

## 1. INFORMACJE ŻYCIORYSOWE

Urodziłam się 11 października 1978 roku w Łodzi. W 1997 r. ukończyłam XXXI Liceum Ogólnokształcącego w Łodzi. Podczas edukacji w LO uczestniczyłam w olimpiadach i konkursach przedmiotowych, zostałam finalistką szczebla krajowego Olimpiady Wiedzy Ekologicznej (1995) i Biologicznej (1996). W roku 1997 rozpoczęłam studia na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy) we Wrocławiu. W latach 1998 - 2002 aktywnie uczestniczyłam w pracach Anatomicznego Koła Naukowego przy Katedrze Anatomii Zwierząt, następnie Koła Naukowego Rozrodu Zwierząt i Immunologicznego Koła Naukowego Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, AR. W dniu 21 lutego 2003 roku ukończyłam studia wyższe otrzymując dyplom Lekarza Weterynarii.

### 1.1 WYKSZTAŁCENIE

- 1985-1993 – Szkoła Podstawowa nr 64 w Łodzi,
- 1993-1997 – XXXI Liceum Ogólnokształcące im. Leona Kruczkowskiego w Łodzi,
- 1997-2003 - Akademia Rolnicza we Wrocławiu Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Kierunek: Weterynaria
- 21.02.2003 - uzyskanie tytułu **lekarza weterynarii**
- 24.10.2006 - uzyskanie tytułu **doktora nauk weterynaryjnych**

### 1.2. DOŚWIADCZENIA ZAWODOWE

- 06.2003-09.2003 – staż na stanowisku „lekarz weterynarii” w Schronisku dla Zwierząt w Łodzi
- 01.10.2003-31.10.2006 – studia doktoranckie w Katedrze i Klinice Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy oraz Ochrony Zdrowia Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR we Wrocławiu
- 07. 2006. Klinika Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej Akademii Medycznej w Białymstoku (pod kierunkiem prof. dr hab. Sławomira Wołczyńskiego); 1 tydzień (2006)
- od 01.11.2006 do chwili obecnej - adiunkt w Zakładzie Immunologii i Patologii Rozrodu Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie
- **Portugalia**, Uniwersytet w Lizbonie, 13-20.10.2007. – staż 1-tygodniowy (**visitingresearcher**) związany z udziałem w projekcie międzynarodowym: „Apoptoza i angiogeneza w jajniku kłaczy podczas cyklu płciowego”. Umowa między Rzeczpospolitą Polską a Republiką Portugalską o współpracy naukowej i technicznej (podpisana w Lizbonie w dniu 17.06.2005)
- **Polska**, Instytut Zootechniki PIB w Balicach, 10-15.2007. – staż 1-tygodniowy: produkcja zarodków in vitro, pod kierunkiem prof. dr hab. Lucyny Kątskiej-Książkiewicz;

- **Japonia**, Okayama University 1.10.2008.-30.09.2009. – staż długoterminowy 12-miesięczny (**post doc position**) stypendium Japan Society for the Promotion of Science pod kierunkiem prof. Kiyoshi Okuda.
- **Szwajcaria**, Zurich, Vet Swiss Faculty, 5.02.-29.04.2011. – staż 3-miesięczny (**visiting researcher**).
- **Szwajcaria**, Zurich, Vet Swiss Faculty, 28.09.-12.10.2011. – staż 2-tygodniowy (**visiting researcher**).
- **USA**, Woods Hole, MA, 29.04.-10.06.2012. – staż 6-tygodniowy, specjalistyczny kurs pt. Frontiers in Reproduction.

## 2. GŁÓWNE KIERUNKI PROWADZONYCH BADAŃ

- Konserwacja nasienia zwierząt domowych i dzikich oraz ocena jego przydatności do celów sztucznej inseminacji.
- Regulacje immuno-endokrynne w błonie śluzowej macicy oraz w łożysku i jajniku kotki domowej w aspekcie fizjologii rozrodu
- Biotechnika w rozrodzie krów oraz mediatory procesów fizjologicznych w układzie rozrodczym krowy w cyklu i wczesnej ciąży. Poza-odżywcze składniki pasz wpływające na fizjologię rozrodu krowy
- Immuno-endokrynne regulacje procesów fizjologicznych i patologicznych w błonie śluzowej macicy klaczy

## 3. WAŻNIEJSZE OSIĄGNIĘCIA W ZAKRESIE PROWADZONYCH BADAŃ

### 3.1 Konserwacja nasienia zwierząt domowych i dzikich oraz ocena jego przydatności do celów sztucznej inseminacji

Podczas studiów doktoranckich prowadziłam badania obejmujące opracowanie metod pobierania i oceny nasienia świeżego, zmian występujących podczas przechowywania nasienia w rozrzedzalnikach płynnych oraz przydatności plemników przechowywanych w różnych warunkach do celów sztucznej inseminacji. Cykl badań poświęconych opracowaniu metod izolacji plemników z najądrzy kota domowego, ich ocenie oraz konserwacji w rozrzedzalnikach płynnych oraz w temperaturze  $-196^{\circ}\text{C}$  oraz ocena aktywności spermatogenetycznej gonady w zależności od wieku zwierzęcia i sezonu rozrodczego stanowiły trzon mojej rozprawy doktorskiej. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że wykształcenie kanalików nasieniotwórczych i rozpoczęcie aktywności spermatogenicznej występuje u kotów poniżej 8 miesiąca życia; w tym okresie występuje również najwięcej zmian apoptotycznych w gonadach. Najefektywniej przebiegająca spermatogeneza, wraz z najlepszymi wskaźnikami jakościowymi nasienia, występuje u kotów w wieku od 1 do 3 roku życia. Analizy cytometryczne oraz komputerowo wspomaganą ocenę ruchliwości plemników potwierdziły przydatność plemników pozyskanych z najądrzy do konserwacji w niskich temperaturach oraz ich potencjalne wykorzystanie w procedurach wspomaganego rozrodu. Do

konserwacji plemników najdłuższych w temperaturze + 4°C zaadaptowano rozrzedzalnik stosowany do konserwacji nasienia psa, zawierający pastę Equex STM, uzyskując zadowalające parametry ruchliwości oraz niski odsetek plemników z uszkodzonymi akrosomami.

