



Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

mgr Karolina Dobrzyń

**Regulacja ekspresji błonowych receptorów progesteronu
oraz ich funkcja w łożysku krowy**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
dr hab. Magdaleny Kowalik
w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu
Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Praca finansowana w ramach projektu promotorskiego Konsorcjum Naukowego KNOW
„Zdrowe zwierzę – bezpieczna żywność”, decyzja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego
nr 05-1/KNOW2/2015.

Olsztyn 2021

Składam serdeczne podziękowania
Pani dr hab. Magdalenie Kowalik
za życzliwość, wsparcie merytoryczne
oraz wszechstronną pomoc w realizacji niniejszej pracy.

Pragnę wyrazić moją wdzięczność
Panu Profesorowi dr hab. Janowi Kotwicy,
kierownikowi projektu promotorskiego,
za cenne uwagi w trakcie realizacji badań.

Dziękuję wszystkim
Pracownikom Zakładu Fizjologii i Toksykologii Rozrodu
za okazaną pomoc i niepowtarzalną atmosferę w pracy.

Składam również podziękowania dla
Męża i Rodziców
za ogromne wsparcie i motywację do pracy.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	3
SUMMARY	5
WYKAZ SKRÓTÓW	7
WSTĘP.....	9
1. Procesy regulacyjne w układzie rozrodczym samicy	9
2. Progesteron.....	10
2.1. Synteza progesteronu	10
2.2. Funkcje progesteronu w układzie rozrodczym samicy	12
2.3. Mechanizm działania progesteronu na komórki	14
2.3.1. Genomowe działanie progesteronu	14
2.3.2. Pozagenomowe działanie progesteronu	17
2.3.2.1. Błonowe receptory progesteronu (PGRMC).....	18
2.3.2.2. Błonowe receptory progestagenów (mPR).....	20
3. Budowa i funkcje łożyska	23
3.1. Formowanie i budowa łożyska z uwzględnieniem łożyska krowy	23
3.2. Funkcje łożyska.....	26
3.3. Łožysko jako gruczoł dokrewny	27
3.4. Receptory progesteronu w łożysku	29
CELE I ZADANIA BADAWCZE PRACY	30
MATERIAŁ I METODY	32
1. Materiał badawczy	32
2. Preparacja skrawków placentomów, endometrium i kosmówki gładkiej	32
3. Warunki inkubacji skrawków łożyska	32
4. Opis przebiegu doświadczeń	33
5. Metody analityczne	34
5.1. Ocena żywotności skrawków	34
5.2. Oznaczenie stężenia hormonów w medium pohodowlanym	35
5.3. Pomiar ekspresji badanych genów z wykorzystaniem techniki Real-Time PCR	36
5.3.1. Izolacja RNA.....	36
5.3.2. Odwrotna transkrypcja	37
5.3.3. Real-Time PCR	38
5.4. Barwienie immunohistochemiczne	40
5.4.1. Przygotowanie skrawków histologicznych	40

5.4.2. Odparafinowanie i uwodnienie tkanek.....	40
5.4.3. Odslanianie determinant antygenowych	40
5.4.4. Blokowanie aktywności endogennych peroksydaz.....	40
5.4.5. Blokowanie miejsc niespecyficznie wiążących antygeny i inkubacja z pierwszorzędownymi przeciwciałami	40
5.4.6. Immunohistochemiczne barwienie tkanek	41
5.4.7. Odwodnienie tkanek i zamykanie preparatów	42
6. Opracowanie wyników i ich analiza statystyczna.....	42
WYNIKI.....	43
1. Określenie poziomu ekspresji błonowych receptorów progesteronu w łożysku krowy: endometrium, kosmówce gładkiej i placentomach	43
2. Określenie immunolokalizacji błonowych receptorów progesteronu w skrawkach placentomów krowy	44
3. Określenie udziału hormonów steroidowych w regulacji ekspresji błonowych receptorów progesteronu w łożysku krowy	47
4. Określenie udziału cytokin i czynników wzrostu w regulacji ekspresji błonowych receptorów progesteronu w łożysku krowy	52
5. Zdefiniowanie odpowiedzi komórek łożyska zależnie od ich genomowego lub pozagenomowego pobudzenia	59
DYSKUSJA	63
WNIOSKI.....	71
LITERATURA.....	72

STRESZCZENIE

Regulacja ekspresji błonowych receptorów progesteronu oraz ich funkcja w łożysku krowy

Progesteron (P4) uczestniczy w regulacji cyklu płciowego oraz w przygotowaniu macicy do implantacji blastocysty i dalszego rozwoju płodu. Hormon ten działa na komórki docelowe na drodze genomowej, przez jądrowe receptory (PGR) oraz na drodze pozagenomowej, przez błonowe receptory P4: PGRMC (*progesterone membrane receptor component*) 1 i 2 oraz mPR (*membrane progesterin receptor*) α , β i γ . Pozagenomowe działanie P4 wykazano w układzie rozrodczym samic różnych gatunków ssaków, w tym u krów. Ekspresję mRNA i białka PGRMC1, PGRMC2 oraz mPR α , mPR β i mPR γ wykazano w macicy oraz jajniku krowy. Stwierdzono również ekspresję receptorów PGRMC1 i PGRMC2 w łożysku krowy, jednakże brak jest danych dotyczących receptorów mPR w tej tkance. Ponadto, nie są znane czynniki, które mogą regulować ekspresję błonowych receptorów P4 w układzie rozrodczym.

Dlatego celem pracy była weryfikacja hipotezy, że P4 uczestniczy w regulacji funkcji łożyska krowy na drodze pozagenomowej poprzez aktywację błonowych receptorów P4, których ekspresja może być regulowana przez hormony steroidowe, cytokiny i czynniki wzrostu produkowane lokalnie w macicy i łożysku. Szczegółowe zadania badawcze dotyczyły: **(a)** określenia poziomu ekspresji oraz lokalizacji błonowych receptorów P4; **(b)** określenia czynników regulujących ekspresję błonowych receptorów P4 oraz **(c)** zdefiniowania odpowiedzi komórek na P4 zależnie od ich genomowego lub pozagenomowego pobudzenia w łożysku krowy w drugim trymestrze ciąży.

Materiałem do badań były macice pozyskane od ciężarnych krów ($n=5$) w drugim trymestrze ciąży. W skrawkach endometrium, kosmówki gładkiej oraz placentomów określono poziom ekspresji genów PGRMC1, PGRMC2, mPR α , mPR β i mPR γ metodą Real-Time PCR oraz oznaczono lokalizację białek tych receptorów metodą immunohistochemiczną (IHC). Następnie, przeprowadzono doświadczenia *in vitro* z zastosowaniem modelu hodowli skrawków placentomów z zachowaniem połączeń maczyno-płodowych. W celu określenia czynników regulujących ekspresję błonowych receptorów P4, skrawki placentomów inkubowano 6 i 24 godziny z **(1)** steroidami: (a) P4 (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M), (b) estradiolem (E2; 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M), (c) P4 podanym łącznie z E2 (P4/E2; $10^{-5}/10^{-8}$, $10^{-6}/10^{-9}$, $10^{-7}/10^{-10}$ M), **(2)** cytokinami: (a) czynnikiem martwicy nowotworu (TNF) α (10, 100 ng/ml), (b) interleukiną (IL) 1 (1, 10 ng/ml), (c) IL6 (1, 10 ng/ml), (d) IL8 (1, 10 ng/ml), (e) interferonem (INF) γ (10, 100 ng/ml), (f) czynnikiem

hamującym białaczkę (LIF; 10, 100 ng/ml) oraz **(3)** czynnikami wzrostu: (a) czynnikiem wzrostu naskórka (EGF; 1, 10 ng/ml), (b) czynnikiem wzrostu fibroblastów (FGF7; 1, 10 ng/ml), (c) insulinopodobnym czynnikiem wzrostu (IGF1; 10, 100 ng/ml), (d) czynnikiem wzrostu śródbłonna (VEGF; 5, 50 ng/ml) i (e) transformującym czynnikiem wzrostu (TGF) β (5, 20 ng/ml). W celu weryfikacji odpowiedzi komórek łożyska na P4 zależnie od ich genomowego lub pozagenomowego pobudzenia, skrawki placentomów inkubowano 6 i 24 godziny z czynnikami modulującymi działanie P4 **(4)**: (a) inhibitorem transkrypcji - aktynomycyną D (ActD; 250 ng/ml), (b) antagonistą PGR - mifepristonem (RU486; 10^{-5} M), (c) inhibitorem PGRMC1 - AG205 (2×10^{-5} M), (d) nieprzenikającym przez błonę komórkową koniugatem P4-BSA (10, 100 ng/ml) oraz (e) P4 podanym łącznie z każdym z wymienionych czynników. Po zakończeniu doświadczeń w medium oznaczano koncentrację P4, E2 oraz prostaglandyn (PG) E2 i F2 α , natomiast w skrawkach ekspresję genów PGRMC1, PGRMC2, mPR α , mPR β i mPR γ , odpowiednio metodą immunoenzymatyczną (EIA) i Real-Time PCR.

Uzyskane wyniki wykazały ekspresję błonowych receptorów P4 typu mPR oraz potwierdziły obecność receptorów typu PGRMC w endometrium, kosmówce oraz placentomach krowy w drugim trymestrze ciąży. Lokalizację komórkową tych receptorów stwierdzono zarówno w części maczynej, jak i płodowej łożyska krowy. Nie wykazano ($p > 0,05$) wpływu badanych czynników na ekspresję mRNA PGRMC1 i PGRMC2. Wykazano, że P4 podany łącznie z E2 ($10^{-5}/10^{-8}$ M) zwiększał ($p < 0,05$) ekspresję genu mPR α , natomiast P4 w dawce 10^{-5} M obniżał ($p < 0,05$) ekspresję mPR β po 6 godzinach. Ponadto, P4 podany samodzielnie oraz łącznie z E2 we wszystkich zastosowanych dawkach oraz E2 w dawce 10^{-8} M obniżały ($p < 0,05$) ekspresję mPR γ . Stwierdzono, że TNF α (100 ng/ml) stymulował ekspresję genu mPR α , natomiast TGF β w obu podanych dawkach (5 i 20 ng/ml) stymulował ekspresję mRNA mPR γ po 24 godzinach. Wykazano również obniżenie ($p < 0,05$) ekspresji mRNA mPR β i mPR γ po 6 godzinach inkubacji z P4, ActD, RU486 oraz P4 podanym łącznie z każdym badanym czynnikiem.

Podsumowując, wykazano obecność błonowych receptorów P4 typu PGRMC i mPR w łożysku krowy oraz wpływ steroidów na regulację ich ekspresji na drodze genomowej i pozagenomowej. Stwierdzono także stymulujący wpływ TNF α na ekspresję mRNA mPR α oraz TGF β na ekspresję mRNA mPR γ w łożysku krowy. Brak wpływu steroidów na ekspresję PGRMC1 i PGRMC2, a także pozostałych badanych cytokin i czynników wzrostu na ekspresję błonowych receptorów P4 wskazuje na złożoność procesów regulacyjnych oraz ich zależność od jednoczesnego działania wielu różnych czynników. Zagadnienia te wymagają dalszych badań.

SUMMARY

The regulation of membrane progesterone receptors expression and their function in the bovine placenta

Progesterone (P4) participates in the regulation of the estrus cycle and the creation of suitable conditions for implantation and further development of the fetus. This hormone may affect cell function by genomic mechanism, through nuclear P4 receptors (PGR), and via nongenomic mechanism through the membrane P4 receptors, such as progesterone receptor membrane component (PGRMC) 1 and 2, and membrane progestin receptors (mPR) α , β and γ . The nongenomic effect of P4 has been demonstrated in the tissues of the female reproductive system of various species of mammals, including cows. Expression of PGRMC1, PGRMC2 and mPR α , β and γ was demonstrated in the uterus and ovary in cow. The expression of PGRMC1 and 2 has also been found in the bovine placenta, however there are no data on mPR receptors in this tissue. Furthermore, the factors that can regulate the expression of membrane P4 receptors in the female reproductive system are not known.

Therefore, the aim of this study was to verify the hypothesis that P4 participates in the regulation of bovine placenta function through membrane P4 receptors and their expression can be regulated by steroid hormones, cytokines and growth factors produced locally in the uterus and placenta. Specific research tasks were: (a) to determine the level of expression and immunolocalization of membrane P4 receptors; (b) to determine the factors regulating the expression of membrane P4 receptors and (c) to define the response of cells to P4 depending on their genomic and nongenomic stimulation in the bovine placenta from the second trimester of pregnancy.

The research material was uteri obtained from pregnant cows (n=5) in the second trimester of pregnancy. The expression level of PGRMC1, PGRMC2, mPR α , β and γ genes in the sections of the endometrium, chorion and placentomes was determined using the Real-Time PCR. In addition, the cellular localization of membrane P4 receptors was determined by immunohistochemistry in placentome slices. Subsequently, in vitro experiments were performed using a culture of placentome slices with the maintenance of maternal-fetal connections. To determine the factors regulating the expression of membrane P4 receptors, placentome sections were incubated 6 and 24 hours with **(1)** steroids: (a) P4 (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M), (b) estradiol (E2; 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M), (c) P4 jointly with E2 (P4/E2; $10^{-5}/10^{-8}$, $10^{-6}/10^{-9}$, $10^{-7}/10^{-10}$ M), **(2)** cytokines: (a) tumor necrosis factor (TNF) α (10, 100 ng/ml), (b) interleukin (IL) 1 (1, 10 ng/ml), (c) IL6 (1, 10 ng/ml), (d) IL8 (1, 10 ng/ml), (e) interferon

(INF) γ (10, 100 ng/ml), (f) leukemia inhibitory factor (LIF; 10, 100 ng/ml) and **(3)** growth factors: (a) epidermal growth factor (EGF; 1, 10 ng/ml), (b) fibroblast growth factor (FGF7; 1, 10 ng/ml), (c) insulin-like growth factor (IGF1; 10, 100 ng/ml), (d) endothelial growth factor (VEGF; 5, 50 ng/ml) and (e) transforming growth factor (TGF) β (5, 20 ng/ml). However, to verify the response of placental cells to P4 depending on their genomic or nongenomic stimulation, placentome sections were incubated for 6 and 24 hours with factors modulating the action of P4 **(4)**: (a) inhibitor of transcription – actinomycin D (ActD; 250 ng/ml), (b) antagonist of PGR – mifepristone (RU486; 10^{-5} M), (c) inhibitor of PGRMC1 - AG205 (2×10^{-5} M), (d) conjugate P4-BSA (10, 100 ng/ml) and (e) P4 added jointly with each of used factors. In the medium, the concentration of P4, E2 and prostaglandins E2 and F2 α was determined, while in the placentome sections, the expression of PGRMC1 and 2, mPR α , β and γ mRNA was determined by enzyme-immunoassay test and Real-Time PCR, respectively.

The obtained results showed the expression of mPR receptors and confirmed the presence of PGRMC receptors in the endometrium, chorion and placentomes of cows in the second trimester of pregnancy. Immunohistochemical staining revealed the presence of these receptors in both the maternal and fetal parts of the bovine placenta. There was no effect ($p > 0.05$) of studied factors on the expression of mRNA PGRMC1 and PGRMC2. It was shown that P4 jointly with E2 ($10^{-5}/10^{-8}$ M) increased ($p < 0.05$) expression of mPR α , while P4 in dose 10^{-5} M decreased ($p < 0.05$) expression of mPR β after 6 hours of incubation in the placentome sections. Moreover, P4 alone and jointly with E2 in all used doses and E2 in dose 10^{-8} M reduced ($p < 0.05$) mPR γ expression. It was found that TNF α (100 ng/ml) stimulated mPR α gene expression, while TGF β in both used doses (5 and 20 ng/ml) stimulated mPR γ expression after 24 hours. Moreover, P4, ActD, RU486, and P4 added jointly with each of used factors, decreased ($p < 0.05$) the expression of mPR β and mPR γ after 6 hours of incubation.

In conclusion, obtained data indicate the presence of membrane P4 receptors of both types: PGRMC and mPR in the bovine placenta and the influence of steroids on their expression by genomic and nongenomic way. The stimulating effect of TNF α on the expression of mPR α and TGF β on the expression of mPR γ mRNA in the bovine placenta was also found. There was no effect of steroids and used cytokines and growth factors on the expression of PGRMC1 and PGRMC2, which can indicate a complexity of regulatory processes and their dependence on the simultaneous action of many different factors. However, this issue requires further studies.

WYKAZ SKRÓTÓW

AA	kwas arachidonowy (ang. <i>arachidonic acid</i>)
ActD	aktynomycyna D (ang. <i>actinomycin D</i>)
AF	płyn owodniowy (ang. <i>amniotic fluid</i>)
cAMP	cykliczny adenozynomonofosforan (ang. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CL	ciałko żółte (ang. <i>corpus luteum</i>)
COX	cyklooksygenaza (ang. <i>cyclooxygenase</i>)
cPLA2	cytozolowa fosfolipaza A2 (ang. <i>cytosolic phospholipase A2</i>)
DBD	domena wiążąca DNA (ang. <i>DNA binding domain</i>)
E1	estron (ang. <i>estrone</i>)
E2	17 β -estradiol (ang. <i>17β-estradiol</i>)
E3	estriol (ang. <i>estriol</i>)
EGF	czynn timerostu naskórka (ang. <i>epidermal growth factor</i>)
EIA	test immunoenzymatyczny (ang. <i>enzyme immunoassay</i>)
FCS	plodowa surowica bydlęca (ang. <i>fetal calf serum</i>)
FGF	czynn timerostu fibroblastów (ang. <i>fibroblast growth factor</i>)
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
HDL	lipoproteiny o wysokiej gęstości (ang. <i>high density lipoproteins</i>)
HRE	element odpowiedzi na hormon (ang. <i>hormone response element</i>)
HRP	peroksydaza chrzanowa (ang. <i>horseradish peroxidase</i>)
HSP	białka szoku cieplnego (ang. <i>heat-shock proteins</i>)
ID	domena inhibitorowa (ang. <i>inhibitory domain</i>)
IGF	insulinopodobny czynn timerostu (ang. <i>insulin-like growth factor</i>)
IL	interleukina (ang. <i>interleukin</i>)
INF γ	interferon γ (ang. <i>interferon</i>)
LBD	domena wiążąca ligand (ang. <i>ligand binding domain</i>)
LDL	lipoproteiny o niskiej gęstości (ang. <i>low density lipoproteins</i>)
LH	hormon luteinizujący (ang. <i>luteinizing hormone</i>)
LIF	czynn timeramujący białaczkę (ang. <i>leukaemia inhibitory factor</i>)
MAPK	kinaza aktywowana mitogenami (ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
mPR	blonowy receptor progestagenów (ang. <i>membrane progesterin receptor</i>)
OT	oksytocyna (ang. <i>oxytocin</i>)

P4	progesteron (ang. <i>progesterone</i>)
P5	pregnenolon (ang. <i>pregnenolone</i>)
PAIRBP1	białko PAIRBP1 (ang. <i>plasminogen activator inhibitor RNA binding protein</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PG	prostaglandyna (ang. <i>prostaglandin</i>)
PGE2	prostaglandyna E2 (ang. <i>prostaglandin E2</i>)
PGF2 α	prostaglandyna F2 α (ang. <i>prostaglandin F2α</i>)
PGFM	metabolit prostaglandyny F2 α (ang. <i>prostaglandin F2α metabolite</i>)
PGR	jądrowy receptor progesteronu (ang. <i>nuclear progesterone receptor</i>)
PGRMC	błonowy receptor progesteronu (ang. <i>progesterone receptor membrane component</i>)
PKC	kinaza białkowa C (ang. <i>protein kinase C</i>)
PKG	kinaza białkowa G (ang. <i>protein kinase G</i>)
SCP	białko nośnikowe cholesterolu (ang. <i>sterol carrier protein</i>)
SERBP1	białko SERBP1 (ang. <i>serpine 1 mRNA binding protein</i>)
SH	domena homologiczna do produktu onkogenu Src (ang. <i>Src homology domain</i>)
Src/Ras/MAP	szlak kinaz tyrozynowo-serynowych (ang. <i>serine-tyrosine kinase pathway</i>)
TGF β	transformujący czynnik wzrostu β (ang. <i>transforming growth factor β</i>)
TNF α	czynnik martwicy nowotworu α (ang. <i>tumor necrosis factor</i>)
VEGF	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
3 β -HSD	dehydrogenaza 3 β -hydroksysteroidowa (ang. <i>3β-hydroxysteroid dehydrogenase</i>)

WSTĘP

1. Procesy regulacyjne w układzie rozrodczym samicy

Procesy rozrodcze u samic ssaków regulowane są poprzez wielopoziomowy system sprzężeń zwrotnych opartych o regulacje neurohormonalne. System ten działa poprzez podporządkowanie niższych jego poziomów piętom nadrzędnym. Podstawową pętlą sygnalizacyjną tego układu jest oś podwzgórzowo-przysadkowo-jajnikowa. Podwzgórze stanowi nadrzędny ośrodek przekazywania informacji z układu nerwowego do systemu hormonalnego organizmu. Wydzielane przez podwzgórze neurohormony regulują aktywność wydzielniczą przedniego płata przysadki. Nadrzędnym neuropeptydem biorącym udział w regulacji procesów rozrodczych jest gonadoliberyna (GnRH). Hormon ten bezpośrednio wpływa na uwalnianie przysadkowych hormonów gonadotropowych: folikulotropowego (FSH) oraz luteinizującego (LH). Pierwszy z nich zapoczątkowuje wzrost i dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych, natomiast drugi odpowiada za owulację oraz formowanie ciała żółtego (CL) (HOWLES 2000; MESSINIS 2006).

Przysadkowe hormony gonadotropowe wpływają na funkcje wydzielnicze jajników, regulując w ten sposób oś podwzgórzowo-przysadkowo-jajnikową. W trakcie fazy pęcherzykowej, FSH prowadzi do wzrostu wydzielania estradiolu (E2) z komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego. Hormon ten zwrotnie prowadzi do zahamowania wydzielania podwzgórzowego GnRH oraz przysadkowych gonadotropin. Sytuacja zmienia się przed owulacją, kiedy E2 powoduje wzrost sekrecji GnRH, a tym samym przyczynia się do wyrzutu LH, koniecznego do owulacji pęcherzyka jajnikowego. Podczas fazy lutealnej, produkowany przez CL progesteron (P4), działa hamująco zarówno na wydzielanie GnRH oraz hormonów gonadotropowych (MESSINIS 2006).

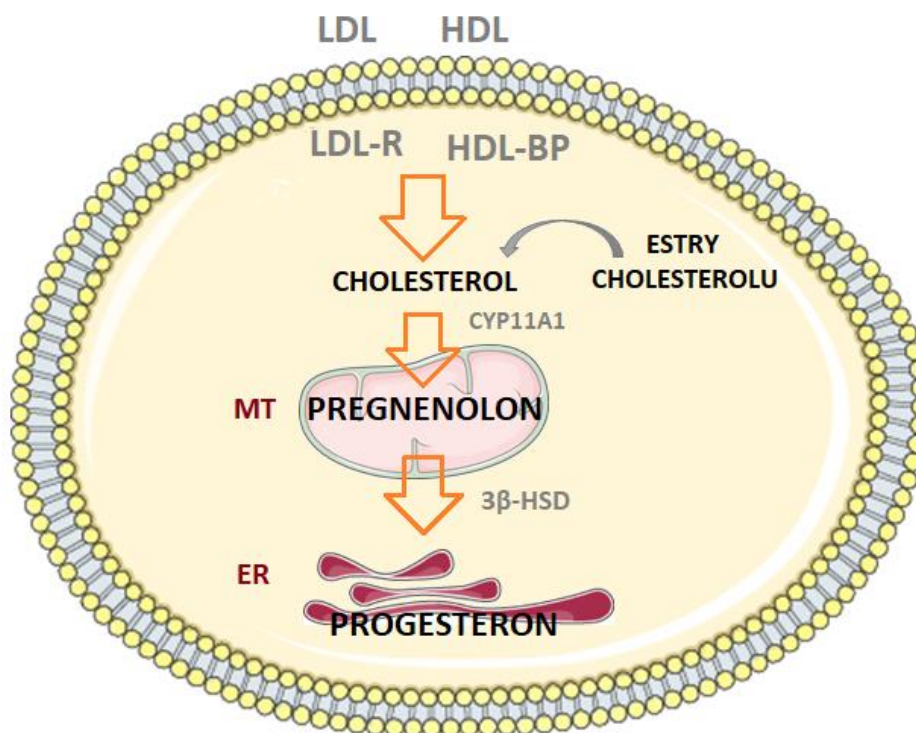
Funkcje jajnika w dużym stopniu zależą również od lokalnych regulacji mających miejsce w samym jajniku oraz od stanu czynnościowego macicy. Po owulacji pęknięty pęcherzyk jajnikowy przekształcany jest w CL, które jako tymczasowy gruczoł endokrynnny, umożliwia utworzenie sprzyjających warunków w macicy do zagnieżdżenia blastocysty. Funkcjonowanie CL uzależnione jest od wpływu czynników luteotropowych, których przewaga umożliwia produkcję P4 (SPENCER i BAZER 2004) oraz blokowanie syntezy macicznych receptorów dla oksytocyny (OT) (SKARŻYŃSKI i wsp. 1997; BISHOP 2013). Regresję CL powoduje natomiast główny czynnik luteolityczny produkowany przez błonę śluzową macicy (endometrium) – prostaglandyna (PG) F2 α . Działanie tego hormonu zostaje

zniesione w przypadku ciąży (SKARŻYŃSKI i OKUDA 1999), dzięki czemu CL zachowuje swoją funkcjonalność, produkując jeden z najważniejszych hormonów ciąży, jakim jest P4.

