjnych (Doktorat Europejski). Uniwersytet w Lizbonie, Portugalia. Tytuł rozprawy: “*New insights in the immuno-endocrine regulation of equine reproduction: in vitro studies on luteal and endometrial function*”; promotor pracy prof. G. Ferreira-Dias

wrzesień 2000 – wrzesień 2006 – lekarz weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej (FMV), Uniwersytet w Lizbonie. Ocena końcowa: 16/20 (wśród 2% najlepiej ocenionych)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych
Od 12.2017- stypendysta Marie Currie, Dr Gavin Kelsey Lab, Babraham Institute, Cambridge, Wielka Brytania

05.2014 - 11.2017 – pracownik naukowy, Zakład Immunologii i Patologii Rozrodu, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności (IRZiBZ), Polska Akademia Nauk (PAN), Olsztyn, Polska. Kierownik zakładu – Prof. D.J. Skarzyński

07.2013 - 05.2014 – stypendysta typu post-doc w zespole Prof. D.J. Skarzyńskiego, IRZiBZ

01.2012 - 07.2013 - stypendysta typu post-doc w zespole Prof. G. Ferreira-Dias, Centrum Interdyscyplinarnych Badań Zdrowia Zwierząt (CIISA), Wydział Medycyny Weterynaryjnej (FMV), Uniwersytet w Lizbonie, Portugalia

07.2007 - 12.2011 – student studiów doktoranckich, zespół Prof. G. Ferreira –Dias, CIISA, FMV

06.2006 – 07.2007 – współpracownik naukowy, zespół Prof. G. Ferreira-Dias, FMV

Stáže naukowo-badawcze:

12.2017- 12.2019 stypendium indywidualne Marii Skłodowskiej-Curie, MSCA – Horyzont 2020: “*Maternal Obesity and Epigenetic Reprogramming: from Gametogenesis to Early Embryonic Development*”, 24-miesięczny staż, Babraham Institute, Cambridge, Wielka Brytania

04.2016 - 10.2016 KNOW Konsorcjum Naukowe "Zdrowe Zwierzę- Zdrowa Żywność" 6-miesięczny staż: "*Regulation of epigenetic events in the mouse oocyte*"; zespół Dr G. Kelsey, Babraham Institute, Cambridge, Wielka Brytania

05.2015 szkolenie z zakresu epigenetyki w biologii rozrodu, COST Action FA1201, 18-21 Maj, Uniwersytet w Murcji, Murcia, Hiszpania

12.2014 – 02.2015 krótkoterminowa misja "*EPICONCEPT - Epigenetics and Periconception Environment*", COST Action FA1201, "*Impact of diet induced obesity on oocyte epigenome using the mouse model*" Program epigenetyczny; 3-miesięczny staż, Dr G. Kelsey Lab Babraham Institute, Cambridge, Wielka Brytania

01.2012 - 01.2015 stypendysta typu post- doc w dziedzinie medycyny weterynaryjnej, *Portuguese Science Foundation (PSF)* (SFRH/BPD/79001/2011). Pierwsze miejsce w rankingu, zespół Prof. G. Ferreira-Dias, CIISA FMV, Portugalia

07.2007- 07.2011 stypendium doktorskie finansowane przez PSF (SFRH/BD/29765/2006), zespół Prof. G. Ferreira-Dias, CIISA FMV, Portugalia

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

a) Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

Rola cytokin z nadrodzin transformującego czynnika wzrostu β oraz czynnika martwicy nowotworu w regulacji funkcji ciała żółtego klaczy

b) Prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

- 1. Galvao AM, Szostek AZ, Skarzynski DJ, Ferreira-Diaz GM. (2013)** Role of Tumor necrosis factor- α , Interferon- γ and Fas-ligand on In Vitro Nitric Oxide Activity in the Corpus Luteum. *Cytokine* 64 (1): 18-21. (IF 2013: 2.874, MNiSW points 2013: 25, citations: 4)
- 2. Galvao AM, Skarzynski DJ, Ferreira-Diaz GM. (2016)** Nodal Promotes Functional Luteolysis via downregulation of Progesterone and Prostaglandins E2 and Promotion of PGF2 α Synthetic Pathways in Mare Corpus Luteum. *Endocrinology* 157: 858-71. (IF 2016: 4.286, MNiSW points: 35, citations: 6)
- 3. Galvao AM, Wolodko K, Reborado MR, Skarzynski DJ, Ferreira-Diaz GM. (2018)** TGFB1 Modulates In Vitro Secretory Activity and Viability of Equine Luteal Cells.

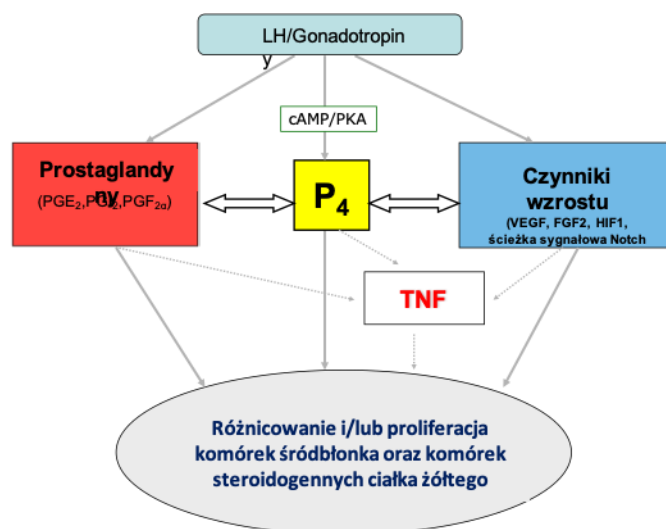
Cytokine 110: 316-327. (IF 2018: 3.514, MNiSW points 2016: 25 (MNiSW points 2018 are not available), citations: 0)

4. **Galvao AM**, Skarzynski DJ, Ferreira-Diaz GM. (2018) Luteolysis and the Auto-, Paracrine Role of Cytokines from Tumor Necrosis Factor α and Transforming Growth Factor B Superfamilies. *Vitamins and Hormones* 107:287-315 (IF 2017: 3.286 (IF 2018 is not available), MNiSW points 2016: 20 (MNiSW points 2018 are not available), citations: 0)

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Wstęp

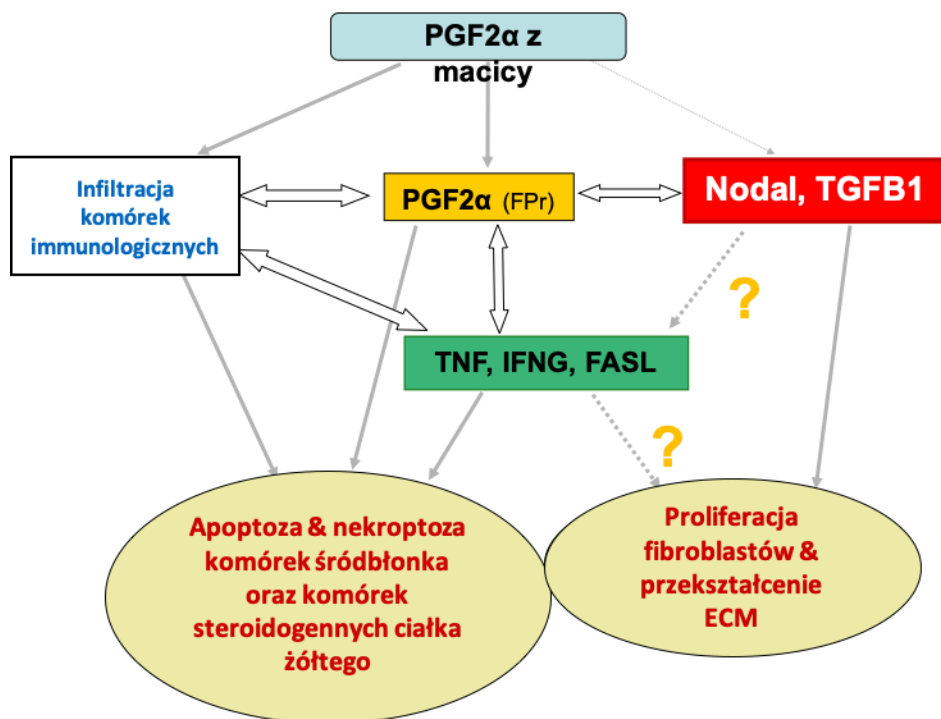
Regulacja funkcjonowania ciała żółtego (łac. *Corpus Luteum*, CL) jest jednym z najbardziej złożonych mechanizmów fizjologicznych występujących w żeńskim układzie rozrodczym ssaków. Prawidłowe funkcjonowanie CL jest czynnikiem determinującym zapłodnienie i utrzymanie ciąży. Proces ten jest zależny od złożonej sieci wzajemnych oddziaływań o charakterze lokalnym i systemowym. Formowanie i działalność endokrynną ciałek żółtych jest efektem intensywnych procesów biologicznych związanych ze zmianami w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *Extracellular Matrix*) oraz angiogenezy. Z wyjątkiem tkanki nowotworowej, analogiczne zjawiska nie zachodzą w żadnym innym organie. Dlatego też, zaraz po owulacji, pod wpływem regulacyjnego działania hormonu luteinizującego (ang. *luteinizing hormone*, LH), naczynia i komórki pozostałe po pęknięciu pęcherzyka, różnicują się w komórki ciała żółtego [1]. Ostatecznie, powstaje nowa sieć naczyń krwionośnych, a pozostała tkanka w wyniku dojrzewania aparatu enzymatycznego nabywa zdolności sekrecyjnej niezbędnej do produkcji progesteronu (P4) (Ryc. 1).



Ryc. 1 Lokalne interakcje podczas powstawania ciała żółtego. Hormon luteinizujący (LH) pośredniczy w wydzielaniu progesteronu (P4) poprzez aktywację cyklicznego adenozylo-3',5'-monofosforanu (cAMP)/kinazy białkowej A (PKA). Za sekrecją P4 i rozwój CL odpowiadają również prostaglandyny (PG), czynniki wzrostu, takie jak: czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego A (VEGF A), czynnik indukowany hipoksją 1 (HIF-1), ścieżka sygnałowa białka Notch, czy też czynnik martwicy nowotworów (TNF- α).

U klaczy proces formowania się ciała żółtego jest dynamiczny i już po 3 dniach od owulacji CL jest w pełni rozwinięte i zdolne do sekrecji dużych ilości P4. [2]. Podczas środkowej fazy lutealnej zapada decyzja, jaki los czeka CL. Regresja CL jest podstawą do wznowienia cyklu rujowego i jest głównie inicjowana przez luteolityczne działanie prostaglandyny F2 α (PGF2 α) syntezowanej w macicy. Działając na CL, PGF2 α inicjuje złożoną sieć interakcji, które wzmagają procesy regresji lutealnej. Głównymi cechami tego zjawiska są: a) zatrzymanie produkcji P4 (luteoliza funkcjonalna); oraz b) indukowanie programowanej śmierci komórek, zwężenie naczyń i przekształcenie ECM, które skutkują degradacją CL (luteoliza strukturalna). W przypadku zapłodnienia, luteoliza musi zostać powstrzymana, umożliwiając utrzymanie funkcjonowania CL i produkcję P4. W ostatnich latach nasz zespół oraz inni naukowcy opisali wiele lokalnych mechanizmów pośredniczących w głównych procesach powstawania i regresji CL. W nawiązaniu do rozwoju CL, szczególny nacisk położono na auto- i parakrynną rolę nadrodziny czynnika martwicy nowotworów (ang. *Tumour Necrosis Factor*, TNF) w angiogenezie i steroidogenezie. Wyniki tych badań wykazały stymulujące działanie TNF na produkcję czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego A (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor A*, VEGF A) oraz tlenku azotu (ang. *Nitric Oxide*, NO). Nasze badania potwierdziły, że interakcja TNF-VEGFA, która jest podatna na działanie LH, bierze udział w regulacji procesu

angiogenezy podczas powstawania CL u klaczy (Ryc. 1). Niemniej jednak, to właśnie w procesie regulującym luteolizę odkryliśmy złożoność wzajemnych oddziaływań między nadrodziną cytokin TNF oraz transformującego czynnika wzrostu (ang. *Transforming Growth Factor*, TGF) (Ryc. 2). Jednym z naszych głównych odkryć było rozpoznanie morfogenów Nodal i TGFβ1 jako dwóch ważnych mediatorów luteolizy. Badania wykazały, że cytokiny te nie tylko obniżały sekrecję P4 i wspierały regresję CL w komórkach lutealnych hodowanych *in vitro*, ale także, że były one kluczowymi mediatorami regresji strukturalnej oraz wzmacniały luteolityczny sygnał PGF2α.



Ryc. 2 Oddziaływania mające wpływ na inicjację procesu luteolizy. Udział Nodal oraz transformującego czynnika wzrostu β1 (TGFβ1) w amplifikacji sygnałów prostaglandyny F2α (PGF2α) w komórkach lutealnych i równoczesne oddziaływania z innymi cytokinami, takimi jak czynnik martwicy nowotworów (TNF), ligand FAS (FASL), oraz interferon gamma (IFNG) wpływają na zahamowanie steroidogenezy, przyczyniając się do obumierania komórek lutealnych i przekształcenia macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Receptor prostaglandyny PGF2α (FPr).

Niniejsza praca w pierwszej kolejności skupia się na opisanu regulacji angiogenezy w CL klaczy przez TNF, ligand Fas (ang. *Fas-ligand*, FASL) i interferon gamma (ang. *interferon*

gamma, IFNG), ze szczególnym zwróceniem uwagi na wpływ cytokin na proces syntezy NO. Następnie, scharakteryzowano szlaki sygnałowe Nodal i TGF β 1 w CL klaczy ze szczególnym uwzględnieniem ich roli podczas luteolizy funkcjonalnej i strukturalnej. Co istotne, odkryto sprzężenia zwrotne istniejące między ścieżkami Nodal/TGF, a PGF2 α w obrębie komórek lutealnych, służące wzmocnieniu sygnałów luteolitycznych.

Część I – Znaczenie zmian unaczynienia w powstawaniu i regresji ciała żółtego (CL).