Część moich zainteresowań badawczych związana była z poznaniem biologii rozrodu zwierząt dziko żyjących, głównie zająca szaraka. Wynikiem prowadzonych badań było opracowanie metodyki pozyskiwania nasienia zająca szaraka, jego oceny pod kątem morfologicznym, konserwacji, jak również opracowanie metod owulacji farmakologicznej i sztucznej inseminacji u zająca. Celem badań prowadzonych w ramach tego tematu jest opracowanie schematów pobierania i konserwacji nasienia oraz zarodków, a w przyszłości stworzenie banku genów zwierząt dzikich, zwłaszcza gatunków zagrożonych wyginięciem. Podczas studiów doktoranckich uczestniczyłam również w badaniach nad kriokonserwacją nasienia knura, których celem było porównanie wpływu różnych dodatków do rozrzedzalników w celu uzyskania jak najwyższego odsetka plemników żywych i ruchliwych oraz jak najniższego udziału plemników apoptotycznych. Skuteczności wybranych rozrzedzalników potwierdzana była w próbach biologicznych poprzez porównanie odsetka zapłodnialności i oproszeń u loch.

### **3.2 Regulacje immuno-endokryne w błonie śluzowej macicy oraz w łożysku i jajniku kotki domowej w aspekcie fizjologii rozrodu**

Celem badań było poznanie podstawowych zależności immunologicznych i hormonalnych głównie w błonie śluzowej macicy kotki. Wyniki tych badań zostały opublikowane w czterech publikacjach i stanowią podstawę mojej rozprawy habilitacyjnej. Komórki nabłonka błony śluzowej macicy kotki są predylekcyjnym miejscem syntezy  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , natomiast w komórkach zrębu łącznotkankowego stwierdzono wyraźniejszą produkcję  $\text{PGE}_2$ . Kwas arachidonowy (AA), będący prekursorem prostaglandyn (PGs), wyraźnie zwiększał ich uwalnianie w komórkach endometrium. Wzrost sekrecji PGs w komórkach endometrium hamowany był poprzez blokery receptora progesteronowego i estradiolowego, wskazując na genomowy mechanizm działania hormonów steroidowych. W badaniach prowadzonych w systemie hodowli tkankowej zaobserwowano wzrost sekrecji  $\text{PGE}_2$  po stymulacji skrawków: progesteronem ( $\text{P}_4$ ) i  $\text{P}_4/\text{E}_2$  pochodzących z estrus oraz  $\text{P}_4/\text{E}_2$  pochodzących ze środkowej fazy lutealnej. Zaobserwowano również wzrost ekspresji mRNA dla syntazy prostaglandynowo-endoperoksydazową H (PTGS2) i syntazy  $\text{PGE}_2$  (PGES) w endometrium kotek będących w rui (estrus) i środkowej fazie lutealnej (diestrus) w wyniku łącznego podania  $\text{P}_4$  i  $\text{E}_2$  do medium. Ekspresja wszystkich badanych genów w tkankach nie poddawanych stymulacji była zwiększona w środkowej fazie lutealnej.

Podczas badań dotyczących wpływu oksytocyny (OT) na regulację wydzielania PGs stwierdzono, że zwiększa ona sekrecję  $\text{PGF}_{2\alpha}$  w komórkach nabłonkowych i efekt ten jest hamowany równoczesnym podaniem blokera receptora oksytocynowego. Natomiast w komórkach zrębu łącznotkankowego OT zwiększała wydzielanie  $\text{PGE}_2$ , jednakże efekt ten nie ulegał zahamowaniu po podaniu blokera. Można więc przypuszczać, że mechanizm działania OT w komórkach zrębu jest pozagenomowy, w przeciwieństwie do genomowego działania w

komórkach nabłonka. Stwierdzono również, że OT zwiększa ekspresję mRNA dla PTGS2 zarówno w komórkach nabłonka jak i zrębu błony śluzowej macicy.

Ekspresja białka jak i genu dla TNF $\alpha$  w endometrium pochodzącym od kotek będących w różnych fazach cyklu jajnikowego jest najniższa w fazie międzurujowej (interestrus), a najwyższej w diestrus. Ekspresja mRNA dla receptora TNF $\alpha$  typu 1 (TNFR1) była najwyższa w skrawkach endometrium pochodzących z diestrus, natomiast w odniesieniu do TNFR2 nie wykazywała zmian w zależności od fazy cyklu płciowego. TNF $\alpha$  nie wpływał na wydzielanie PGs w fazie interestrus, natomiast w fazie diestrus zwiększał wydzielanie PGE $_2$  i hamował uwalnianie PGF $_{2\alpha}$ . W skrawkach pochodzących z estrus zaobserwowano wzrost sekrecji PGF $_{2\alpha}$ po podaniu TNF $\alpha$  do medium. Uzyskane wyniki sugerują, że PGs syntezowane w błonie śluzowej macicy kotki w różnych fazach cyklu rujowego i pod wpływem badanych hormonów i cytokiny, mogą pełnić rolę głównie auto-/parakrynną w endometrium modulując procesy zachodzące w endometrium.

Wraz z zamknięciem cyklu badań poświęconych regulacjom w błonie śluzowej macicy kotki, zajęłam się zagadnieniem hormonalnych mechanizmów utrzymania ciąży na poziomie łożyska i jajnika. Obecnie część badań w tym zakresie prowadzę wraz z zespołem profesor Katariny Jewgenow z Berlina oraz dr hab. Mariuszem Kowalewskim z Zurychu. Przypuszcza się, że u kotki, odmiennie niż u suki, część aktywności steroidogennej podczas ostatnich tygodni ciąży przejmują łożysko. Wyniki doświadczeń mających na celu sprawdzenie, czy *ovariectomy* przeprowadzana w różnych okresach ciąży powoduje roniczenia są niejednoznaczne, dlatego celem moich badań było wykazanie, na poziomie genu i białka, obecności StAR oraz 3 $\beta$ HSD w łożysku kotki. Zmiany ekspresji genów analizowano za pomocą metody Real Time PCR. Ekspresja StAR w CL kotek ciężarnych zależna była od fazy lutealnej. Najwyższą ekspresję mRNA dla StAR obserwowano w CLs pochodzących od kotek w środkowej fazie ciąży ( $P < 0.001$ ). Nie zaobserwowano różnic statystycznych w ekspresji StAR w materiale pochodzącym z łożysk. Zaobserwowano zależny od fazy cyklu wzrost ekspresji lutealnej 3 $\beta$ HSD w środkowej fazie ciąży rzekomej ( $P < 0.05$ ), jak również w środkowej fazie ciąży ( $P < 0.01$ ). Transkrypcja genu dla 3 $\beta$ HSD w łożysku uległa znacznemu wzrostowi w materiale pochodzącym z końcowych tygodni ciąży ( $P < 0.01$ ). Obecność obu badanych czynników na poziomie białka potwierdzono metodą immunohistochemiczną. Białko dla StAR i 3 $\beta$ HSD zlokalizowano w komórkach lutealnych podczas wczesnej, środkowej i późnej ciąży rzekomej oraz podczas ciąży. Stwierdzono również, że ekspresja białka dla badanych czynników w łożysku jest największa w 6 i 7 tygodniu ciąży. Aby potwierdzić, że StAR i 3 $\beta$ HSD obecne na poziomie genu, wykazują również aktywność funkcjonalną, z łożysk pochodzących z różnych tygodni ciąży wyekstrahowano progesteron. Stwierdzono niską zawartość P4 w łożyskach pochodzących z 2-3 tygodnia ciąży (1.5-2 ng/g tkanki), która wzrastała w łożyskach pochodzących z 4-5 tygodnia ciąży (7-8 ng/g tkanki) i osiągała najwyższe wartości w 6-7 tygodniu ciąży (10-15 ng/g), ulegając obniżeniu w 8-9 tygodniu ciąży. Uzyskane wyniki potwierdzają, że łożysko kotki, zwłaszcza w drugiej połowie ciąży, jest dodatkowym miejscem syntezy P $_4$  oraz wskazują na łożysko kotki jako organ o znaczeniu endokrynnym. Publikacja przedstawiająca wyniki badań obecnie jest po pierwszej pozytywnej recenzji w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej.