2. Progesteron

2.1. Synteza progesteronu

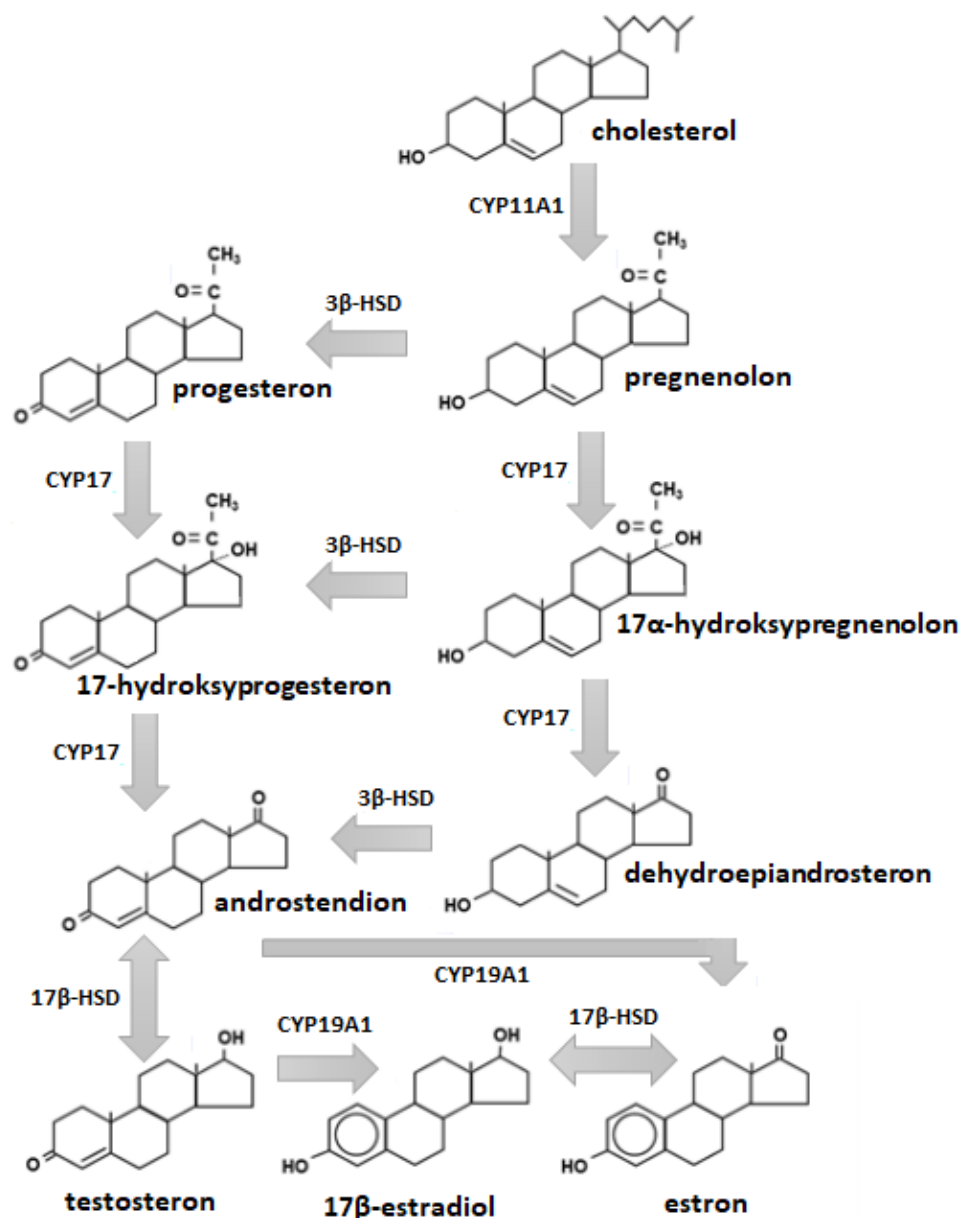
Progesteron należy do grupy progestagenów, które obok glukokortykoidów, mineralokortykoidów, androgenów i estrogenów stanowią jedną z pięciu klas hormonów steroidowych. Prekursorem syntezy tych hormonów jest cholesterol, który jest transportowany do komórek za pośrednictwem lipoprotein o niskiej (LDL – ang. *low density lipoproteins*) lub wysokiej gęstości (HDL – ang. *high density lipoproteins*) (NISWENDER 2002). Transport LDL do wnętrza komórki odbywa się po związaniu ze specyficznym receptorem, natomiast HDL z białkiem wiążącym zlokalizowanym na powierzchni błony komórkowej. Kompleksy LDL-receptor i HDL-białko wiążące dostają się do komórki na drodze endocytozy, w wyniku której dochodzi do wpuklenia błony komórkowej i utworzenia pęcherzyków określanych endosomami. Powstałe endosomy łączą się z lizosomami, gdzie następuje rozdzielenie LDL/HDL od receptora/białka wiążącego i dochodzi do uwolnienia cholesterolu. W komórce występuje również dodatkowe źródło cholesterolu w postaci jego estrów, zmagazynowanych w kroplach lipidowych. Miejscem syntezy hormonów steroidowych jest mitochondrium (NISWENDER i wsp. 2000; NISWENDER 2002). Do zewnętrznej błony mitochondrium transport cholesterolu odbywa się przy udziale cytoszkieletu i białek nośnikowych SCP (ang. *sterol carrier proteins*), a do wewnętrznej błony za pomocą białka StAR (ang. *steroidogenic acute regulatory protein*). Pierwszym etapem syntezy steroidów jest usunięcie z bocznego łańcucha cholesterolu sześciowęglowej jednostki, w wyniku czego powstaje 21-węglowy pregnenolon (P5). Reakcja ta jest katalizowana przez desmolazę cholesterolową (CYP11A1; EC 1.14.15.6), należącą do rodziny cytochromu P450. Następnie P5 jest transportowany do siateczki śródplazmatycznej gładkiej, gdzie 3-hydroksylowa grupa pregnenolonu jest utleniana do grupy 3-ketonowej pod wpływem dehydrogenazy 3 β -hydroksysteroidowej (3 β -HSD; EC 1.1.1.145). W wyniku tej reakcji powstaje P4, będący prekursorem kortyzolu i aldosteronu oraz pierwszym aktywnym biologicznie produktem w szlaku syntezy hormonów steroidowych (STOCCO 2000; NISWENDER 2002). Ogólny schemat syntezy P4 prezentuje Ryc. 1, natomiast schemat steroidogenezy jajnikowej przedstawiono na Ryc. 2.



Ryc. 1. Schemat syntezy progesteronu w jajniku (zmodyfikowane wg NISWENDER 2002).

LDL – lipoproteiny o małej gęstości, HDL – lipoproteiny o dużej gęstości, LDL-R – receptor dla lipoprotein, HDL-BP – białko wiążące lipoproteinę HDL, CYP11A1 – desmolaza cholesterolowa, 3β-HSD – dehydrogenaza 3β-hydroksysteroidowa, MT – mitochondrium, ER – siateczka śródplazmatyczna

Progesteron w komórkach jajnika może być przekształcony przy udziale enzymu o aktywności 17α-hydroksylazy (CYP17; EC 1.14.14.19) w 17α-hydroksyprogesteron, będący prekursorem syntezy androgenów. Reakcja katalizowana przez CYP17 prowadzi do powstania androstendionu (A4), który następnie poprzez dehydrogenazę 17β-hydroksysteroidową (17β-HSD; EC 1.1.1.51) przekształcany jest w testosteron (T4). Hormon ten jest prekursorem biosyntezy estrogenów (Ryc. 2) (CUI i wsp. 2013). Progesteron produkowany jest głównie w CL, pęcherzyku jajnikowym i macicy, a w trakcie ciąży również przez łożysko (NISWENDER i wsp. 2000; DIEP i wsp. 2015). Ciało żółte powstaje po owulacji z pękniętego pęcherzyka jajnikowego. Komórki warstwy ziarnistej pęcherzyka przekształcane są w duże komórki lutealne (LLC – ang. *large luteal cells*), natomiast komórki osłonki wewnętrznej w małe komórki lutealne (SLC – ang. *small luteal cells*) (NISWENDER i NETT 1988; NISWENDER i wsp. 1994). Procesy te stymulowane są przez czynniki luteotropowe, do których zalicza się między innymi: LH (*Luteinizing Hormone*) (NISWENDER i NETT 1988), prostaglandyna (PG) E2 (NISWENDER i wsp. 2000), OT (SKARŻYŃSKI i wsp. 2001) oraz tlenek azotu (NO) (FRIDEN i wsp. 2000).



Ryc. 2. Schemat syntezy hormonów steroidowych w jajniku (zmodyfikowane wg SCHULER i wsp. 2018).

CYP11A1 – desmolaza cholesterolowa, 3β-HSD - 3β-dehydrogenaza hydroksysteroidowa, CYP17 – enzym o aktywności 17α-hydroksylazy i 17,20-liazy, 17β-HSD - 17β-dehydrogenaza hydroksysteroidowa, CYP19A1 – P450 aromataza

2.2. Funkcje progesteronu w układzie rozrodczym samicy

Progesteron bierze udział w licznych procesach zachodzących w obrębie układu rozrodczego samic. Dzięki swojemu wielokierunkowemu działaniu uczestniczy on w regulacji cyklu płciowego, jak również w zapoczątkowaniu oraz utrzymaniu ciąży.

W trakcie cyklu P4 działa na poziomie osi podwzgórze-przysadka-jajnik, regulując wydzielanie hormonów gonadotropowych. Podczas fazy lutealnej hamuje wydzielanie GnRH z podwzgórza, a tym samym FSH i LH z przysadki, w wyniku czego dochodzi do

zahamowania wzrostu i rozwoju pęcherzyków jajnikowych. Hormon ten działa również jako czynnik luteotropowy, promując własną syntezę w komórkach lutealnych (GRAHAM i CLARKE 1997; PELUSO 2006).

Progesteron pełni kluczową rolę podczas ustanawiania ciąży. Wspomaga on proces implantacji blastocysty poprzez stymulację produkcji enzymów odpowiedzialnych za lizę osłonki przejrzystej. Wpływa również hamująco na proliferacyjne działanie E2 na komórki nabłonka macicy oraz reguluje ekspresję cząsteczek adhezyjnych (integryna $\alpha_4\beta_1$, integryna $\alpha_v\beta_3$, mucyna-1) (HALASZ i SZEKERES-BARTHO 2013). Ponadto, P4 hamuje odpowiedź immunologiczną matki, umożliwiając właściwy przebieg implantacji (GRAHAM i CLARKE 1997; HALASZ i SZEKERES-BARTHO 2013). Hormon ten stymuluje limfocyty do wydzielania czynnika blokującego, tzw. PIBF (ang. *progesterone-induced blocking factor*), który wpływa na profil wydzielania cytokin. Powoduje to wzrost produkcji interleukin (IL) o działaniu przeciwzapalnym (IL-3, IL-4 i IL-10) i zmniejszenie produkcji cytokin prozapalnych, takich jak interferon (INF) δ , czy też czynnik martwicy nowotworu (TNF) α . Ponadto, P4 hamuje w sposób pośredni syntezę IL-2 poprzez zwiększanie syntezy PGE2 (FORMBY 1995; DRUCKMANN 2005).

Progesteron jest również hormonem niezbędnym do utrzymania ciąży. Ogranicza on kurczliwość macicy oraz obniża wrażliwość na bodźce inicjujące jej skurcze, tworząc tzw. blok progesteronowy (CSAPO 1956). Utrzymanie tego bloku polega na zachowaniu odpowiedniej równowagi jonowej w komórkach błony mięśniowej (miometrium) macicy, polegającej na przewodze jonów magnezu (Mg^{2+}) nad jonami wapnia (Ca^{2+}). Zaburzenie tej równowagi skutkuje wrażliwością miometrium na działanie OT, będącej głównym czynnikiem inicjującym skurcze ciężarnej macicy. Ponadto, P4 prowadzi do zahamowania ekspresji receptorów OT, co stanowi dodatkowy mechanizm hamujący kurczliwość macicy (GRAHAM i CLARKE 1997).

W końcowym etapie ciąży P4 wraz z E2 pobudzają rozwój gruczołu mlekowego. Rozwój przewodów mlecznych wywołany jest przez E2, natomiast pęcherzyków przez P4. Hormony te wykazują działanie synergistyczne z LH oraz pobudzają przysadkę do wydzielania prolaktyny, odpowiedzialnej za laktację (GRAHAM i CLARKE 1997; NISWENDER i wsp. 2000).

Progesteron wykazuje zróżnicowany wpływ na tkanki rozrodcze, jak również na różne typy komórek w obrębie tej samej tkanki. Odpowiedź komórkowa na P4 jest również odmienna w zdrowych i chorych komórkach/tkankach. Wykazano, że u kobiet P4 sprzyja rozwojowi i wzrostowi raka piersi oraz mięśniaków macicy, natomiast chroni przed rozwojem

raka endometrium wywołanego przez estrogeny. Mechanizmy odpowiedzialne za różnice w działaniu P4 mogą być wynikiem charakterystycznego dla danej tkanki mikrośrodowiska, na które mogą składać się lokalnie wydzielane czynniki, ekspresja poszczególnych receptorów czy też komunikacja parakrynną i autokrynną. Czynniki te mogą determinować ogólny wpływ P4 na daną komórkę, a tym samym na tkankę czy narząd (KIM i CHAPMAN-DAVIS 2010; KIM i wsp. 2013).

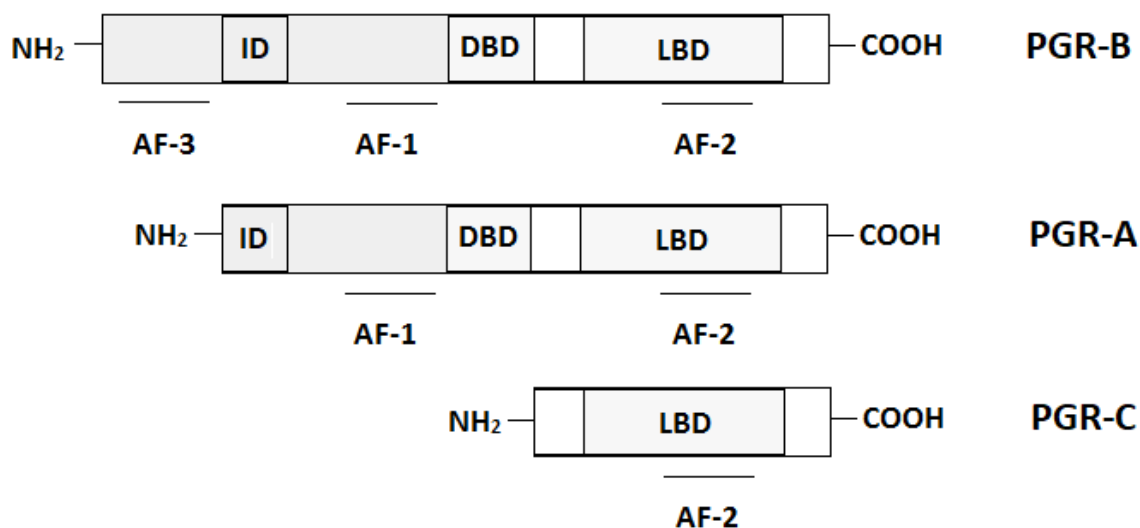
2.3. Mechanizm działania progesteronu na komórki

Klasyczne działanie P4 na komórki docelowe odbywa się na drodze genomowej poprzez jądrowe receptory P4 (PGR), co prowadzi do pobudzenia lub zahamowania ekspresji genów docelowych. W tym przypadku odpowiedź komórkowa następuje po kilku lub kilkunastu godzinach od podania hormonu (BAGHI i wsp. 1992; MULAC-JERICEVIC i CONNEELY 2004; THIJSEN 2005). Poza drogą klasyczną, P4 może działać również na komórki poprzez mechanizm pozagenomowy, a odpowiedź komórkowa pojawia się w bardzo krótkim czasie (kilka sekund lub minut) od momentu podania hormonu. Ponadto, efekt ten nie jest hamowany przez inhibitory transkrypcji i translacji (WEHLING 1997; SIMONCINI i GENAZZANI 2003; PELUSO 2006). Sugeruje to, że P4 może wywoływać szybką odpowiedź komórkową na drodze pozagenomowej, między innymi poprzez wiązanie ze specyficznymi błonowymi receptorami (WEHLING 1997; BRAMLEY 2003; PELUSO 2006; CAHILL 2007; GELLERSEN i wsp. 2009; DRESSING i wsp. 2011).

2.3.1. Genomowe działanie progesteronu

Według klasycznego mechanizmu działania steroidów, P4 wiąże się ze specyficznym jądrowym receptorem P4, będącym jednocześnie czynnikiem transkrypcyjnym. Hormon poprzez PGR reguluje ekspresję określonych genów, doprowadzając do zapoczątkowania procesów komórkowych składających się na fizjologiczną odpowiedź organizmu. Znane są dwie główne izoformy jądrowego receptora P4: izoforma A (PGR-A) oraz izoforma B (PGR-B). Obie izoformy kodowane są przez ten sam gen, ale ich transkrypcja odbywa się z dwóch różnych promotorów. U człowieka izoforma PGR-A ma masę równą 94 kDa, natomiast PGR-B – 116 kDa (KASTNER i wsp. 1990; MULAC-JERICEVIC i CONNEELY 2004). Wykazano również istnienie trzeciej izoformy jądrowego receptora P4, izoformy C (PGR-C), która została zidentyfikowana po raz pierwszy w ludzkiej linii komórek raka piersi. Izofoma ta ma masę około 60 kDa (WEI i MINER 1994). Schemat budowy izoform PGR-A, PGR-B i PGR-C przedstawiono na Ryc. 3.

Jądrowe receptory P4 posiadają charakterystyczną dla jądrowych receptorów hormonów steroidowych budowę modułową (Ryc. 3). Wyodrębnione regiony receptora różnią się pod względem strukturalnym i funkcjonalnym (BROSENS i wsp. 2004). Wyróżnia się trzy główne domeny funkcjonalne: domena N-końcowa, domena wiążąca DNA (DBD; ang. *DNA binding domain*) oraz domena odpowiadająca za przyłączanie ligandu (LBD; ang. *ligand binding domain*).



Ryc. 3. Schemat budowy izoform jądrowego receptora progesteronu: PGR-A, PGR-B i PGR-C u człowieka (zmodyfikowane wg SCHUMACHER i wsp. 1999; MULAC-JERICEVIC i CONNEELY 2004).

AF1-AF3 - domeny aktywujące proces transkrypcji, ID – domena inhibitorowa, DBD – domena wiążąca DNA, LBD – domena wiążąca ligand

Domena N-końcowa receptora zawiera sekwencje AF (ang. *activation function*), odpowiedzialne za przyłączanie czynników transkrypcyjnych, co umożliwia aktywację odpowiedniego promotora oraz rozpoczęcie procesu transkrypcji (MEYER i wsp. 1992; GIANGRANDE i wsp. 1997). Domena ta wykazuje największą zmienność gatunkową (TORA i wsp. 1988). U człowieka N-końcowa domena PGR-B jest dłuższa od izoformy PGR-A o 164 aminokwasy, dlatego oprócz sekwencji AF1 posiada również sekwencję AF-3 (SARTORIUS i wsp. 1994). Ponadto, domena N-końcowa zawiera domenę inhibitorową (ID; ang. *inhibitory domain*), która po przyłączeniu antagonisty receptora ma zdolność do hamowania jego aktywności (GIANGRANDE i wsp. 1997).

Kolejna domena funkcjonalna, domena DBD, należy do najbardziej konserwatywnych sekwencji w obrębie jądrowych receptorów P4. Jej strukturę przestrzenną tworzą dwa palce cynkowe, w których dwa jony cynku są związane przez osiem reszt cysteinowych (FREEDMAN 1992). Domena DBD odpowiada za przyłączanie kompleksu ligand-receptor do specyficznej sekwencji regulatorowej DNA, określanej jako elementy odpowiedzi na hormon

(HRE; ang. *hormone response elements*) (GIANGRANDE i wsp. 1997). Sekwencja HRE zbudowana jest zazwyczaj z palindromowego elementu odpowiedzi hormonalnej AGAACAnnGTCT (gdzie n jest dowolną zasadą azotową) (HAM i wsp. 1988).

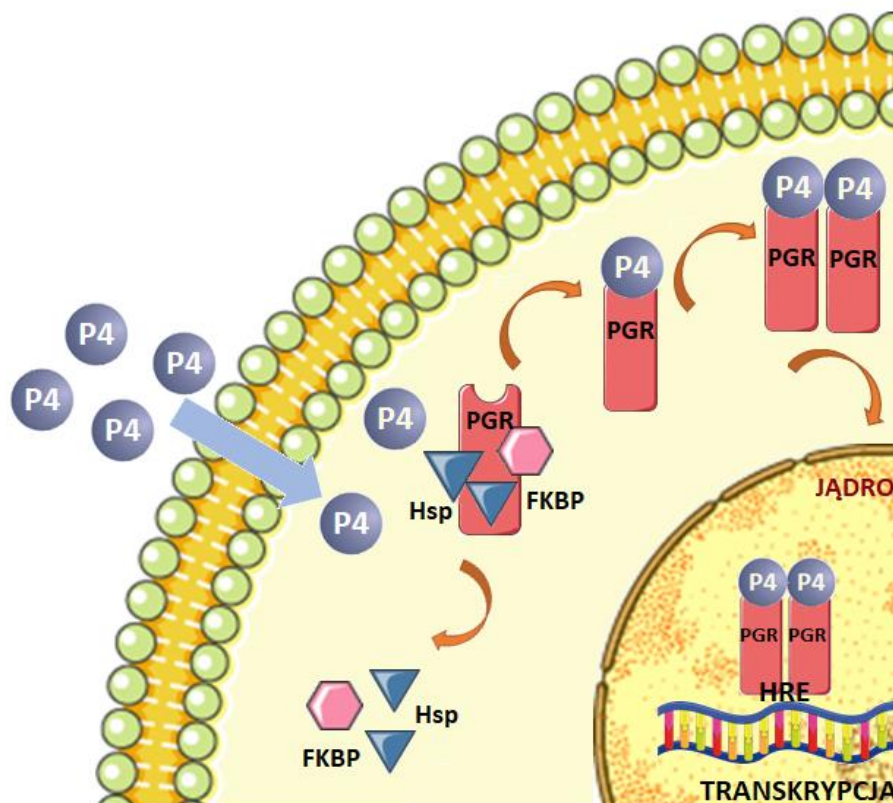
Ostatnią domeną zlokalizowaną na C-końcu białka jest domena LBD, która zawiera dodatkową sekwencję AF2. Sekwencja ta odpowiada za oddziaływanie z białkami szoku cieplnego (Hsp; ang. *heat-shock protein*) oraz bierze udział w dimeryzacji receptorów (SCHUMACHER i wsp. 1999; MULAC-JERICEVIC i CONNEELY 2004).

Izoforma PGR-C jest najkrótszą izoformą jądrowego receptora P4, posiadającą jeden palec cynkowy w domenie DBD oraz domenę LBD z elementem aktywującym transkrypcję AF-2 (Ryc. 3). Izoforma ta nie wykazuje aktywności transkrypcyjnej, ale może tworzyć heterodimery z PGR-A lub PGR-B i w ten sposób wpływać na ich aktywność transkrypcyjną (WEI i MINER 1994; WEI i wsp. 1996; WEI i wsp. 1997).

Poszczególne izoformy jądrowego receptora P4 wykazują różną aktywność biologiczną oraz pełnią odmienne role w komórkach. Izoforma PGR-B odpowiada za aktywację transkrypcji genów zależnych od P4, natomiast PGR-A działa jako inhibitor izoformy PGR-B, przez co zmniejsza działanie P4 na komórki docelowe (LEONHARDT i wsp. 2003; MULAC-JERICEVIC i CONNEELY 2004). Wykazano również, że izoforma PGR-A może odpowiadać za owulację i wpływać na antyproliferacyjne działanie P4 w macicy, a izoforma PGR-B bierze udział w rozwoju gruczołu sutkowego (MULAC-JERICEVIC i wsp. 2000; MULAC-JERICEVIC i wsp. 2003).

W klasycznym, genomowym działaniu steroidów cząsteczka hormonu dyfunduje przez błonę komórkową i wnika do cytoplazmy, gdzie znajdują się niezwiązane z ligandem specyficzne receptory tego hormonu. W przypadku braku sygnału hormonalnego receptory tworzą kompleksy z białkami opiekuńczymi, co umożliwia utrzymanie receptora w aktywnej, gotowej do związania ligandu konformacji. Do białek tych zalicza się głównie białka szoku cieplnego (Hsp70, Hsp90), immunofiliny (FKBP51, FKBP52) oraz białko p23 (SMITH i TOFT 1993; SMITH 2000). Progesteron transportowany jest do komórek docelowych głównie w postaci związanej z transkortyną (WIERMAN 2007). Przyłączenie cząsteczki hormonu do receptora zmienia jego przestrzenną konformację, co w konsekwencji prowadzi do oddysocjowania białek opiekuńczych, dimeryzacji receptorów i ich translokacji do jądra komórkowego. W jądrze kompleks receptor-steroid wiąże się ze specyficznymi miejscami odpowiedzi na hormon, znajdującymi się w regionach promotorowych genów docelowych, doprowadzając do regulacji ekspresji tych genów (SŁOMCZYŃSKA 1995; SCHUMACHER i wsp.

1999; LEONHARDT i wsp. 2003). Schemat mechanizmu działania P4 na komórkę docelową poprzez jądrowy receptor P4 przedstawiono na Ryc. 4.



Ryc. 4. Schemat działania progesteronu poprzez jądrowy receptor P4 na komórkę docelową – droga genomowa (zmodyfikowane wg KOWALIK i wsp. 2013b).

P4 – progesteron, Hsp - białko szoku cieplnego; FKBP – immunofilina, PGR – jądrowy receptor progesteronu, HRE – element odpowiedzi na hormon zlokalizowany w obrębie promotora docelowych genów

2.3.2. Pozagenomowe działanie progesteronu

Klasyczny mechanizm działania P4 nie wyjaśnia wszystkich efektów wywoływanych przez ten hormon. Wykazano, że hormony steroidowe mogą wywierać szybki wpływ na komórkę, niezależnie od procesu transkrypcji genów i syntezy nowych białek. Jest to pozagenomowe działanie steroidów, które następuje już po kilku sekundach lub minutach od podania hormonu (WEHLING 1997; SIMONCINI i GENAZZANI 2003; PELUSO 2006). Mechanizm ten opiera się na pobudzeniu różnych szlaków transdukcji sygnału, związanych z generowaniem wtórnych przekazników sygnału, modulowaniem kanałów jonowych czy aktywacją lub dezaktywacją kinaz białkowych (SIMONCINI i GENAZZANI 2003; LACHOWICZ-OCHĘDALSKA 2005; WEHLING i wsp. 2007).

Pozagenomowe działanie P4 wykazano w tkankach układu rozrodczego samic różnych gatunków ssaków (BRAMLEY 2003; CAI i STOCCO 2005; PELUSO 2006; TAHIR i wsp. 2012; BUNMA i wsp. 2020), w tym u krów (BOGACKI i wsp. 2002; DURAS i wsp. 2005; KOWALIK i wsp. 2009). Sugerowanych jest kilka dróg pozagenomowego działania P4. (1) Steroidy jako

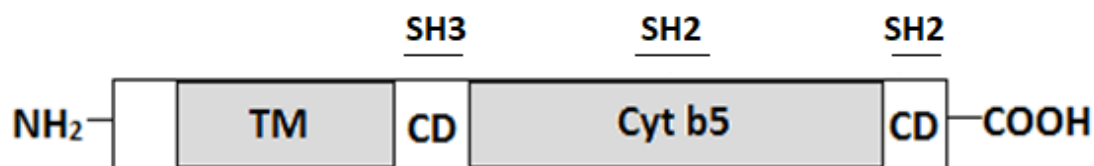
substancje lipofilne mogą wpływać na płynność błony komórkowej, co prowadzi do zmiany powinowactwa innych błonowych receptorów do ich ligandów oraz modyfikacji innych białek czynnościowych, związanych z błonami komórkowymi, na przykład kanałów jonowych (BURGER i wsp. 1999; GIMPL i FAHRENHOLZ 2002; LACHOWICZ-OCHEŃDALSKA 2005). Tą drogą P4 może upośledzać wiązanie OT do jej receptora, ograniczając tym samym jej wpływ na komórkę (GRAZZINI i wsp. 1998). (2) Ponadto, cytoplazmatyczne jądrowe receptory P4 w postaci monomerów, które są zlokalizowane w pobliżu błon komórkowych, mogą uczestniczyć w pozagenomowym działaniu P4 (PELUSO 2006). Wykazano, że receptory te modyfikują wewnątrzkomórkowe szlaki kinaz białkowych, powodując fosforylację różnych białek, w tym czynników transkrypcyjnych (CONNELLY i wsp. 2001; LEONHARDT i wsp. 2003; WEHLING i LÖSEL 2006). (3) Dodatkowo, w pozagenomowy mechanizm działania P4 zaangażowane są błonowe receptory tego hormonu. Dotychczas opisano dwa typy tych receptorów błonowych: PGRMC (ang. *progesterone receptor membrane component*) i mPR (ang. *membrane progestin receptor*) (PELUSO 2006; WEHLING i wsp. 2007; GELLERSEN i wsp. 2009).

2.3.2.1. Błonowe receptory progesteronu (PGRMC)

Błonowy receptor PGRMC1 oraz jego homolog PGRMC2 należą do rodziny białek MAPR (ang. *membrane associated progesteron receptor*). Białko PGRMC1 zostało po raz pierwszy wyizolowane z błon plazmatycznych komórek wątroby świni (MEYER i wsp. 1996), a następnie wykazano jego obecność w wewnętrznej błonie akrosomalnej świńskich plemników (LÖSEL i wsp. 2004). W komórce receptor ten występuje głównie w błonie komórkowej oraz błonach retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego (FALKENSTEIN i wsp. 1996; MEYER i wsp. 1996; PELUSO i wsp. 2005; PELUSO 2006).