Po owulacji komórki ziarniste, pochodzące z pęcherzyka jajnikowego, ulegają luteinizacji, co przyczynia się do powstania CL. W ostatnich dziesięcioleciach prowadzono badania skupione głównie nad złożonością lokalnych oddziaływań prowadzących do powstania CL. Głównym czynnikiem luteotropowym u ssaków, w tym także u klaczy jest LH, a wzmocnienie jego działania wspomaga procesy angiogenezy, przekształcenia w obrębie ECM i steroidogenezę (Ryc. 1) [3–5]. Powstanie CL jako organu endokrynnego może być postrzegane w dwóch wymiarach. Po pierwsze, znaczące zmiany w tkance są indukowane przez radykalną reorganizację komórek, w których, po intensywnych podziałach komórkowych, inicjowanych głównie przez estradiol (E2), dochodzi do różnicowania się komórek. Proces ten podtrzymywany jest przez obniżenie zawartości hormonu folikulotropowego (ang. *follicle-stimulating hormone*, FSH) w krwi i wzrost zawartości LH [6–8]. Po drugie, sekrecja P4 i jego poziom w krwioobiegu muszą zapewnić prawidłowe zagnieżdżenie się zarodka i podtrzymanie ciąży [9]. Komórki steroidogenne CL różnicują się z poowulacyjnych komórek ziarnistych i komórek osłonki [10]. W tym samym czasie następuje znaczna reorganizacja tkanki i aktywna angiogeneza, co prowadzi do powstania CL [11,12]. Niektóre doniesienia wykazały, że procesy angiogenezy zachodzące w CL odgrywają ważną rolę w regulacji jego wydajności. Szczególnie istotny jest fakt, że zablokowanie procesów angiogenezy, mimo prawidłowego przebiegu owulacji, powoduje zahamowanie rozwoju i funkcjonowania CL [13,14]. Obniżony poziom P4 w osoczu krwi związany był z zaburzonym procesem unaczynienia CL i zmniejszoną płodnością, co jest dowodem na bliską zależność między angiogenezą w ciałku żółtym i jego funkcjonowaniem. Mimo iż uważa się, że VEGF A i czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *Fibroblast Growth Factor*, FGF2) są kluczowymi regulatorami angiogenezy w CL, staje się coraz bardziej jasne, że wiele innych czynników pełni także funkcje regulacyjne. Z drugiej strony, równie ważna dla zajścia procesu luteolizy jest regresja naczyń krwionośnych CL, ponieważ odgrywa ona kluczową rolę w luteolizie

funkcjonalnej i strukturalnej. U owiec i świnek morskich [15] stwierdzono, że apoptoza komórek śródbłonna naczyń może skutkować okluzją naczyń. Może to prowadzić do dalszej apoptozy komórek śródbłonna, a następnie apoptozy komórek steroidogennych [16]. Nie wiadomo, czy taki sam przebieg procesów jest konieczny dla zajścia luteolizy u innych gatunków, lecz bez wątplenia śmierć komórek naczyń krwionośnych skutkuje ograniczeniem dostępu komórek produkujących hormony do tlenu i składników odżywczych, przypuszczalnie powodując ich śmierć.

Po zakończeniu wstępnych badań nad regulacją luteolizy przez cytokiny należące do nadrodziny TNF, IFNG i FASL, które są zwięźle opisane w Części II, skupiliśmy się na interakcjach między wyżej wspomnianymi cytokinami i wazoaktywnym tlenkiem azotu zarówno podczas powstawania, jak i regresji CL u klaczy. W wyniku przeprowadzonych badań wyjaśniliśmy mechanizm, zgodnie z którym miejscowo powstałe cytokiny regulują angiogenezę w CL u klaczy.

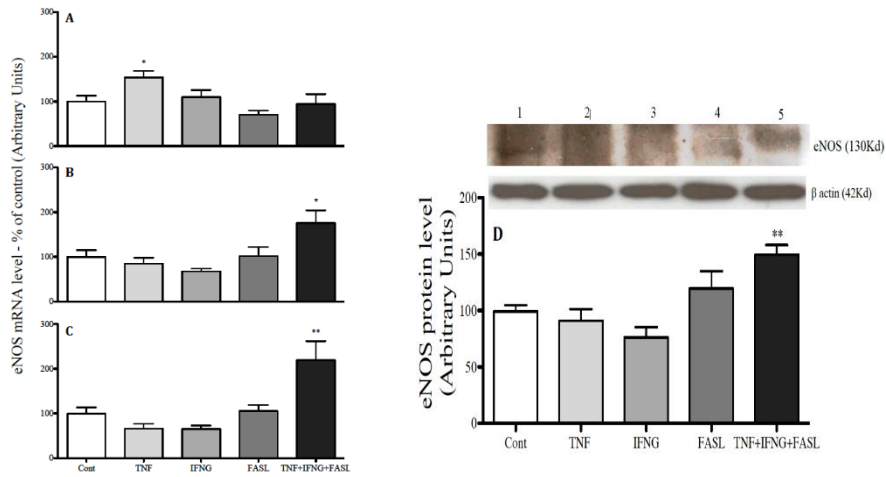
Część I.I –Regulacja angiogenezy przez nadrodzinę TNF jest zależna od aktywności tlenku azotu (NO)

Praca oryginalna „Role of Tumor necrosis factor- α , Interferon-gamma and Fas-ligand on In Vitro Nitric Oxide Activity in the Corpus Luteum”

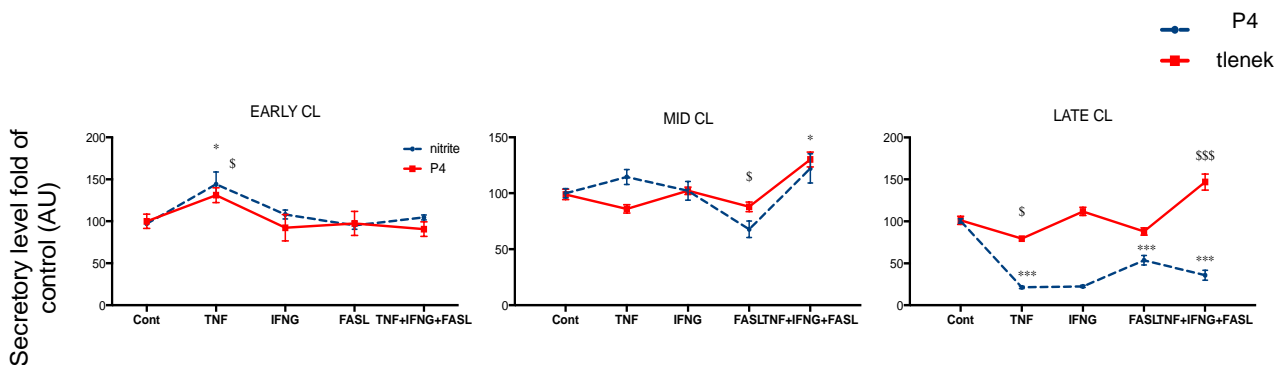
Wstęp – W czasie owulacji wylew LH prowadzi do istotnych zmian na poziomie komórkowym i biochemicznym, takich jak rozpad błony podstawnej czy odpowiedzi immunologicznej, które są kluczowe w inicjacji angiogenezy [17]. W rozpad i reorganizację błony podstawnej naczyń krwionośnych zaangażowanych jest wiele proteaz, w tym proteazy z rodziny metaloproteinaz (ang. *Matrix Metalloproteinase*, MMP), np. kolagenaza, żelatynaza i MMP typu błonowego. Ekspresja niektórych metaloproteinaz (MMP9, MMP13, MT-MMP1), które są pierwotnie wydzielane przez makrofagi w jajniku wielu gatunków [18] jest zwiększona po wylewie LH [19]. Dlatego też fizyczne zahamowanie tworzenia naczyń krwionośnych w obrębie warstwy ziarnistej jest powstrzymane- następuje rozpad i rozprzestrzenienie komponentów ECM, co przyczynia się do powstania przestrzeni umożliwiającej przemieszczanie się i migrację komórek śródbłonna, a także innych elementów naczyń krwionośnych. Ważną konsekwencją tej strukturalnej przemiany jest uwolnienie czynników angiogennych znajdujących się w błonie podstawnej. Dezintegryna i metaloproteinaza z trombospodyną (TSP) typu 1 (ang. *A disintegrin and metalloproteinase*

with thrombospondin motifs, ADAMTS) są proteazami, które wydają się być niezbędne dla zajścia procesu angiogenezy następującego po owulacji [20]. ADAMTS1 to proteoglikany, które ulegają ekspresji w pęcherzyku okołowulacyjnym. Dodatkowo, ekspresja ADAMTS1 zwiększa się po stymulacji gonadotropinami [21], prawdopodobnie za pośrednictwem ścieżki czynnika indukowanego hipoksją 1 α (ang. *hypoxia inducible factor 1 α* , HIF1A) [22]. Może to być istotne w procesie inwazji komórek śródbłonna, ponieważ wykazano, iż ich stymulacja przez VEGFA i FGF2 powoduje inwazję macierzy kolagenowej i zwiększoną ekspresję ADAMTS1 [23]. Innymi czynnikami wazoaktywnymi zaangażowanymi w opisywane procesy są wolne rodniki NO [11, 24]. Istotnie, NO jest niezbędny w powstawaniu, utrzymaniu i regresji CL [25]. Cząsteczka ta jest czynnikiem plejotropowym, a jej wpływ na układ rozrodczy został powiązany ze złożonym mechanizmem wzajemnych oddziaływań z innymi czynnikami wydzielanymi miejscowo [26, 27]. Z drugiej strony, badania dotyczące wpływu TNF na funkcjonowanie CL u bydła wskazują na ważną rolę NO jako mediatora procesów zapoczątkowanych przez TNF [28]. Postawiliśmy hipotezę, według której cytokiny TNF, IFNG i FASL, miejscowo produkowane w CL u kłaczy, mogą regulować aktywność NO podczas fazy lutealnej. W celu weryfikacji postawionej hipotezy, zbadaliśmy wpływ TNF, IFNG i FASL na transkrypcję mRNA śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (ang. *endothelial NO synthase*, eNOS) oraz metabolitów tlenku azotu (azotyny), a także sekrecję P4 przez komórki lutealne kłaczy podczas fazy lutealnej. Zbadano również wpływ wspomnianych cytokin na ekspresję białka eNOS w środkowej fazie lutealnej.

Wyniki- Wykorzystując hodowlę komórek *in vitro* komórek wczesnej, środkowej i późnej fazy lutealnej, sprawdziliśmy, czy TNF, IFNG i FASL mogą bezpośrednio regulować aktywność NO. W komórkach wczesnej fazy lutealnej, TNF spowodował wzrost ekspresji eNOS zarówno na poziomie mRNA (Ryc. 3A), jak i wzrost stężenia NO w medium pohodowlanym (Ryc. 4). W komórkach środkowej fazy lutealnej, tylko połączenie cytokin TNF+IFNG+FASL spowodowało zwiększenie ekspresji eNOS na poziomie mRNA (Ryc. 3B) i białka (Ryc. 3D), jak również stężenia NO (Ryc.4). Natomiast w komórkach późnej fazy lutealnej połączenie TNF+IFNG+FASL spowodowało wzrost ekspresji eNOS na poziomie mRNA (Ryc. 3C) i produkcję NO w komórkach, podczas gdy sam TNF spowodował zmniejszenie sekrecji NO (Ryc. 4).



Ryc. 3 Ekspresja białka w komórkach lutealnych pochodzących z wczesnej (A), środkowej (B, D) i późnej fazy lutealnej (C) **po stymulacji cytokinami (24 godz.)**. W A, B i C wyniki zostały znormalizowane względem genu referencyjnego – B2MG. W przypadku D - górne panele zawierają reprezentatywne zdjęcie membrany (n=4). Wartości osi poziomej: 1- kontrola; 2- TNF; 3- IFNG; 4- FASL i 5- TNF+IFNG+FASL; dane znormalizowane względem ekspresji białka referencyjnego- baktyny. Słupki przedstawiają wartości średnie ± SEM. Różne litery wskazują na różnice w istotności (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).



Ryc. 4 - Produkcja NO i P4 przez komórki lutealne klaczy w warunkach *in vitro* po stymulacji cytokinami (24 godz.). Zmiany procentowe w odniesieniu do próby kontrolnej. Słupki przedstawiają wartości średnie ± SEM. Różne litery wskazują na różnice w istotności (\$ lub * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$); * odnosi się do NO; \$ odnosi się do P4.

Nasze wyniki wskazują, że TNF, FASL i IFNG modulują produkcję NO. Ponadto, zwiększona produkcja NO we wczesnej i późnej fazie lutealnej przyczynia się do zwiększenia udziału reaktywnych form tlenu w powstawaniu i regresji CL. Nasz zespół wcześniej zbadał wpływ TNF, IFNG i FASL na CL klaczy w różnych fazach [29]. Podczas powstawania CL, TNF powodowało sekrecję P4 [29], zwiększało aktywność angiogenną i ekspresję VEGF w

ciałku żółtym klaczy [29]. W przeprowadzonym doświadczeniu, TNF spowodował wzrost produkcji NO w komórkach wczesnej fazy lutealnej (Ryc. 4), kiedy tlen i składniki odżywcze są niezbędne do powstania CL. Ponadto, wykazaliśmy, że donor NO (ang. *Spermine NONOate*) zwiększał aktywność angiogenną we wczesnej fazie lutealnej [7]. Stąd też wydaje się, że proangiogenne działanie TNF podczas powstawaniu CL u klaczy odbywa się z udziałem NO. Odkrycie to potwierdza fakt, że poddanie komórek lutealnych działaniu donora NO nie wpłynęło na stężenie TNF w medium pohodowlanym (dane niepublikowane). Dlatego też interakcja między TNF i eNOS powinna być rozważona jako jeden z ważnych elementów luteotropowej pętli w obrębie komórek lutealnych, która wpływa na proliferację naczyń, produkcję P4 oraz prostaglandyny E2 (PGE2) [29].

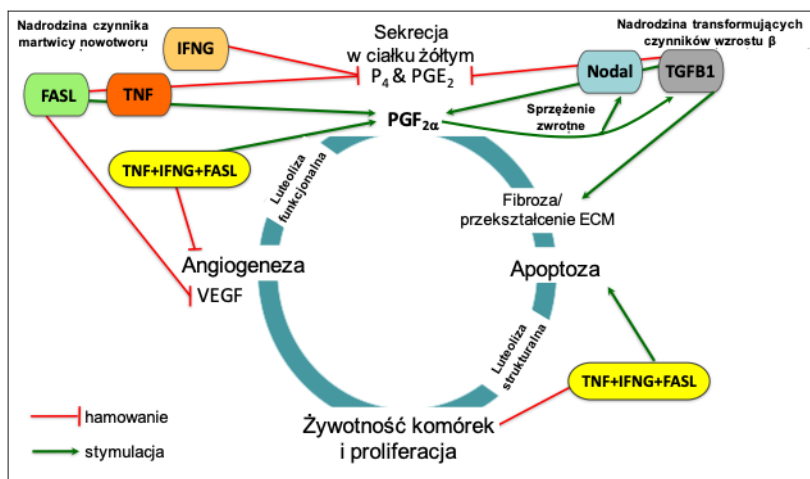
Wzajemna zależność pomiędzy NO i TNF może istnieć również w przypadku innych cytokin. Połączenie TNF+IFNG+FASL spowodowało inicjację transkrypcji eNOS (Ryc. 3B) oraz produkcję NO w komórkach środkowej i późnej fazy lutealnej (Ryc. 4). Wyniki te potwierdzają założenie, że działanie cytokin zależy od warunków lokalnych i obecności innych autokrynych i parakrynych czynników [3,4]. Dlatego też sam TNF powodował spadek produkcji NO w późnej fazie lutealnej, podczas gdy połączenie TNF+IFNG+FASL spowodowało efekt odwrotny (Ryc. 3C). Jak poprzednio potwierdzono, w ciałku żółtym klaczy wykazano ekspresję zarówno eNOS jak i indukowalnej NOS (iNOS) [25]. Mimo iż produkcja NO była poprzednio przypisywana obu enzymom [30], niezmienny poziom ekspresji iNOS w ciałku żółtym klaczy podczas całej fazy lutealnej zachęcił nas do zbadania wzajemnych zależności między cytokinami, a eNOS. Ekspresja eNOS w komórkach powodowała niewielką produkcję NO, co mogło wynikać z jego antyapoptotycznych właściwości [31]. Z drugiej strony, zwiększenie ekspresji iNOS przyczyniało się do zwiększenia produkcji NO, aktywując apoptozę [31]. Można spekulować, iż cytokiny dostosowały mechanizmy produkcji NO, w zależności od stadium fazy lutealnej.