### 3.3 Biotechnika w rozrodzie krów oraz mediatory procesów fizjologicznych w układzie rozrodczym cyklicznych krów i podczas wczesnej ciąży. Poza-odżywcze składniki pasz wpływające na fizjologię rozrodu krowy

Duża część moich zainteresowań badawczych związana jest z zagadnieniami fizjologii i patologii rozrodu zwierząt gospodarskich, ponieważ tych zagadnień dotyczy główny nurt badawczy zakładu, w którym jestem zatrudniona. Część opracowywanych przez nasz zespół zagadnień znajduje bezpośrednie zastosowanie w praktyce weterynaryjnej, jak na przykład porównanie metod synchronizacji rui na funkcje wydzielnicze ciała żółtego (CL) krowy. Wykazano, że powszechnie stosowane do synchronizacji rui u krów analogi prostaglandyny  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) mogą obniżyć wrażliwość CL na działanie czynników luteotropowych, prowadząc w konsekwencji do tzw. niedomogi lutealnej.

Prowadzono badania nad wpływem wybranych mediatorów na uwalnianie prostaglandyn (PG) w błonie śluzowej jajowodu oraz jej kurczliwość. Transport zarodka odbywa się dzięki skurczom i rozkurczom mięśni gładkich jajowodu, ruchowi rzęsek komórek nabłonkowych jajowodu (BOEC) oraz syntezie czynników przez BOEC m.in. prostaglandyn (PG) i tlenu azotu (NO), które regulują aktywność komórek mięśni gładkich. Stwierdzono, że czynnik martwicy nowotworu- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) zwiększa wydzielanie  $PGE_2$  niezależnie od fazy cyklu płciowego, zarówno w bańce jak i cieśni jajowodu, powoduje również wzrost  $NO_2/NO_3$ . Wzrost  $PGF_{2\alpha}$  wyraźny był w obu badanych fragmentach jajowodu w dniu 0 oraz w dniach 2-3 cyklu płciowego; natomiast w dniu 18-20 cyklu wzrost wydzielania  $PGF_{2\alpha}$  obserwowano jedynie w bańce jajowodu. W początkowych dniach cyklu płciowego donor tlenu azotu (NO) wzmacniał sekrecję  $PGF_{2\alpha}$  w badanym narządzie.  $PGF_{2\alpha}$  zwiększała kurczliwość jajowodu, natomiast  $PGE_2$  wywoływała relaksację tkanki. Zbadano wpływ steroidów jajnikowych na uwalnianie PG i  $NO_2/NO_3$  regulowane TNF- $\alpha$  lub NO z komórek BOEC *in vitro*. Wyniki badań sugerują potencjalne powiązanie TNF- $\alpha$  i NO modulowanych przez steroidy jajnikowe w regulacji syntezy PG przez BOEC, co może mieć znaczenie w procesie skurczów jajowodu. Badania wykazały, że TNF $\alpha$  oraz NO są mediatorami działania PG w jajowodzie. Wpływając na kurczliwość tego narządu poprzez zmianę sekrecji PG mogą pośredniczyć w rozwoju zarodka w okresie przedimplantacyjnym.

Część badań prowadzonych przez nasz zespół poświęcona była wpływowi glikokortykosteroidów na regulację procesów fizjologicznych w układzie rozrodczym krowy. Zbadano m.in. wpływ kortyzolu i kortyzonu na rozwój wczesnego zarodka oraz istnienie zależności między receptorem glikokortykosteroidów i enzymami zaangażowanymi w metabolizm glikokortykosteroidów (dehydrogenaz steroidowych:  $11\beta$ -HSD1 i 2) w zarodku przedimplantacyjnym, nabłonku jajowodowym i w błonie śluzowej macicy krowy. Stwierdzono ekspresję mRNA dla wszystkich badanych czynników zarówno w układzie rozrodczym krowy, jak również w zarodkach złożonych z 2-4 i 5-16 blastomerów oraz będących w stadium moruli i blastocysty. Obserwacje te sugerują, że kortyzol jest czynnikiem zaangażowanym w komunikację pomiędzy matką a zarodkiem podczas okresu około-implantacyjnego. Niewykluczone, że kortyzol bierze udział w regulacji procesów immunologicznych na wczesnym etapie zarodkowym, wspomagając rozwój wczesnej ciąży u krowy.

W badaniach dotyczących roli poza-odżywczych składników na procesy fizjologiczne w układzie rozrodczym krowy wykazano, że eksperymentalnie wywołane stany zapalne macicy i wymienia oraz wczesna i zaawansowana ciąża powodują zwiększenie metabolizmu fitoestrogenów oraz wzrost stężenia aktywnych metabolitów fitoestrogenów w osoczu krwi. Wyniki badań wskazują, że aktywność  $\beta$ -glukuronidazy, odpowiadającej za uwalnianie aktywnych izoflawonów z nieaktywnych koniugatów, wzrasta u krów z eksperymentalnie wywołanym stanem zapalnym macicy. Obserwacje te wskazują na możliwość wzrostu biodostępności aktywnych metabolitów izoflawonów, para-etyl-fenolu i ekwolu, podczas *endometritis* u krów.