Białko PGRMC1 zbudowane jest ze 194 aminokwasów, a jego masa cząsteczkowa, w zależności od gatunku, waha się od 25 do 28 kDa (FALKENSTEIN i wsp. 1996; PELUSO 2006). Receptor ten zbudowany jest z trzech domen: N-końcowa domena zewnątrzkomórkowa, pojedyncza domena transbłonowa (TM; ang. *transmembrane domain*) oraz najdłuższa domena cytoplazmatyczna (CD; ang. *cytoplasmic domain*) (FALKENSTEIN i wsp. 1996; MEYER i wsp. 1996; PELUSO 2006). W obrębie domeny cytoplazmatycznej znajduje się domena o budowie zbliżonej do cytochromu b-5 (ang. *cytochrome b-5-like/steroid binding domain*), która odpowiada za wiązanie steroidów (PELUSO 2006). Ponadto, w cytoplazmatycznej części receptora znajdują się trzy homologiczne domeny Src (ang. *Src homology domains*), umożliwiające zależną od ligandu transdukcję sygnału

oraz oddziaływanie PGRMC1 z innymi białkami, takimi jak kinazy tyrozynowe (PELUSO 2006; SINGH i wsp. 2013). Schemat budowy białka PGRMC1 przedstawiono na Ryc. 5.



Ryc. 5. Schemat budowy białka błonowego receptora progesteronu - PGRMC1 (zmodyfikowane wg GELLERSEN i wsp. 2009).

TM – domena transbłonowa, CD – domena cytoplazmatyczna, Cyt b5 – motyw wiążący cytochrom b5, SH2, SH3 – domeny Src

Ekspresję genu i/lub białka PGRMC1 wykazano dotychczas w komórkach ziarnistych świni (JIANG i wsp. 2004), komórkach ziarnistych i lutealnych człowieka (SASSON i wsp. 2004), myszy (McRAE i wsp. 2005), szczura (CAI i STOCCO 2005) i krowy (LUCIANO i wsp. 2011; KOWALIK i wsp. 2014), a także w komórkach nabłonkowych błony mięśniowej i śluzowej macicy krowy (LUCIANO i wsp. 2011; SŁONINA i wsp. 2012; KOWALIK i wsp. 2013). Rola białka PGRMC1 w układzie rodnym nie została w pełni wyjaśniona. Dotychczasowe badania wykazały, że receptor ten może pośredniczyć w regulacji wewnątrzkomórkowego metabolizmu cholesterolu oraz steroidogenezie, hamowaniu kurczliwości miometrium, czy też dojrzewaniu oocytów (SUCHANEK i wsp. 2005; HUGHES i wsp. 2007; WU i wsp. 2011; APARICIO i wsp. 2011). Sugeruje się również, że PGRMC1 bierze udział w regulacji funkcji lutealnych poprzez wpływ na połączenia międzykomórkowe (ang. *gap junctions*) oraz transkrypcję genów związanych z procesami anty-apoptotycznymi (CAI i STOCCO 2005). Ponadto, receptor ten może pośredniczyć w indukowanej przez P4 reakcji akrosomalnej (LÖSEL i wsp. 2005). Ekspresję PGRMC1 wykazano również w ludzkiej tkance nowotworowej piersi (PEDROZA i wsp. 2020).

Białko PGRMC1 może również tworzyć kompleks wiążący P4 z innym białkiem – SERBP1 (ang. *serpine 1 mRNA binding protein*) określanym także jako PAIRBP1 (ang. *plasminogen activator inhibitor RNA binding protein*) (PELUSO i wsp. 2006). Białko to zlokalizowane jest w błonie komórkowej, jednak nie posiada domeny transbłonowej, przez co jego działanie jest uzależnione od związania z PGRMC1 (PELUSO i wsp. 2004, 2005; CAI i STOCCO 2005). Dotychczas ekspresję tego białka wykazano między innymi w komórkach pęcherzyków jajnikowych oraz komórkach lutealnych szczura (PELUSO i PAPPALARDO 1998; PELUSO i wsp. 2004, 2005), a także w komórkach ziarnistych i lutealnych człowieka (ENGMANN i wsp. 2006). Sugeruje się, że w komórkach ziarnistych

jajnika szczura kompleks PGRMC1 z SERBP1 pośredniczy w anty-apoptotycznym działaniu P4. Związek P4 z tym kompleksem prowadzi do aktywacji kinazy białkowej G (PKG) oraz wzrostu poziomu cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP), co w konsekwencji skutkuje obniżeniem wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia w komórce (PELUSO 2006; ENGMANN i wsp. 2006).

Białko PGRMC2 poznane jest w mniejszym stopniu niż PGRMC1. Sekwencje aminokwasowe tych dwóch białek są wysoce homologiczne, główne różnice występują w obrębie domeny transbłonowej (CAHILL 2007; WENDLER i WEHLING 2013). Ekspresję genu i/lub białka PGRMC2 zlokalizowano w błonie śluzowej macicy myszy (ZHANG i wsp. 2008) i małpy (KEATOR i wsp. 2012), jak również w CL (KOWALIK i wsp. 2014), endometrium (KOWALIK i wsp. 2013), miometrium (SŁONINA i wsp. 2012) i jajowodzie krowy (SAINT-DIZIER i wsp. 2012; KOWALIK i wsp. 2015). Receptor PGRMC2, podobnie jak PGRMC1, pełni ważną rolę w obrębie układu rozrodczego samicy. Wykazano jego zwiększoną ekspresję w łożysku kobiet w trakcie przedwczesnych i terminowych skurczów, co wskazuje na możliwy udział tego białka w inicjacji porodu (PRU i CLARK 2013; WENDLER i WEHLING 2013). Przypuszcza się również, że PGRMC2 bierze udział w funkcji wydzielniczej i motorycznej jajowodu (SAINT-DIZIER i wsp. 2012; KOWALIK i wsp. 2015). Ponadto, badania wskazują na związek białka PGRMC2 ze zmianami patologicznymi występującymi w obrębie układu rodowego. Wykazano zwiększoną ekspresję receptora PGRMC2 u kobiet z endometriozą oraz jego wpływ na szybkość migracji komórek raka jajnika (BUNCH i wsp. 2014; WENDLER i WEHLING 2013).

2.3.2.2. Błonowe receptory progestagenów (mPR)

Druga grupa błonowych receptorów P4 to błonowe receptory progestagenów, które należą do rodziny białek PAQR (ang. *progestin and adipoQreceptors*) (NATHAN i wsp. 2010). Wyróżnia się trzy główne izoformy tego receptora: mPR α (PAQR7), mPR β (PAQR8) oraz mPR γ (PAQR5), kodowane przez różne geny (ZHU i wsp. 2003b; FERNANDES i wsp. 2005; PELUSO 2006). Badania wskazują również na obecność dwóch dodatkowych izoform: mPR δ (PAQR6) oraz mPR ϵ (PAQR9) w tkankach układu nerwowego człowieka (PANG i wsp. 2013).

Obecność błonowych receptorów mPR α , mPR β i mPR γ wykazano w obrębie układu rozrodczego różnych gatunków zwierząt. U owiec zidentyfikowano ekspresję białek mPR w macicy i jajnikach (ASHLEY i wsp. 2006), natomiast w przypadku krów w macicy (KOWALIK i wsp. 2019) oraz w jajowodzie (KOWALIK i wsp. 2016). U ciężarnych kobiet wykazano obecność tych receptorów w komórkach błony śluzowej (mPR α) i mięśniowej

macicy (mPR α i mPR β) oraz w jajowodzie (mPR β) (FERNANDES i wsp. 2005; NUTU i wsp. 2009; KARTERIS i wsp. 2006).

Białko mPR α zostało po raz pierwszy wyizolowane z jajnika pstrąga tęczowego (ZHU i wsp. 2003b). Ludzkie białko mPR α składa się z 352 aminokwasów i jego masa cząsteczkowa wynosi około 40 kDa (ZHU i wsp. 2003b). Błonowe receptory progestagenów posiadają budowę charakterystyczną dla receptorów związanych z białkami G. Zbudowane są z N-końcowej domeny zewnątrzkomórkowej, siedmiu domen transbłonowych oraz krótkiej domeny cytoplazmatycznej. Lokalizacja komórkowa tych receptorów obejmuje głównie błonę komórkową oraz błonę retikulum endoplazmatycznego (ZHU i wsp. 2003a, b; FERNANDES i wsp. 2005). Schemat budowy białka błonowego receptora P4 - mPR przedstawiono na Ryc. 6.

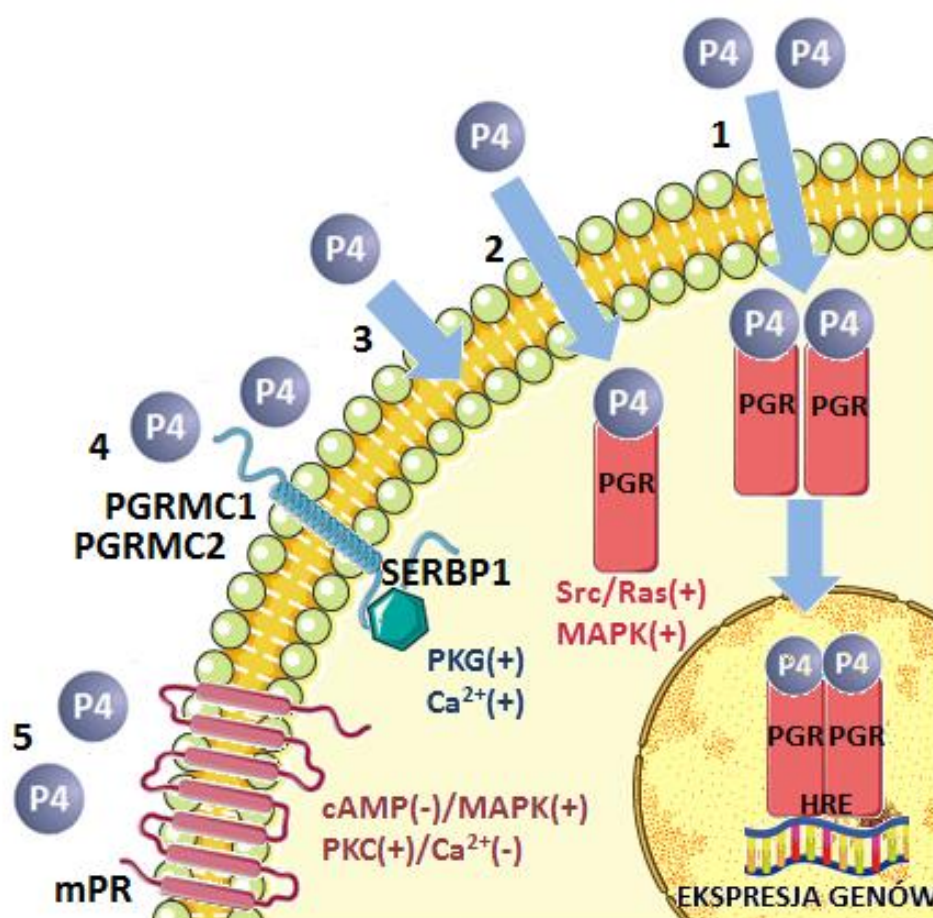


Ryc. 6. Schemat budowy białka błonowego receptora P4 - mPR (zmodyfikowane wg ZHU i wsp. 2003b).

Na czarno zaznaczono siedem domen transbłonowych, na szaro domeny zewnątrzkomórkowe, natomiast na białą domeny cytoplazmatyczne. Numery oznaczają ilości aminokwasów w poszczególnych domenach.

Wiązanie P4 z błonowym receptorem mPR aktywuje różne wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, co prowadzi do specyficznej odpowiedzi komórki na ten hormon. Wykazano, że aktywacja receptorów mPR przez P4 może hamować aktywność cykazy adenylationowej (CA) oraz obniżać poziom wewnątrzkomórkowego stężenia cyklicznego adenylationomonofosforanu (cAMP) w komórkach. W konsekwencji dochodzi do pobudzenia ścieżki sygnałowej zależnej od kinazy MAP (ang. *mitogen activated protein*), która uczestniczy w regulacji licznych procesów komórkowych, takich jak migracja, apoptoza oraz proliferacja komórek (KARTERIS i wsp. 2006; GELLERSEN i wsp. 2009). Funkcja białek mPR nie jest jednak w pełni wyjaśniona. Należy zaznaczyć, że zmniejszenie poziomu cAMP w komórce prowadzi do hamowania procesu steroidogenezy, natomiast aktywacja kinazy MAP jest częścią apoptozy w wielu typach komórek. Wskazuje to na potencjalny udział receptorów mPR w promowaniu apoptozy komórek lutealnych i w konsekwencji regresji CL (AMSTERDAM i wsp. 2003; PELUSO 2006). Stwierdzono również, że białka te mogą brać udział w zapłodnieniu (QIU i wsp. 2008), transporcie oocytów (NUTU i wsp. 2009) oraz przygotowaniu macicy do implantacji blastocysty, ciąży oraz porodu (ASHLEY i wsp. 2006; FERNANDES i wsp. 2005; DRESSING i wsp. 2011). Jednakże, dokładna funkcja fizjologiczna białek mPR nie jest w pełni wyjaśniona.

Najnowsze badania wskazują na możliwy udział receptorów mPR w powstawaniu zmian nowotworowych. Wykazano wzrost poziomu ekspresji tych białek w guzach jajnika oraz piersi u kobiet (CHARLES i wsp. 2010; DRESSING i wsp. 2012). Natomiast w endometrium stwierdzono udział receptorów mPR α i mPR β w hamowaniu proliferacji i inwazyjności komórek nowotworowych. Ponadto, analiza ekspresji mRNA i białka mPR γ wykazała, że wyższy poziom tego receptora wiąże się z większymi szansami na wyzdrowienie (SINREIH i wsp. 2018). Różnice te mogą być konsekwencją odmiennego działania P4 w poszczególnych tkankach układu rozrodczego (KIM i wsp. 2013).



Ryc. 7. Schemat genomowego (1) i pozagenomowego (2-5) działania progesteronu w komórce.

(1) działanie przez klasyczne jądrowe receptory P4 (PGR), (2) wpływ na jądrowe cytoplazmatyczne receptory P4 zlokalizowane w pobliżu błony komórkowej, (3) zmiana płynności błony komórkowej, (4) wiązanie P4 z receptorem PGRMC1 lub kompleksem PGRMC1/SERBP1, (5) aktywacja błonowych receptorów P4 (mPR). MAPK – kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny, PKC – kinaza białkowa C, cAMP – cykliczny adenosinomonofosforan, Ca²⁺ – wewnątrzkomórkowe jony wapnia, PKG – kinaza białkowa G, Src/Ras/MAPK – szlak kinaz tyrozynowo-serynowych.

Podsumowując, P4 może oddziaływać na komórki docelowe zarówno na drodze genomowej, jak i niegenomowej (Ryc. 7). Mechanizm genomowy doprowadza do ekspresji genów docelowych i syntezy nowych białek, natomiast mechanizm pozagenomowy oddziałuje na różne ścieżki transdukcji sygnału, wpływając na białka już istniejące. Obie drogi działania steroidu równolegle biorą udział w regulacji procesów komórkowych. Możliwe jest zatem, że P4 docierając do komórki, aktywuje równocześnie syntezę nowych białek oraz powoduje szereg zmian na poziomie błony komórkowej. Może to mieć znaczenie w przygotowaniu odpowiednich warunków do działania nowopowstałego białka (STEFANO 2003). Integracja dwóch mechanizmów działania P4 prowadzi do prawidłowej regulacji odpowiedzi komórki, tkanki, a w konsekwencji całego organizmu (PELUSO i PRU 2014).

3. Budowa i funkcje łożyska

3.1. Formowanie i budowa łożyska z uwzględnieniem łożyska krowy

Łożysko (*placenta*) jest tymczasowym narządem łączącym układy krwionośne płodu i matki. Umożliwia ono prawidłowy przebieg ciąży i rozwój płodu. W łożysku wyróżnia się część płodową (*pars fetalis*) oraz część matczyną (*pars materna*). Pierwszą z nich stanowi kosmówka, która powstaje z trofoblastu oraz mezodermy pozazarodkowej, natomiast drugą – błona śluzowa macicy (BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA 2001).

Formowanie łożyska, określane jako placentacja, rozpoczyna się w momencie implantacji blastocysty w błonie śluzowej macicy. Blastocystę tworzy jama wypełniona płynem (blastocel), która otoczona jest przez powierzchniową warstwę komórek (trofoblast). Na jednym z biegunów blastocelu grupa komórek zarodkowych tworzy węzeł zarodkowy (embrioblast) (KOVAR i wsp. 1985). W pierwszym etapie zetknięcia blastocysty ze śluzówką macicy prowadzi do intensywnych podziałów trofoblastu. Namnożone komórki różnicują się na zewnętrzny syncytiotrofoblast oraz wewnętrzny cytotrofoblast. W fazie inwazji zarodka syncytiotrofoblast wytwarza enzymy proteolityczne, umożliwiające wniknięcie zarodka do głębiej leżących warstw endometrium (JURA i KLAG 2005). Po implantacji blastocysty rozpoczyna się gastrulacja, w wyniku której powstają trzy listki zarodkowe: wewnętrzna endoderma, zewnętrzna ektoderma oraz wnikająca pomiędzy nimi mezoderma. Następnie, w okresie zarodkowym, dochodzi do rozwoju narządów (organogeneza) oraz błon płodowych. U ssaków wyróżnia się następujące błony płodowe: pęcherzyk żółtkowy (*saccus vitellinus*), owodnię (*amnion*), omocznę (*allantois*) oraz kosmówkę (*chorion*), biorącą udział w budowie łożyska. Kosmówka powstaje w wyniku namnażania się komórek trofoblastu i pozazarodkowej mezodermy ściennej. Otacza ona płód od zewnątrz i łączy się z błoną

śluzową macicy, tworząc płodową część łożyska. Funkcjonalne połączenie kosmówki i endometrium możliwe jest dzięki kosmkom znajdującym się na domacicznej powierzchni kosmówki. Początkowo kosmki rozłożone są równomiernie, jednak w trakcie rozwoju łożyska powierzchnia kosmówki różnicuje się na część gładką, pozbawioną kosmków (*chorion laeve*) oraz część szorstką, pokrytą kosmkami (*chorion frondosum*). Funkcją kosmków jest resorpcja substancji odżywczych z krwiobiegu matki oraz przekazywanie ich do zarodka, a także wymiana gazowa (KOVAR i wsp. 1985; BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA 2001; JURA i KLAG 2005). Rozmieszczenie kosmków oraz ich stopień penetracji błony śluzowej macicy jest charakterystyczny w zależności od gatunku zwierząt. Biorąc pod uwagę rozmieszczenie kosmków na kosmówce, łożyska dzielimy na:

- **łożysko rozproszone** (*placenta diffusa, disseminanta*) – charakteryzuje się równomiernym rozmieszczeniem kosmków na całej powierzchni kosmówki, występuje u kłaczy i świni,
- **łożysko wielokrotne lub liścieniowate** (*placenta cotyledonaria*) - kosmki są zgrupowane w przestrzeniach zwanych liścieniami lub kotyledonami, którym ze strony macicy odpowiadają uwypuklenia endometrium macicy (brodawki maciczne), występuje u przeżuwaczy,
- **łożysko pierścieniowe lub poprzęgowe** (*placenta zonaria*) - posiada kosmki rozmieszczone na kosmówce w postaci pasa ułożonego wokół osi worka płodowego, ten typ łożyska występuje u zwierząt mięsożernych,
- **łożysko tarczowe** (*placenta discoidea*) - kosmki skupione są na jednej przestrzeni w kształcie koła, występuje ono u człowieka i królika (KOVAR i wsp. 1985).

W zależności od stopnia penetracji kosmków do błony śluzowej macicy wyróżnia się następujące rodzaje łożysk:

- **nabłonkowokosmówkowe** (*placenta epitheliochorialis*) – kosmki wnikają do krypt, które są utworzone przez nieuszkodzoną błonę śluzową macicy, rodzaj ten występuje u kłaczy i świni,
- **łącznokosmówkowe** (*placenta syndesmochorialis*) – kosmki przenikają przez nabłonek endometrium, osiągając tkankę łączną, przez co oddzielenie błon płodowych od śluzówki macicy podczas porodu jest trudniejsze niż w przypadku łożyska nabłonkowokosmówkowego, występuje u przeżuwaczy,

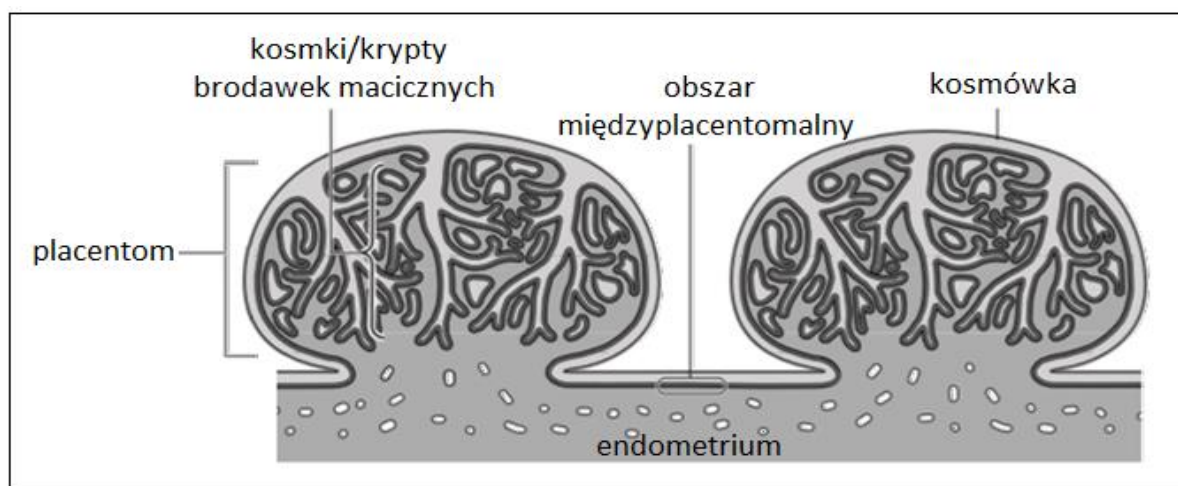
- **śródbłonkowokosmówkowe** (*placenta endotheliochorialis*) – kosmki przenikają przez nabłonek i tkankę łączną endometrium, wnikają do naczyń krwionośnych, nie perforując przy tym ich ścian, rodzaj ten występuje u zwierząt mięsożernych,
- **krwiokosmówkowe** (*placenta haemochorialis*) – kosmki kosmówki wnikają do światła naczyń krwionośnych endometrium, występuje ono u człowieka, gryzoni i niektórych gatunków małp (KOVAR i wsp. 1985; BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA 2001).

Łożyska nabłonkowokosmówkowe i łącznokosmówkowe należą do **łożysk rzekomych** (*semiplacenta*), nazywanych inaczej nieinwazyjnymi. W przypadku tych łożysk kosmki wchodzi w ścisły kontakt z błoną śluzową macicy, lecz jej nie przenikają. Łożyska śródbłonkowokosmówkowe i krwiokosmówkowe są natomiast **łożyskami prawdziwymi** lub inwazyjnymi (*placenta vera*), gdyż kosmki penetrują błonę śluzową macicy w różnym stopniu. U zwierząt posiadających łożyska rzekome błona śluzowa macicy podczas porodu nie zostaje uszkodzona, natomiast u zwierząt z łożyskiem prawdziwym część błony śluzowej oddziela się wraz z błonami płodowymi (KOVAR i wsp. 1985).

Łożysko krów jest nieinwazyjne i liścieniowate. Nazwa ta pochodzi od rozwijających się na powierzchni kosmówki liścieniom (kotyledonom), posiadającym rozgałęzione kosmki wnikające w krypty brodawek macicznych (*caruncula*), znajdujących się na obszarze błony śluzowej macicy. W obrębie brodawek macicznych tkanka łączna jest zgrubiała i tworzy zbitą warstwę pod nabłonkiem macicy. Warstwa ta charakteryzuje się występowaniem licznych włosowatych naczyń krwionośnych i brakiem ujść gruczołów macicznych, które znajdują się jedynie w obszarze międzybrodawkowym (BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA 2001). Miejsca połączeń kotyledonów z kryptami brodawek macicznych określa się jako placentomy lub łożyszczka. W macicy ciężarnej krowy liczba brodawek macicznych waha się od 70 do 100. Tworzą one placentomy o wymiarach około 10-12 cm długości i 3-4 cm szerokości. Wzdłuż rogu macicy placentomy ułożone są zazwyczaj w czterech rzędach. Całkowita powierzchnia styku pomiędzy błoną śluzową macicy a kosmówką, czyli rozgałęzionej struktury wszystkich dojrzałych łożyszcz ciężarnej macicy, wynosi około 130 m² (SCHLAFFER 2002). Pomiędzy placentomami, gdzie kosmówka płasko przylega do endometrium, występują obszary międzypacentomalne (MORDAK 2011). Schemat budowy połączenia maczyno-płodowego przedstawiono na Ryc. 8. Kosmówka krowy zbudowana jest z dwóch blaszek. Na początku ciąży występuje jedynie blaszka zewnętrzna (*lamina externa*), natomiast później tworzy się również blaszka wewnętrzna (*lamina interna*), całkowicie wykształcona około 5 miesiąca

ciąży. Jedynie zewnętrzna blaszka kosmówki przylega do błony śluzowej macicy (JAINUDEEN i HAFEZ 1980).

Przez większość ciąży u krów łożysko ma charakter nabłonkowo-kosmówkowy, gdyż trofoblast styka się bezpośrednio z nabłonkiem macicy. Wśród komórek trofoblastu wyróżnia się komórki jednojądrzaste (mononuklearne), które posiadają głównie funkcje fagocytarne oraz komórki dwujądrzaste (binuklearne), odpowiadające za produkcję hormonów (P4, E2, laktogen, prostaglandyny i inne). Komórki binuklearne, stanowiące około 20% wszystkich komórek trofoblastu, mają również zdolność migracji z zewnętrznej warstwy kosmówki w kierunku błony śluzowej macicy. Dzięki migracji tych komórek oraz ich fuzji z komórkami nabłonka macicy, powstają hybrydowe trójnuklearne komórki (*syncytium*). Złożone są one z binuklearnej komórki płodu i mononuklearnej komórki endometrium matki. W wyniku tych zmian histologicznych dochodzi do spłaszczania lub zanikania komórek endometrialnych, dzięki czemu łożysko nabłonkowokosmówkowe stopniowo przekształca się w łożysko łącznokosmówkowe (WOODING 1992; HOFFMAN i WOODING 1993).



Ryc. 8. Schemat budowy połączenia maczyno-płodowego w obrębie łożyska krowy (zmodyfikowane wg Davies i wsp. 2000).

3.2. Funkcje łożyska

Łożysko podczas trwania ciąży pełni wiele funkcji, umożliwiających prawidłowy wzrost i rozwój płodu. Do najważniejszych funkcji łożyska zalicza się dostarczanie substancji odżywczych oraz usuwanie produktów przemiany materii, wymiana gazowa między matką a płodem, a także wytwarzanie hormonów niezbędnych dla właściwego rozwoju ciąży.