Wnioski – Ekspresja eNOS była zwiększona we wczesnej fazie lutealnej przez traktowanie TNF oraz późnej fazie lutealnej [31] przez traktowanie połączeniem TNF+IFNG+FASL. Zarówno wzrost produkcji NO i transkrypcji mRNA eNOS w późnej fazie lutealnej, jak i ekspresja białka w środkowej fazie lutealnej, są zgodne z wcześniejszymi wynikami. W badaniach tych wykazano aktywność luteolityczną TNF+IFNG+FASL, które spowodowały spadek aktywności angiogennej i ekspresji VEGFA [31], jak również wzrost wydzielania PGF2 α i apoptozę komórek lutealnych [31]. Obecnie spekulujemy nad udziałem NO w opisaney pętli luteolitycznej. Poprzednie wyniki badań sugerowały, że NO bierze udział w

luteolizie u bydła [27] i u kobiet [32]. Dlatego też luteolityczna aktywność cytokin TNF, IFNG i FASL wydaje się być związana ze zwiększoną ekspresją eNOS oraz sekrecją NO w CL u klaczy. Podkreśliliśmy znaczenie tych cytokin oraz sekrecji NO wynikającej z aktywności eNOS w procesie powstawania i regresji CL u klaczy.

Część II – Luteoliza i dynamika zależności pomiędzy nadrodzinami TNF i TGF

Jedną z cech luteolizy jest spadek sekrecji P4, który początkowo jest wywoływany przez PGF2 α [33, 34]. Złożoność procesu luteolizy w ostatnich dekadach skłoniła środowisko naukowe do podjęcia dalszych badań w tym obszarze. Odkryto, iż nie tylko PG pochodząca z macicy [33], ale także wiele lokalnie produkowanych cytokin i innych czynników jest kluczowych w zajściu procesu luteolizy. Czynniki, takie jak TNF [35, 36, 37], FASL [29], interferon γ (IFNG) [38], NO [32] oraz leukotrieny [39] okazały się być istotnie zaangażowane w tym procesie. Wspólne działanie wyżej wymienionych mediatorów prowadzi do zaburzeń funkcjonalnych CL oraz programowaną śmierć komórek. Zjawiska te ostatecznie odpowiadają za znaczne przekształcenie i usunięcie większej części komórek tego narządu (Ryc. 2). Wstępne prace nad regulacją regresji lutealnej u klaczy skupiły się na zbadaniu działania nadrodziny TNF. Scharakteryzowano interakcje pomiędzy TNF, FASL i IFNG zarówno w procesie luteolizy funkcjonalnej, jak i regresji strukturalnej. Po zoptymalizowaniu hodowli *in vitro* komórek lutealnych, wykazaliśmy specyfikę kontroli luteolizy u klaczy. Co istotne, udowodniliśmy, że FASL kontroluje aktywność sekrecyjną u klaczy [29], podczas gdy u innych gatunków np. u krów [40] i myszy [41], bierze udział wyłącznie w procesie regresji strukturalnej. FASL zwiększał stężenie PGF2 α oraz zmniejszał P4 i PGE2 w medium pochodzącym z komórek CL, [29]. Co więcej, traktowanie komórek ciała żółtego FASL nie miało wpływu na żywotność czy apoptozę komórek lutealnych przeciwnie niż przy zastosowaniu połączenia cytokin TNF+IFNG+FASL [29] (Ryc. 5). Kolejnym istotnym odkryciem podczas badań wstępnych było potwierdzenie udziału TNF i IFNG w hamowaniu sekrecji P4 [36]. Ponadto, wspólne działanie cytokin TNF+IFNG+FASL powodowało zmniejszenie żywotności komórek oraz wspomogło regresję naczyń krwionośnych i zajście apoptozy [38].



Ryc. 5 Wykres prezentujący udział nadrodzin czynnika martwicy nowotworu (TNF) i transformującego czynnika wzrostu β (TGF β) w luteolizie. TNF α , FASL, IFNG, Nodal i TGF β 1 biorą udział w luteolizie funkcjonalnej poprzez obniżenie ekspresji progesteronu (P4) i prostaglandyny (PGE $_2$) oraz zwiększenie ekspresji PGF $_{2\alpha}$. Synergistyczne działanie cytokin TNF+IFNG+FASL wspomaga luteolizę strukturalną przez wpływ na apoptozę, spadek żywotności komórek, przekształcenie ECM i regresję naczyń krwionośnych.

Wykazaliśmy udział czynników z nadrodziny TGF w procesie luteolizy. Po raz pierwszy zbadano ekspresję białka Nodal, morfogenu z nadrodziny TGF, w CL kłaczy. Przeprowadzone przez nas badania pozwoliły na zidentyfikowanie istotnych interakcji między cytokiną Nodal a PGF $_{2\alpha}$, które wraz z TGF są czynnikami biorącymi udział w luteolizie funkcjonalnej i strukturalnej u kłaczy. Co istotne, po raz pierwszy wykazaliśmy obecność białka Nodal oraz jego udział w regulacji CL. Ponadto, nasze wyniki wskazują, że TGF, oprócz znanej u innych gatunków funkcji luteolitycznej [42, 43], łączy luteolizę funkcjonalną i strukturalną u kłaczy.

Część II.I – Luteolityczna funkcja cytokiny Nodal i jego interakcja z PGF $_{2\alpha}$

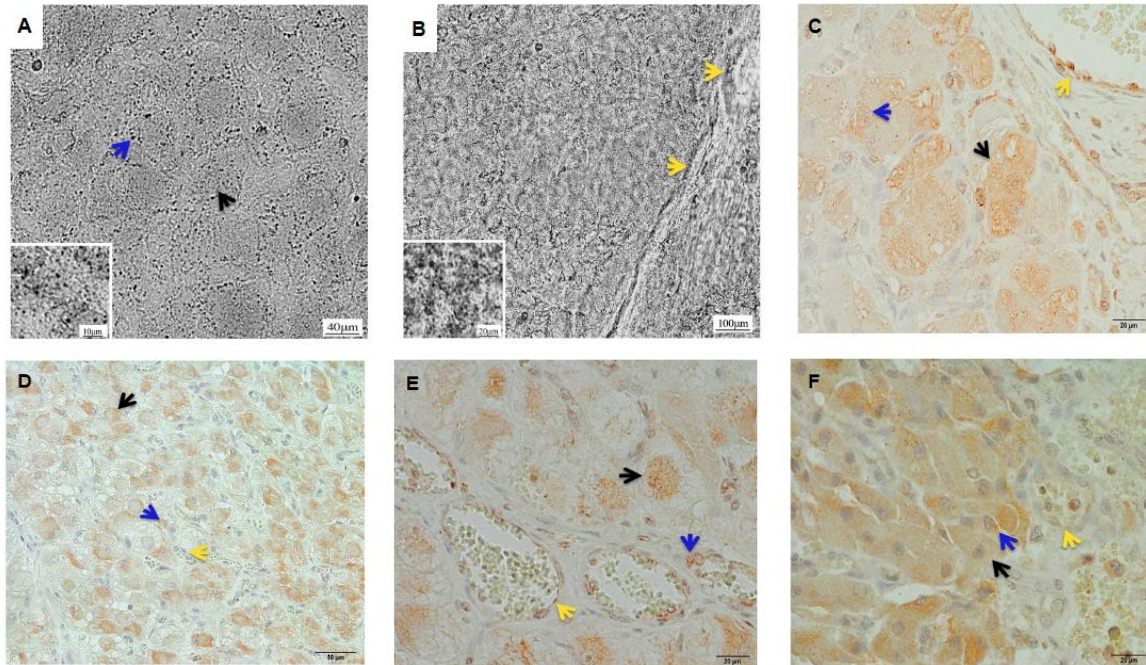
Praca oryginalna „Nodal Promotes Functional Luteolysis via downregulation of Progesterone and Prostaglandins E2 and Promotion of PGF2 alpha Synthetic Pathways in Mare Corpus Luteum”

Wstęp – Ze względu na przejściowy charakter funkcji ciała żółtego, procesy w nim zachodzące się wykazują podobieństwo do procesów biologicznych obserwowanych w zarodku, takich jak: intensywne różnicowanie się komórek i przekształcenie tkanki. Nie

oznacza to podobieństwa ciała żółtego do zarodka, ale świadczy, że jest ono jedną z najbardziej unaczynionych struktur w całym organizmie [44], powstając i zanikając w bardzo krótkim czasie. W związku z tym, zbadaliśmy rolę białka Nodal, zarodkowego morfogenu z nadrodziny TGF, w funkcji wydzielniczej CL i jego regulacji strukturalnej podczas luteolizy. W pierwszej części wykazaliśmy, że białko Nodal i jego receptory typu I: ALK7, ALK4 (ang. *activin receptor-like kinase*, ALK) i typu II, ACVR2B (ang. *activin receptor type IIB*) ulegały ekspresji w CL klaczy. Ponadto, przy użyciu wcześniej zoptymalizowanego modelu *in vitro*, przeprowadziliśmy serię eksperymentów, które wykazały, że Nodal pośredniczy w sposób auto- i/lub para-kryny w regulacji aktywności wydzielniczej CL, obniżając ekspresję P4 i PGE2, a stymulując PGF2 α . Następnie zbadaliśmy zależność pomiędzy białkiem Nodal, a HIF1 α podczas luteolizy u klaczy, wykazując, że poziom ekspresji cytokiny Nodal zmienia się w zależności od poziomu tlenu oraz bezpośrednio reguluje ekspresję HIF1 α w tkance. Nodal jest cytokiną należącą do nadrodziny TGF, biorącą udział w rozwoju osi proksymalno-dystalnej [45] oraz stymulującą asymetryczną proliferację komórek mezodermalnych i endodermalnych we wczesnym rozwoju zarodkowym [46]. W ostatnich latach Nodal był powiązany z licznymi procesami biologicznymi, także u organizmów w okresie postnatalnym. Ponadto, kontrowersyjne doniesienia pojawiły się w szczególności w obszarze nauk związanych z układem rozrodczym. Ścieżka Nodal/Lefty okazała się być zaangażowana w proces regulacji ECM błony śluzowej macicy oraz tkanki łącznej podczas cyklu menstruacyjnego i ciąży [47]. Jak wykazano w pracy Cornet i wsp. (2002), ścieżka sygnałowa Nodal związana jest z regulacją produkcji kolagenu, czynnika wzrostu tkanki łącznej i kilku metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej [48]. Co więcej, wykazano ekspresję białka Nodal w śródbłonku jajowodu u bydła [49]. Wspomniane powyżej badania reprezentują coraz liczniejsze dowody na udział białka Nodal w regulacji procesów rozrodczych. W odniesieniu do ścieżki sygnałowej, Nodal wiąże się z receptorem typu II - ACVR2B, który w dalszej kolejności aktywuje receptor typu I, ALK4 lub ALK7. Aktywowany receptor typu I fosforyluje cytoplazmatyczne białka SMAD2/SMAD3, wspomagając ich interakcję ze SMAD4, a następnie dochodzi do translokacji do jądra komórkowego i utworzenia kompleksów transkrypcyjnych. Niniejszym, scharakteryzowaliśmy ekspresję elementów ścieżki sygnałowej Nodal w CL klaczy i wykonaliśmy badania funkcjonalne, które potwierdziły jego udział w luteolizie.

Wyniki- Wykazaliśmy ekspresję komponentów ścieżki sygnałowej białka Nodal w CL klaczy. Najpierw zlokalizowaliśmy ligand Nodal i oba receptory typu I (ALK4 i ALK7) w

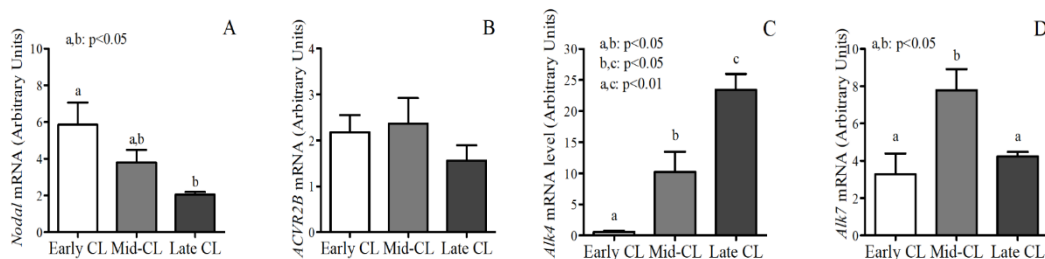
małych komórkach lutealnych (SLC), dużych komórkach lutealnych (LLC) oraz lutealnych komórkach śródbłonka (LEC). Barwienie immunohistochemiczne białka oraz hybrydyzacja *in situ* RNA potwierdziły ekspresję Nodal tylko w SLC i LLC, natomiast nie wykazano jego obecności w LEC (Ryc. 6).



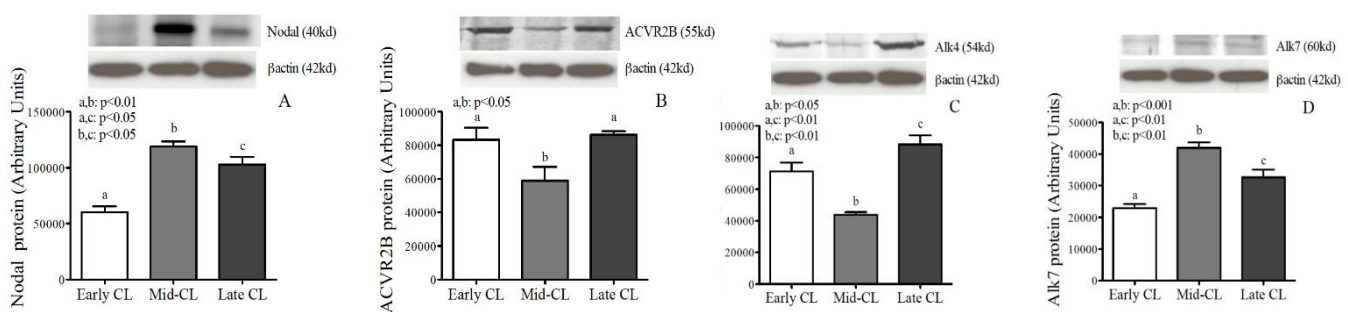
Ryc. 6. Hybrydyzacja *in situ* mRNA Nodal w ciału żółtym środkowej (A) i późnej fazy lutealnej (B) **oraz immunobarwienie** na obecność białka Nodal w CL środkowej fazy lutealnej (C), ACVR2B w CL późnej fazy lutealnej (D), ALK4 w CL środkowej fazy lutealnej (E), ALK7 w CL wczesnej fazy lutealnej (F). Czarna strzałka oznacza duże komórki lutealne (LLC), niebieska strzałka oznacza małe komórki lutealne (SLC), a żółta strzałka oznacza komórki śródbłonka CL (LEC). Zdjęcia z każdej fazy zostały przypisane losowo, jako że ekspresja czynników była jednakowa w różnych fazach lutealnych CL.