### **3.4 Immunoendokryne regulacje procesów fizjologicznych i patologicznych w błonie śluzowej macicy kłaczy**

Sezon rozrodczy u kłaczy trwa zwykle od marca do września, więc badania nad fizjologią rozrodu, z użyciem hodowli komórkowych, są ograniczone tylko do tego okresu. Celem wstępnych badań było opracowanie metody izolacji, hodowli oraz kriokonserwacji (uniezależnienie badań od sezonowości w rozrodzie) komórek nabłonka i zrębu łącznotkankowego endometrium. Badania wskazują, iż komórki zrębu łącznotkankowego mogą być mrożone i pasażowane do IV pasażu bez zmiany ich morfologii oraz funkcji wydzielniczych w porównaniu do hodowli pierwotnej. Natomiast komórki nabłonka mogą być pasażowane do pasażu I, gdyż w następnym pasażu zmieniają się ich funkcje wydzielnicze i morfologia w porównaniu do hodowli pierwotnej.

Część badań poświęcona była wpływowi tlenu azotu (NO) na produkcję PG oraz aktywność enzymów zaangażowanych w syntezę PG w endometrium. Stwierdzono, że spontaniczne uwalnianie NO jest najwyższe tuż po owulacji u kłaczy. Nie obserwowano zależności pomiędzy ilością NO a syntazą prostaglandynowo-endoperoksydazową H (PTGS2), enzymem mającym kluczowe znaczenie dla produkcji wszystkich PG. Natomiast NO wyraźnie zwiększał ekspresję białka dla końcowych syntez prostaglandyn (PGES oraz PGFS), jak również wpływał na sekrecję poszczególnych PG *in vitro*. Uzyskane wyniki dowodzą, że NO bierze udział w regulacji syntezy i uwalniania PG w błonie śluzowej macicy kłaczy.

W dalszej części badań zajęliśmy patogenezą zwyrodnieniowego zapalenia błony śluzowej macicy kłaczy (*endometrosis*), prowadzącego do zmian w jej funkcjonowaniu i problemów z zagnieżdżeniem się zarodków. Stwierdzono, że w przebiegu włóknienia (w I, II i III kategorii Kenney'a) dochodzi do poważnych zmian w profilu ekspresji syntaz PG na poziomie mRNA oraz w stężeniu PG w błonie śluzowej macicy kłaczy. Zmiany te mogą być potencjalną przyczyną zaburzeń prowadzących do zaburzeń cyklu jajnikowego oraz do strat zarodków w okresie około implantacyjnym.

## **4. PRACE STANOWIĄCE SZCZEGÓLNE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE POD TYTUŁEM: Immuno-endokryna regulacja wydzielania prostaglandyn w błonie śluzowej macicy kotki domowej**

- 4.1 Siemieniuch MJ, Ogrodowska K, Ohgawara H, Skarzynski DJ, Okuda K (2010): Tumor Necrosis Factor-alpha as a possible auto-/paracrine factor affecting estrous cycle in the cat uterus. *Pol J Vet Sci* vol.13 (4):605-613.  
IF<sub>2010</sub>=0.507
- 4.2 Siemieniuch MJ, Bowolaksono A, Skarzynski DJ, Okuda K (2010): Ovarian steroids regulate the prostaglandin secretion in the feline endometrium. *Animal Reproduction Science* 120:142-150. IF<sub>2010</sub>=1.721
- 4.3 Siemieniuch MJ, Jursza E, Kowalewski MP, Majewska M, Skarzynski DJ (2012): Prostaglandin Endoperoxide Synthase 2 and Prostaglandin Synthase Expression, Prostaglandin F<sub>2α</sub> and E<sub>2</sub> Secretion Following Oestrogen and/or Progesterone Stimulation of the Feline Endometrium. *Reproduction in Domestic Animals* doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.0231.x  
IF<sub>2012</sub>=1.606
- 4.4 Siemieniuch MJ, Mlynarczuk JJ, Skarzynski DJ, Okuda K (2011): Possible involvement of oxytocin and its receptor in the local regulation of prostaglandin secretion in the cat endometrium. *Animal Reproduction Science* 123: 89-97.  
IF<sub>2011</sub>=1.721

*Prace finansowane były z projektu badawczego własnego MNiSW N308 031934: „Opracowanie modelu in vitro do badań nad immuno-endokrynnymi regulacjami funkcji macicy u kota domowego (Felis catus, L.1758)” nr N 308 031 934 (2008-2011) przyznanego przez MNiSW, kierownik dr n. wet. Marta J. Siemieniuch.*

## **5. OPIS PRAC STANOWIĄCYCH SZCZEGÓLNE OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE, O KTÓRYM MOWA W ART. 16 UST. 2 USTAWY**

### **5.1 Wstępna charakterystyka macicy kotki w aspekcie syntezy prostaglandyn pod wpływem czynnika martwicy nowotworu- $\alpha$ (TNF $\alpha$ ). Określenie czy profil ekspresji jego receptorów (TNFR1 i 2) układu TNF $\alpha$ /TNF $\alpha$ receptor typu 1 i 2 (TNFR1 i 2) jest regulowany w zależności od fazy cyklu płciowego (praca nr I)**

Wcześniejsze badania dowiodły, że TNF $\alpha$  stanowi ważny element kaskady sygnałowej w komunikacji międzykomórkowej w endometrium wielu gatunków i jest zaangażowany w kontrolę wzrostu oraz różnicowania komórek zarówno w cyklu płciowym jak i w ciąży. Ponieważ rola systemu TNF $\alpha$ /TNFRs, zarówno w regulacji cyklicznych procesów fizjologicznych zachodzących w endometrium i CL, jak również w stanach patologicznych u wielu gatunków zwierząt i człowieka jest niepodważalna, celem niniejszych badań było określenie możliwego wpływu tej cytokiny na wydzielanie PGw macicy kotki oraz zbadanie czy ekspresja układu TNF $\alpha$ /TNFR w macicy jest zależna od fazy cyklu rujowego u kotki.

Podjęte badania miały charakter pilotażowy, będąc przyczynkiem do dalszych doświadczeń nad rozwojem stanów patologicznych w macicy kotki.

Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że ekspresja TNF $\alpha$  na poziomie genu i białka w macicy kotki jest najniższa w fazie międzyrujowej (interestrus), natomiast pomiędzy fazą estrus a fazą diestrus nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic. Stwierdzono również, że geny dla receptorów TNF $\alpha$  ulegają zróżnicowanej ekspresji w zależności od cyklu płciowego. Najwyższa ekspresja mRNA dla TNFR1 widoczna była w tkankach pobranych w fazie diestrus, natomiast transkrypcja genu dla TNFR2 nie ulegała zmianom w badanych fazach. Zaobserwowano, że w endometrium kotki ekspresja genu i białka dla TNF $\alpha$  podlega zmianom w zależności od fazy cyklu jajnikowego. Dlatego przypuszcza się, że steroidy płciowe, E<sub>2</sub> i P<sub>4</sub>, mogą regulować aktywność tego genu kotki, zwłaszcza że najniższą ekspresję genu i białka dla TNF $\alpha$  zaobserwowano w okresie międzyrujowym (interestrus), podczas którego hormony płciowe występują na poziomie bazalnym.