Łożysko zapewnia dostarczanie substancji odżywczych, koniecznych dla właściwego rozwoju płodu, takich jak: aminokwasy, białka, węglowodany, kwasy tłuszczowe, glicerol, sole mineralne oraz witaminy. Ponadto, łożysko jest odpowiedzialne za usuwanie szkodliwych produktów metabolizmu płodu: kwasu moczowego, mocznika, bilirubiny, czy

dwutlenku węgla. Transport substancji przez łożysko odbywa się na drodze dyfuzji prostej, dyfuzji ułatwionej (wspomaganej), transportu pęcherzykowego (endocytozy, egzocytozy, fagocytozy) oraz transportu aktywnego (JURA i KLAG 2005). Łožysko odpowiada również za wymianę gazową pomiędzy matką a płodem. W okresie płodowym płuca płodu są zapadnięte, słabo ukrwione i wypełnione wodą owodni, dlatego też łożysko pełni rolę narządu oddechowego (BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA 2001). Ponadto, łożysko stanowi barierę immunologiczną pomiędzy matką a płodem, dzięki czemu przeciwko zarodkowi nie zostaje skierowana odpowiedź immunologiczna matki. Łožysko w trakcie ciąży pełni też rolę gruczołu dokrewnego i selektywnej bariery zabezpieczającej rozwijający się płód przed dostawianiem się nadmiernych ilości hormonów (zwłaszcza glikokortykoidów) z organizmu matki. Wytwarza zarówno hormony steroidowe, peptydowe i glikoproteinowe, jak również cytokiny i cząsteczki sygnałowe (HEAP 1994; BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA 2001; JURA i KLAG 2005). Wydzielane są one głównie do krwi matki, dzięki czemu prowadzą do regulacji określonych procesów fizjologicznych, koniecznych do prawidłowego przebiegu ciąży i porodu (JURA i KLAG 2005).

3.3. Łožysko jako gruczoł dokrewny

Początkowo źródłem P4 u wszystkich ssaków jest CL, które u niektórych gatunków pozostaje jedynym istotnym źródłem tego hormonu przez cały okres ciąży z niewielkim udziałem łożyska (koza, świnia), lub nawet jego brakiem (pies). W przypadku takich gatunków jak owca czy koń, łożysko przejmuje produkcję P4 po charakterystycznym dla danego gatunku okresie ciąży (MEYER 1994; MITCHELL i TAGGART 2009). U krów przez cały przebieg ciąży łożysko przyczynia się tylko w niewielkim stopniu do matczynego poziomu P4, który przeważnie jest pochodzenia lutealnego (ESTERGREEN i wsp. 1967; DAY 1977; JOHNSON i wsp. 1981). Stężenie P4 w tkance łożyska znacznie wzrasta w piątym i szóstym miesiącu ciąży, osiągając maksymalne wartości w liścieniach około 50 ng/g mokrej tkanki w ósmym i dziewiątym miesiącu (SCHULER i wsp. 1999).

Ważnymi dla przebiegu ciąży hormonami steroidowymi produkowanymi przez łożysko są również estrogeny. Ilość tych hormonów w trakcie ciąży stopniowo wzrasta, a najwyższy poziom we krwi osiągają przed porodem (za wyjątkiem psa, gdzie w okresie okołoporodowym ilość estrogenów spada). Do estrogenów wytwarzanych przez łożysko zalicza się: estron (E1), estradiol (E2) oraz estriol (E3). Pierwsze dwa syntetyzowane są z siarczanu dehydroandrosteronu, pochodzącego z krwi matki i płodu. Siarczan ten jest hydrolizowany i przekształcany w androstendion, a ten następnie aromatyzowany w E1. Część powstałego E1 jest redukowana do E2. Estriol natomiast jest syntetyzowany

z siarczanu hydroksydehydroandrosteronu, który powstaje w wątrobie płodu z wyprodukowanego w nadnerczach płodu siarczanu dehydroandrosteronu (BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA 2001). Estrogeny występują głównie w postaci skoniugowanej z grupą siarczanową, która usuwana jest dzięki sulfatazie – łożyskowemu enzymowi hydrolizującemu (JANOWSKI i ZDUŃCZYK 1995; MORDAK 2011). Synteza poszczególnych estrogenów różni się w zależności od gatunku. U krowy do krwi matki przechodzi głównie E1 oraz E2 (ELEY i wsp. 1979; HOFFMANN i wsp. 1997). Estrogeny łożyskowe u tego gatunku odgrywają głównie rolę w trakcie porodu poprzez wzrost pobudliwości mięśniówki macicy oraz biorą udział w rozwoju gruczołu mlekowego, przygotowując go do laktacji (SAWYER i wsp. 1986; SCHAMS i wsp. 2003). Poziom tych hormonów zaczyna jednak znacznie wzrastać już między 120 a 150 dniem ciąży (HOFFMANN i wsp. 1997). Poza tym, estrogeny biorą udział w różnicowaniu komórek trofoblastu oraz regulują wzrost łożyska poprzez stymulację proliferacji nabłonka brodawek macicznych (PEPE i ALBRECHT 1999; SCHULER i wsp. 2000). Wpływają również na ekspresję kluczowych czynników wzrostu niezbędnych w procesie łożyskowej angiogenezy (ALBRECHT i PEPE 2010).

Łożysko jako gruczoł dokrewny, jest zdolne również do produkcji prostaglandyn (AROSH i wsp. 2004). Hormony te należą do grupy eikozanoidów i są pochodnymi wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie kwasu arachidonowego (AA) (GOFF 2004; SIROIS i wsp. 2004). Kwas arachidonowy występuje w formie zestryfikowanej z fosfolipidami błonowymi (GOFF 2004). W pierwszym etapie biosyntezy PGs dochodzi do uwolnienia AA z fosfolipidów błonowych, dzięki zależnej od jonów Ca^{2+} cytozolowej fosfolipazie A2 (cPLA2) (CLARK i wsp. 1991, 1995; GOFF 2004). Następnie, wolny AA jest przekształcany do PGG2 w reakcji katalizowanej przez cyklooksygenazę (COX), która występuje w dwóch izoformach: COX-1 i COX-2. Obie izoformy wykazują u bydła aktywność zarówno w obrębie placentomów, jak i obszarów międzypacentomalnych (AROSH i wsp. 2004). W kolejnym etapie, PGG2 ulega redukcji do PGH2, która w zależności od aktywnych w komórce enzymów, ulega przemianom do określonego typu eikozanoidu: prostaglandyny, prostacykliny lub tromboksanu (MADORE i wsp. 2003; GOFF 2004). Prostaglandyny, podobnie jak hormony steroidowe, biorą udział w procesach zaangażowanych w przebieg ciąży i porodu (AROSH i wsp. 2004). Ich oddziaływanie na komórki docelowe odbywa się poprzez receptory związane z białkiem G oraz receptory jądrowe (GOFF 2004; SIROIS i wsp. 2004). Prostaglandyna $\text{F}_{2\alpha}$ bierze udział w przygotowaniu błony śluzowej macicy do implantacji blastocysty oraz jako czynnik luteolityczny wpływa na regresję ciążowego CL (MCCRACKEN i wsp. 1999; KRZYMOWSKI

i PRZAŁA 2005). Luteoliza inicjowana przez $\text{PGF2}\alpha$ u krów odbywa się przed porodem, natomiast u ludzi - we wczesnej ciąży (STOCCO i wsp. 2007). Ponadto, $\text{PGF2}\alpha$ bierze udział w pobudzaniu kurczliwości miometrium przed porodem (AROSH i wsp. 2004). Prostaglandyna E2 , w przeciwieństwie do $\text{PGF2}\alpha$, jest czynnikiem luteotropowym, wspierającym funkcjonowanie CL (PRATT i wsp. 1977; MAGNESS i wsp. 1981). Prostaglandyna ta zwiększa również przepływ krwi przez ciążarną macicę (KRZYMOWSKI i PRZAŁA 2005). Obie prostaglandyny pełnią ważną rolę w separacji błon płodowych podczas porodu (GROSS i WILLIMAS 1988; LEIDL 1980).

3.4. Receptory progesteronu w łożysku

Łożysko stanowi zarówno miejsce syntezy, jak i działania P4 , co wskazuje na obecność receptorów P4 w obrębie tego narządu. Ekspresję jądrowych receptorów P4 na poziomie mRNA i białka wykazano dotychczas w łożysku człowieka, owcy i krowy (PERROT-APLANAT i wsp. 1994; SPENCER i BAZER 1995; SCHULER i wsp. 1999; BAIRAGI i wsp. 2018; BUNMA i wsp. 2020). Badania PERROT-APLANAT i wsp. (1994) wskazują, że PGR u człowieka wykazuje ekspresję na stałym poziomie przez całą ciążę w komórkach zrębu i ścian tętnic spiralnych endometrium. Ponadto, wykazano obecność tych receptorów w ludzkich błonach płodowych oraz doczesnej (GOLDMAN i SHALEV 2007). W łożysku krowy ekspresję PGR zlokalizowano jedynie w komórkach zrębu i naczyń krwionośnych endometrium (SCHULER i wsp. 1999; BOOS i wsp. 2006). Ekspresję błonowych receptorów P4 wykazano natomiast w łożysku człowieka (KARTERIS i wsp. 2006; FERNANDES i wsp. 2005, ZACHARIADES i wsp. 2012) i owcy (REYNOLDS i wsp. 2015; BUNMA i wsp. 2020). W łożysku krowy wykazano ekspresję mRNA i białka dla PGRMC1 i PGRMC2. Receptory te zlokalizowano zarówno w komórkach nabłonka, zrębu i śródbłonka naczyń krwionośnych endometrium oraz w kosmówce (BEYER i wsp. 2017).

Dotychczas nie są znane czynniki, które mogą mieć wpływ na ekspresję jądrowych i błonowych receptorów P4 w łożysku. Liczne badania wskazują na wpływ steroidów na ekspresję tych receptorów w układzie rozrodczym samicy (SPENCER i BAZER 1995; KARTERIS i wsp. 2006; GELLERSEN i wsp. 2009). Sugeruje się również, że za regulację ekspresji receptorów P4 mogą odpowiadać uwalniane w trakcie ciąży cytokiny i czynniki wzrostu, które biorą udział w regulacji maczynego układu immunologicznego, implantacji zarodka oraz pobudzaniu wzrostu i różnicowania łożyska (POLLARD 1990; ROBERTSON i wsp. 1994; SZEREDAY i wsp. 1997). Biorąc pod uwagę kluczową rolę P4 w zapoczątkowaniu i przebiegu ciąży, poznanie mechanizmów działania P4 w łożysku oraz czynników regulujących te procesy ma istotne znaczenie.

CELE I ZADANIA BADAWCZE PRACY

Biorąc pod uwagę dotychczasową wiedzę na temat szerokiego zakresu działania P4 w okresie ciąży, istotnym wydaje się określenie ekspresji i lokalizacji błonowych receptorów P4 oraz zdefiniowanie czynników zaangażowanych w ich regulację w łożysku krowy w czasie ciąży.

Hipoteza badawcza

Progesteron uczestniczy w regulacji funkcji łożyska krowy na drodze pozagenomowej poprzez aktywację receptorów błonowych P4, których ekspresja jest regulowana przez hormony steroidowe, cytokiny i czynniki wzrostu produkowane lokalnie w macicy i łożysku.

Cel pracy

Celem badań jest określenie czynników regulujących ekspresję błonowych receptorów P4 w łożysku oraz zdefiniowanie odpowiedzi komórek łożyska zależnie od ich genomowego lub pozagenomowego pobudzenia przez P4.

Cele szczegółowe

1. Określenie poziomu ekspresji mRNA oraz immunolokalizacji białek błonowych receptorów P4 w łożysku krowy w drugim trymestrze ciąży.
2. Określenie czynników biorących udział w regulacji ekspresji błonowych receptorów P4 w łożysku krowy w drugim trymestrze ciąży:
 - A. Zbadanie wpływu hormonów steroidowych (P4, E2 oraz P4 podanego łącznie z E2) na ekspresję błonowych receptorów P4 w skrawkach placentomów łożyska krowy.
 - B. Określenie udziału wybranych cytokin: czynnika martwicy nowotworu (TNF) α , interleukiny (IL) 1, IL6, IL8, interferonu (INF) γ oraz czynnika hamującego białaczkę (LIF) w regulacji ekspresji błonowych receptorów P4 w skrawkach placentomów łożyska krowy.
 - C. Określenie udziału wybranych czynników wzrostu: czynnika wzrostu naskórka (EGF), czynnika wzrostu fibroblastów (FGF7), insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF1), czynnika wzrostu śródbłónki naczyniowej (VEGF) oraz transformującego czynnika wzrostu (TGF) β w regulacji ekspresji błonowych receptorów P4 w skrawkach placentomów łożyska krowy.

3. Zdefiniowanie odpowiedzi komórek łożyska na P4 zależnie od ich genomowego lub pozagenomowego pobudzenia:
 - A. Określenie wpływu inhibitora transkrypcji (aktynomycyna D; ActD), antagonisty PGR (mifepriston; RU486), inhibitora PGRMC1 (AG205), koniugatu P4-BSA na ekspresję błonowych receptorów P4 w skrawkach placentomów łożyska krowy.
 - B. Określenie wpływu P4 podanego z ActD, RU486, AG205 oraz koniugatem P4-BSA na ekspresję błonowych receptorów P4 w skrawkach placentomów łożyska krowy.

MATERIAŁ I METODY

1. Materiał badawczy

Materiałem do badań były macice uzyskane od ciężarnych krów ($n=5$) w drugim trymestrze ciąży (4-6 miesiąc). Wybór drugiego trymestru ciąży do badań związany jest ze stopniem rozwoju łożyska w tym okresie. Łožysko w drugim trymestrze ma ukształtowany charakter nabłonkowo-kosmówkowy, placentomy są już ukształtowane, a produkcja P4 odbywa się głównie przez CL. Pobrane bezpośrednio po uboju macice transportowano w ciągu godziny w roztworze 0,9% NaCl w łaźni lodowej (temperatura około 4°C) do laboratorium Zakładu Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie. Miesiąc ciąży określono na podstawie cech morfologicznych łożyska i płodu oraz korzystając ze wzoru Kellera: $x(x+2)=\text{długość płodu}$, gdzie niewiadomą x jest czas trwania ciąży (SALISBURY i VANDEMARK 1961; JAINUDEEN i HAFEZ 1980).

2. Preparacja skrawków placentomów, endometrium i kosmówki gładkiej

Skrawki placentomów z zachowaniem połączeń maczyno-płodowych wyizolowano według modelu badawczego opracowanego w Zakładzie Fizjologii i Toksykologii Rozrodu IRZiBŻ PAN, umożliwiającego badanie funkcji łożyska *in vitro* (WOJCIECHOWSKA i wsp. 2015). Model ten, jako jednostka strukturalna łożyska, oddaje status fizjologiczny tego narządu, dlatego skrawki placentomów wykorzystano we wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach. Placentomy pozyskane z ciężarnej macicy krowy podzielono na skrawki o grubości 1-2 mm, a następnie pocięto na skrawki o masie 60-80 mg.

Skrawki endometrium i kosmówki gładkiej ciężarnej macicy krowy pozyskano z obszarów międzyplacentalnych i posłużyły one jedynie do określenia poziomu ekspresji genów błonowych receptorów P4. Kosmówkę gładką mechanicznie oddzielono od endometrium, a następnie wykorzystaną w badaniach blaszkę zewnętrzną kosmówki odseparowano od blaszki wewnętrznej. Endometrium oddzielono od miometrium i pocięto na skrawki o masie 60-80 mg, natomiast fragmenty kosmówki gładkiej podzielono na skrawki wielkości 1x1 cm.

3. Warunki inkubacji skrawków łożyska

Pozyskane pojedyncze skrawki placentomów, kosmówki gładkiej i endometrium inkubowano w medium M199 bez dodatku czerwieni fenylowej z dodatkiem 2% płodowej surowicy bydlęcej (FCS; ang. *fetal calf serum*), 10% płynu owodniowego (AF; ang. *amniotic fluid*) oraz antybiotyków: gentamycyny (20 $\mu\text{g/ml}$) oraz amfoterycyny (5 $\mu\text{g/ml}$),

w warunkach: temperatura 37,5°C, atmosfera mieszaniny powietrza i 5% CO₂ według procedury opracowanej przez WOJCIECHOWSKA i wsp. 2015.

4. Opis przebiegu doświadczeń

Doświadczenie 1. Określenie poziomu ekspresji błonowych receptorów progesteronu w łożysku krowy: placentomach, endometrium i kosmówce gładkiej.

Skrawki placentomów, endometrium i kosmówki gładkiej po 24 godzinnej inkubacji w medium hodowlanym zebrano, zamrożono i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu określenia poziomu ekspresji błonowych receptorów P4 metodą Real-Time PCR.

Doświadczenie 2. Określenie immunolokalizacji błonowych receptorów progesteronu w łożysku krowy.

Placentomy, bezpośrednio po izolacji, podzielono na skrawki o grubości około 1 cm, a następnie utrwalono poprzez umieszczenie w 4% roztworze paraformaldehydu (PFA). Tak przygotowane skrawki pozostawiono do dalszych etapów związanych z barwieniem immunohistochemicznym (IHC).

Doświadczenie 3. Określenie udziału hormonów steroidowych w regulacji ekspresji błonowych receptorów progesteronu w skrawkach placentomów łożyska krowy.

Skrawki placentomów poddano dwugodzinnej preinkubacji w medium hodowlanym, a następnie inkubowano przez 6 i 24 godziny z:

- a) medium kontrolnym;
- b) P4 (dawki: 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ M),
- c) E2 (dawki: 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰ M),
- d) P4 podanym łącznie z E2 (P4/E2; dawki: 10⁻⁵/10⁻⁸, 10⁻⁶/10⁻⁹, 10⁻⁷/10⁻¹⁰ M),
- e) AA (10⁻⁵ M) jako kontrolą pozytywną.

Doświadczenie 4. Określenie udziału cytokin i czynników wzrostu w regulacji ekspresji błonowych receptorów progesteronu w skrawkach placentomów łożyska krowy.

Skrawki placentomów poddano dwugodzinnej preinkubacji, a następnie inkubowano przez 6 i 24 godziny z:

- a) medium kontrolnym,
- b) cytokinami: TNFα (dawki: 10, 100 ng/ml), IL1 (dawki: 1, 10 ng/ml), IL6 (dawki: 1, 10 ng/ml), IL8 (dawki: 1, 10 ng/ml), INFγ (dawki: 10, 100 ng/ml), LIF (dawki: 10, 100 ng/ml),
- c) czynnikami wzrostu: EGF (dawki: 1, 10 ng/ml), FGF7 (dawki: 1, 10 ng/ml), IGF1 (dawki: 10, 100 ng/ml), VEGF (dawki: 5, 50 ng/ml) i TGFβ (dawki: 5, 20 ng/ml).

Doświadczenie 5. Zdefiniowanie odpowiedzi komórek łożyska na progesteron zależnie od ich genomowego lub pozagenomowego pobudzenia.

Skrawki placentomów, po dwugodzinnej preinkubacji w medium hodowlanym, inkubowano przez 6 i 24 godziny z:

- a) medium kontrolnym,
- b) P4 (dawka: 10^{-5} M),
- c) ActD (dawka: 250 ng/ml),
- d) RU486 (dawka: 10^{-5} M),
- e) AG205 (dawka: 2×10^{-5} M),
- f) koniugatem P4-BSA (dawki: 10, 100 ng/ml),
- g) oraz P4 łącznie z każdym wymienionym czynnikiem.

Po zakończeniu inkubacji medium hodowlane zebrano do probówek, dodano stabilizator PG (10 μ l 0,3 M EDTA w 1% kwasie acetylosalicylowym) i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu oznaczenia stężenia hormonów. Natomiast skrawki umieszczono w temperaturze -80°C i pozostawiono do dalszych analiz.

Wszystkie doświadczenia wykonano w pięciu powtórzeniach, poza analizą IHC, którą wykonano w trzech powtórzeniach. Każda ciężarna macica krowy stanowiła oddzielny eksperyment w obrębie którego czynniki podawano w trzech powtórzeniach.

5. Metody analityczne

5.1. Ocena żywotności skrawków

Wpływ użytych podczas inkubacji czynników na żywotność skrawków placentomów zbadano testem kolorymetrycznym z użyciem czynnika AlamarBlue (Thermo Fisher Scientific, USA). Test ten pozwala na ocenę aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej w odniesieniu do kontroli. Substratem jest resazuryna o niebieskiej barwie, która w procesach oksydoredukcyjnych przekształcana jest w różową resorufinę. Żywe komórki aktywnie konwertują resazurynę w resorufinę, której pomiar może być przeprowadzony spektrofotometrycznie lub fluorymetrycznie. Intensywność zmierzonej fluorescencji jest proporcjonalna do liczby żywych komórek (KWACK i LYNCH 1999; O'BRIEN i wsp. 2000).

Skrawki placentomów poddano dwugodzinnej preinkubacji w 2 ml medium M199 z 2% FCS, 10% AF oraz antybiotykami, a następnie inkubowano przez 24 godziny z badanymi czynnikami, podanymi w najwyższych stężeniach. Następnie zmieniono medium, dodano 200 μ l odczynnika AlamarBlue i próby inkubowano przez kolejne 6 godzin. W doświadczeniu jako próbę ślepą wykorzystano medium hodowlane bez skrawka

z odczynnikiem AlamarBlue, a jako kontrolę negatywną zastosowano staurosporynę (1 µg/ml). Po okresie inkubacji, 200 µl medium hodowlanego przeniesiono na płytkę 96-dołkową i zmierzono absorbancję przy długości fal 570/600 nm za pomocą czytnika Multiscan EX Labsystem (Finland).

5.2. Oznaczenie stężenia hormonów w medium pohodowlanym

Aktywność wydzielniczą skrawków placentomów podczas inkubacji z czynnikami doświadczalnymi sprawdzono poprzez pomiar stężenia steroidów (P4, E2) oraz prostaglandyn (PGE2 i PGF2α) w medium. Głównym wskaźnikiem reaktywności inkubowanych tkanek powinien być wzrost sekrecji PGF2α po inkubacji z AA, który stanowi podstawowy substrat w syntezie prostaglandyn. Ponadto, badania FRANCAK i KOTWICA (2008) wykazały, że P4 stymuluje wydzielanie E2 z ciężarnej macicy świni, dlatego oznaczenie stężenia E2 może być kolejnym wskaźnikiem aktywności wydzielniczej inkubowanych skrawków placentomów.

Koncentrację P4, E2, PGE2 i PGF2α oznaczono za pomocą analiz enzymatyczno-immunologicznych (EIA). W zależności od oznaczanego hormonu zastosowano następujące przeciwciała pierwszorzędowe:

- P4 - przeciwciała anti-P4 (otrzymane od prof. S. Okrasa, UWM, Olsztyn) w rozcieńczeniu 1:50 000 oraz P4 znakowane peroksydazą chrzanową (P4-HRP) w rozcieńczeniu 1:70 000,
- E2 - przeciwciała anti-E2 (otrzymane od prof. G. L. Williams, A&M Texas University, College Station, USA) w rozcieńczeniu 1:90 000 oraz E2-HRP w rozcieńczeniu 1:90 000,
- PGE2 - przeciwciała anti-PGE2 (otrzymana od prof. W. W. Thatcher, University of Floryda, Gainesville, USA) w rozcieńczeniu 1:50 000 i PGE2-HRP (1:40 000),
- PGF2α - wykorzystano pomiar skorelowanego PGFM (13,14-dihydro-15-keto-PGF2α, metabolit PGF2α), dlatego oba terminy w pracy są używane zamiennie, użyto przeciwciał anti-PGFM (otrzymane od prof. W. J. Silvia, University of Kentucky, USA) w rozcieńczeniu 1:50 000 oraz PGFM-HRP (1:70 000).

Wszystkie przeciwciała rozcieńczono w buforze EIA (Na₂HPO₄, NaCl, woda dejonizowana, pH 7,2 z 0,1% BSA i 0,5% stabilizatorem prostaglandyn przy oznaczeniu PGs). Do oznaczeń wykorzystano 96-dołkową polistyrelową płytkę pokrytą drugorzędowymi przeciwciałami - owczymi, przeciw γ-globulinie króliczej.

W pierwszym etapie analizy na 96-dołkową płytkę dodano, w dwóch powtórzeniach, odpowiednią ilość standardów i badanych prób (30 µl w przypadku P4 i PGFM, 50 µl PGE2

i 100 µl E2). Następnie dodano po 100 µl przeciwciał pierwszorzędowych (oprócz próby ślepej) oraz 100 µl przeciwciał znakowanych peroksydazą chrzanową. Tak przygotowaną płytkę inkubowano przez 18-24 godziny w 4°C, w zaciemnionym miejscu. W kolejnym etapie usunięto cały roztwór z płytki i czterokrotnie płukano roztworem Tween 80. Następnie dodano 150 µl buforu A+B (bufor A: Urea Hydrogen Peroxide, jednowodny kwas cytrynowy, Na₂HPO₄, pH 5; bufor B: tetramethylbenzydyna, 4% dimetylosulfotlenek, jednowodny kwas cytrynowy, pH 2,4) i płytkę zabezpieczoną przed dostępem światła, inkubowano w temperaturze 36°C przez 45 minut z mieszaniem. Następnie dodano 50 µl 2M H₂SO₄. Wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 450 nm z wykorzystaniem czytnika Multiscan EX Labsystem (Helsinki, Finland). Parametry pomiaru stężeń badanych hormonów przedstawiono w Tabeli 1. W zależności od doświadczenia przeprowadzono oznaczenia stężenia następujących hormonów:

- **Doświadczenie 3** - P4, E2, PGE2, PGFM;
- **Doświadczenie 4** – P4, PGFM;
- **Doświadczenie 5** – P4, E2, PGE2, PGFM.

Tabela 1. Parametry pomiaru stężeń badanych hormonów.

Oznaczany hormon	Zasięg krzywej standardowej (ng/ml)	Współczynnik zmienności wewnątrzseryjnej (%)	Współczynnik zmienności międzyseryjnej (%)
P4	0,1-25,00	7,13	10,86
E2	0,00625-1,60	9,22	10,26
PGE2	0,078-20,00	8,05	8,32
PGFM	0,0625-16,00	8,03	9,14

5.3. Pomiar ekspresji badanych genów z wykorzystaniem techniki Real-Time PCR

5.3.1. Izolacja RNA

Izolację RNA przeprowadzono przy użyciu zestawu Total RNA (A&A Biotechnology, Polska) opartego na zmodyfikowanej metodzie CHOMCZYŃSKIEGO i SACCHI (1987). Izolację poprzedzono homogenizacją skrawków kosmówki, endometrium i placentomów. W tym celu skrawki zamrożono w ciekłym azocie (-196°C), a następnie rozdrobniono za pomocą homogenizatora Retsch MM 200 (Germany). Otrzymany homogenat rozpuszczono w 800 µl fenozolu. W kolejnym etapie do prób dodano 200 µl chloroformu i próby delikatnie mieszano poprzez kilkukrotne odwracanie probówki. Następnie próby pozostawiono na 3 minuty w temperaturze pokojowej, po czym wirowano przez 10 minut z prędkością 12 000 obr./min.

Górną frakcję (około 450 μ l) przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf i dodano 250 μ l izopropanolu. Całość dokładnie wymieszano, naniesiono na minikolumnę do izolacji RNA, a następnie wirowano przez minutę (prędkość 12 000 obr./min). Po zakończonym wirowaniu kolumnę do izolacji RNA przeniesiono do nowej probówki i dodano 700 μ l roztworu płuczającego, po czym ponownie wirowano w tych samych warunkach. Płukanie roztworem i wirowanie powtórzono dwukrotnie, po czym kolumnę przeniesiono do nowej probówki i dodano 200 μ l roztworu płuczającego. Próby wirowano 2 minuty z prędkością 12 000 obr./min, po czym kolumny umieszczono w nowych, jałowych, wolnych od RNA-z probówkach. Na złożę krzemionkowe na dnie kolumny naniesiono 100 μ l jałowej wody wolnej od RNA-z. Całość pozostawiono na 3 minuty w temperaturze pokojowej, po czym wirowano minutę z prędkością 12 000 obr./min. Wyizolowane RNA przechowywano w temperaturze -80°C do czasu przeprowadzenia dalszych analiz.