Następnie zbadano ekspresję cytokiny Nodal i jej receptorów ACVR2B, ALK4 i ALK7 w CL klaczy. Najwyższą ekspresję *Nodal* na poziomie mRNA wykazano we wczesnej fazie lutealnej, którego ekspresja zmniejszała się w kierunku późnej fazy lutealnej ($p < 0.05$, Ryc. 7A). Podczas gdy poziom ekspresji mRNA genu *ACVR2B* nie zmienił się podczas poszczególnych faz lutealnych, ekspresja mRNA *ALK4* wykazywała profil odwrotny do profilu ekspresji mRNA *Nodal*, wzrastając od wczesnej do późnej fazy lutealnej ($p < 0.05$, Ryc. 7C). Ekspresja genu *ALK7* na poziomie mRNA wykazała wzrost w kierunku od wczesnej do środkowej fazy lutealnej, a następnie nieznacznie zmniejszyła się w późnej fazie

lutealnej ($p < 0.05$, Ryc. 7D). Ostatecznie, analiza ekspresji białka Nodal i ALK7 z zastosowaniem metody Western-blot wykazała podobną tendencję, kiedy to stężenie białek osiągnęło najwyższy poziom w środkowej fazie lutealnej i nieznacznie spadło w późnej fazie lutealnej. Co istotne, ekspresja w późnej fazie lutealnej była znacznie wyższa niż we wczesnej fazie lutealnej (Ryc. 8A i D, $p < 0.05$). Najniższą ekspresję receptora typu II ACVR2B odnotowano w środkowej fazie lutealnej (Ryc. 8B, $p < 0.05$) w porównaniu z pozostałymi fazami. Ekspresja ALK4 na poziomie białka zmniejszała się od wczesnej do środkowej fazy lutealnej, a najwyższe stężenia odnotowano w późnej fazie lutealnej (Ryc. 8C, $p < 0.05$). Podsumowując, scharakteryzowaliśmy profil ekspresji komponentów ścieżki sygnałowej Nodal w ciałku żółtym klaczy.



Ryc. 7. Ekspresja genu *Nodal* (A), *ACVR2B* (B), *ALK4* (C), i *ALK7* (D) we wczesnej, środkowej i późnej fazie lutealnej ciałka żółtego klaczy. Ekspresja mRNA komponentów ścieżki sygnałowej Nodal podczas fazy lutealnej została zbadana z wykorzystaniem metody *real time* PCR. Dane znormalizowano względem genu β 2-mikroglobuliny (B2MG). Litery (a-c) oznaczają różnice istotne statystycznie.

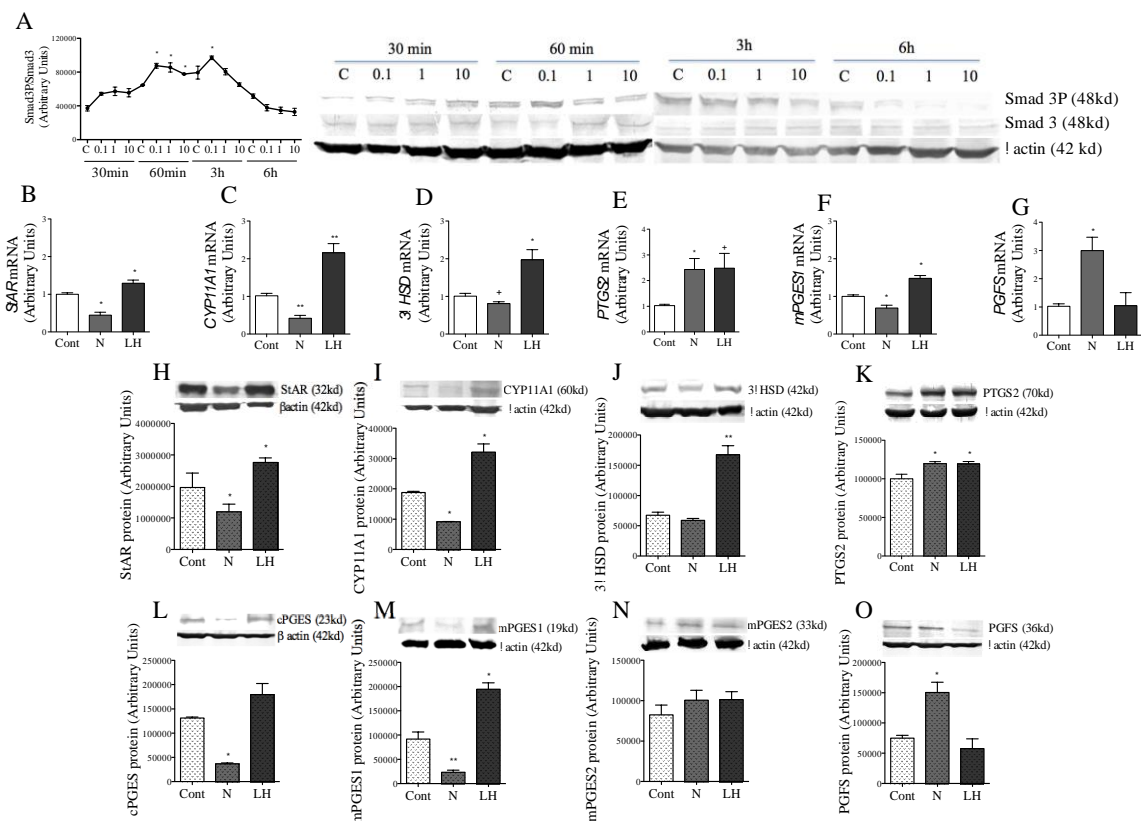


Ryc. 8. Ekspresja białka *Nodal*, *ACVR2B*, *ALK4* i *ALK7* podczas fazy lutealnej u klaczy analizowana z wykorzystaniem metody Western Blotting. Górne panele zawierają reprezentatywne zdjęcie membrany ($n=4$). Dane ujednolicone względem ekspresji białka referencyjnego- β aktyny. Słupki przedstawiają wartości średnie \pm SEM. Różne litery wskazują na różnice w istotności statystycznej.

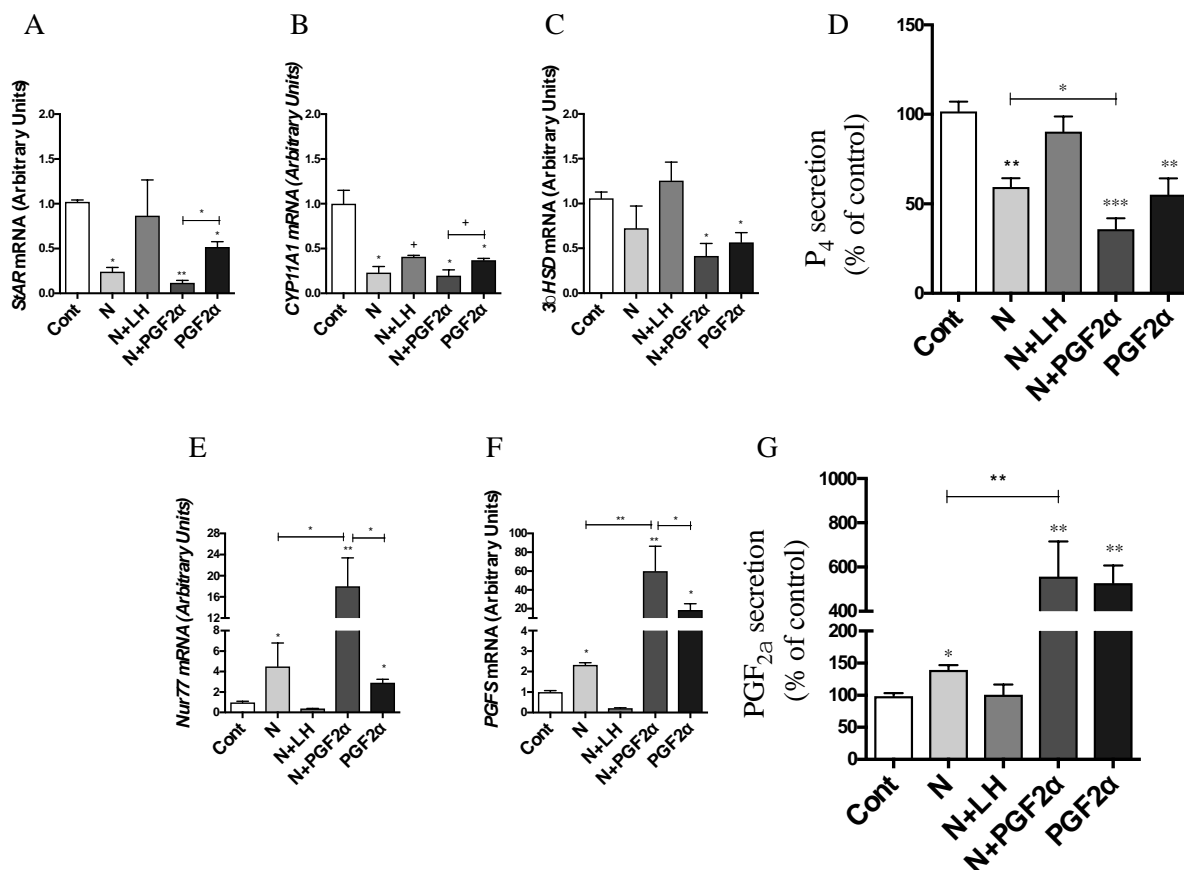
Ekspresja komponentów szlaku sygnałowego cytokiny Nodal w ciałku żółtym klaczy skłoniła nas do spekulacji nad jego przypuszczalną rolą w luteolizie. Zbadaliśmy wpływ białka Nodal na aktywność sekrecyjną oraz żywotność komórek CL z wykorzystaniem systemu hodowli komórek *in vitro*, wcześniej zoptymalizowanego przez naszą grupę [29]. Ocena poziomu stężenia P4 i PG w medium pochodzonym wykazała spójne wyniki z fizjologicznego punktu widzenia. Co zaskakujące, Nodal nie wpływał na żywotność komórek CL, co zmotywowało nas do skupienia się wyłącznie na badaniach luteolizy funkcjonalnej. W przeprowadzonym doświadczeniu potwierdziliśmy aktywację komponentów ścieżki sygnałowej białka Nodal w komórkach lutealnych klaczy poprzez określenie fosforylacji białka SMAD3 (SMAD3P) w komórkach pochodzących ze środkowej fazy lutealnej. Fosforylacja białka SMAD3P wyraźnie zwiększyła się między 30, a 60 minutą po traktowaniu komórek lutealnych białkiem Nodal (Ryc. 9A). Co więcej, poziom niefosforylowanego białka SMAD3 był niezmienny podczas przeprowadzonego eksperymentu. Kolejna analiza wykazała hamujący efekt cytokiny Nodal na transkrypcję mRNA *StAR* (ang. *steroidogenic acute regulatory protein*) (Ryc. 9B, $p < 0.05$), enzymu *CYP11A1* (ang. *cholesterol side-chain cleavage enzyme*) (Ryc. 9C, $p < 0.05$) i *mPGES1* (ang. *microsomal prostaglandin E synthase-1*) (Ryc. 9F, $p < 0.05$). Ponadto, również poziom ekspresji mRNA *PGFS* (ang. *PGF2 α synthase*) i *PTGS2* (ang. *2 PG-endoperoxidase synthase 2*) zwiększył się pod wpływem działania cytokiny Nodal (Ryc. 9G, $p < 0.05$). Profil ekspresji białek był zgodny z wynikami ekspresji na poziomie mRNA. Wykazaliśmy, że traktowanie komórek lutealnych ze środkowej fazy cytokiną Nodal, powoduje spadek ekspresji białka StAR (Ryc. 9H, $p < 0.05$) i CYP11A1 (Ryc. 9I, $p < 0.05$), lecz nie wpływa na ekspresję 3 β HSD (ang. *3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase*) (Ryc. 9J). Dodatkowo, traktowanie białkiem Nodal spowodowało spadek ekspresji cPGES (ang. *cytosolic PGE synthase*) (Ryc. 9L, $p < 0.05$) i mPGES1 (ang. *microsomal PGES*) (Ryc. 9M, $p < 0.01$), ale nie wpłynęło na ekspresję mPGES2 (Ryc. 9N). Wyniki te potwierdziły udział cytokiny Nodal w regulacji aktywności sekrecyjnej komórek CL.

W kolejnym etapie przeprowadzono badania, aby wykazać w jakim stopniu PGF2 α reguluje ekspresję elementów ścieżki sygnałowej białka Nodal. Wykazano, iż stymulacja komórek CL eikozanoidem PGF2 α spowodowała zwiększenie ekspresji białka Nodal, jak również fosforylację SMAD3, w porównaniu do grupy kontrolnej. Wskazuje to na istnienie wzajemnej zależności pomiędzy Nodal, a PGF2 α , co później potwierdzono serią eksperymentów w celu wykazania ich synergicznego działania. Potwierdziliśmy synergiczne działanie cytokiny Nodal i PGF2 α podczas luteolizy funkcjonalnej, a zwłaszcza ich wpływ na sekrecję PGF2 α i

P4. W przypadku P4, zarówno Nodal, jak i Nodal+PGF2 α spowodowały obniżenie ekspresji *StAR* na poziomie mRNA w podobny sposób (Ryc. 10A, $p<0.05$). Co istotne, połączenie Nodal+LH nie wywołało zmian w poziomie ekspresji mRNA *StAR* w porównaniu do grupy kontrolnej, co sugeruje, że LH znosi hamujący efekt białka Nodal na zmiany poziomu *StAR*. Dodatkowo, podobne obserwacje odnotowano w przypadku *CYP11A1* (Ryc. 10B, $p<0.05$), jednakże spadek ekspresji mRNA *CYP11A1* nie został całkowicie zahamowany przez połączenie Nodal+LH (Ryc. 10B, $p=0.06$). W przypadku poziomu mRNA *3 β HSD*, wykazano spadek ekspresji wyłącznie po traktowaniu komórek połączeniem Nodal+PGF2 α (Ryc. 10C, $p<0.05$). Ostatecznie, wyniki wpływu traktowań na sekrecję P4 do medium hodowlanego potwierdziły rezultaty uzyskane na poziomie mRNA, gdzie zarówno Nodal, jak i połączenie Nodal+PGF2 α spowodowały spadek syntezy P4 (Ryc. 10D, $p<0.001$). Warto podkreślić, iż połączenie Nodal+PGF2 α skuteczniej wpływało na zahamowanie produkcji P4, niż sam Nodal (Ryc. 10D, $p<0.05$). W przypadku PGF2 α , poziom ekspresji mRNA *Nur77* (ang. *nerve growth factor IB*) i *PGFS* wzrósł zarówno po stymulacji cytokiną Nodal (Ryc. 10E, 10F, $p<0.05$ odpowiednio), jak również po zastosowaniu połączenia Nodal+PGF2 α (Ryc. 10E, 10F, $p<0.01$ odpowiednio). Co więcej, odnotowano silniejszy efekt stymulujący pod wpływem traktowania Nodal+PGF2 α , niż pod wpływem samej cytokiny Nodal dla obu badanych genów (Ryc. 10E, 10F, $p<0.05$ odpowiednio). Analogicznie, doszło do wzrostu stężenia PGF2 α w medium hodowlanym po stymulacji cytokiną Nodal (Ryc. 10G, $p<0.05$) i połączeniem Nodal+PGF2 α (Ryc. 10G, $p<0.01$). Warto zaznaczyć, iż stymulacja Nodal+PGF2 α spowodowała najwyższą sekrecję PGF2 α (Ryc. 10G, $p<0.01$). Przedstawione wyniki potwierdzają istnienie synergizmu działania pomiędzy białkiem Nodal i PGF2 α podczas luteolizy funkcjonalnej.