Korzystając z danych dostępnych w piśmiennictwie naukowym ustalono zakres dawek TNF $\alpha$  (0, 1, 10, 100 ng/ml) oraz oczekiwany czas działania (2, 4, 12 godzin). Opierając się na wstępnych wynikach obrazujących wpływ TNF $\alpha$  na zmianę uwalniania PG w inkubowanych skrawkach macicy, wybrano najefektywniejszą dawkę (1 ng/ml) i czas działania (12 godz.). W badaniach własnych wykazano, że rodzaj PG wydzielanej pod wpływem stymulacji TNF $\alpha$  zależy od fazy cyklu, z którego tkanka była pobrana. Zaobserwowano, że u kotki najsilniejszy wpływ TNF $\alpha$  na zmianę profilu wydzielniczego PG występował w fazie lutealnej. TNF $\alpha$  wzmacniał sekrecję PGE<sub>2</sub> o 170 % w stosunku do kontroli, dodatkowo obniżając wydzielanie PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Natomiast w estrus obserwowano wzrost wydzielania PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  o 100% w porównaniu z kontrolą. W fazie międzyrujowej TNF $\alpha$  nie wpływał na wydzielanie PG w macicy kotki. Zmiana profilu sekrecji PG podczas badanych faz cyklu płciowego odpowiada zmianom w ekspresji systemu TNF $\alpha$ /TNFR, sugerując możliwy wpływ hormonów płciowych na regulację badanego systemu.

## **5.2. Określenie wpływu estradiolu (E<sub>2</sub>) i progesteronu (P<sub>4</sub>) oraz mechanizmu ich działania na syntezę prostaglandyn (PG) w komórkach łącznotkankowych i nabłonkowych błony śluzowej macicy kotki (praca nr II)**

W pierwszej części badań własnych opracowano metodę izolacji i hodowli komórek nabłonka i zrębu łącznotkankowego błony śluzowej macicy kotki (praca nr II). W odniesieniu do komórek nabłonkowych zastosowano trzy metody izolacji, natomiast izolacja komórek zrębu łącznotkankowego okazała się znacznie mniej skomplikowana. Pierwsza metoda stanowiła połączenie mechanicznej i enzymatycznej separacji komórek nabłonkowych. Od strony jajowodowego rogu macicy wprowadzano kateter, przez który podawano mieszaninę trawiacą (3.5 ml płynu/min.) w ilości całkowitej wynoszącej 50 ml przez 60 min. Nasada rogu macicy zaopatrzona była w drugi kateter, poprzez który komórki zawieszane w medium przedostawały się do zbiornika głównego, z którego pobierana była kolejna partia mieszaniny trawiaczej. Płyn krążył w systemie półotwartym i był wymieniany po 20, 40 i 60 min. izolacji, aby uniknąć strawienia już wyizolowanych komórek przez enzymy obecne w mieszaninie. Rogi macicy rozcinano, następnie delikatnie zbierano przy użyciu ostrza skalpela pozostałe komórki nabłonka powierzchniowego. Poszczególne partie komórek były umieszczane w temp.

+4°C, a następnie wirowane w gradiencie prędkości (200 x g, 300 x g i 350 x g). Po pierwszym wirowaniu komórki przenoszono do wspólnej probówki wirowniczej. Osad komórek nabłonkowych uzyskany po ostatnim wirowaniu zawieszano w medium, określano procentowy udział komórek żywych oraz liczebność komórek przy pomocy barwienia negatywnego błękitem trypanu. W celu uzyskania komórek łącznotkankowych, rozcięte rogi macicy po izolacji komórek nabłonkowych, rozpinano na podkładkach w celu wyekspozowania światła narządu. Przy pomocy ostrza skalpela i pęset odpreparowywano pozostałą warstwę błony śluzowej, unikając naruszenia warstwy mięśniowej. Skrawki endometrium rozdrabniano i umieszczano w naczyniu zawierającym 50 ml mieszaniny enzymatycznej złożonej z kolagenazy (2 mg/ml, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), DNazy I (200 µg/ml, Sigma Aldrich) i dispazy (1.2 U/ml, Sigma Aldrich). Naczynie umieszczano na mieszadle magnetycznym, w łaźni wodnej utrzymującej temp. 38°C. Mieszaninę zbierano po 20, 40 i 60 min., w celu uniknięcia strawienia uwolnionych komórek i umieszczano w +4°C. Następnie mieszaninę komórkową wirowano w gradiencie prędkości (200 x g, 300 x g i 350 x g). Po pierwszym wirowaniu komórki przenoszono do wspólnej probówki wirowniczej. Osad komórek łącznotkankowych uzyskany po ostatnim wirowaniu zawieszano w medium, określano procentowy udział komórek żywych oraz liczebność komórek przy pomocy barwienia negatywnego z użyciem błękitu trypanu. W jednym z doświadczeń wstępnych (praca nr II) określono spontaniczną sekrecję PG przez izolowane komórki rosnące w systemie hodowli jednowarstwowej (monolayer) po uzyskaniu 90% pokrycia powierzchni hodowlanej (konfluencja). Komórki nabłonkowe odpowiedzialne były głównie za sekrecję PGF<sub>2α</sub>, natomiast w komórkach łącznotkankowych sekrecja PGE<sub>2</sub> przewyższała uwalnianie PGF<sub>2α</sub>. Udział poszczególnych PG wydzielanych przez komórki nabłonkowe i łącznotkankowe błony śluzowej macicy kotki okazał się podobny do profilu sekrecyjnego u innych gatunków zwierząt i człowieka. Zasadniczym celem badań podjętych w pracy nr II było wykazanie czy wybrane steroidy jajnikowe (E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub> i E<sub>2</sub>+P<sub>4</sub>) mają wpływ na zmiany wydzielania PG z komórek błony śluzowej macicy kotki *in vitro*. Zakres badanych dawek (E<sub>2</sub>: 10<sup>-9</sup>-10<sup>-7</sup>M oraz P<sub>4</sub>: 10<sup>-7</sup>-10<sup>-5</sup>M) został wybrany na podstawie dawek wywierających efekt stymulujący bądź hamujący na sekrecję PG przez komórki endometrium krowy, świni i człowieka. Dawki blokerów receptora estrogenowego (ICI-7a, 17b-[9[(4,4,5,5,5-pentafluoropentyl)sulfinyl]nonyl]estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol) lub progesteronowego (mifepriston, RU486) odpowiadały efektywnym dawkom E<sub>2</sub> lub P<sub>4</sub>. W doświadczeniach wykorzystujących izolowane komórki kwas arachidonowy (AA), będący prekursorem PG, został użyty jako kontrola pozytywna. We wszystkich doświadczeniach stwierdzono statystycznie istotny wzrost uwalniania PG po zastosowaniu AA (P<0.001), potwierdzając aktywność mechanizmów enzymatycznych zaangażowanych w metabolizm fosfolipidów. Podczas 24-godz. stymulacji komórek nabłonkowych endometrium wybranymi steroidami jajnikowymi oraz blokerami ich receptorów zaobserwowano 1) wzrost uwalniania PGF<sub>2α</sub> po stymulacji E<sub>2</sub> (P<0.01) oraz E<sub>2</sub> wraz z P<sub>4</sub> (P<0.001), 2) blokowanie działania E<sub>2</sub> poprzez równoczesne podanie do medium ICI; 3) wzrost uwalniania PGE<sub>2</sub> po stymulacji P<sub>4</sub> (P<0.05) i 4) zahamowanie jego działania w wyniku równoczesnego podania RU486. Wyniki dotyczące braku efektu steroidów jajnikowych na wydzielanie PG przez komórki zrębu łącznotkankowego są dość zaskakujące, zwłaszcza że ich zdolność do produkcji PG nie została zahamowana, a ponadto wykazano w nich obecność mRNA dla