5.3.2. Odwrotna transkrypcja

Jakość i ilość wyizolowanego RNA oznaczono za pomocą spektrofotometru Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA) przy długości fal 260/280 nm z wykorzystaniem programu Nanodrop 1000. Stosunek absorbancji 260/280 nm wszystkich badanych prób mieścił się pomiędzy 1,8 a 2,0, co oznacza czystość wyizolowanego RNA na odpowiednim poziomie. Na podstawie oznaczonej ilości RNA, próby rozcieńczono jałową, wolną od RNA-z wodą do koncentracji 1 μ g/ μ l i przeniesiono do probówek typu PCR. Proces odwrotnej transkrypcji przeprowadzono przy użyciu zestawu komercyjnego – ‘RT-PCR by Thermo Maxima cDNA Synthesis Kit’. W pierwszym etapie do prób dodano 1 μ l DNAzy i 1 μ l buforu reakcyjnego dla DNAzy i inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 1 μ l Stop Solution, po czym przeprowadzono denaturację prób w termocyklerze (Eppendorf Mastercycler Nexus gradient, Hamburg) przez 10 minut w temperaturze 70°C. W ostatnim etapie do prób dodano 4 μ l 5xReaction Mix, 2 μ l Maxima Enzyme Mix oraz 3 μ l jałowej, wolnej od RNA-z wody i umieszczono w termocyklerze w następujących warunkach:

- 25°C/10 minut - wydłużanie starterów,
- 50°C/20 minut - synteza cDNA,
- 85°C/5 minut - terminacja reakcji.

Zsyntetyzowane cDNA przechowywano w temperaturze -20°C do czasu przeprowadzenia dalszych analiz.

5.3.3. Real-Time PCR

Jakość i czystość otrzymanego cDNA oznaczono za pomocą spektrofotometru Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA) przy długości fal 260/280 nm. Na podstawie pomiarów próby rozcieńczono jałową, wolną od nukleaz wodą do koncentracji 200 ng/μl. Reakcję Real-Time PCR przeprowadzono przy użyciu aparatu ABI7900 (Applied Biosystems, USA). Mieszanina reakcyjna (10 μl) zawierała: cDNA (3 μl), SYBR Green PCR Master Mix (5 μl) oraz startery: sensowny (1 μl, 200 pM) i antysensowny (1 μl, 200 pM). Sekwencje zastosowanych starterów przedstawiono w Tabeli 2. Reakcja Real-Time PCR obejmowała następujące etapy:

- 95°C/10 minut – denaturacja wstępna,
- 95°C/10 sekund – denaturacja,
- 60°C/45 sekund; 58°C/45 sekund dla PGRMC2 (40 cykli) – przyłączanie starterów i wydłużanie komplementarnej nici.

Tabela 2. Sekwencje starterów oraz długości produktów amplifikacji dla genów zastosowanych w reakcji Real-Time PCR.

Nazwa genu	Startery Sensowny (S)/antysensowny (A)	Długość amplikonu (bp)	Numer genu w GeneBanku
PGRMC1	S: TCTTCAGGGGTGTGTGTGAA A: CATTGTCCTGTGCTCTTTGG	265	NM_001075133
PGRMC2	S: TGCCTCTTTGCCTCGTATGA A: GAGGCATCCCTACCAGCAAAT	179	NM_001099060
mPRα	S: CCGGCGGTCCATCTATGA A: CCACCCCCTTCACTGAGTCTT	159	NM_001038553
mPRβ	S: TGCCCCTGCTCGTCTATGTC A: CCCACGTAGTCCACGAAGTAGAA	120	NM_001101135
mPRγ	S: GGTTCCTTCTCGTGGAGGTTTGT A: GTTCCTGGACATGGAGCTGAA	151	XM_005193580
GAPDH	S: CCTGCCCCGTTTCGACAGATA A: GGCGACGATGTCCACTTTG	150	NM_001034034.2
C2orf29	S: TCAGTGGACCAAAGCCACCTA A: CTCCACACCGGTGCTGTTCT	169	XM_002691150.1
SUZ	S: CATCCAAAAGGTGCTAGGATAGATG A: TGGGCCTGCACACAAGAATG	157	XM_582605.5
TBP	S: CAGAGAGCTCCGGGATCGT A: CACCATCTTCCCAGAACTGAATAT	194	NM_001075742.1
β-aktyna	S: CGGCATCGAGGACAGGAT A: CATCGTACTCCTGCTTGCTGAT	169	NM_173979.3

W badaniach jako genu referencyjnego użyto GAPDH (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego) wybranego na podstawie analizy stabilności ekspresji genów referencyjnych w łożysku krowy w czasie ciąży (Ryc. 9). Do badań użyto pięciu genów referencyjnych, często stosowanych w badaniach łożyska krowy: GAPDH, C2orf29 (ang. *human chromosome 2 open reading frame 29*), SUZ (ang. *suppressor of zeste 12 homolog*), TBP (ang. *TATA-binding protein*) oraz β -aktyny przy użyciu programu RefFinder (XIE i wsp. 2012). Jest to internetowe narzędzie do oceny stabilności ekspresji genów referencyjnych w danej tkance lub warunkach doświadczalnych. Narzędzie to integruje cztery główne algorytmy obliczeniowe (Genorm, Normfinder, BestKeeper oraz deltaCT) generując ranking genów referencyjnych na podstawie ich współczynnika stabilności ekspresji (M). Geny wykazujące najmniejszy współczynnik M wykazują największą stabilność. W łożysku taką stabilność wykazywały geny: GAPDH (M=1,19), następnie SUZ (1,86), TBP (2,28), β -aktyna (4,0) i C2orf29 (5,0) (Ryc. 9).



Ryc. 9. Zbiórny ranking stabilności 5 genów referencyjnych: GAPDH, SUZ, TBP, β -aktyna i C2orf29, stosowanych w badaniach ekspresji genów w łożysku krowy, wyliczony z użyciem narzędzia internetowego RefFinder.

Tabela przedstawia uszeregowanie genów na podstawie współczynników stabilności ekspresji genów (M) wyliczonych za pomocą algorytmu DeltaCT, BestKeeper, Normfinder, Genorm i RefFinder (wartość zbiorcza). Wykres kompleksowy przedstawia zbiórny ranking stabilności genów w łożysku krowy.

5.4. Barwienie immunohistochemiczne

5.4.1. Przygotowanie skrawków histologicznych

Utrwalone w 4% roztworze paraformaldehydu fragmenty placentomów płukano pod bieżącą wodą, a następnie odwodniono przy użyciu szeregu alkoholu etylowego: 50%, 70%, 80%, 90%, 100%. Odwodnione próby prześwietlono w ksylenie i zatopiono w parafinie. Bloczki krojono przy użyciu mikrotomu na 4-6 μm skrawki i umieszczono na mikroskopowych szkiełkach podstawowych (Superfrost plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Niemcy).

5.4.2. Odparafinowanie i uwodnienie tkanek

W celu odparafinowania preparatów szkiełka ze skrawkami umieszczono w cieplarni na 40 minut w temperaturze 56-60°C. Następnie skrawki płukano w ksylenie (2 razy po 10 minut) usuwając w ten sposób pozostałości parafiny. W kolejnym etapie preparaty uwodniono poprzez przeprowadzenie ich przez szereg alkoholu etylowego o malejących stężeniach: 100%, 96% oraz 70%. Skrawki inkubowano w alkoholach w podanej kolejności na czas 5 minut. Następnie, w celu ostatecznego uwodnienia tkanek, preparaty umieszczono w wodzie destylowanej na 5 minut.

5.4.3. Odslanianie determinant antygenowych

Utrwalanie i zatapianie tkanki może prowadzić do zmian w cząsteczkach antygenów, co wpływa na intensywność zachodzącej w kolejnych etapach reakcji immunohistochemicznej. W celu odsłonięcia determinant antygenowych skrawki gotowano w 0,01 M cytrynianie sodowym z dodatkiem 0,05% Tween-20 (pH 6,0) 3 razy po 5 minut. Po zakończonym gotowaniu preparaty schłodzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej, a następnie płukano 3 razy po 10 minut w buforze TBS (sól fizjologiczna buforowana TRIS, pH 7,4).

5.4.4. Blokowanie aktywności endogennych peroksydaz

Aktywność endogennych peroksydaz zablokowano przy użyciu roztworu blokującego Bloxall (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; 15 minut, temperatura pokojowa). Roztwór ten wykazuje działanie blokujące względem endogennej peroksydazy oraz fosfatazy alkalicznej. Po zakończonym blokowaniu preparaty płukano 3 razy po 5 minut w TBS.

5.4.5. Blokowanie miejsc niespecyficznie wiążących antygeny i inkubacja z pierwszorzędowymi przeciwciałami

W celu uniknięcia niespecyficznych wiązań przeciwciał pierwszorzędowych z prezentowanymi w tkance antygenami, preparaty inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej z 2,5% surowicą końską (NHS; ang. *normal horse serum*)

w buforze blokującym zawierającym 0,1 M PBS, 0,1% BSA oraz 0,05% thimerosal. Następnie na skrawki nałożono specyficzne przeciwciała pierwszorzędowe (Tabela 3) i inkubowano przez całą noc w temperaturze 4°C. W przypadku kontroli negatywnej pierwszorzędowe przeciwciała zastąpiono 2,5% surowicą końską.

Tabela 3. Rodzaje przeciwciał pierwszorzędowych stosowanych dla poszczególnych białek w barwieniu immunohistochemicznym.

Białko	Zastosowane przeciwciała pierwszorzędowe
PGRMC1	Rabbit Polyclonal anti-PGRMC1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) rozcieńczenie 1:500
PGRMC2	Mouse Polyclonal anti-PGRMC2 (Abcam, Cambridge, UK) rozcieńczenie 1:250
mPRα	Rabbit Polyclonal anti-PAQR7 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) rozcieńczenie 1:200
mPRβ	Rabbit Polyclonal anti-PAQR8 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) rozcieńczenie 1:200
mPRγ	Rabbit Polyclonal anti-PAQR5 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) rozcieńczenie 1:5

5.4.6. Immunohistochemiczne barwienie tkanek

Następnie skrawki płukano w TBS 3 razy po 10 minut. W przypadku białek: PGRMC1, mPR α , mPR β i mPR γ , dla których zastosowano królicze przeciwciała pierwszorzędowe, tkanki inkubowano przez 30 minut w temperaturze 4°C z ImmPRESS HRP Reagent (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), zawierającym przeciwciała drugorzędowe. W przypadku białka PGRMC2, dla którego wykorzystano mysie przeciwciała pierwszorzędowe, zastosowano metodę ABC (awidyna-biotyna-peroksydaza). W tym celu, skrawki inkubowano z biotynylowanymi końskimi anty-mysimi IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), rozcieńczonymi 1:400 w buforze blokującym z 2,5% NHS przez 30 minut w temperaturze 4°C. Następnie skrawki inkubowano 30 minut w temperaturze 4°C z kompleksem awidyna-biotyna-peroksydaza (zestaw ABC; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Skrawki po inkubacji z ImmPRESS HRP Reagent, jak i z kompleksem ABC, płukano 3 razy po 10 minut w TBS. Reakcję immunohistochemiczną wizualizowano za pomocą 3,3'-diaminobenzyny (DAB; DakoCytomation) jako chromogenu dającego brązową reakcję barwną. Po 5 minutowej inkubacji z DAB skrawki płukano 3 razy po 5 minut w TBS, a następnie podbarwiano przez 2 minuty hematoksyliną (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, USA) w celu wizualizacji jąder komórkowych (barwa niebieska). Następnie skrawki płukano pod bieżącą wodą przez 20 minut.

5.4.7. Odwodnienie tkanek i zamykanie preparatów

Po przeprowadzeniu barwnych reakcji z chromogenami preparaty odwodniono w szeregu alkoholu etylowego o wzrastających stężeniach: 70%, 96% oraz 100%. Skrawki umieszczono w alkoholach w podanej kolejności na czas 2 minut. Następnie preparaty zamknięto w medium o niskiej gęstości (DPX; POCh, Gliwice, Polska) i obserwowano za pomocą mikroskopu Zeiss Axio Imager Z1 (Zeiss, Oberkochen, Niemcy). Zdjęcia były analizowane przez dwóch niezależnych obserwatorów.

6. Opracowanie wyników i ich analiza statystyczna

Otrzymane wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm$ błąd standardowy średniej (SEM). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

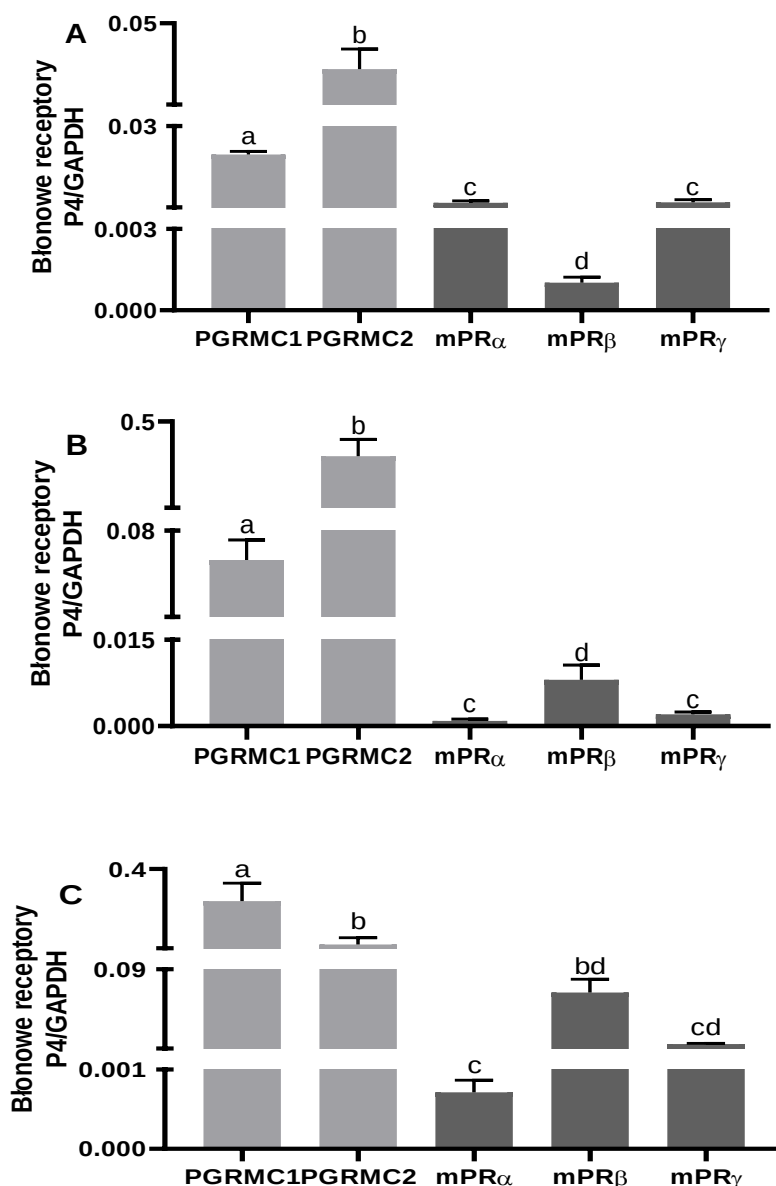
Ze względu na znaczne różnice pomiędzy kolejnymi doświadczeniami, wyniki dotyczące stężenia hormonów w medium przeliczono na wartości procentowe w stosunku do kontroli, którą przyjęto za 100%. Różnice między wpływem czynników doświadczalnych względem kontroli wykazano, stosując jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA z użyciem testu post-hoc Duncana. W taki sam sposób analizowano wyniki dotyczące przeżywalności komórek w skrawkach łożyska, otrzymane za pomocą testu AlamarBlue. Różnice uznano za statystycznie istotne przy $p < 0,05$. Wyniki w tej postaci przedstawiono na wykresach.

Dane pochodzące z analizy Real-Time PCR przeliczono przy użyciu programu PCR algorytm Miner (ZHAO i FERNALD 2005), a następnie znormalizowano względem zawartości mRNA genu referencyjnego (GAPDH). Wyniki dotyczące podstawowej ekspresji błonowych receptorów P4 porównano stosując jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA z użyciem testu post-hoc Tukeya. Różnice w ekspresji receptorów pod wpływem czynników doświadczalnych względem kontroli wykazano natomiast przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z użyciem testu post-hoc Duncana. Różnice wyników uznano za statystycznie istotne przy $p < 0,05$.

WYNIKI

1. Określenie poziomu ekspresji błonowych receptorów progesteronu w łożysku krowy: endometrium, kosmówce gładkiej i placentomach

Uzyskane wyniki potwierdziły ekspresję wszystkich badanych genów błonowych receptorów P4 w łożysku krowy, zarówno w endometrium, kosmówce, jak i placentomach w drugim trymestrze ciąży (Ryc. 10A-C).



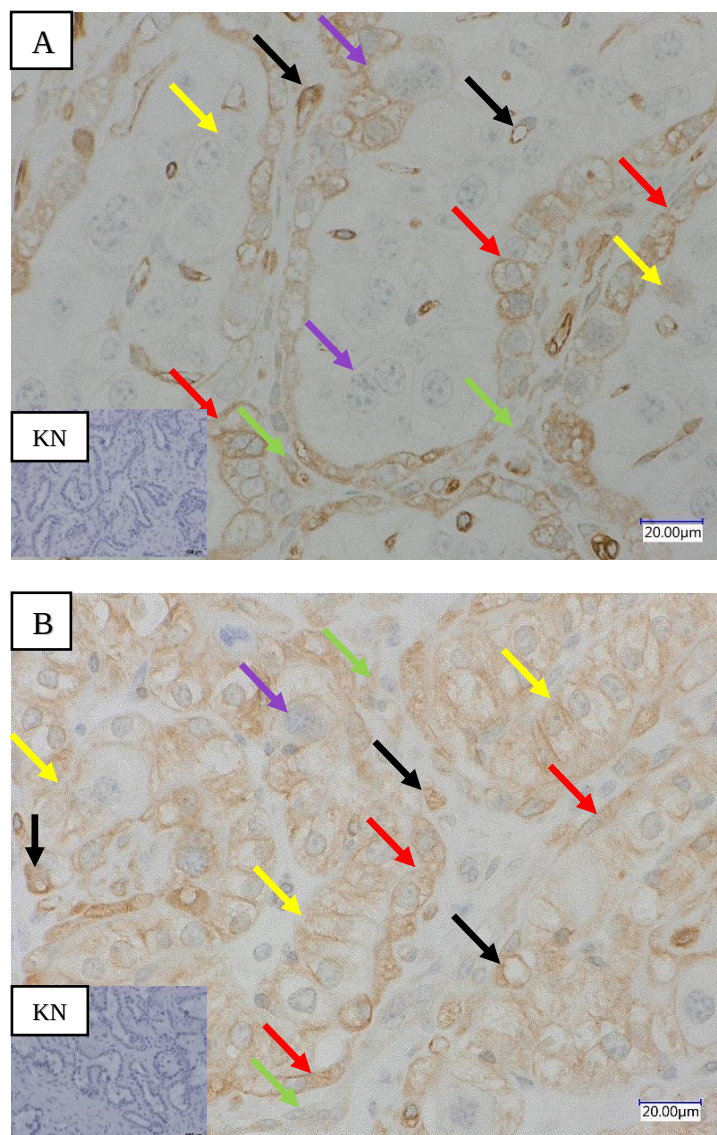
Ryc. 10. Ekspresja błonowych receptorów P4 wykazana metodą Real-Time PCR w skrawkach endometrium (A), kosmówki gładkiej (B) i placentomów (C) łożyska krów pochodzących z drugiego trymestru ciąży (n=5). Różne oznaczenia literowe nad słupkami wskazują na istotne różnice ($p < 0,05$).

Ekspresja mRNA błonowych receptorów P4 była zróżnicowana w poszczególnych tkankach. Zaobserwowano wyższą ekspresję mRNA PGRMC1 i PGRMC2, w porównaniu do receptorów mPR we wszystkich badanych tkankach. W rozdzielonych tkankach endometrium i kosmówki obserwowano wyższą ($p<0,05$) ekspresję PGRMC2, zaś w placentomach wykazano wyższą ekspresję mRNA PGRMC1 ($p<0,05$) (Ryc. 10A-C). Ponadto, w endometrium wykazano najwyższą ekspresję mRNA mPR α i mPR γ , natomiast w kosmówce najwyższy poziom ekspresji wykazano dla receptora mPR β (Ryc. 10A, B). W placentomach ekspresja mPR β była najwyższa ($p<0,05$) spośród badanych receptorów mPR (Ryc. 10C).

2. Określenie immunolokalizacji błonowych receptorów progesteronu w skrawkach placentomów krowy

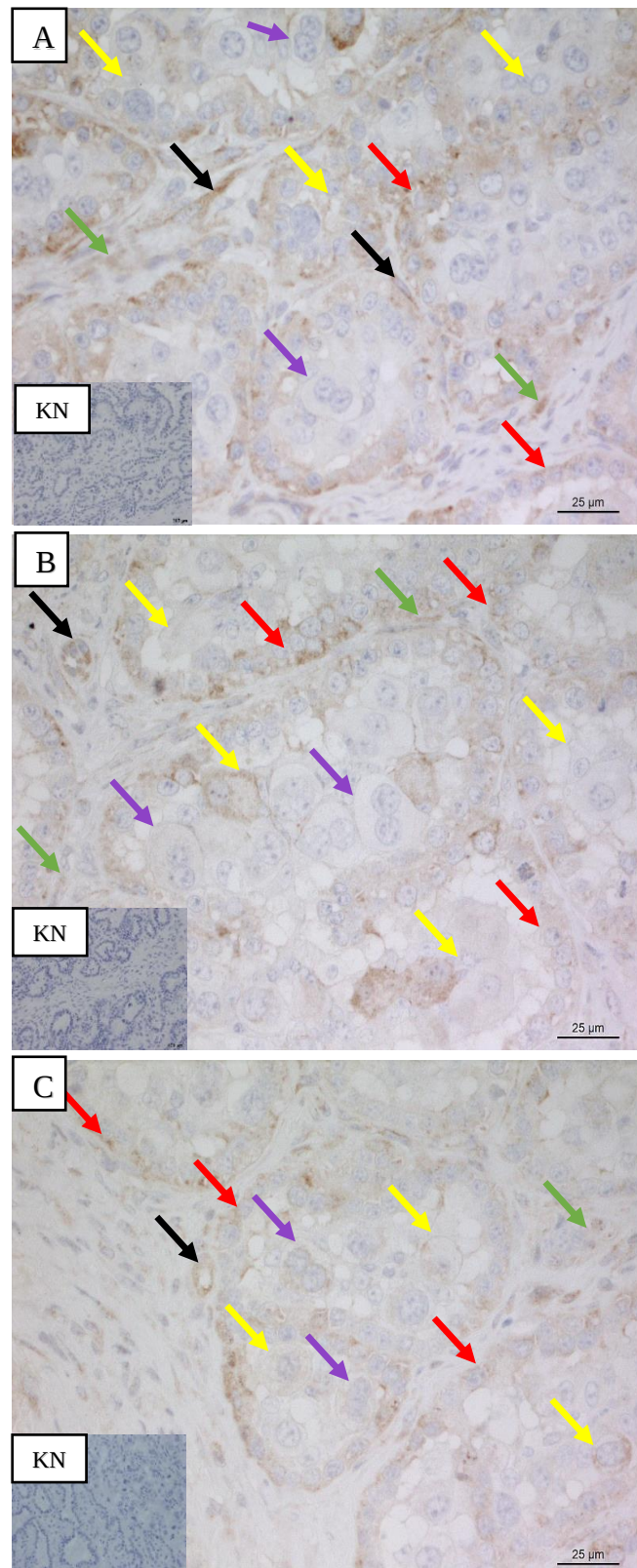
Analiza IHC wykazała obecność wszystkich badanych błonowych receptorów P4 w skrawkach placentomów łożyska krowy w drugim trymestrze ciąży (Ryc. 11, 12). Pozytywne barwienie obserwowano zarówno w cytoplazmie komórek części maczynej, jak i płodowej łożyska. Kontrola negatywna nie wykazała barwienia (Ryc. 11, 12).

Immunolokalizacja białek PGRMC1 wykazała silne zabarwienie w części maczynej, głównie w komórkach nabłonkowych i zrębu oraz w komórkach śródbłónka naczyń krwionośnych. W części płodowej zaobserwowano intensywne barwienie komórek śródbłónka naczyń krwionośnych płodu i słabe wybarwienie komórek nabłonka kosmówki (Ryc. 11A). Natomiast, barwienia białek PGRMC2 było intensywne w komórkach nabłonka endometrium oraz nabłonka kosmówki. Ponadto, silne barwienie stwierdzono w komórkach zrębu części maczynej oraz w komórkach śródbłónka maczynych i płodowych naczyń krwionośnych. Zarówno jedno-, jak i dwujądrzaste komórki trofoblastu wykazywały immunobarwienie (Ryc. 11B).



Ryc. 11. Lokalizacja białek: błonowego receptora progesteronu PGRMC1 (A) oraz PGRMC2 (B) w skrawkach placentomów łożyska krwi pochodzących z drugiego trymestru ciąży. Barwienie kontrolne (KN) przeprowadzono bez użycia przeciwciał pierwszorzędowych (zdjęcie w lewym dolnym rogu). Skala: 20 μ m. czerwone strzałki – komórki nabłonka endometrium, żółte strzałki – komórki nabłonka kosmówki, zielone strzałki – komórki zrębu endometrium, fioletowe strzałki – komórki dwujędrzaste, czarne strzałki – komórki śródbłonka naczyń krwionośnych

Białka mPR α wykazały silną immunoreaktywność w komórkach nabłonka endometrium, komórkach zrębu oraz komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych części macznej i płodowej. Komórki nabłonka kosmówki oraz trofoblastu wykazywały słabe barwienie dla tego receptora (Ryc. 12A). Odwrotny wzór barwienia obserwowano w przypadku białka mPR β , którego silne barwienie wykazano w nabłonku kosmówki płodu, zaś słabe w komórkach nabłonka matki. Ponadto, wykazano barwienie w komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych obu części łożyska (Ryc. 12B). Lokalizację receptora mPR γ wykazano głównie w nabłonku endometrium i kosmówki, a także komórkach zrębu oraz w śródbłonku naczyń krwionośnych (Ryc. 12C).