Ryc. 9. Aktywacja ścieżki sygnałowej białka Nodal w ciałku żółtym w środkowej fazie lutealnej oraz wpływ na regulację syntezy P4, PGE2 i PGF2 α . Profil fosforylacji SMAD3P w czasie (A) po traktowaniu komórek białkiem Nodal (0.1-10ng/ml) po upływie 30 min, 60 min, 3 godz. i 6 godz. (C – kontrola niestymulowana). Górne panele zawierają reprezentatywne zdjęcie membrany z uwidocznionymi białkami SMAD3P, SMAD3, β -aktyny. Wpływ cytokiny Nodal (0.1ng/ml) na poziom ekspresji mRNA: *StAR* (B), *CYP11A1* (C), *3-H β SD* (D), *PTGS2* (E), *mPGES1* (F) i *PGFS* (G). Analiza została wykonana z wykorzystaniem metody *real time* PCR. Wpływ cytokiny Nodal (0.1ng/ml) na stężenie białek: StAR (H), CYP11A1 (I), 3-HSD (J), PTGS2 (K), cPGES (L), mPGES1 (M), mPGES2 (N), i PGFS (O). Pomiaru dokonano za pomocą analizy Western-blot; powyżej wykresu przedstawiono reprezentatywne zdjęcia membrany; wykres przedstawia wyniki analizy densytometrycznej poziomu białka znormalizowanego względem β -aktyny. * oznacza istotne statystycznie różnice.



Ryc. 10. Interakcje podczas luteolizy funkcjonalnej. Wpływ cytokiny Nodal (0.1 ng/ml), Nodal+LH (10ng/ml), Nodal+PGF $_{2\alpha}$, i PGF $_{2\alpha}$ (10-7M) na poziom ekspresji mRNA: *StAR* (A), *CYP11A1* (B), *3 β -HSD* (C) i sekrecję P₄ w medium pochodowlanym (D); oraz poziom ekspresji mRNA *Nur77* (E), *PGFS* (F) i sekrecji PGF $_{2\alpha}$ w medium pochodowlanym (G).

Wniosek – Przeprowadzone przez nas badania po raz pierwszy opisują wpływ cytokiny Nodal na funkcjonowanie CL u kłaczy. Poprzednie badania dotyczyły udziału ścieżki sygnałowej Nodal w nowotworach jajnika [50] czy atrezji pęcherzyków [51], jednak jak dotąd nie opisano udziału tej cytokiny w funkcji CL. Przeprowadzone badania scharakteryzowały ekspresję komponentów ścieżki sygnałowej cytokiny Nodal w ciałku żółtym w różnych fazach lutealnych. Co więcej, wpływ na stężenie P₄ i PG świadczy o udziale białka Nodal w funkcjonalnej regresji CL. Wykazaliśmy, że Nodal obniża sekrecję P₄ i PGE₂ oraz zwiększa produkcję PGF $_{2\alpha}$, poprzez wpływ na ścieżki ich syntezy. Dodatkowo udowodniliśmy, że PGF $_{2\alpha}$ aktywuje cytokinę Nodal, co skłoniło nas do wysunięcia hipotezy, że istnieje mechanizm wzmacniania luteolitycznego sygnału w ciałku żółtym. Co więcej,

synergiczne działanie obu czynników w luteolizie funkcjonalnej dowodzi znaczenia, jakie białko Nodal pełni w funkcjonalnej regresji CL.

Część II.II – Udział TGF β 1 w luteolizie funkcjonalnej i strukturalnej

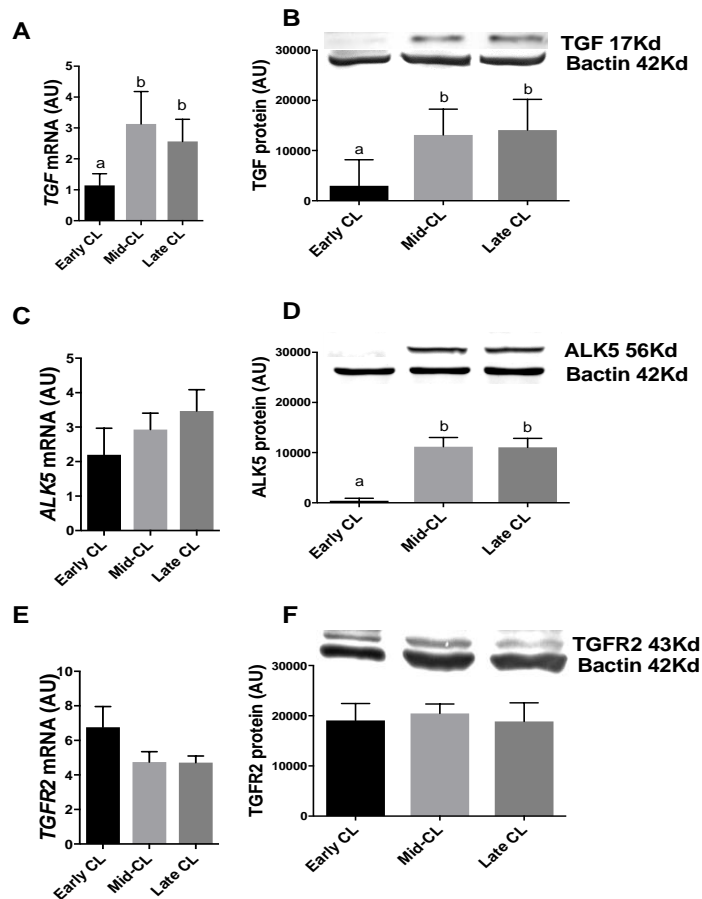
Praca oryginalna „TGF β 1 Modulates In Vitro Secretory Activity and Viability of Equine Luteal Cells & the book chapter Luteolysis and the Auto-, Paracrine Role of Cytokines from Tumor Necrosis Factor α and Transforming Growth Factor β Superfamilies”

Wstęp – W przypadku niewystąpienia ciąży, luteoliza funkcjonalna i strukturalna jest aktywowana, aby doszło do wznowienia cyklu rujowego. Ponownie, używając modelu hodowli *in vitro* komórek CL klaczy, podjęliśmy się scharakteryzowania udziału nadrodziny TGF w regresji funkcjonalnej [52]. Zbadaliśmy rolę, jaką pełni cytokina TGF w luteolizie funkcjonalnej, śmierci komórek i apoptozie komórek środkowej fazy CL klaczy.

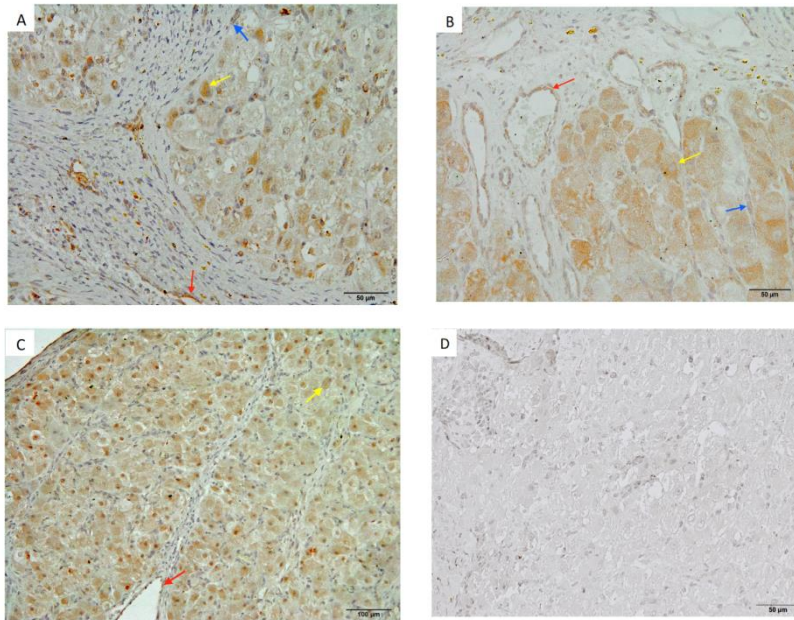
Nadrodzina TGF jest wielką grupą strukturalnie podobnych do siebie cytokin odpowiedzialnych za różne procesy biologiczne, takie jak regulowanie funkcjonowania komórek w stanie fizjologicznym i patologicznym [53]. Ogólnie, jak wcześniej wspomniano cytokiny z nadrodziny TGF, takie jak TGF β 1 lub morfogen Nodal, aktywują ścieżki sygnałowe za pośrednictwem receptorów powierzchniowych ALK, które następnie fosforylują wewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnałowe SMAD. Te, z kolei, po translokacji do jądra komórkowego regulują transkrypcję genów [54]. We wcześniejszych badaniach wykazano udział TGF w luteolizie strukturalnej u bydła, gdzie związany był z przekształceniem ECM i regresją naczyń [11, 12]. Co więcej, wykazano, iż TGF wpływa na spadek ekspresji białka StAR i stężenia P4 w ludzkich komórkach ziarnistych [56]. W pracy wchodzącej w skład osiągnięcia habilitacyjnego sformułowaliśmy hipotezę, według której TGF i jego receptory wykazują ekspresję w ciałku żółtym klaczy, uczestnicząc w luteolizie funkcjonalnej i strukturalnej oraz iż receptory ALK4, ALK5 i ALK7, są kluczowe dla zajścia luteolizy za pośrednictwem PGF2 α u klaczy. Kolejno, po potwierdzeniu wzrostu ekspresji TGF i ALK5 w komórkach późnej fazy CL, odkryliśmy również, że poddanie komórek ze środkowej fazy CL działaniu TGF, spowodowało spadek sekrecji P4 i PGE2 oraz ekspresji enzymów je syntetyzujących. Z drugiej strony, TGF stymulowało produkcję PGF2 α przez aktywację PGFS i PTGS2. W przypadku luteolizy strukturalnej, traktowanie komórek

lutealnych TGF spowodowało spadek żywotności komórek, stymulację aktywności kaspazy 3, wzrost ekspresji FASL i BAX (ang. *Bcl2 associated X*), a także zwiększenie aktywności enzymów związanych z odkładaniem kolagenu. Co więcej, poddanie komórek lutealnych działaniu SB431542, farmakologicznego inhibitora ALK5, ALK4 i ALK7 (ostatnie dwa będące receptorami typu I ścieżki sygnałowej Nodal) zablokowało luetolityczne działanie PGF2 α w warunkach *in vitro*.

Wyniki - Podobnie jak w poprzednim eksperymencie z zastosowaniem białka Nodal, badania w opisywanej pracy również rozpoczęliśmy od charakterystyki ekspresji ścieżki sygnałowej TGF w fazach lutelanych cyklu rujowego, a następnie wykonaliśmy badania funkcjonalne. Ekspresja TGF zarówno na poziomie mRNA, jak i białka była najwyższa w środkowo-lutealnej fazie cyklu rujowego i pozostała na wysokim poziomie w fazie późno-lutealnej (Ryc. 11A i B, $p < 0.05$). W przypadku ALK5, pomimo braku zmian w ekspresji mRNA (Ryc. 11C), ekspresja na poziomie białka wykazała podobną tendencję, jak w przypadku TGF, wzrastając w fazie środkowo- i późno-lutealnej (Ryc. 11D, $p < 0.05$). Nie odnotowano zmian ekspresji zarówno mRNA, jak i białka TGFR2 (Ryc. 11E and F). Analiza immunohistochemiczna ($n=4$ /fazę/białko) potwierdziła ekspresję TGF, ALK5 i TGFR2 w cytoplazmie komórek śródbłonna, steroidogennych i lutealnych komórkach przypominających fibroblasty (Ryc. 12A-C). Ekspresja cytokin z nadrodziny TGF na poziomie mRNA i białka została wcześniej opisana u innych gatunków, np. w komórkach lutealnych człowieka [57], czy ciała żółtego ciężarnej samicy makaka rezusa [58], chomika [59], szczura [60] czy pazurczatki [61]. W przeprowadzonych badaniach udowodniliśmy, iż ścieżka sygnałowa TGF może być także związana z regulacją funkcjonowania ciała żółtego u klaczy.



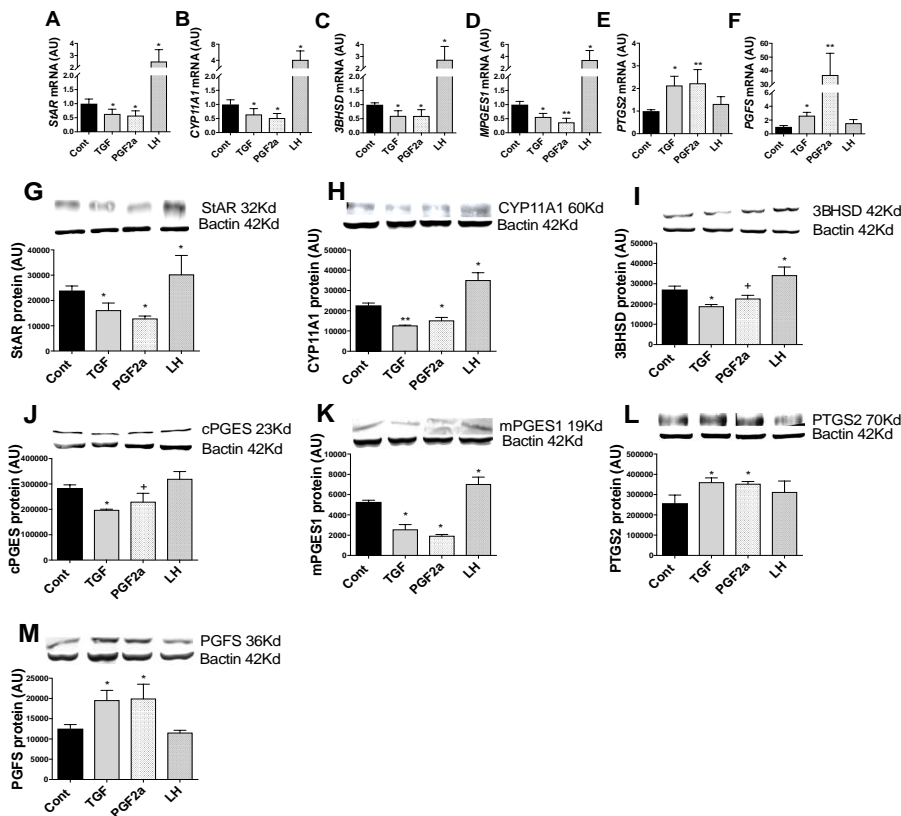
Ryc. 11 Ekspresja TGF i jego receptorów we wczesnej, środkowej i późnej fazie lutealnej ciała żółtego u kłaczy na poziomie mRNA i białka. Analiza ekspresji mRNA *TGF* (A), *ALK5* (C), i *TGFR2* (E) została wykonana z wykorzystaniem metody *real time* PCR (n=6). Wartości znormalizowano względem genu referencyjnego *B2MG*. Ekspresja TGF (B), *ALK5* (D), i *TGFR2* (F) na poziomie białka. Pomiaru dokonano za pomocą analizy Western-blot; powyżej wykresu przedstawiono reprezentatywne zdjęcia membrany; wykres przedstawia wyniki analizy densytometrycznej poziomu białka znormalizowanego względem β -aktyny. Wartości wyrażono w postaci wartości średnich \pm S.E.M. w jednostkach umownych. Słupki oznaczone literami „a” i „b” oznaczają istotne statystycznie różnice ($p < 0.05$).