receptora  $E_2$   $P_4$  (praca nr II). Stwierdzono natomiast, że stymulujący efekt steroidów jajnikowych na uwalnianie PG hamowany jest poprzez blokery ich receptorów. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że stymulujący efekt  $E_2$ /lub  $P_4$  na wydzielanie PG przez komórki błony śluzowej macicy jest wynikiem aktywacji genomowych szlaków receptorowych.

W prezentowanej pracy wykazano, że endometrium kotki posiada mechanizmy enzymatyczne niezbędne do produkcji PG, jednak wzrost uwalniania PG, wywołany podaniem do medium hormonów steroidowych, nie odbywa się poprzez zmiany w ekspresji genu dla PTGS2. Zmiany ekspresji badanego genu analizowano przy użyciu tzw. konwencjonalnej metody PCR, która oszacowuje zmiany ilości DNA po wbudowaniu w jego cząsteczki bromku etydyny w odniesieniu do ekspresji genu referencyjnego. Wybór metody mógł wpłynąć na uzyskane wyniki.

Podsumowując część badań własnych (praca nr II) można stwierdzić, że  $E_2$  i  $P_4$  wpływają na zmiany sekrecji PG w izolowanych komórkach endometrium kotki, jednakże efekt ten jest ograniczony do komórek nabłonkowych. Zmianom sekrecji PG nie towarzyszyły zmiany ekspresji genu PTGS2 badane metodą półilościową PCR.

### **5.3 Analiza ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę prostaglandyn oraz określenie wpływu wybranych steroidów jajnikowych na syntezę i uwalnianie prostaglandyn w endometrium kotki w zależności od fazy cyklu płciowego (praca nr III)**

Zmiany w wydzielaniu prostaglandyn (PG) zależne są od regulacji transkrypcji i translacji genów dla enzymów odpowiedzialnych za metabolizm kwasu arachidonowego (AA). Enzymem regulującym syntezę PG w warunkach indukowanych hormonami i cytokinami jest PTGS2 (syntazaprostaglandynowo-endoperoxydazowa H). Dlatego celem badań było określenie roli PTGS2, kluczowego enzymu odpowiedzialnego za syntezę PG, oraz terminalnych syntaz prostaglandynowych, jako czynników zaangażowanych w metabolizm AA w błonie śluzowej macicy pod wpływem działania wybranych hormonów steroidowych (praca nr III). W pierwszej części badań własnych zaprojektowano i sklonowano sekwencje nukleotydowe dla syntazy  $PGF_{2\alpha}$  (PGFS) i syntazy  $PGE_2$  (PGES). Materiał użyty do sekwencjonowania genów pochodził od 4 klinicznie zdrowych, dorosłych kotek domowych będących w różnych fazach cyklu płciowego (estrus  $n=2$ , diestrus  $n=2$ ). Wybrane sekwencje nukleotydowe (GenBank: AY875970 dla PGFS i EF063141 dla PGES) należące do genomu psa domowego (*Canis lupus familiaris*) porównano z genomem kota przy pomocy programu BLAST. Przy użyciu zaprojektowanych sekwencji i starterów przeprowadzono PCR techniką półilościową, wizualizując otrzymane produkty na 1.5% żelu agarozowym z dodatkiem 0.01% bromku etydyny. Produkty odpowiedniej wielkości wycięto z żelu, następnie izolowano DNA i sekwencjonowano w firmie Genomed, Warszawa. Uzyskane sekwencje nukleotydowe zostały wpisane do Banku Genów (GenBank accession number: HM490147-PGFS i GU059259-PGES; praca nr III).

Materiał użyty w pozostałych doświadczeniach stanowiły skrawki błony śluzowej macicy kotek domowych, w wieku  $18 \pm 5$  miesięcy, z estrus ( $n=4$ ), środkowej fazy diestrus ( $n=4$ ) oraz późnej fazy diestrus ( $n=4$ ). Analiza wszystkich badanych genów zaangażowanych w syntezę PG metodą Real Time PCR wykazała ich najwyższą ekspresję w