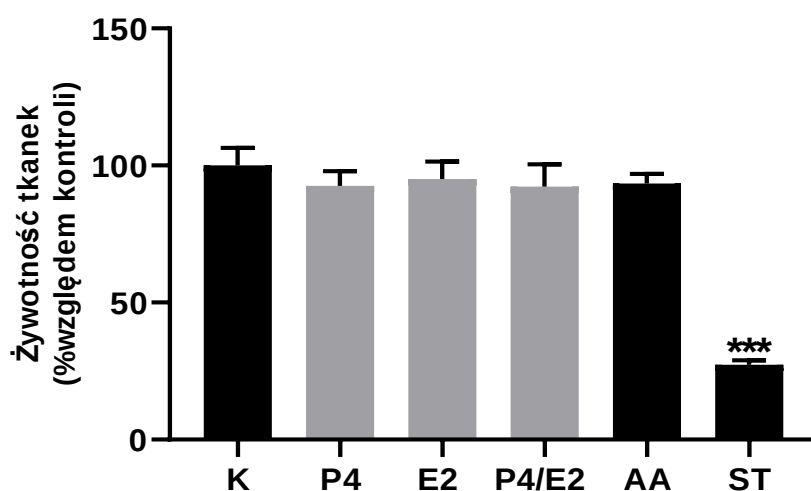


Ryc. 12. Lokalizacja białek: błonowego receptora progesteronu mPR α (A), mPR β (B) oraz mPR γ (C) w skrawkach placentomów łożyska krwi pochodzących z drugiego trymestru ciąży. Barwienie kontrolne (KN) przeprowadzono bez użycia przeciwciał pierwszorzędowych (zdjęcie w dolnym lewym rogu). Skala: 25 μ m. czerwone strzałki – komórki nabłonka endometrium, żółte strzałki – komórki nabłonka kosmówki, zielone strzałki – komórki zrębu endometrium, fioletowe strzałki – komórki dwujędrzaste, czarne strzałki – komórki śródbłonna naczyń krwionośnych

3. Określenie udziału hormonów steroidowych w regulacji ekspresji błonowych receptorów progesteronu w łożysku krowy

3.1. Ocena żywotności skrawków placentomów po inkubacji ze steroidami

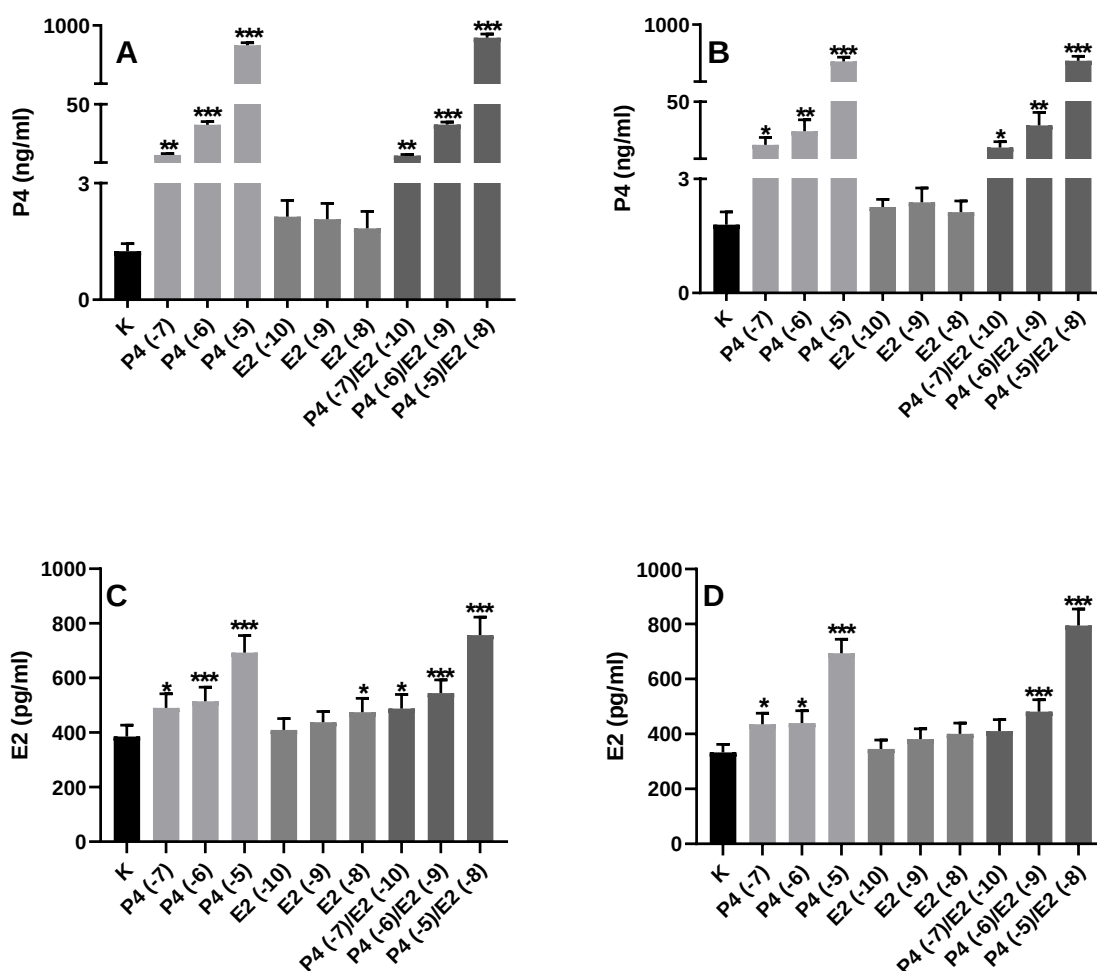
Wykazano, że zastosowane w doświadczeniu steroidy, podane w najwyższych stężeniach, nie wpływały ($p > 0,05$) na żywotność skrawków placentomów. Jedynie staurosporyna jako kontrola negatywna obniżyła ($p < 0,05$) żywotność komórek w tkance łożyska (Ryc. 13).



Ryc. 13. Żywotność skrawków placentomów po 24 godzinach inkubacji z progesteronem (P4; 10^{-5} M), estradiolem (E2; 10^{-8} M), P4 podanym łącznie z E2 (P4/E2; $10^{-5}/10^{-8}$ M), kwasem arachidonowym (AA; 10^{-5} M) oraz staurosporyną (ST; 1 $\mu\text{g/ml}$). Wartości średnie ($\pm$ SEM) przedstawiono w stosunku do wartości w próbie kontrolnej (100%). Istotne różnice statystyczne względem kontroli oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.2. Stężenie hormonów w medium hodowlanym po inkubacji ze steroidami

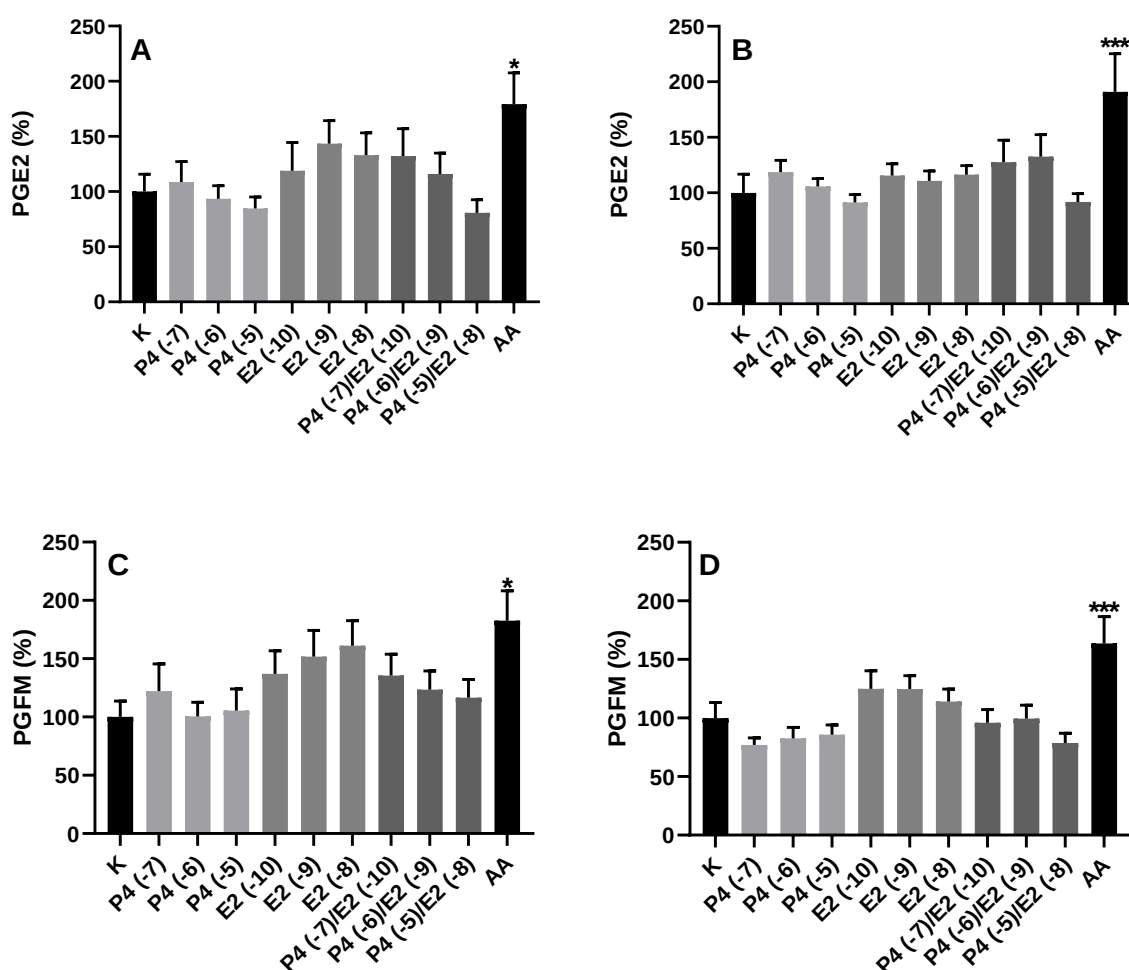
Wykazano wzrost stężenia P4 ($p < 0,05$) po inkubacji z P4 oraz P4 podanym łącznie z E2 we wszystkich użytych dawkach po 6 (Ryc. 14A) i 24 godzinach inkubacji (Ryc. 14B). Nie stwierdzono natomiast wpływu E2 ($p > 0,05$) na wydzielanie P4 przez skrawki łożyska (Ryc. 14A, B). Wykazano, że P4 podany samodzielnie oraz łącznie z E2 we wszystkich zastosowanych dawkach zwiększał ($p < 0,05$) stężenie E2 w medium po 6 godzinach inkubacji (Ryc. 14C). Po 24 godzinnej inkubacji wykazano wzrost stężenia E2 ($p < 0,05$) po podaniu P4 (we wszystkich stężeniach) oraz P4 łącznie z E2 w dawce $10^{-6}/10^{-9}$ M oraz $10^{-5}/10^{-8}$ M (Ryc. 14D).



Ryc. 14. Koncentracja progesteronu (P4) (A, B) i estradiolu (E2) (C, D) w medium hodowlanym po 6 (A, C) i 24 godzinach (B, D) inkubacji skrawków płacentomów z: P4 (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M), E2 (10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M) oraz P4 podanym łącznie z E2 ($10^{-5}/10^{-8}$, $10^{-6}/10^{-9}$, $10^{-7}/10^{-10}$ M). Wartości ($n=5$) średnie ($\pm$ SEM) przedstawiono w stosunku do wartości w próbie kontrolnej. Istotne różnice statystyczne oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.3. Stężenie prostaglandyn w medium hodowlanym po inkubacji ze steroidami

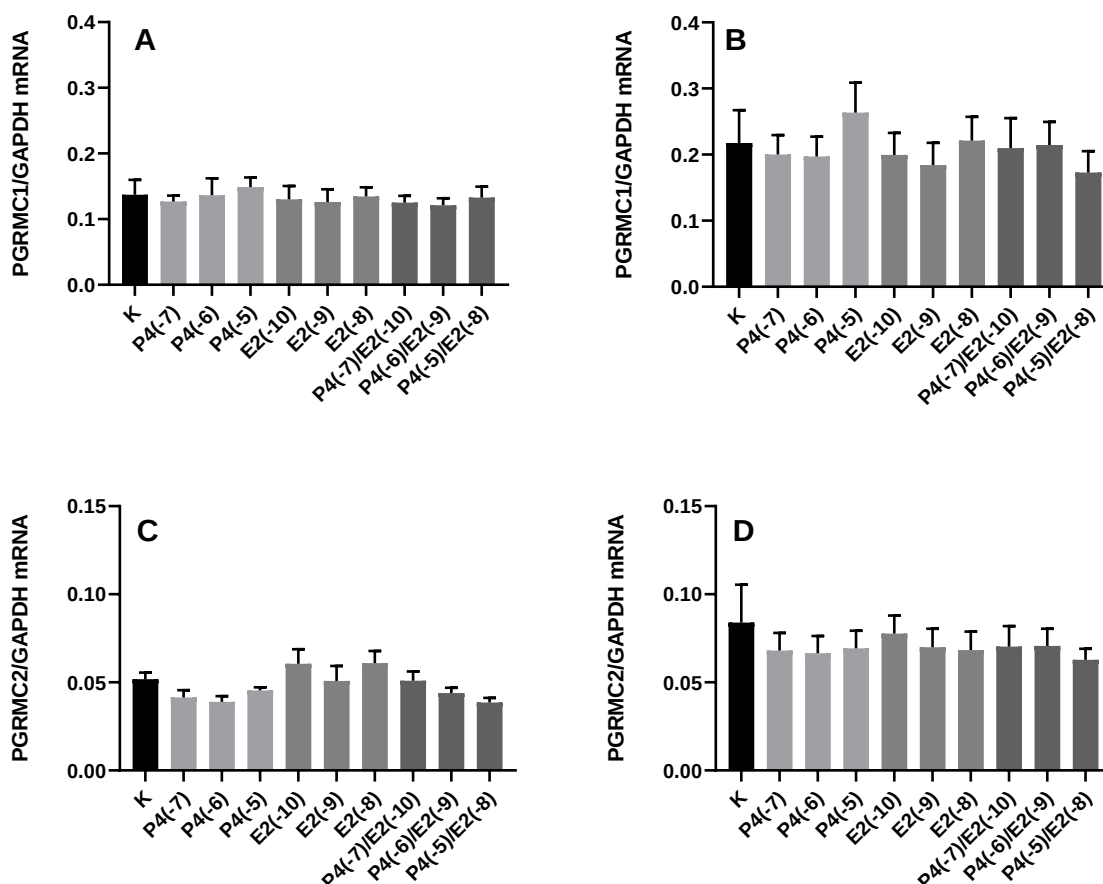
Wykazano, że AA (10^{-5} M), będący prekursorem prostaglandyn, istotnie ($p < 0,05$) stymulował wydzielanie PGE2 i PGF2 α przez skrawki łożyska z drugiego trymestru ciąży po 6 i 24 godzinach inkubacji (Ryc. 15A-D). Wyniki te wskazują na aktywność wydzielniczą inkubowanych skrawków placentomów, co wiąże się z ich przydatnością do dalszych analiz. Nie stwierdzono natomiast wpływu P4 i E2 w zastosowanych dawkach ($p > 0,05$) na stężenie prostaglandyn w medium hodowlanym (Ryc. 15A-D).



Ryc. 15. Koncentracja prostaglandyny (PG) E2 (A, B) i metabolitu PGF2 α (PGFM) (C, D) w medium hodowlanym po 6 (A, C) i 24 godzinach (B, D) inkubacji skrawków placentomów z: progesteronem (P4; 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M), estradiolem (E2; 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M), P4 podanym łącznie z E2 ($10^{-5}/10^{-8}$, $10^{-6}/10^{-9}$, $10^{-7}/10^{-10}$ M) oraz kwasem arachidonowym (AA; 10^{-5} M). Wartości ($n=5$) średnie ($\pm$ SEM) przedstawiono w stosunku do wartości w próbie kontrolnej (100%). Istotne różnice statystyczne oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.4. Ekspresja genów *PGRMC1*, *PGRMC2*, *mPR α* , *mPR β* i *mPR γ* w skrawkach placentomów po inkubacji ze steroidami

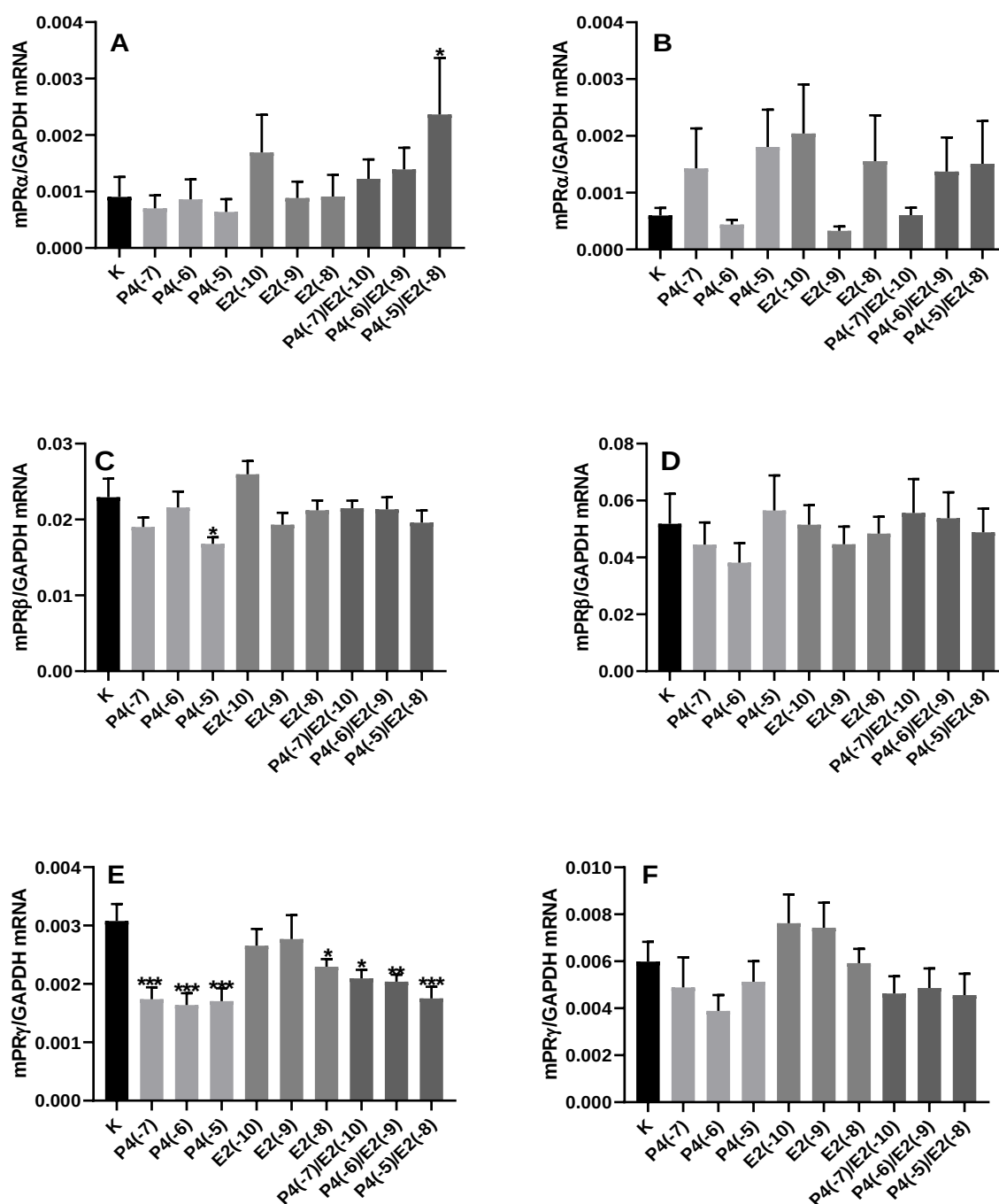
Nie wykazano ($p > 0,05$) wpływu steroidów (P4 i E2) na ekspresję genów *PGRMC1* i *PGRMC2* w skrawkach placentomów po 6 (Ryc. 16A, C) i 24 godzinach (Ryc. 16B, D) inkubacji.



Ryc. 16. Ekspresja genu *PGRMC1* (A, B) oraz *PGRMC2* (C, D) po 6 (A, C) i 24 godzinach (B, D) inkubacji skrawków placentomów z: progesteronem (P4; 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M), estradiolem (E2; 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M) oraz P4 podanym łącznie z E2 ($10^{-5}/10^{-8}$, $10^{-6}/10^{-9}$, $10^{-7}/10^{-10}$ M). Wartości ($n=5$) średnie ($\pm$ SEM) przedstawiono w stosunku do wartości w próbie kontrolnej. Istotne różnice statystyczne oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Analiza ekspresji genów *mPR* w skrawkach placentomów wykazała zróżnicowany wpływ badanych steroidów na poziom ekspresji tych receptorów po 6 godzinach inkubacji. Wykazano, że P4 podany łącznie z E2 ($10^{-5}/10^{-8}$ M) zwiększył ($p < 0,05$) ekspresję *mPR α* po 6 godzinach inkubacji (Ryc. 17A). Ponadto, zaobserwowano obniżoną ekspresję ($p < 0,05$) mRNA *mPR β* pod wpływem P4 w dawce 10^{-5} M po 6 godzinach inkubacji (Ryc. 17C). Ponadto, P4 podany samodzielnie we wszystkich użytych dawkach oraz E2 w dawce 10^{-8} M obniżyły ekspresję genu *mPR γ* (Ryc. 17E). Spadek ekspresji mRNA *mPR γ* obserwowano także po inkubacji skrawków z P4 podanym łącznie z E2 we wszystkich badanych dawkach

(Ryc. 17E). Nie zaobserwowano zmian w poziomie ekspresji badanych receptorów po 24 godzinach inkubacji (Ryc. 17B, D, F).

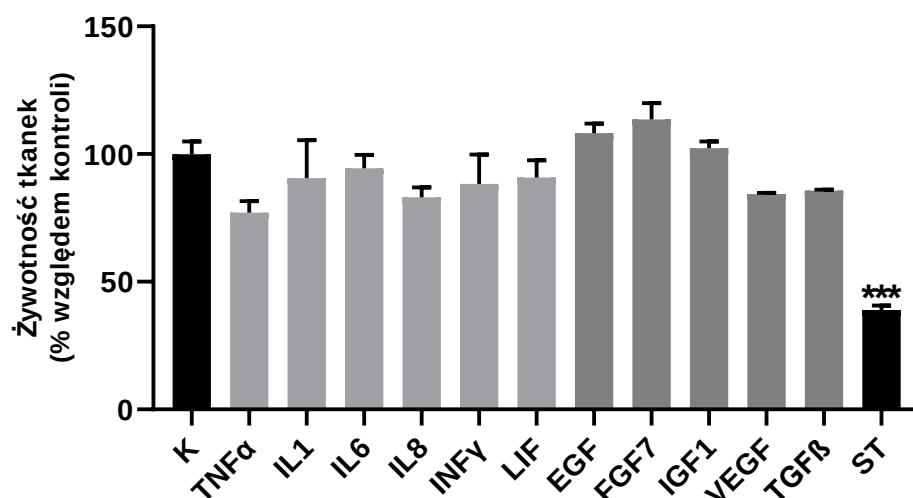


Ryc. 17. Ekspresja genu mPRα (A, B), mPRβ (C, D) oraz mPRγ (E, F) po 6 (A, C, E) i 24 godzinach (B, D, F) inkubacji skrawków placentomów z: progesteronem (P4; 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M), estradiolem (E2; 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M) oraz P4 podanym łącznie z E2 ($10^{-5}/10^{-8}$, $10^{-6}/10^{-9}$, $10^{-7}/10^{-10}$ M). Wartości (n=5) średnie ($\pm$ SEM) przedstawiono w stosunku do wartości w próbce kontrolnej. Istotne różnice statystyczne oznaczono gwiazdkami (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

4. Określenie udziału cytokin i czynników wzrostu w regulacji ekspresji błonowych receptorów progesteronu w łożysku krowy

4.1. Ocena żywotności skrawków placentomów po inkubacji z cytokinami i czynnikami wzrostu.

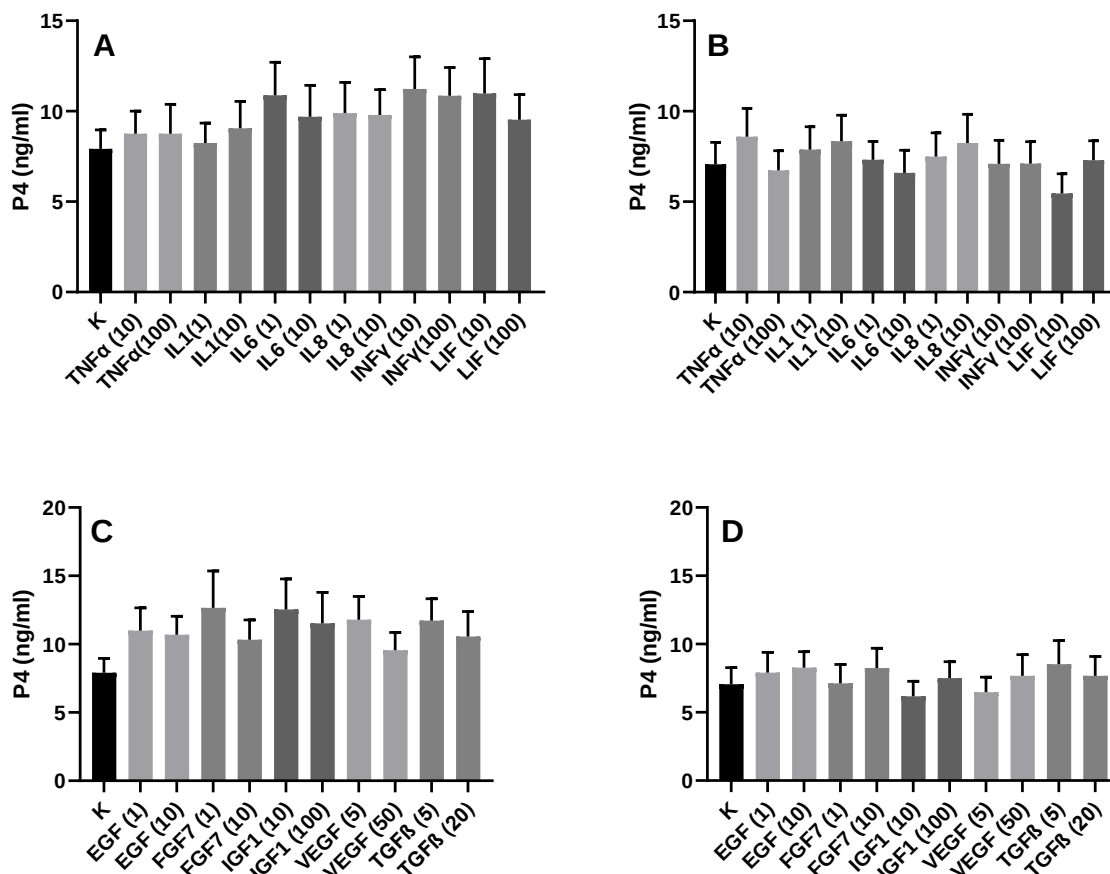
Wykazano, że cytokiny i czynniki wzrostu użyte w doświadczeniu, podane w najwyższych stężeniach, nie wpływały ($p>0,05$) na żywotność inkubowanych skrawków placentomów. Jedynie staurosporyna zastosowana jako kontrola negatywna obniżyła ($p<0,05$) żywotność komórek w skrawkach łożyska (Ryc. 18).