Ryc. 12 Reprezentatywne obrazy immunobarwienia na obecność TGF w późno-lutealnej fazie (A), ALK5 w środkowo-lutealnej fazie (B), i TGFR2 w środkowo-lutealnej fazie CL (C). Kontrola negatywna z zastosowaniem króliczej immunoglobuliny typu G (IgG).

Po scharakteryzowaniu ekspresji ścieżki sygnałowej TGF w CL klaczy, podjęliśmy próbę zrozumienia, czy TGF jest w stanie regulować aktywność sekrecyjną komórek CL. Badania rozpoczęliśmy od potwierdzenia aktywacji kanonicznej ścieżki sygnałowej TGF w komórkach CL klaczy poprzez pomiar fosforylacji SMAD3P. Zarówno TGF, jak i PGF2 α spowodowały spadek ekspresji mRNA *StAR*, *CYP11A1*, *3BHSD*, *MPGES1* (Ryc. 13B-E, odpowiednio; $p < 0.05$), podczas gdy poddanie komórek lutealnych działaniu TGF i PGF2 α spowodowało wzrost ekspresji zarówno *PTGSE*, jak i *PGFS* (Ryc. 13F i G, odpowiednio; $p < 0.05$). Ponadto, ekspresja białek *StAR*, *CYP11A1*, *3BHSD* i *mPGES1* uległa zmniejszeniu po stymulacji TGF i PGF2 α (Ryc. 13H-L; $p < 0.05$). Również translacja *cPGES* została zahamowana przez TGF (Ryc. 13K; $p < 0.05$) i PGF2 α (Ryc. 13K; $p = 0.06$). Co więcej, poddanie komórek działaniu TGF i PGF2 α spowodowało wzrost ekspresji *PTGS2* i *PGFS* (Ryc. 13M-N; $p < 0.05$). Poprzednie badania również wykazały steroidogenne właściwości TGF w komórkach jajnika. W komórkach osłonki pęcherzyka jajnikowego u szczura TGF spowodowało wzrost ekspresji *CYP17A1* (ang. *17 α -hydroxylase/17-20-lyase*) [62]. Z drugiej strony, Miyamoto i współpracownicy wykazali zależną od dawki inhibicję podstawowej oraz stymulowanej LH sekrecji P4, z jednoczesnym wzrostem wydzielania oksytocyny w komórkach bydłowego CL poddanych działaniu TGF [63]. W prezentowanej pracy scharakteryzowaliśmy ekspresję enzymów powodujących spadek wydzielania P4. Ponadto, udowodniliśmy, iż hamujący wpływ TGF na wydzielanie PGE2 w ciałku żółtym klaczy następuje poprzez modulację ekspresji *cPGES* i *mPGES1*. Następnie, zgodnie z profilem

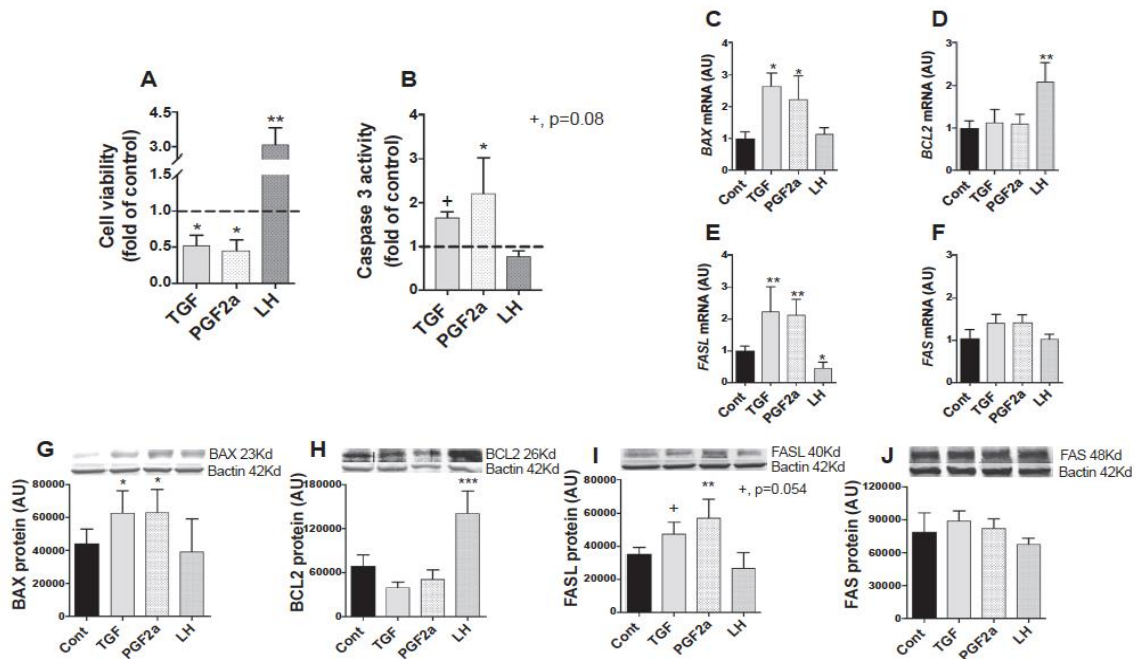
ekspresji genów, poddanie komórek lutealnych działaniu TGF konsekwentnie spowodowało spadek stężenia P4 ($p < 0.05$) i PGE2 ($p < 0.01$), oraz wzrost PGF2 α w medium hodowlanym ($p < 0.05$). LH wywołało wzrost wydzielania zarówno P4, jak i PGE2. W przypadku wszystkich badanych czynników po zastosowaniu połączenia TGF z LH, efekt TGF widoczny w poprzednich badaniach został zniwelowany.



Ryc. 13 Wpływ TGF (1 ng/ml) na transkrypcję mRNA: *StAR* (B), *CYP11A1* (C), *3-HSD* (D), *PTGS2* (E), *mPGES1* (F) i *PGFS* (G) zbadany z zastosowaniem metody *real time* PCR. Wpływ białka TGF (1ng/ml) na ekspresję białek *StAR* (H), *CYP11A1* (I), *3-HSD* (J), *PTGS2* (K), *cPGES* (L), *mPGES1* (M), *mPGES2* (N), i *PGFS* (O) zbadany z zastosowaniem metody Western-blot.

Wykazaliśmy nieznaną dotąd funkcję TGF w luteolizie strukturalnej u kłaczy. Test przeżywalności komórek wykazał, że TGF i PGF2 α znacząco zmniejszyły żywotność komórek w hodowli *in vitro* (Ryc.14A; $p < 0.05$). Podobnie, aktywność kaspazy 3 została zwiększona po stymulacji TGF (Ryc.14B; $p = 0.08$) i PGF2 α (Ryc.14B; $p < 0.05$). Ponadto, zbadaliśmy mechanizmy powodujące śmierć komórek lutealnych i odkryliśmy, że zarówno

TGF, jak i PGF2 α stymulowały ekspresję BAX i FASL na poziomie mRNA i białka (Ryc.14C, E, G and I; p<0.05).

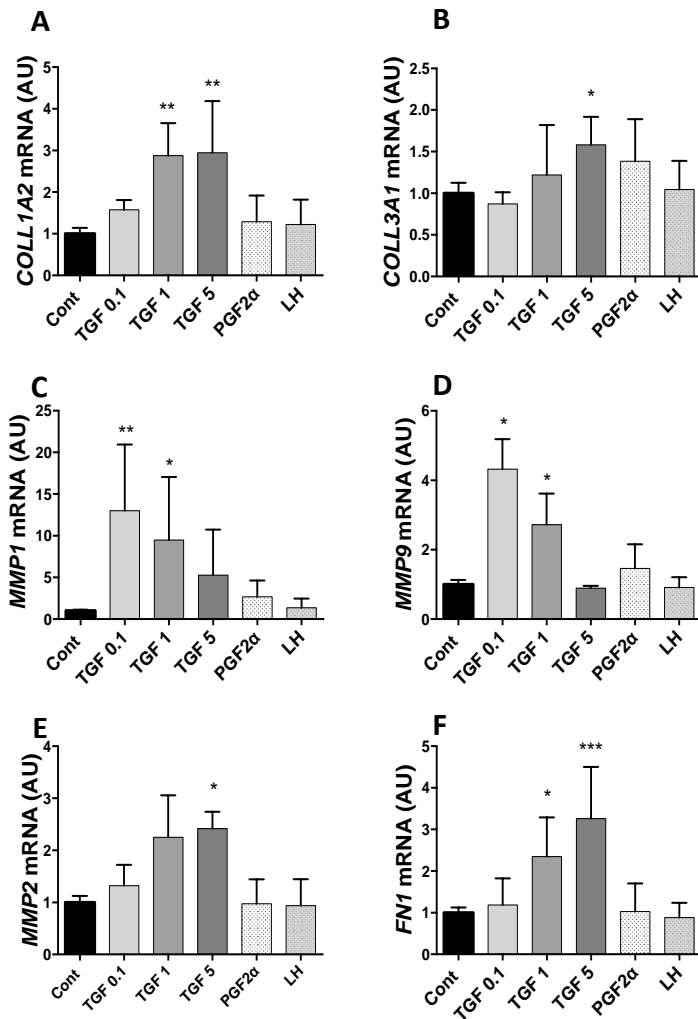


Ryc. 14 Żywotność komórek (n=6) środkowej fazy ciała żółtego (A) i aktywność kaspazy 3 (B) po 24 godz. stymulacji komórek lutealnych TGF. Kontrola negatywna oznaczona linią przerywaną. Analiza ekspresji mRNA *BAX* (C), *BCL2* (D), *FASL* (E) i *FAS* (F) została wykonana z wykorzystaniem techniki *real time* PCR. Dane znormalizowane względem ekspresji B2MG (n=6). Analiza ekspresji białka BAX (G), BCL2 (H), FASL (I), FAS (J) została wykonana z zastosowaniem metody Western-blot. Dane znormalizowane względem ekspresji β aktyny (n=4).

Jeśli chodzi o proces przebudowy tkanki, profibrotyczne działanie TGF w trakcie luteolizy zostało wcześniej wykazane w różnych elementach CL. Maroni i Davis (2012) udowodnili, że poddanie fibroblastów pochodzących z CL działaniu TGF, spowodowało wzrost ekspresji lamininy, kolagenu (COLL1) oraz metaloproteinazy 1 (MMP1) [43]. Co istotne, fibroblasty pochodzące z CL nie wykazują ekspresji receptorów PGF2 α , która jest odnotowana w przypadku komórek steroidogennych. Sugeruje to, że interakcje parakryne są fundamentalne w rozprzestrzanianiu sygnałów luteolitycznych. Tak więc, ekspresja profibrotycznych mediatorów z lutealnych fibroblastów jest regulowana przez TGF, którego ekspresja jest indukowana przez PGF2 α w komórkach steroidogennych [43]. W badaniach *in vitro* wyizolowanych komórek CL ze środkowo-lutealnej fazy, udowodniliśmy, że TGF

spowodował aktywację transkrypcji genów pro-fibrotycznych *COLL1A2* i *COLL3A2* w zależności od dawki (Ryc. 15). Sugeruje to, że TGF może aktywować transkrypcję profibrotycznych czynników w ciałku żółtym klaczy, które ulega regresji. Następnie zbadaliśmy ekspresję MMP i wykazaliśmy, iż ekspresja mRNA *MMP1* i *MMP9* gwałtownie wzrosła po stymulacji cytokiną TGF w dawce 0.1 i 1 ng/ml (Ryc. 15C i D), podczas gdy poziom ekspresji *MMP2* wzrósł nieznacznie wyłącznie w przypadku zastosowania TGF w dawce 5 ng/ml (Ryc. 15E). W ludzkim ciałku żółtym wykazano, że ekspresja *MMP2* była najwyższa w późnej fazie CL [64], co wskazuje na jego udział w luteolizie. *MMP9* odgrywa istotną rolę w procesie przebudowy ECM po owulacji i w trakcie powstawania CL [64]. Podczas gdy Maronie i Davis (2012) wykazali związek pomiędzy TGF i *MMP1* w trakcie luteolizy [43], my zbadaliśmy związek *MMP9* i *MMP1* z TGF. Co więcej, TGF w dawce 1 i 5 ng/ml spowodował również wzrost ekspresji mRNA innego składnika ECM *fibronektyny (FN) 1* (Ryc. 15F). Ogólnie, sugerujemy, że TGF bierze udział w regresji strukturalnej, odgrywając rolę pro-fibrotyczną poprzez wpływ na depozycję kolagenu i przebudowę ECM.