środkowej fazie ciąży rzekomej. Obserwacja ta może wskazywać na czynny udział endometrium w środkowej fazie diestrus w regulacji procesów związanych z uwalnianiem PG. Ponieważ  $P_4$  jest dominującym hormonem steroidowym w fazie diestrus, którego poziom osiąga plateau 12-13 dni po owulacji i u kotek będących w ciąży rzekomej zaczyna obniżać się już kilka dni później, można podejrzewać, że wzrost ekspresji genów dla PTGS2, PGES i PGFS obserwowany w badaniach własnych w środkowej fazie diestrus (praca nr III) towarzyszy wysoki poziom  $P_4$ . W badaniach własnych nie zaobserwowano zmian w ekspresji PGFS po podaniu steroidów w środkowej i późnej fazie ciąży rzekomej, natomiast widoczna była tendencja do wzrostu ilości mRNA dla PGFS w skrawkach pochodzących z estrus po suplementacji medium inkubacyjnego  $P_4$  oraz  $P_4$  wraz z  $E_2$ . W żadnej z badanych faz cyklu płciowego podanie hormonów steroidowych nie spowodowało zmian w uwalnianiu  $PGF_{2\alpha}$ . Zarówno w estrus jak również w środkowej fazie diestrus dodatek do medium  $P_4$  wraz z  $E_2$  skutkował wzrostem mRNA dla PTGS2 i PGES ( $P < 0.05$ ), a zmianom w transkrypcji genów odpowiadał wzrost produktu,  $PGE_2$  ( $P < 0.05$ ). W skrawkach pochodzących z późnego diestrus zaobserwowano jedynie wzrost ilości mRNA dla PGES, jednakże nie towarzyszył mu wzrost ilości produktu. Podczas badań nie zanotowano wzrostu uwalniania  $PGF_{2\alpha}$  w skrawkach endometrium pobranych z końcowej fazy diestrus. Wyniki uzyskane w systemie hodowli tkankowej potwierdzają wcześniejsze obserwacje *in vivo*, podczas których zakwestionowano wpływ śródmaciczej  $PGF_{2\alpha}$  na przebieg luteolizy u cyklicznych kotek.

Wyniki badań przeprowadzonych w systemie hodowli tkankowych (praca nr III) wykazały brak wpływu badanych czynników na sekrecję  $PGF_{2\alpha}$ , która była obserwowana w wyniku stymulacji izolowanych komórek nabłonkowych z błony śluzowej macicy kotki  $E_2$  i  $E_2$  wraz z  $P_4$  (praca nr II). Różnice mogą być wyjaśnione innym układem doświadczalnym i systemem hodowli. W doświadczeniach prowadzonych w systemie hodowli tkankowej użyto tkanek pochodzących z różnych faz cyklu, od zwierząt będących w fazie dominacji estrogenów (estrus) lub  $P_4$  (diestrus). Zastosowana stosunkowo krótka, 12-godzinna, procedura hodowli tkankowej (praca nr III) pozwala uzyskać środowisko bardziej zbliżone do warunków panujących *in vivo*, w porównaniu do hodowli komórkowej (praca nr II). W hodowli komórkowej zastosowanej w pracy nr II, komórki przebywały w układzie izolowanym przez około 10-12 dni, w tym czasie poddawane były pasażowaniu. Długi czas hodowli oraz dodatek do medium hodowlanego 10% surowicy cielęcej mogły wpłynąć na odmienne zachowanie się komórek niż w żywym organizmie. Dodatkowo nie można wykluczyć, że uzyskany w hodowli komórek nabłonkowych wzrost uwalniania PG nie był wynikiem wzrostu ekspresji konstytutywnej izoformy PTGS1, zwłaszcza że nie zaobserwowano zmian w ekspresji PTGS2 (praca nr II). Podsumowując część badań własnych należy stwierdzić, że w środkowym diestrus obserwuje się wzrost ekspresji genów odpowiedzialnych ze syntezę PG. Za wzrost może odpowiadać  $P_4$ , na co wskazują wyniki badań *in vitro*. Wzrost uwalniania  $PGE_2$  oraz wzrost ekspresji genu dla PGES i PTGS2 mogą wskazywać na rolę tego układu około 13-15 dnia po owulacji, w którym u kotek ciężarnych następuje implantacja zarodków, natomiast u kotek nieciążarnych od tego momentu obserwuje się stopniowy spadek  $P_4$  w krwi obwodowej.

#### 5.4 Zbadanie wpływu oksytocyny na uwalnianie prostaglandyn i określenie enzymatycznego mechanizmu jej działania w komórkach błony śluzowej macicy kotki (praca nr IV)

U kotki, w przeciwieństwie do samic zwierząt gospodarskich, czynniki pochodzenia endometrialnego nie wpływają na funkcjonalną luteolizę CL. Faza lutealna w przypadku kotek nieciężarnych (czyli będących w ciąży rzekomej) trwa ok. 35-40 dni, natomiast u kotek ciężarnych trwa 60-65 dni. Zróżnicowana aktywność lutealna u kotek ciężarnych i nieciężarnych wskazuje na obecność mechanizmów regulujących żywotność CL. Ponieważ zarówno ekspresja genu dla syntazy  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , jak również dla receptora zostały wykazane w CL kotki oraz potwierdzono lokalizację białka dla PGFS w CL kotki w różnych fazach diestrus [Siemieniuch, dane niepublikowane] można sugerować, że kontrola aktywności funkcjonalnej komórek lutealnych zachodzi w CL u kotki. Celem badań było określenie, czy OT jest produkowana w komórkach lutealnych kotki, a następnie czy OT ma wpływ na uwalnianie PG w komórkach błony śluzowej macicy (praca nr IV). Opracowano metodę enzymatycznej izolacji kocich komórek lutealnych przy użyciu kolagenazy IA (1.5 mg/ml) i DNAzy (0.005%) (praca nr IV). Zawiesinę komórek w medium M199 wirowano 3x przez 10 min. (300x g) w celu pozbycia się martwych komórek i drobnych fragmentów tkanki. W osadzie komórek oznaczano ich koncentrację oraz określano odsetek komórek martwych. Następnie komórki posiewano w płytkach 48-dołkowych ( $2 \times 10^5/\text{ml}$ ) w medium hodowlanym DMEM/Ham's F-12 (D/F) z dodatkiem surowicy cielęcej (FCS, 10%), kwasu askorbinowego (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), transferyny (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) i selenitu sodowego (5 ng/ml) i gentamycyny (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), następnie umieszczano i hodowano przez 48 godz. (powietrze z 5% dodatkiem  $\text{CO}_2$ , 37.5°C). Przed doświadczeniami właściwym medium w hodowłach wymieniano na medium D/F wzbogacone albuminą bydlęcą (BSA, 0.1%), kwasem askorbinowym (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), transferyną (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), selenitem sodowym (5 ng/ml) i gentamycyną (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Medium inkubacyjne zebrano po 48 godz. i poddano analizie immunoenzymatycznej (EIA). Synteza OT w komórkach lutealnych wynosiła  $38.3 \pm 4.4$  pg/ml. Dodatkowo komórki lutealne stymulowano hormonem luteotropowym (LH, 100 ng/ml), ponieważ udowodniono, że u przeżuwaczy zwiększa wydzielanie OT i jest stosowany jako kontrola pozytywna w tego typu doświadczeniach. Uzyskano dwukrotny wzrost wydzielania OT po podaniu LH. Dodatkowo zmierzono również ilość OT w krwi pochodzącej z odgałęzienia macicznego tętnicy jajnikowej (*ramus uterini arteriae ovaricae*), pobranej śródoperacyjnie. Średnia zawartość OT w badanym materiale wynosiła  $52.7 \pm 4.5$  pg/ml. Następnie wykonano doświadczenia mające na celu wybór skutecznej dawki OT, tzn. mającej najsilniejszy wpływ na uwalnianie PG przez komórki. Zakres dawek ( $10^{-8}\text{M}$ - $10^{-6}\text{M}$ ) oparto na wcześniejszych doświadczeniach prowadzonych w hodowłach komórek endometrialnych krowy. Do dalszych doświadczeń wybrana została dawka  $10^{-7}\text{M}$ , ponieważ była to jedyna dawka, która wpływała na wzrost uwalniania  $\text{PGF}_{2\alpha}$  przez komórki nabłonka ( $P < 0.001$ ). W komórkach łącznotkankowych zrębu zarówno dawka  $10^{-7}\text{M}$ , jak i dawka  $10^{-6}\text{M}$  powodowała wzrost wydzielania  $\text{PGE}_2$  ( $P < 0.001$ ), jednakże efekt wywołany podaniem wyższej dawki OT mógł być efektem farmakologicznym, a nie fizjologicznym. W jednym z doświadczeń mających na celu zbadanie mechanizmu działania OT, do medium hodowlanego podano atosiban (antagonista receptora OT) oraz atosiban razem z OT. Receptor OT (OTR) należy do rodziny receptorów