Ryc. 18. Żywotność skrawków placentomów po 24 godzinach inkubacji z cytokinami: czynnikiem martwicy nowotworu (TNFα; 100 ng/ml), interleukiną (IL) 1 (10 ng/ml), IL6 (10 ng/ml), IL8 (10 ng/ml), interferonem γ (INFγ; 100 ng/ml), czynnikiem hamującym białaczkę (LIF; 100 ng/ml) oraz czynnikami wzrostu: czynnikiem wzrostu naskórka (EGF; 10 ng/ml), czynnikiem wzrostu fibroblastów (FGF7; 10 ng/ml), insulinopodobnym czynnikiem wzrostu (IGF1; 100 ng/ml), czynnikiem wzrostu śródbłónki naczyniowej (VEGF; 50 ng/ml), transformującym czynnikiem wzrostu (TGFβ; 20 ng/ml) oraz staurosporyną (ST; 1 μ g/ml). Wartości średnie ($\pm$ SEM) przedstawiono w stosunku do wartości w próbie kontrolnej (100%). Istotne różnice statystyczne względem kontroli oznaczono gwiazdkami (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

4.2. Stężenie progesteronu w medium hodowlanym po inkubacji z cytokinami i czynnikami wzrostu

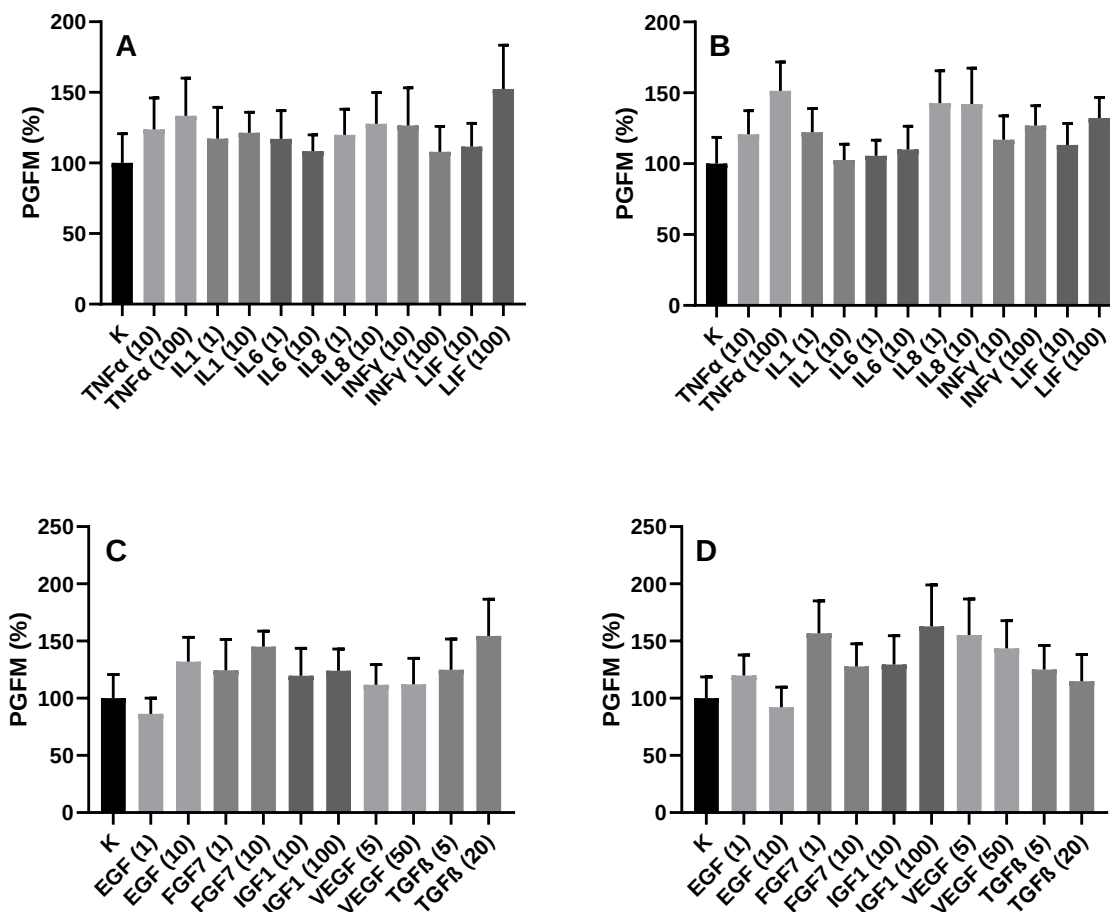
Nie obserwowano wpływu cytokin (TNF α , IL1, IL6, IL8, INF γ , LIF) i czynników wzrostu (EGF, FGF7, IGF1, VEGF, TGF β) ($p>0,05$) na wydzielanie P4 ze skrawków łożyska po 6 (Ryc. 19A, C) i 24 godzinach (Ryc. 19B, D) inkubacji.



Ryc. 19. Koncentracja progesteronu (P4) w medium hodowlanym po 6 (A, C) i 24 godzinach (B, D) inkubacji skrawków placentomów z cytokinami (A, B): czynnikiem martwicy nowotworu (TNF α ; 10, 100 ng/ml), interleukiną (IL) 1 (1, 10 ng/ml), IL6 (1, 10 ng/ml), IL8 (1, 10 ng/ml), interferonem γ (INF γ ; 10, 100 ng/ml), czynnikiem hamującym białaczkę (LIF; 10, 100 ng/ml) oraz czynnikami wzrostu (C, D): czynnikiem wzrostu naskórka (EGF; 1, 10 ng/ml), czynnikiem wzrostu fibroblastów (FGF7; 1, 10 ng/ml), insulinopodobnym czynnikiem wzrostu (IGF1; 10, 100 ng/ml), czynnikiem wzrostu śródbłona naczyniowego (VEGF; 5, 50 ng/ml), transformującym czynnikiem wzrostu (TGF β ; 5, 20 ng/ml). Wartości ($n=5$) średnie ($\pm$ SEM) przedstawiono w stosunku do wartości w próbie kontrolnej. Istotne różnice statystyczne względem kontroli oznaczono gwiazdkami (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

4.3. Stężenie prostaglandyny $F2\alpha$ w medium hodowlanym po inkubacji z cytokinami i czynnikami wzrostu

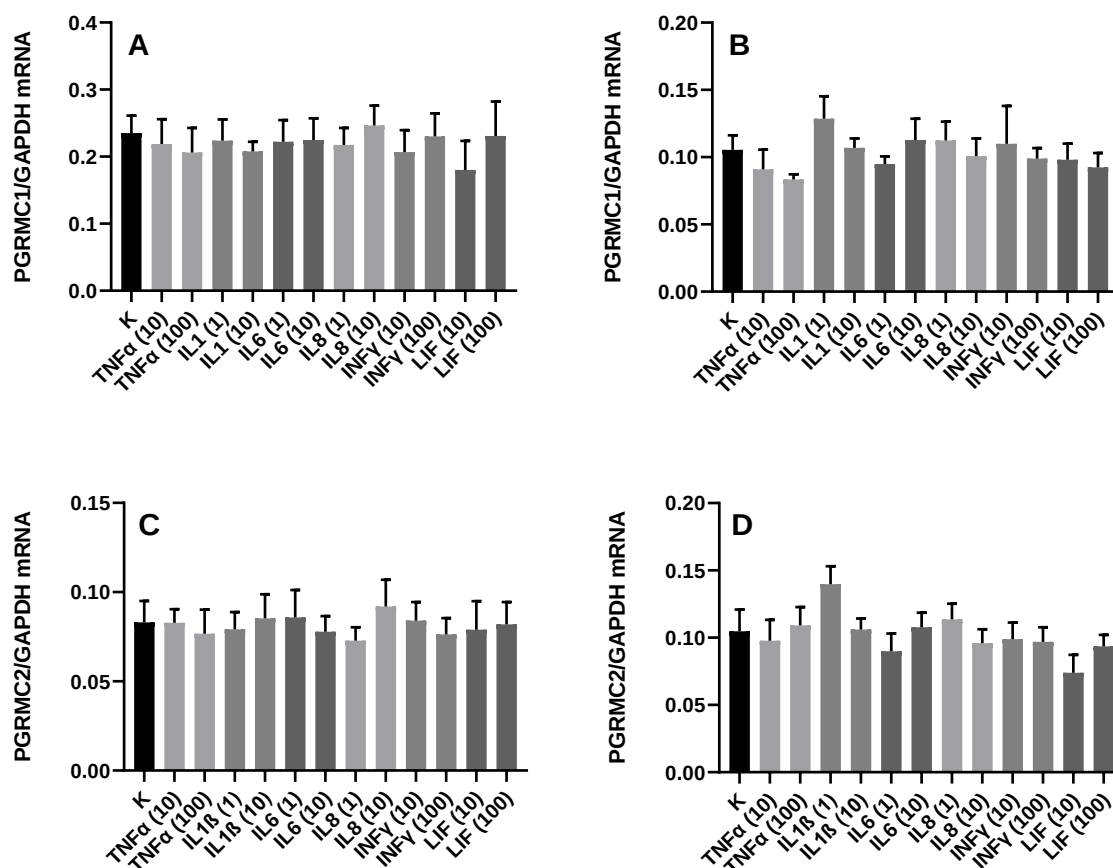
Nie wykazano wpływu ($p>0,05$) badanych cytokin ($TNF\alpha$, IL1, IL6, IL8, $INF\gamma$, LIF) i czynników wzrostu (EGF, FGF7, IGF1, VEGF, $TGF\beta$) na koncentrację PGFM (metabolit $PGF2\alpha$) w skrawkach łożyska po 6 (Ryc. 20A, C) i 24 godzinach (Ryc. 20B, D) inkubacji.



Ryc. 20. Koncentracja metabolitu prostaglandyny $F2\alpha$ (PGFM) w medium hodowlanym po 6 (A, C) i 24 godzinach (B, D) inkubacji skrawków placentomów z cytokinami (A, B): czynnikiem martwicy nowotworu ($TNF\alpha$; 10, 100 ng/ml), interleukiną (IL) 1 (1, 10 ng/ml), IL6 (1, 10 ng/ml), IL8 (1, 10 ng/ml), interferonem γ ($INF\gamma$; 10, 100 ng/ml), czynnikiem hamującym białaczkę (LIF; 10, 100 ng/ml) oraz czynnikami wzrostu (C, D): czynnikiem wzrostu naskórka (EGF; 1, 10 ng/ml), czynnikiem wzrostu fibroblastów (FGF7; 1, 10 ng/ml), insulinopodobnym czynnikiem wzrostu (IGF1; 10, 100 ng/ml), czynnikiem wzrostu śródbłónka naczyniowego (VEGF; 5, 50 ng/ml), transformującym czynnikiem wzrostu ($TGF\beta$; 5, 20 ng/ml). Wartości ($n=5$) średnie ($\pm$ SEM) przedstawiono w stosunku do wartości w próbie kontrolnej. Istotne różnice statystyczne względem kontroli oznaczono gwiazdkami (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

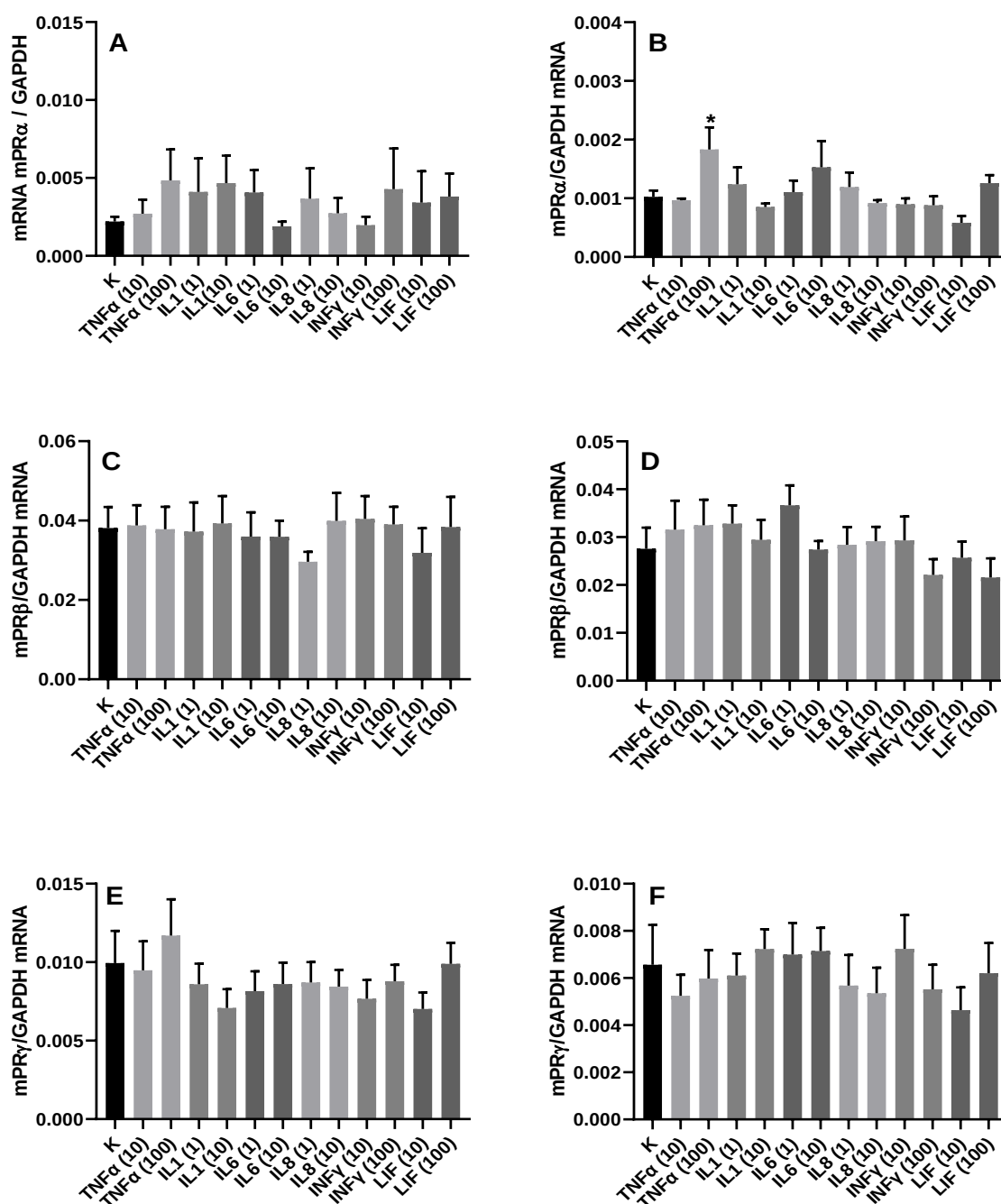
4.4. Ekspresja genów *PGRMC1*, *PGRMC2*, *mPR α* , *mPR β* i *mPR γ* po inkubacji z cytokinami

Nie stwierdzono ($p > 0,05$) zmian w ekspresji genów receptorów *PGRMC1* oraz *PGRMC2* po 6 (Ryc. 21A, C) i 24 godzinach (Ryc. 21B, D) inkubacji skrawków placentomów z badanymi cytokinami (TNF α , IL1, IL6, IL8, INF γ , LIF).



Ryc. 21. Ekspresja genu *PGRMC1* (A, B) oraz *PGRMC2* (C, D) po 6 (A, C) i 24 godzinach (B, D) inkubacji skrawków placentomów z cytokinami: czynnikiem martwicy nowotworu (TNF α ; 10, 100 ng/ml), interleukiną (IL) 1 (1, 10 ng/ml), IL6 (1, 10 ng/ml), IL8 (1, 10 ng/ml), interferonem γ (INF γ ; 10, 100 ng/ml) i czynnikiem hamującym białaczkę (LIF; 10, 100 ng/ml). Wartości ($n=5$) średnie ($\pm$ SEM) przedstawiono w stosunku do wartości w próbie kontrolnej. Istotne różnice statystyczne oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

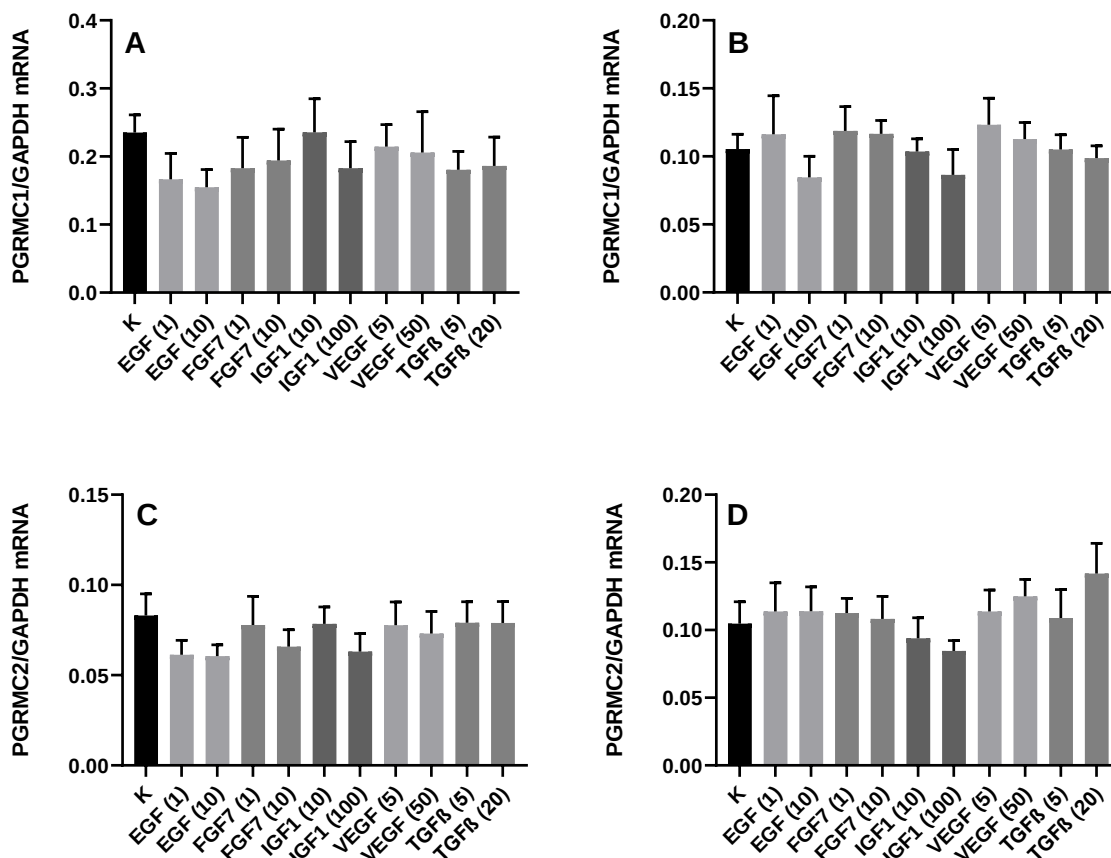
Wykazano jedynie stymulujący wpływ ($p<0,05$) $\text{TNF}\alpha$ w dawce 100 ng/ml na ekspresję $\text{mPR}\alpha$ po 24 godzinach inkubacji skrawków placentomów z tym czynnikiem (Ryc. 22B). Pozostałe cytokiny nie wpływały na ekspresję receptorów mPR w skrawkach łożyska zarówno po 6 (Ryc. 22A, C) jak i 24 godzinach (Ryc. 22B, D) inkubacji.



Ryc. 22. Ekspresja genu $\text{mPR}\alpha$ (A, B), $\text{mPR}\beta$ (C, D) oraz $\text{mPR}\gamma$ (E, F) po 6 (A, C, E) i 24 godzinach (B, D, F) inkubacji skrawków placentomów z cytokinami: czynnikiem martwicy nowotworu ($\text{TNF}\alpha$; 10, 100 ng/ml), interleukiną (IL) 1 (1, 10 ng/ml), IL6 (1, 10 ng/ml), IL8 (1, 10 ng/ml), interferonem γ ($\text{INF}\gamma$; 10, 100 ng/ml) i czynnikiem hamującym białaczkę (LIF; 10, 100 ng/ml). Wartości ($n=5$) średnie ($\pm$ SEM) przedstawiono w stosunku do wartości w próbie kontrolnej. Istotne różnice statystyczne oznaczono gwiazdkami (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

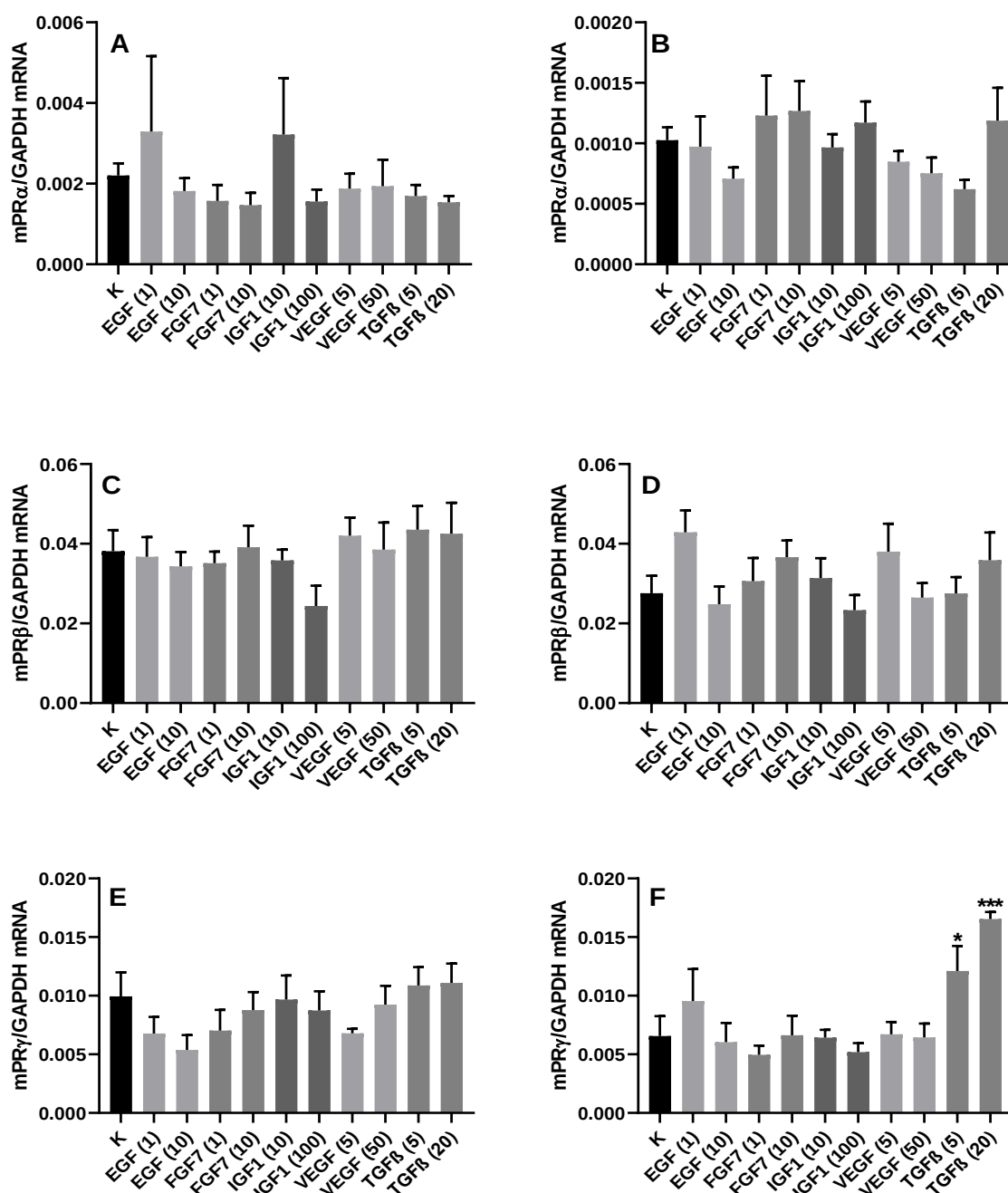
4.5. Ekspresja genów *PGRMC1*, *PGRMC2*, *mPR α* , *mPR β* i *mPR γ* po inkubacji z czynnikami wzrostu

Nie wykazano ($p > 0,05$) zmian w ekspresji receptorów *PGRMC1* oraz *PGRMC2* po 6 (Ryc. 23A, C) i 24 godzinach (Ryc. 23B, D) inkubacji skrawków placentomów z badanymi czynnikami wzrostu (EGF, FGF7, IGF1, VEGF, TGF β).



Ryc. 23. Ekspresja genu *PGRMC1* (A, B) oraz *PGRMC2* (C, D) po 6 (A, C) i 24 godzinach (B, D) inkubacji skrawków placentomów z czynnikami wzrostu: czynnikiem wzrostu naskórka (EGF; 1, 10 ng/ml), czynnikiem wzrostu fibroblastów (FGF7; 1, 10 ng/ml), insulinopodobnym czynnikiem wzrostu (IGF1; 10, 100 ng/ml), czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF; 5, 50 ng/ml) i transformującym czynnikiem wzrostu (TGF β ; 5, 20 ng/ml). Wartości ($n=5$) średnie ($\pm$ SEM) przedstawiono w stosunku do wartości w próbie kontrolnej. Istotne różnice statystyczne oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Zastosowane w doświadczeniu czynniki wzrostu (EGF, FGF7, IGF1, VEGF, TGF β) nie wpływały również na ekspresję mPR α , mPR β i mPR γ po 6 godzinach inkubacji (Ryc. 24A, C, E). Wykazano jednak, że TGF β w obu podanych dawkach zwiększał ($p<0,05$) ekspresję mPR γ po 24 godzinach inkubacji skrawków placentomów (Ryc. 24F).

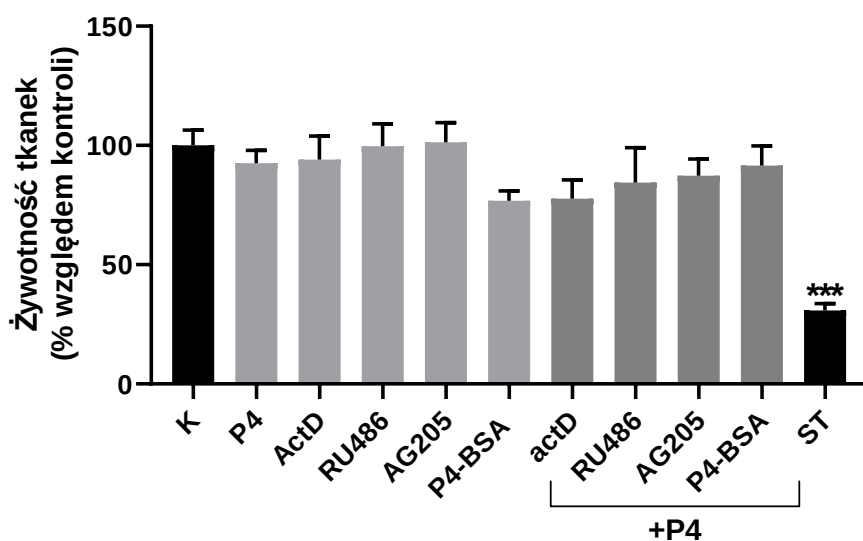


Ryc. 24. Ekspresja genu mPR α (A, B), mPR β (C, D) oraz mPR γ (E, F) po 6 (A, C, E) i 24 godzinach (B, D, F) inkubacji skrawków placentomów z czynnikami wzrostu: czynnikiem wzrostu naskórka (EGF; 1, 10 ng/ml), czynnikiem wzrostu fibroblastów (FGF7; 1, 10 ng/ml), insulinopodobnym czynnikiem wzrostu (IGF1; 10, 100 ng/ml), czynnikiem wzrostu śródbłónki naczyniowej (VEGF; 5, 50 ng/ml) i transformującym czynnikiem wzrostu (TGF β ; 5, 20 ng/ml). Wartości ($n=5$) średnie ($\pm$ SEM) przedstawiono w stosunku do wartości w próbie kontrolnej. Istotne różnice statystyczne oznaczono gwiazdkami (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

5. Zdefiniowanie odpowiedzi komórek łożyska zależnie od ich genomowego lub pozagenomowego pobudzenia

5.1. Ocena żywotności skrawków placentomów po inkubacji z ActD, RU486, AG205 i koniugatem P4-BSA

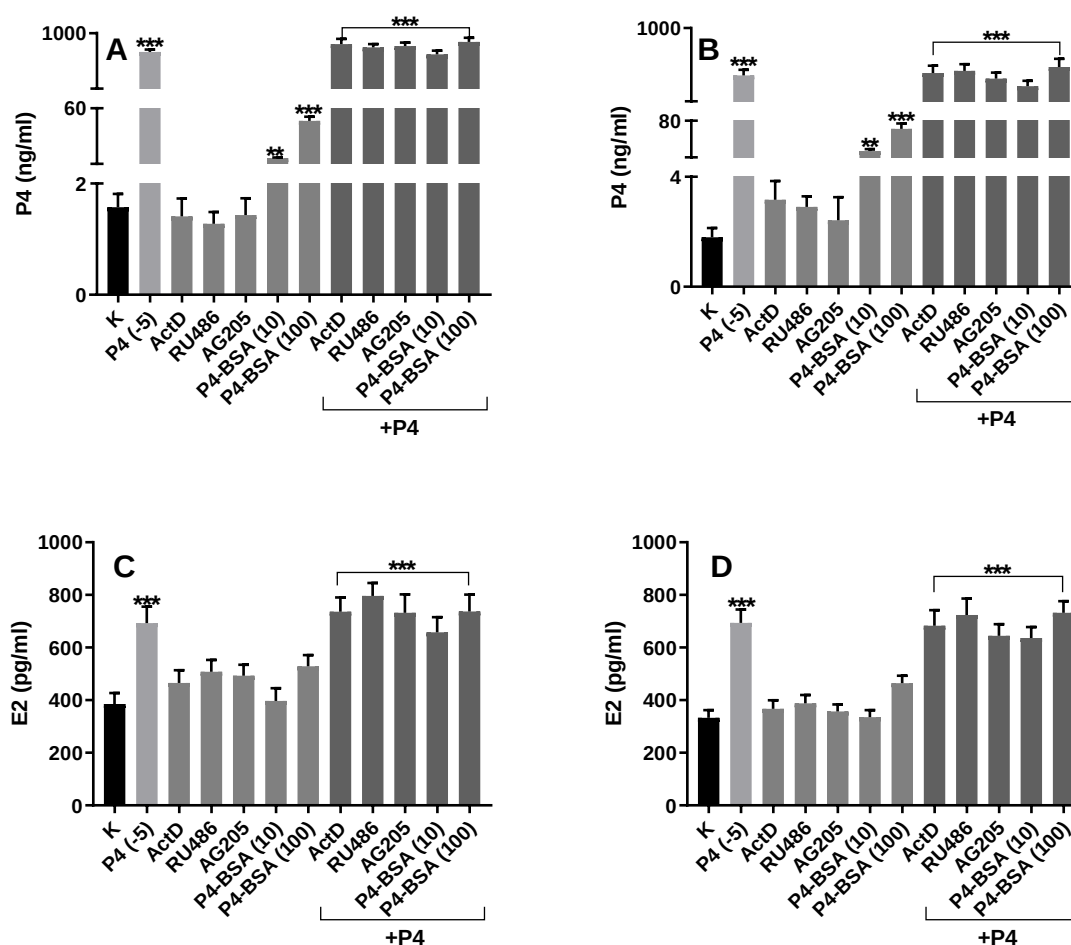
Wykazano, że użyte w doświadczeniu czynniki podane w najwyższych stężeniach, nie wpływały ($p > 0,05$) na żywotność inkubowanych skrawków placentomów. Staurosporyna zastosowana jako kontrola negatywna spowodowała spadek żywotności komórek w tkance łożyska (Ryc. 25).