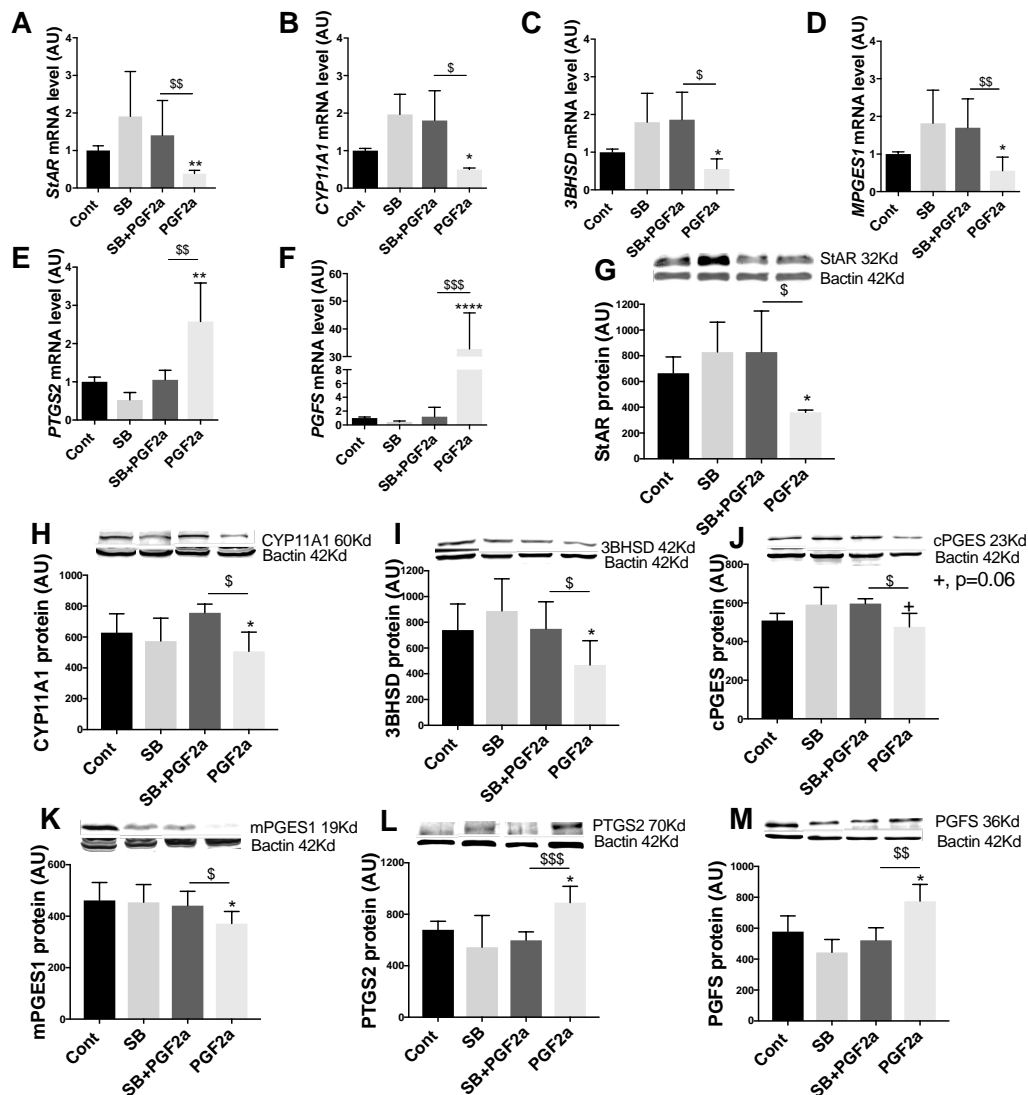
Ostatecznie, przeprowadziliśmy badania, których celem było ustalenie w jakim stopniu aktywność luteolityczna $PGF2\alpha$ u klaczy była zależna od aktywności Nodal i TGF. Przeprowadziliśmy eksperyment, w którym farmakologicznym inhibitorem zablokowaliśmy wewnątrzkomórkowe receptory typu I ALK4, ALK5 i ALK7 i poddaliśmy komórki działaniu $PGF2\alpha$. Co ciekawe, potwierdziliśmy, że $PGF2\alpha$ stymulowała fosforylację SMAD3 w komórkach CL klaczy, który jest mediatorem w obu ścieżkach sygnałowych białek Nodal i TGF [52]. Dlatego też istnieje duże prawdopodobieństwo, że wzajemne oddziaływanie między ścieżkami sygnałowymi TGF i Nodal, a $PGF2\alpha$ służy zwiększeniu sygnałów luteolitycznych w ciałku żółtym u klaczy. Z tego względu, po ustaleniu optymalnej dawki SB431542 (SB) -10 μ M (testowane dawki - 1, 2 i 10 μ M), potwierdziliśmy, że SB nie powodowało żadnych zmian w transkrypcji i translacji badanych czynników.



Ryc. 15 Ekspresja genów pro-fibrotycznych: kolagenu (*COLL*) 1A2 (A), *COLL* 3A1 (B), metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (*MMP*) 1 (C), *MMP* 9 (D), *MMP* 2 (E), i fibronektyny (*FN1*) (F) w komórkach CL środkowej fazy lutealnej klaczy po stymulacji *in vitro*: (i) fizjologicznym roztworem soli; (ii) TGF w różnych stężeniach (od 0.1 do 5 ng/ml); (iii) PGF2 α i (iv) LH (10 ng/ml). Analiza została wykonana z wykorzystaniem metody *real time* PCR.

Luteolityczna PGF2 α spowodowała spadek transkrypcji *StAR*, *CYP11A1*, *3BHSD* i *mPGES1* (Ryc.16A-D; $p < 0.05$). Niemniej jednak, kiedy SB użyto w połączeniu z PGF2 α (SB + PGF2 α), hamujący wpływ PGF2 α na wyżej wymienione geny został zniesiony (Ryc. 16A-D; $p < 0.05$). W przypadku *PTGS2* i *PGFS*, SB skutecznie zablokował działanie PGF2 α , kiedy to połączenie SB + PGF2 α nie spowodowało wzrostu ekspresji *PTGS2* oraz *PGFS* wywołanego przez PGF2 α (Ryc. 16E and F; $p < 0.001$). Profil ekspresji białek był zgodny z profilem zmian ekspresji mRNA. Traktowanie komórek PGF2 α spowodowało spadek ekspresji białek StAR,

CYP11A1, 3BHSD, mPGES1 (Ryc. 16G-I and K; $p < 0.05$), oraz cPGES, kiedy to odnotowano tendencję do spadku ekspresji (Fig. 16J; $p = 0.06$). Jednakże połączenie SB + PGF2 α spowodowało zablokowanie wcześniej zaobserwowanego hamującego wpływu PGF2 α na ekspresję białek StAR, CYP11A1, 3BHSD i cPGES (Fig. 16G-J; $p < 0.05$). W przypadku traktowania komórek PGF2 α , zaobserwowaliśmy stymulację ekspresji enzymów związanych z jego syntezą- PTGS2 i PGFS, a efekt ten był osłabiony przez traktowanie połączeniem SB + PGF2 α (Ryc. 16L-M; $p < 0.01$).



Ryc. 16 Farmakologiczne blokowanie ALK4, ALK5, i ALK7 w komórkach CL za pomocą SB431542 (SB) oraz jego wpływ na ekspresję enzymów syntetyzujących steroidy i eikozanoidy. Komórki środkowej fazy CL zostały poddane działaniu SB (10 ng/ml), PGF2 α (10-7M) lub połączeniu SB + PGF2 α . Badania przeprowadzono z zastosowaniem metody *real time* PCR (dane znormalizowano względem ekspresji B2MG; $n = 6$); oraz Western-blot

(n=4). Powyżej wykresu przedstawiono reprezentatywne zdjęcia membrany wywołanej kolorymetrycznie; wykres przedstawia wyniki analizy densytometrycznej poziomu białka znormalizowanego względem ekspresji β -aktyny. Wartości wyrażono w postaci średnich \pm SEM. * oznaczają istotne statystycznie różnice stosunku do kontroli negatywnej - Cont (*p<0.05; **p<0.01); \$ oznaczają istotne statystycznie różnice w stosunku do kontroli pozytywnej - PGF2a (\$p<0.05; \$\$p<0.01; \$\$\$p<0.001).

Wnioski – Wykazaliśmy, iż w ciałku żółtym klaczy dochodzi do ekspresji TGF i jego receptorów, a także, że aktywacja ścieżki sygnałowej TGF powoduje zahamowanie wydzielania P4 i PGE2 oraz wzrost ekspresji PGF2 α . Ponadto, TGF spowodował spadek żywotności lutealnych komórek steroidogennych w ciałku żółtym poprzez wpływ na ekspresję FASL, BAX i aktywację kaspazy 3. Udowodniliśmy również, że istnieje pętla sprzężeń zwrotnych pomiędzy ścieżkami sygnałowymi Nodal i TGF, a PGF2 α , w której aktywacja ALK5, ALK4 i ALK7 wydaje się być niezbędna do inicjacji sygnałów luteolitycznych przez PGF2 α u klaczy. Wyniki te świadczą o bezpośrednim udziale TGF w luteolizie funkcjonalnej i strukturalnej u klaczy, jak również ważnej roli ALK5, ALK4 oraz ALK7, jaką odgrywają w luteolizie sterowanej przez PGF2 α . Co więcej, wpływ TGF na luteolizę u klaczy zdaje się także obejmować reorganizację ECM poprzez aktywację MMP9, MMP1 i FN1.

Wnioski ogólne

U ssaków optymalne funkcjonowanie CL jest kluczowe dla utrzymania ciąży, jak również dla prawidłowego przebiegu cyklu rujowego. Progesteron wytwarzany przez komórki lutealne stymuluje aktywność sekrecyjną gruczołów endometrium. Ponadto, miejscowe działanie auto- i parakryne P4 w ciałku żółtym, powoduje aktywację mediatorów takich jak TNF, cAMP/kinaza białkowa A, FGF2, i NO, które powodują inicjację wielu procesów komórkowych, np. unaczynienia, przebudowy ECM, steroidogenezy i proliferacji komórek. Ta bardzo szybka sekwencja wydarzeń powoduje gwałtowne podniesienie poziomu P4 we krwi, co jest fundamentalne dla utrzymania ciąży. W przypadku gdy nie dojdzie do zapłodnienia, PGF2 α pochodzenia macicznego zapoczątkowuje proces luteolizy. W konsekwencji, w ciałku żółtym inicjowanych jest wiele interakcji, które powodują: a) zaburzenie steroidogenezy – luteolizę funkcjonalną; i b) angioregresję, śmierć komórek lutealnych i komórek śródbłonna oraz zanik organu - luteolizę strukturalną. W niniejszym osiągnięciu habilitacyjnym udowodniono, iż czynniki auto- i parakryne, takie jak TNF, FASL, IFNG, Nodal i TGF, są zaangażowane w różne etapy procesu luteolizy u klaczy i mogą potencjalnie sterować jego regulacją. Szczególnie Nodal i TGF okazały się hamować steroidogenezę i angiogenezę oraz aktywować procesy różnego rodzaju śmierci komórkowej, jak apoptozę i nekrotozę, Wpływ nowych czynników takich jak Nodal- członek nadrodziny TGF, na proces luteolizy jest przedmiotem badań, co podkreśla zawłość tego procesu. Lepsze zrozumienie mechanizmów działania tych czynników pozwoli na poszukiwanie nowych, potencjalnych sposobów leczenia niewydolności CL czy nowych strategii sterowania cyklem rujowym.

Dysfunkcje jajników są powodem niepłodności u ludzi i innych gatunków. Pomimo istotności tego problemu, fizjologiczne znaczenie większości badań nad funkcjonowaniem jajników u kobiet jest wątpliwe, ponieważ bazują one na eksperymentach przeprowadzonych na nieprawidłowej tkance lub komórkach ziarnistych pobranych od kobiet uczestniczących w badaniach zapłodnienia metodą *in vitro* po podaniu egzogennych niefizjologicznych dawek gonadotropin [65]. Z powodu szczególnych podobieństw między kobietą, a klaczą w wielu aspektach funkcjonowania jajników, ciałko żółte klaczy jest cennym modelem wykorzystywanym do lepszego zbadania ścieżek regulacyjnych biorących udział w kontrolowaniu procesów fizjologicznych w jajnikach [66]. Biorąc pod uwagę fakt, iż CL podlega gwałtownym zmianom komórkowym i naczyniowym, porównywalnym jedynie z nowotworem [67], czynniki regulujące procesy angiogenezy, migracji i inwazji komórek

mogą również odgrywać istotną rolę w funkcjonowaniu CL. Koordynacja omawianych procesów biologicznych polega na złożonych wzajemnych oddziaływaniach pomiędzy wymienianymi czynnikami. Biorąc pod uwagę zdolności plejotropowe cytokin, szczególną uwagę poświęca się obecnie badaniom ich wpływu na regulację funkcji rozrodczych, [68].

Szacuje się, że rynek związany z hodowlą koni w Europie wart jest 100 miliardów euro PKB oraz stwarza 400 tysięcy pełnoetatowych miejsc pracy głównie na obszarach wiejskich. Biorąc pod uwagę wpływ na produkcję koni, lepsze zrozumienie mechanizmów kontrolujących funkcjonowanie jajników poprawi wydajność reprodukcyjną u koni, a w konsekwencji zwiększy przychody i przyczyni się do rozwoju wiedzy naukowej.

Bibliografia

- [1] A.M. Galvão, D. Skarzynski, G. Ferreira-Dias, Luteolysis and the Auto-, Paracrine Role of Cytokines From Tumor Necrosis Factor α and Transforming Growth Factor β Superfamilies, *Vitam. Horm.* 107 (2018) 287–315. doi:10.1016/bs.vh.2018.01.001.
- [2] E.D. Watson, P.L. Sertich, Secretion of prostaglandins and progesterone by cells from corpora lutea of mares, *J. Reprod. Fertil.* 88 (1990) 223–229.
- [3] J.L. Juengel, T.M. Nett, T.R. Tandeski, D.C. Eckery, H.R. Sawyer, G.D. Niswender, Effects of luteinizing hormone and growth hormone on luteal development in hypophysectomized ewes, *Endocrine.* 3 (1995) 323–326. doi:10.1007/BF03021414.
- [4] G.D. Niswender, T.M. Nett, Corpus luteum and its control in infraprimate species, in: E. Knobil (Ed.), *KNOBIL AND NEILL'S PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION*, Third Edition, Elsevier Academic Press Publications, 1994; pp. 781–816.
- [5] D.J. Skarzynski, G. Ferreira-Dias, K. Okuda, Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal control, immune mechanisms and intercellular communication, *Reprod. Domest. Anim.* 43 Suppl 2 (2008) 57–65. doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01143.x.
- [6] T.M. Crisp, C.P. Channing, Fine structural events correlated with progesterin secretion during luteinization of rhesus monkey granulosa cells in culture, *Biol. Reprod.* 7 (1972) 55–72.
- [7] O.J. Ginther, M.D. Utt, D.R. Bergfelt, M.A. Beg, Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares, *Anim. Reprod. Sci.* 95 (2006) 144–150. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.10.008.
- [8] A. Jablonka-Shariff, A.T. Grazul-Bilska, D.A. Redmer, L.P. Reynolds, Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle, *Endocrinology.* 133 (1993) 1871–1879. doi:10.1210/endo.133.4.8404629.
- [9] J.D. Graham, C.L. Clarke, Physiological action of progesterone in target tissues, *Endocr. Rev.* 18 (1997) 502–519. doi:10.1210/edrv.18.4.0308.
- [10] B.D. Murphy, Models of Luteinization, *Biology of Reproduction.* 63 (2000) 2–11. doi:10.1095/biolreprod63.1.2.
- [11] G. Ferreira-Dias, P.P. Bravo, L. Mateus, D.A. Redmer, J.A. Medeiros, Microvascularization and angiogenic activity of equine corpora lutea throughout the estrous cycle, *Domest. Anim. Endocrinol.* 30 (2006) 247–259. doi:10.1016/j.domaniend.2005.07.007.
- [12] R.S. Robinson, K.J. Woad, Luteal Angiogenesis, in: R. Meidan (Ed.), *The Life Cycle of the Corpus Luteum*, Springer International Publishing, 2017; pp. 1–21. doi:10.1007/978-3-319-43238-0_1.
- [13] D.S. Moons, S. Jirawatnotai, T. Tsutsui, R. Franks, A.F. Parlow, D.B. Hales, G. Gibori, A.T. Fazleabas, H. Kiyokawa, Intact follicular maturation and defective luteal function in mice deficient for cyclin- dependent kinase-4, *Endocrinology.* 143 (2002) 647–654. doi:10.1210/endo.143.2.8611.
- [14] M.J. Boden, T.J. Varcoe, A. Voultios, D.J. Kennaway, Reproductive biology of female Bmal1 null mice, *Reproduction.* 139 (2010) 1077–1090. doi:10.1530/REP-09-0523.
- [15] T.I. Azmi, J.D. O'Shea, Mechanism of deletion of endothelial cells during regression of the corpus luteum, *Lab. Invest.* 51 (1984) 206–217.
- [16] H.M. Fraser, C. Wulff, Angiogenesis in the corpus luteum, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1 (2003) 88. doi:10.1186/1477-7827-1-88.