związanych z białkiem G. Związanie liganda z receptorem powoduje aktywację fosfolipazy C, w rezultacie zwiększając poziom wewnątrzkomórkowego wapnia, który aktywuje kinazy białkowe przyczyniając się pośrednio do wzrostu sekrecji PG. Blokier receptora nie wpływał na podstawowe wydzielanie PG, natomiast podanie obu badanych czynników znosiło dodatni efekt OT na sekrecję  $\text{PGF}_{2\alpha}$  w komórkach nabłonkowych, nie hamując dodatniego efektu na uwalnianie  $\text{PGE}_2$  w komórkach łącznotkankowych błony śluzowej macicy kotki (praca nr IV). OT w dawce  $10^{-7}\text{M/ml}$  podano również do medium hodowlanego, w celu określenia czy zmiany w ilości uwalnianych PG mogą być wynikiem zwiększenia aktywności genu dla PTGS2. Zarówno OT, jak również kwas arachidonowy (AA,  $10^{-6}\text{M}$ ), użyty jako kontrola pozytywna, zwiększały ilość transkryptu dla PTGS2 w komórkach nabłonkowych ( $P < 0.01$ ) i łącznotkankowych ( $P < 0.001$  AA,  $P < 0.01$  OT  $10^{-7}\text{M}$ ).

Uzyskane wyniki potwierdziły przypuszczenia, że OT jest produkowana w CL kotki, a jej obecność w naczyniach krwionośnych transportujących krew z jajnika do macicy pozwala przypuszczać, że OT nie działa jedynie lokalnie, w komórkach lutealnych, ale odgrywa również rolę w macicy. Badania potwierdziły wpływ OT na wzrost uwalniania PG przez komórki błony śluzowej macicy kotki.

## 6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Uzyskane wyniki badań pozwalają na przedstawienie następujących podsumowań i wniosków:

1. Czynniki martwicy nowotworu- $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ) wpływa na sekrecję prostaglandyn (PG) w zależności od fazy cyklu płciowego. Najniższa aktywność transkrypcyjna układu  $\text{TNF}\alpha/\text{TNFR}1$ , wraz z towarzyszącym nieistotnym statystycznie wpływem  $\text{TNF}\alpha$  na wydzielanie PG, występuje w fazie międzyrurowej, co sugeruje prawdopodobny udział hormonów steroidowych: estradiolu ( $\text{E}_2$ ) i progesteronu ( $\text{P}_4$ ), w regulacji układu  $\text{TNF}\alpha/\text{TNFRs}$ .
2. Udowodniono, że  $\text{E}_2$  i  $\text{P}_4$  wpływają na zmianę wydzielania PG w macicy kota domowego.
  - 2.1 Przy pomocy opracowanego modelu izolacji i hodowli komórek nabłonkowych i zrębu łącznotkankowego błony śluzowej macicy kotki stwierdzono, że  $\text{E}_2$  i  $\text{P}_4$  wpływają na wydzielanie PG w komórkach endometrium na drodze genomowej.
3. Wykazanie ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm AA pozwoliło stwierdzić, że w błonie śluzowej macicy kotki dochodzi do czynnej syntezy PG.
  - 3.1. Opracowanie sekwencji nukleotydowych dla syntaz prostaglandyn  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (PGFS) i  $\text{PGE}_2$  (PGES) umożliwiło zbadanie zmian ekspresji tych genów w różnych fazach cyklu jajnikowego.
  - 3.2. Najwyższa aktywność transkrypcyjna genu dla PGES i najsilniejsze wydzielanie  $\text{PGE}_2$  zaobserwowano w endometrium pochodzącym z 12-13 dnia po owulacji, w czasie kiedy u kotek ciężarnych następuje implantacja zarodków, co sugeruje udział PGES/ $\text{PGE}_2$  podczas implantacji.

3.3. Zmiany w ekspresji genów dla PGES i PTGS2 oraz w wydzielaniu PGE<sub>2</sub> pod wpływem steroidów jajnikowych sugerują, że PGE<sub>2</sub> odgrywa znaczącą rolę w lokalnej, auto-/parakrynej regulacji w błonie śluzowej macicy kotki.

4. Udowodniono, że OT, poprzez wpływ na wydzielanie PG, może być zaangażowana w regulację procesów rozrodczych u kotki.

4.1. Komórki lutealne z wczesnego ciała żółtego kotki produkują OT, a obecność receptorów dla OT w strukturach jajnikowych oraz endometrium, sugeruje zarówno auto-/para-, jak również endokryny mechanizm działania tego hormonu.

4.2. Oksytocyna może stanowić jeden z czynników luteotropowych u kotki, ponieważ jest syntetyzowana w komórkach lutealnych pochodzących z wczesnego diestrus. Obecność receptorów dla OT w komórkach lutealnych świadczy o jej roli auto-/parakrynej w ciałku żółtym, natomiast wzrost sekrecji PGE<sub>2</sub> w komórkach zrębu łącznotkankowego błony śluzowej macicy po stymulacji OT potwierdza jej rolę luteotropową.

*Marta Świercz*