- [17] S.E. Dickson, H.M. Fraser, Inhibition of early luteal angiogenesis by gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment in the primate, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (2000) 2339–2344.
- [18] R. Wu, K.H. Van der Hoek, N.K. Ryan, R.J. Norman, R.L. Robker, Macrophage contributions to ovarian function, *Hum. Reprod. Update.* 10 (2004) 119–133. doi:10.1093/humupd/dmh011.
- [19] H. Kliem, H. Welter, W.D. Kraetzl, M. Steffl, H.H.D. Meyer, D. Schams, B. Berisha, Expression and localisation of extracellular matrix degrading proteases and their inhibitors during the oestrous cycle and after induced luteolysis in the bovine corpus luteum, *Reproduction.* 134 (2007) 535–547. doi:10.1530/REP-06-0172.
- [20] M. Shozu, N. Minami, H. Yokoyama, M. Inoue, H. Kurihara, K. Matsushima, K. Kuno, ADAMTS-1 is involved in normal follicular development, ovulatory process and organization of the medullary vascular network in the ovary, *J. Mol. Endocrinol.* 35 (2005) 343–355. doi:10.1677/jme.1.01735.
- [21] P. Madan, P.J. Bridges, C.M. Komar, A.G. Beristain, R. Rajamahendran, J.E. Fortune, C.D. MacCalman, Expression of messenger RNA for ADAMTS subtypes changes in the periovulatory follicle after the gonadotropin surge and during luteal development and regression in cattle, *Biol. Reprod.* 69 (2003) 1506–1514. doi:10.1095/biolreprod.102.013714.
- [22] J. Kim, I.C. Bagchi, M.K. Bagchi, Signaling by hypoxia-inducible factors is critical for ovulation in mice, *Endocrinology.* 150 (2009) 3392–3400. doi:10.1210/en.2008-0948.
- [23] S.-C. Su, E.A. Mendoza, H.-I. Kwak, K.J. Bayless, Molecular profile of endothelial invasion of three-dimensional collagen matrices: insights into angiogenic sprout induction in wound healing, *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 295 (2008) C1215-1229. doi:10.1152/ajpcell.00336.2008.
- [24] R.S. Robinson, K.J. Woad, A.J. Hammond, M. Laird, M.G. Hunter, G.E. Mann, Angiogenesis and vascular function in the ovary, *Reproduction.* 138 (2009) 869–881. doi:10.1530/REP-09-0283.
- [25] G. Ferreira-Dias, A.S. Costa, L. Mateus, A.J. Korzekwa, A. Galvão, D.A. Redmer, K. Lukasik, A.Z. Szóstek, I. Woclawek-Potocka, D.J. Skarzynski, Nitric oxide stimulates progesterone and prostaglandin E2 secretion as well as angiogenic activity in the equine corpus luteum, *Domest. Anim. Endocrinol.* 40 (2011) 1–9. doi:10.1016/j.domaniend.2010.08.001.
- [26] R.P. Roberto da Costa, A.S. Costa, A.J. Korzekwa, R. Platek, M. Siemieniuch, A. Galvão, D.A. Redmer, J.R. Silva, D.J. Skarzynski, G. Ferreira-Dias, Actions of a nitric oxide donor on prostaglandin production and angiogenic activity in the equine endometrium, *Reprod. Fertil. Dev.* 20 (2008) 674–683.
- [27] A. Korzekwa, I. Woclawek-Potocka, K. Okuda, T.J. Acosta, D.J. Skarzynski, Nitric oxide in bovine corpus luteum: Possible mechanisms of action in luteolysis, *Animal Science Journal.* 78 (2007) 233–242. doi:10.1111/j.1740-0929.2007.00430.x.
- [28] D.J. Skarzynski, M.M. Bah, K.M. Deptula, I. Woclawek-Potocka, A. Korzekwa, M. Shibaya, W. Pilawski, K. Okuda, Roles of tumor necrosis factor-alpha of the estrous cycle in cattle: an in vivo study, *Biol. Reprod.* 69 (2003) 1907–1913. doi:10.1095/biolreprod.103.016212.
- [29] A.M. Galvao, D.W. Ramilo, D.J. Skarzynski, K. Lukasik, A. Tramontano, A. Mollo, L.M. Mateus, G.M.L. Ferreira-Dias, Is FAS/Fas ligand system involved in equine corpus luteum functional regression?, *Biol. Reprod.* 83 (2010) 901–908. doi:10.1095/biolreprod.110.084699.

- [30] S. Yoshioka, T.J. Acosta, K. Okuda, Roles of cytokines and progesterone in the regulation of the nitric oxide generating system in bovine luteal endothelial cells, *Mol. Reprod. Dev.* 79 (2012) 689–696. doi:10.1002/mrd.22075.
- [31] N. Nakatsubo, H. Kojima, K. Kikuchi, H. Nagoshi, Y. Hirata, D. Maeda, Y. Imai, T. Irimura, T. Nagano, Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diamino fluoresceins, *FEBS Lett.* 427 (1998) 263–266.
- [32] M. Vega, L. Urrutia, G. Iñiguez, F. Gabler, L. Devoto, M.C. Johnson, Nitric oxide induces apoptosis in the human corpus luteum in vitro, *Mol. Hum. Reprod.* 6 (2000) 681–687.
- [33] J.A. McCracken, J.C. Carlson, M.E. Glew, J.R. Goding, D.T. Baird, K. Gréen, B. Samuelsson, Prostaglandin F₂ identified as a luteolytic hormone in sheep, *Nature New Biol.* 238 (1972) 129–134.
- [34] R.H. Douglas, O.J. Ginther, Effect of prostaglandin F_{2a} on length of diestrus in mares, *Prostaglandins.* 2 (1972) 265–268. doi:10.1016/S0090-6980(72)80014-5.
- [35] A. Friedman, S. Weiss, N. Levy, R. Meidan, Role of tumor necrosis factor alpha and its type I receptor in luteal regression: induction of programmed cell death in bovine corpus luteum-derived endothelial cells, *Biol. Reprod.* 63 (2000) 1905–1912.
- [36] A. Galvão, D.J. Skarzynski, A. Szóstek, E. Silva, A. Tramontano, A. Mollo, L. Mateus, G. Ferreira-Dias, Cytokines tumor necrosis factor- α and interferon- γ participate in modulation of the equine corpus luteum as autocrine and paracrine factors, *J. Reprod. Immunol.* 93 (2012) 28–37. doi:10.1016/j.jri.2011.11.002.
- [37] D.J. Skarzynski, I. Woclawek-Potocka, A. Korzekwa, M.M. Bah, K. Piotrowska, B. Barszczewska, K. Okuda, Infusion of exogenous tumor necrosis factor dose dependently alters the length of the luteal phase in cattle: differential responses to treatment with indomethacin and L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, *Biol. Reprod.* 76 (2007) 619–627. doi:10.1095/biolreprod.106.053280.
- [38] A. Galvão, S. Henriques, D. Pestka, K. Lukasik, D. Skarzynski, L.M. Mateus, G.M.L. Ferreira-Dias, Equine luteal function regulation may depend on the interaction between cytokines and vascular endothelial growth factor: an in vitro study, *Biol. Reprod.* 86 (2012) 187. doi:10.1095/biolreprod.111.097147.
- [39] D.J. Skarzynski, J.J. Jaroszewski, K. Okuda, Role of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in luteolysis in cattle, *Domest. Anim. Endocrinol.* 29 (2005) 340–346. doi:10.1016/j.domaniend.2005.02.005.
- [40] H. Taniguchi, Y. Yokomizo, K. Okuda, Fas-Fas ligand system mediates luteal cell death in bovine corpus luteum, *Biol. Reprod.* 66 (2002) 754–759.
- [41] S.M. Quirk, R.M. Harman, S.C. Huber, R.G. Cowan, Responsiveness of mouse corpora luteal cells to Fas antigen (CD95)-mediated apoptosis, *Biol. Reprod.* 63 (2000) 49–56.
- [42] D. Maroni, J.S. Davis, TGFB1 disrupts the angiogenic potential of microvascular endothelial cells of the corpus luteum, *J Cell Sci.* 124 (2011) 2501–2510. doi:10.1242/jcs.084558.
- [43] D. Maroni, J.S. Davis, Transforming growth factor Beta 1 stimulates profibrotic activities of luteal fibroblasts in cows, *Biol. Reprod.* 87 (2012) 127. doi:10.1095/biolreprod.112.100735.
- [44] D.A. Redmer, L.P. Reynolds, Angiogenesis in the ovary, *Rev. Reprod.* 1 (1996) 182–192.
- [45] A.F. Schier, Nodal Morphogens, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 (2009) a003459. doi:10.1101/cshperspect.a003459.

- [46] K. Takaoka, M. Yamamoto, H. Shiratori, C. Meno, J. Rossant, Y. Saijoh, H. Hamada, The mouse embryo autonomously acquires anterior-posterior polarity at implantation, *Dev. Cell.* 10 (2006) 451–459. doi:10.1016/j.devcel.2006.02.017.
- [47] J.C. Smith, Mesoderm-inducing factors and mesodermal patterning, *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (1995) 856–861.
- [48] P.B. Cornet, C. Picquet, P. Lemoine, K.G. Osteen, K.L. Bruner-Tran, S. Tabibzadeh, P.J. Courtoy, Y. Eeckhout, E. Marbaix, P. Henriët, Regulation and function of LEFTY-A/EBAF in the human endometrium. mRNA expression during the menstrual cycle, control by progesterone, and effect on matrix metalloproteinases, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 42496–42504. doi:10.1074/jbc.M201793200.
- [49] M.E. Argañaraz, S.A. Apichela, R. Kenngott, M. Vermeheren, D. Rodler, G.A. Palma, D.C. Miceli, F. Sinowatz, Expression and localization of nodal in bovine oviduct and uterus during different functional stages of oestrus cycle and pregnancy, *Histochem. Cell Biol.* 139 (2013) 89–97. doi:10.1007/s00418-012-1030-4.
- [50] G. Fu, C. Peng, Nodal enhances the activity of FoxO3a and its synergistic interaction with Smads to regulate cyclin G2 transcription in ovarian cancer cells, *Oncogene.* 30 (2011) 3953–3966. doi:10.1038/onc.2011.127.
- [51] H. Wang, J.-Y. Jiang, C. Zhu, C. Peng, B.K. Tsang, Role and regulation of nodal/activin receptor-like kinase 7 signaling pathway in the control of ovarian follicular atresia, *Mol. Endocrinol.* 20 (2006) 2469–2482. doi:10.1210/me.2005-0446.
- [52] A. Galvão, D. Skarzynski, G. Ferreira-Dias, Nodal Promotes Functional Luteolysis via Down-Regulation of Progesterone and Prostaglandins E2 and Promotion of PGF2 α Synthetic Pathways in Mare Corpus Luteum, *Endocrinology.* 157 (2016) 858–871. doi:10.1210/en.2015-1362.
- [53] J. Massagué, TGF β signalling in context, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13 (2012) 616–630. doi:10.1038/nrm3434.
- [54] H. Wang, B.K. Tsang, Nodal signalling and apoptosis, *Reproduction.* 133 (2007) 847–853. doi:10.1530/REP-07-0053.
- [55] S. Farberov, R. Meidan, Functions and transcriptional regulation of thrombospondins and their interrelationship with fibroblast growth factor-2 in bovine luteal cells, *Biol. Reprod.* 91 (2014) 58. doi:10.1095/biolreprod.114.121020.
- [56] L. Fang, H.-M. Chang, J.-C. Cheng, P.C.K. Leung, Y.-P. Sun, TGF- β 1 downregulates StAR expression and decreases progesterone production through Smad3 and ERK1/2 signaling pathways in human granulosa cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (2014) E2234–2243. doi:10.1210/jc.2014-1930.
- [57] N. Chegini, R.S. Williams, Immunocytochemical localization of transforming growth factors (TGFs) TGF-alpha and TGF-beta in human ovarian tissues, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74 (1992) 973–980. doi:10.1210/jcem.74.5.1569174.
- [58] X.-L. Chen, H.-J. Gao, P. Wei, X.-X. Song, Z.-Y. Hu, Y.-X. Liu, Regulatory effect of IFN-gamma on expression of TGF-beta 1, T beta R-II, and StAR in corpus luteum of pregnant rhesus monkey, *Acta Pharmacol. Sin.* 24 (2003) 435–441.
- [59] S.K. Roy, A.R. Kole, Transforming growth factor-beta receptor type II expression in the hamster ovary: cellular site(s), biochemical properties, and hormonal regulation, *Endocrinology.* 136 (1995) 4610–4620. doi:10.1210/endo.136.10.7664681.
- [60] K.J. Teerds, J.H. Dorrington, Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 during follicular development in the adult rat ovary, *Mol. Cell. Endocrinol.* 84 (1992) R7-13.
- [61] U. Wehrenberg, J. Giebel, G.M. Rune, Possible involvement of transforming growth factor-beta 1 and transforming growth factor-beta receptor type II during luteinization in the marmoset ovary, *Tissue Cell.* 30 (1998) 360–367.

- [62] E.R. Hernandez, A. Hurwitz, D.W. Payne, A.M. Dharmarajan, A.F. Purchio, E.Y. Adashi, Transforming growth factor-beta 1 inhibits ovarian androgen production: gene expression, cellular localization, mechanisms(s), and site(s) of action, *Endocrinology*. 127 (1990) 2804–2811. doi:10.1210/endo-127-6-2804.
- [63] A. Miyamoto, K. Okuda, F.J. Schweigert, D. Schams, Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro, *J. Endocrinol.* 135 (1992) 103–114.
- [64] W.C. Duncan, A.S. McNeilly, P.J. Illingworth, The Effect of Luteal “Rescue” on the Expression and Localization of Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in the Human Corpus Luteum, *J Clin Endocrinol Metab.* 83 (1998) 2470–2478. doi:10.1210/jcem.83.7.4950.
- [65] H. Matsubara, K. Ikuta, Y. Ozaki, Y. Suzuki, N. Suzuki, T. Sato, K. Suzumori, Gonadotropins and cytokines affect luteal function through control of apoptosis in human luteinized granulosa cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (2000) 1620–1626. doi:10.1210/jcem.85.4.6509.
- [66] O.J. Ginther, E.L. Gastal, M.O. Gastal, D.R. Bergfelt, A.R. Baerwald, R.A. Pierson, Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women, *Biol. Reprod.* 71 (2004) 1195–1201. doi:10.1095/biolreprod.104.031054.
- [67] L.P. Reynolds, A.T. Grazul-Bilska, D.A. Redmer, Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications, *Int J Exp Pathol.* 83 (2002) 151–163.
- [68] H.N. Jabbour, K.J. Sales, R.D. Catalano, J.E. Norman, Inflammatory pathways in female reproductive health and disease, *Reproduction.* 138 (2009) 903–919. doi:10.1530/REP-09-0247.

Antonio Miguel G.T. Galvão