Ryc. 25. Żywotność skrawków placentomów po 24 godzinach inkubacji z: progesteronem (P4; 10^{-5} M), aktynomycyną D (ActD; 250 ng/ml), mifepristonem (RU486; 10^{-5} M), AG205 (2×10^{-5} M), koniugatem P4-BSA (100 ng/ml), P4 podanym z każdym wymienionym czynnikiem oraz staurosporyną (ST; 1 μ g/ml). Wartości średnie ($\pm$ SEM) przedstawiono w stosunku do wartości w próbie kontrolnej (100%). Różne oznaczenia literowe nad słupkami wskazują na istotne różnice ($p < 0,05$).

5.2. Stężenie hormonów w medium hodowlanym po inkubacji z ActD, RU486, AG205 i koniugatem P4-BSA

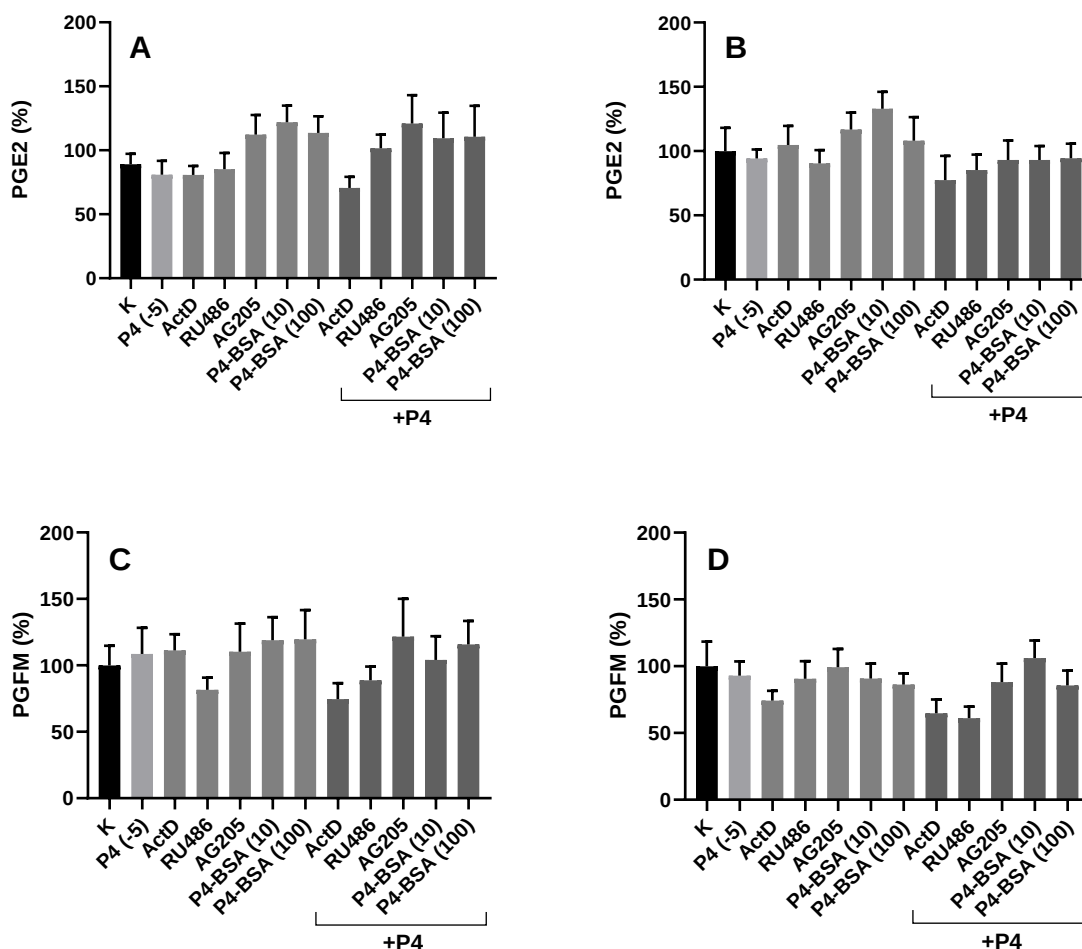
Wykazano wzrost stężenia P4 ($p < 0,05$) po 6 (Ryc. 26A) i 24 (Ryc. 26B) godzinach inkubacji skrawków placentomów z P4 oraz P4 podanym łącznie z zastosowanymi w doświadczeniu czynnikami. Badane czynniki podane samodzielnie, z wyjątkiem koniugatu P4-BSA, nie wpływały ($p > 0,05$) na wydzielanie P4 przez skrawki łożyska. Z kolei P4 podany samodzielnie oraz z każdym badanym czynnikiem, we wszystkich użytych dawkach, spowodował wzrost ($p < 0,05$) stężenia E2 w medium po 6 (Ryc. 26C) i 24 godzinach inkubacji (Ryc. 26D).



Ryc. 26. Koncentracja progesteronu (P4) (A, B) i estradiolu (E2) (C, D) w medium hodowlanym po 6 (A, C) i 24 godzinach (B, D) inkubacji skrawków placentomów z: P4 (10^{-5} M), aktynomycyną D (ActD; 250 ng/ml), mifepristonem (RU486; 10^{-5} M), AG205 (2×10^{-5} M), koniugatem P4-BSA (10, 100 ng/ml) oraz P4 podanym z każdym wymienionym czynnikiem. Wartości ($n=5$) średnie ($\pm$ SEM) przedstawiono w stosunku do wartości w próbie kontrolnej (100%). Istotne różnice statystyczne względem kontroli oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.3. Stężenie prostaglandyn w medium hodowlanym po inkubacji z ActD, RU486, AG205 i koniugatem P4-BSA

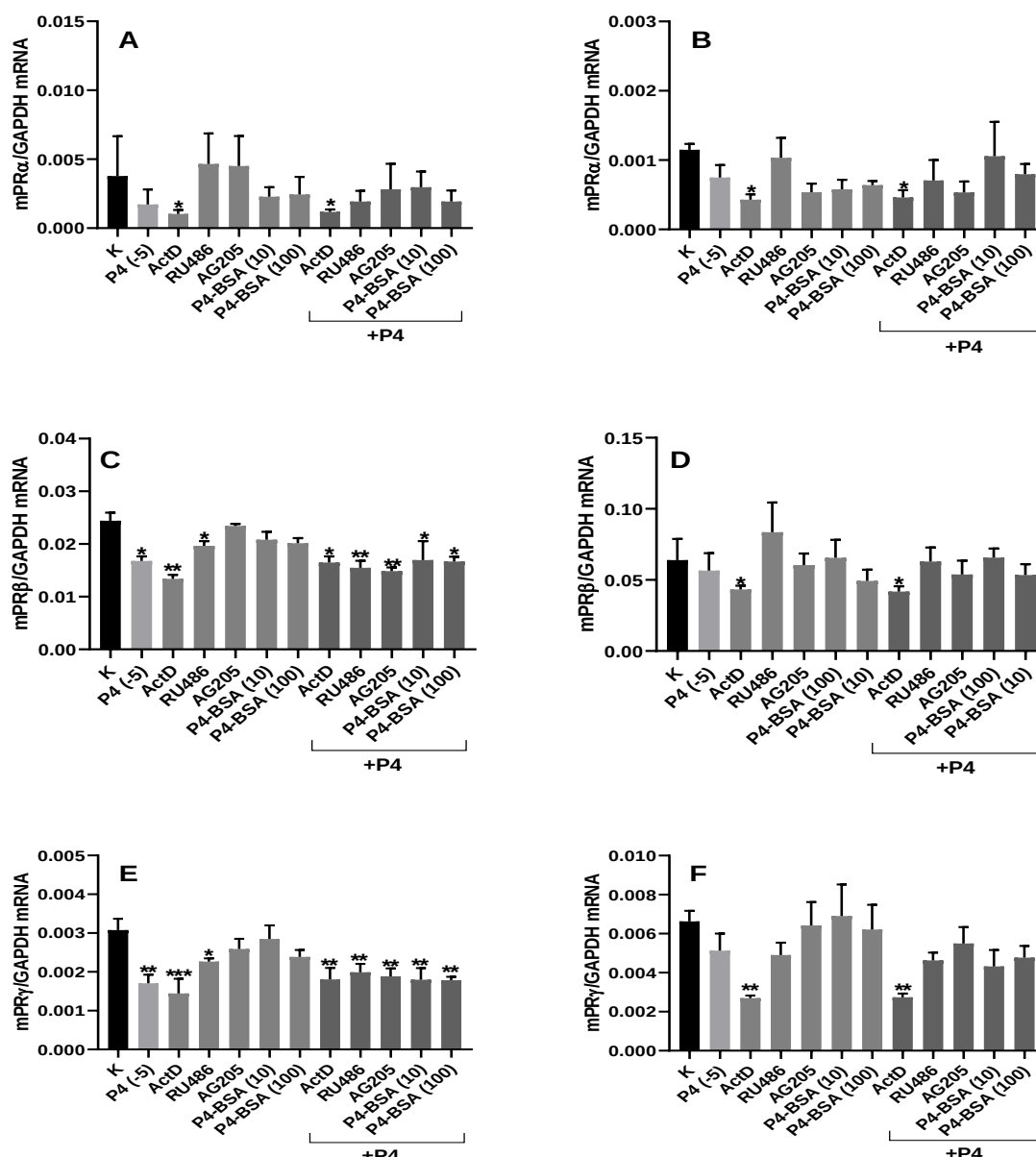
Nie wykazano ($p>0,05$) zmian w stężeniu PGE2 oraz PGFM po 6 (Ryc. 27A, C) i 24 godzinach (Ryc. 27B, D) inkubacji skrawków placentomów z badanymi czynnikami.



Ryc. 27. Koncentracja prostaglandyny (PG) E2 (A, B) i metabolitu prostaglandyny F2 α (PGFM) (C, D) w medium hodowlanym po 6 (A, C) i 24 godzinach (B, D) inkubacji skrawków placentomów z: progesteronem (P4; 10^{-5}), aktynomycyną D (ActD; 250 ng/ml), mifepristonem (RU486; 10^{-5} M), AG205 (2×10^{-5} M), koniugatem P4-BSA (10, 100 ng/ml) oraz P4 podanym z każdym wymienionym czynnikiem ($n=5$) średnie ($\pm$ SEM) przedstawiono w stosunku do wartości w próbie kontrolnej (100%). Istotne różnice statystyczne oznaczono gwiazdkami (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

5.4. Ekspresja genów *mPR α* , *mPR β* i *mPR γ* po inkubacji z ActD, RU486, AG205 i koniugatem P4-BSA

Ze względu na to, że P4 nie wpływał na ekspresję receptorów typu PGRMC w Doświadczeniu 3, jedynie w przypadku receptorów mPR możliwe było zdefiniowanie drogi działania tego hormonu. Wykazano obniżenie ekspresji ($p < 0,05$) wszystkich receptorów pod wpływem ActD podanej samodzielnie oraz z P4 (Ryc. 28A-F). Ponadto, wykazano spadek ($p < 0,05$) ekspresji *mPR β* i *mPR γ* po 6 godzinach inkubacji z P4, RU486 oraz P4 łącznie z każdym badanym czynnikiem (Ryc. 28C, E).



Ryc. 28. Ekspresja genu *mPR α* (A, B), *mPR β* (C, D) oraz *mPR γ* (E, F) po 6 (A, C, E) i 24 godzinach (B, D, F) inkubacji skrawków placentomów z: progesteronem (P4; 10^{-5} M), aktynomycyną D (ActD; 250 ng/ml), mifepristonem (RU486; 10^{-5} M), AG205 (2×10^{-5} M), koniugatem P4-BSA (10, 100 ng/ml) oraz P4 podanym z każdym wymienionym czynnikiem. Wartości ($n=5$) średnie ($\pm$ SEM) przedstawiono w stosunku do wartości w próbie kontrolnej. Istotne różnice statystyczne oznaczono gwiazdkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

DYSKUSJA

W niniejszej pracy wykazano ekspresję błonowych receptorów P4: PGRMC1, PGRMC2, mPR α , mPR β i mPR γ w skrawkach placentomów łożyska, pozyskiwanych od krów w drugim trymestrze ciąży. Dotychczas ekspresja tych receptorów została stwierdzona w łożysku człowieka (KARTERIS i wsp. 2006; FERNANDES i wsp. 2005; ZACHARIADES i wsp. 2012) i owcy (REYNOLDS i wsp. 2015; BUNMA i wsp. 2020). Ponadto, wykazano obecność mRNA i białka PGRMC1 oraz PGRMC2 w łożysku krowy podczas całego okresu ciąży (BEYER i wsp. 2017). Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wykazują ekspresję receptorów błonowych P4 typu mPR oraz potwierdzają obecność receptorów typu PGRMC w łożysku krowy w drugim trymestrze ciąży. Analiza immunohistochemiczna wykazała obecność tych receptorów zarówno w części matczynej, jak i płodowej łożyska, co wskazuje na możliwość pozagenomowego działania P4 w łożysku krowy.

Uzyskane dane potwierdziły ekspresję mRNA błonowych receptorów P4 zarówno w tkance endometrium, kosmówki, jak i placentomach, które stanowią strukturalną i funkcjonalną jednostkę łożyska. Należy zaznaczyć, że w badaniach prowadzonych w ramach niniejszej pracy zastosowano opracowany przez WOJCIECHOWSKA i wsp. (2015) sposób hodowli *in vitro* skrawków placentomów z zachowaniem połączeń maczyno-płodowych do badań fizjologicznych. Model ten dotychczas stosowano jedynie w badaniach toksykologicznych (WOJCIECHOWSKA i wsp. 2107; WOJCIECHOWSKA i wsp. 2018).

Dotychczas wykazano zmienną ekspresję błonowych receptorów P4 w macicy kobiety (FERNANDES i wsp. 2005) i krowy (SŁONINA i wsp. 2012; KOWALIK i wsp. 2013; KOWALIK i wsp. 2019) w trakcie cyklu oraz w pierwszym trymestrze ciąży, co może być związane z przygotowaniem macicy do implantacji blastocysty i prawidłowego przebiegu ciąży. Ponadto, stwierdzono, że ekspresja receptorów błonowych P4 w owodni, kosmówce i łożysku u kobiet (FERNANDES i wsp. 2005), a także w łożysku owcy (BUNMA i wsp. 2020) zmienia się w trakcie trwania ciąży. Wykazano również zmiany w poziomie ekspresji poszczególnych błonowych receptorów P4 w okresie przedwczesnego i terminowego porodu (FERNANDES i wsp. 2005). Dane te wskazują, że obserwowane zmiany mogą być regulowane przez hormony steroidowe oraz czynniki lokalnie produkowane w macicy i jajniku.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy wskazują, że P4 i E2 regulują ekspresję błonowych receptorów typu mPR. Nie wykazano natomiast wpływu badanych steroidów na ekspresję genów PGRMC1 i PGRMC2. Należy zaznaczyć, że wpływ hormonów steroidowych na ekspresję receptorów błonowych P4 w tkankach układu rozrodczego nie jest

jednoznaczny. Wykazano obniżenie ekspresji mPR γ pod wpływem P4 w jajowodzie myszy (NUTU i wsp. 2009). Ponadto, stwierdzono stymulujący wpływ P4 na ekspresję mPR α zarówno w miometrium (KARTERIS i wsp. 2006), jak i jajowodzie u kobiety (MONKKONEN i wsp. 2007). Natomiast badania KARTERIS i wsp. (2006) wskazują na brak wpływu P4 na ekspresję mPR β w ludzkim miometrium. Z drugiej strony, wyniki badań KREBS i wsp. (2000) oraz NEUBAUER i wsp. (2008) wykazały, że ekspresja PGRMC1 może być regulowana przez P4 oraz E2 podane łącznie, co wskazuje na możliwość wspólnego działania obu steroidów na ekspresję błonowych receptorów P4. Wykazano, że E2 może uczestniczyć w pozagenomowym działaniu P4 poprzez regulację aktywności jądrowego receptora P4 (KASTNER i wsp. 1990) i aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków kinaz białkowych (GELLERSEN i wsp. 2009). Możliwe zatem, że oba jajnikowe hormony steroidowe wspólnie wpływają na ekspresję błonowych receptorów P4 poprzez regulację PGR. W niniejszej pracy P4 i E2 podane łącznie zwiększały ekspresję receptora mPR α , natomiast podane samodzielnie nie miały wpływu na jego ekspresję. Wspólne działanie steroidów obserwowano również dla receptora mPR γ . Możliwe zatem, że obserwowany efekt regulacyjny jest wynikiem synergistycznego działania obu steroidów na komórki/tkanki lub efekt ten występuje przy zachowaniu specyficznej proporcji E2:P4. To może tłumaczyć różnice w regulacji ekspresji receptorów w różnych typach badanych komórek/tkanek, gdyż ich aktualny stan funkcjonalny, zwłaszcza ilość i proporcje receptorów E2 i P4, nie są takie same.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują na udział P4 w regulacji ekspresji mRNA mPR α , mPR β and mPR γ w łożysku krowy w drugim trymestrze ciąży. Progesteron za pośrednictwem tych receptorów może wpływać na różne szlaki transdukcji sygnału poprzez regulację wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca²⁺, wzrost aktywności kinazy MAP oraz obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP (ZHU i wsp. 2003b; ASHLEY i wsp. 2006; KARTERIS i wsp. 2006). Sugeruje to, że receptory mPR mogą uczestniczyć w wielu procesach, takich jak różnicowanie, proliferacja i apoptoza komórek (GELLERSEN i wsp. 2009; WU i wsp. 2011; ZHANG i wsp. 2008). Funkcja poszczególnych izoform receptora mPR nie jest jednak w pełni wyjaśniona. Dotychczasowe badania wskazują, że receptory mPR mogą brać udział w apoptozie komórek lutealnych i w konsekwencji regresji CL (AMSTERDAM i wsp. 2003; PELUSO 2006). Białka te mogą być również zaangażowane w procesy związane z przygotowaniem macicy do implantacji blastocysty, ciąży oraz porodu (ASHLEY i wsp. 2006; FERNANDES i wsp. 2005; DRESSING i wsp. 2011). Ponadto, wykazano, że P4 i E2 mogą na drodze niegenomowej wpływać na funkcje naczyń krwionośnych, w tym również na

tętnice i żyły łożyska (RAMIREZ i wsp. 1998; CHOW i wsp. 2010) i w ten sposób regulować przepływ krwi w tym narządzie (RAMIREZ i wsp. 1998; MINSHALL i wsp. 2002; SIMONCINI i wsp. 2004). Badania prowadzone w naszym Zakładzie wskazały na wysoki poziom ekspresji mRNA i białka wszystkich typów błonowych receptorów P4 w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych, zarówno w macicy, CL, jak i jajowodzie krowy (KOWALIK i wsp. 2013; 2014; 2016; 2019), co dodatkowo potwierdza możliwość pozagenomowego działania P4 w regulacji przepływu krwi. Należy wskazać, że najważniejszym czynnikiem regulującym przepływ krwi w łożysku jest endotelina-1 (ET-1) (MACLEAN i wsp. 1992). Stwierdzono, że P4, w zależności od dawki, może wpływać na poziom ekspresji i sekrecji tego białka z komórek nabłonka (WIJAYAGUNAWARDANE i wsp. 1999). Jednocześnie E2 w tych warunkach powodował zależne od dawki zmniejszenie wydzielania tego mediatora (REINHART i wsp. 2003). Należy zaznaczyć, że zmiany w przepływie krwi w organizmie matki muszą być w krótkim czasie kompensowane przez układ krwionośny łożyska, jest więc możliwe, że P4 (wzrost przepływu krwi powoduje większe nasycenie tkanek macicy tym hormonem) działa poprzez receptory błonowe P4, wpływając na uwalnianie ET-1.

Istnieje wiele czynników, które mogą modulować funkcje endometrium oraz rozwój łożyska i odgrywają ważną rolę w przygotowaniu endometrium do implantacji blastocysty. Wśród nich można wyróżnić cytokiny i czynniki wzrostu. Możliwe zatem, że mogą one odpowiadać za regulację błonowych receptorów P4 w łożysku. Cytokiny są białkami produkowanymi przez różne typy aktywowanych komórek układu immunologicznego i fibroblasty, natomiast w obrębie układu rozrodczego przez komórki nabłonkowe macicy (ROBERTSON i wsp. 1992; CASSATELLA 1995; BARRIENTOS i wsp. 2008). Ich główną funkcją jest stymulacja układu immunologicznego, ale biorą też udział w implantacji blastocysty oraz wzroście i rozwoju łożyska (ROBERTSON i wsp. 1992; SZEREDAY i wsp. 1997). Z kolei czynniki wzrostu są białkami zaangażowanymi w regulację podziałów komórkowych i ich różnicowanie. W okresie ciąży, produkowane w macicy czynniki uczestniczą we wzroście i rozwoju łożyska oraz płodu (DIAUGUSTINE i wsp. 1988; POLLARD 1990). Zastosowane w niniejszych badaniach cytokiny: IL1, IL6, IL8, INF γ i LIF oraz czynniki wzrostu: EGF, FGF7, IGF1 i VEGF nie miały wpływu na ekspresję błonowych receptorów P4 w łożysku krowy w drugim trymestrze ciąży. Jedynie TNF α wpływał stymulująco na ekspresję mRNA receptora mPR α , a TGF β na ekspresję mRNA mPR γ .

Czynnik martwicy nowotworu α to jedna z głównych cytokin odpowiedzi immunologicznej organizmu o silnym działaniu cytotoksycznym. W procesach zapalnych TNF α bierze udział w powstawaniu i różnicowaniu limfocytów, pobudzaniu cytotoksyczności

makrofagów, eozynofilów oraz komórek NK. Czynniki te wykazują również właściwości przeciwnowotworowe poprzez działanie apoptotyczne i antyproliferacyjne względem komórek nowotworowych. W układzie rozrodczym samic produkowany jest w jajnikach, jajowodzie, macicy oraz łożysku (HUNT 1993; TERRANOVA i wsp. 1995; HUNT i wsp. 1996; TERRANOVA 1997). Ponadto, jego obecność wykazano w ludzkim płynie owodniowym oraz supernatantach z tkanek łożyska i doczesnej (CHEN i wsp. 1991). Profil syntezy TNF α zmienia się w czasie ciąży u ludzi i odzwierciedla zróżnicowaną regulację syntezy tej cytokiny przez E2 i P4 w różnych typach komórek macicy i łożyska (HUNT i wsp. 1992; HUNT 1993). Działanie TNF α w układzie rozrodczym jest wielokierunkowe. Wykazano, że bierze on udział w regulacji cyklu rujowego krowy. We wczesnej fazie pęcherzykowej może powodować atrezję pęcherzyka jajnikowego, natomiast we wczesnej fazie lutealnej wykazuje działanie luteotropowe, a następnie luteolityczne (MURAKAMI i wsp. 2001). Wykazano, że TNF α u bydła stymuluje wydzielanie PGF2 α z endometrium w trakcie fazy folikularnej, a także w późnej fazie lutealnej, co sugeruje, że cytokina ta jest czynnikiem inicjującym luteolizę u bydła (OKUDA i wsp. 2002). W trakcie ciąży TNF α wpływa głównie na syntezę hormonów oraz rozwój łożyska poprzez stymulację proliferacji i różnicowania komórek łożyska (HUNT i wsp. 1996). Profil syntezy TNF α zmienia się w czasie ciąży u ludzi i odzwierciedla zróżnicowaną regulację syntezy tej cytokiny przez P4 i E2 w różnych typach komórek macicy i łożyska (HUNT i wsp. 1992; HUNT 1993). Jako cytokina o działaniu immunomodulującym bierze również udział w interakcji matka-płód, która wymaga odpowiedniej synergii pomiędzy maczynym układem odpornościowym a reakcjami zapalnymi. Umożliwia to adaptację immunologiczną płodu i jednocześnie utrzymanie odpowiedzi immunologicznej na odpowiednim poziomie zapewniającym ochronę przed potencjalnymi infekcjami. Ponadto, we wczesnych stadiach ciąży cytokiny prozapalne, w tym TNF α , są niezbędne do stymulacji angiogenezy, która umożliwia skuteczną implantację zarodka (DEMIR i wsp. 2010; ROMANOWSKA-PRÓCHNICKA i wsp. 2021). Z drugiej strony podwyższony poziom cytokin prozapalnych, a w szczególności TNF α , wydzielanych przez aktywowane maciczo-łożyskowe makrofagi, może prowadzić do odklejenia się łożyska i utraty ciąży. Z tego punktu widzenia, utrzymanie homeostazy cytokin o działaniu pro- i przeciwzapalnym zapewnia prawidłowy przebieg implantacji blastocysty i rozwój ciąży. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że TNF α zwiększa ekspresję błonowego receptora mPR α w łożysku krowy w drugim trymestrze ciąży. Ponadto, badania MENG i wsp. (2016) wskazują, że TNF α stymuluje ekspresję białka PGRMC1 w komórkach błon płodowych u kobiet. Możliwe zatem, że wzrost ekspresji receptorów błonowych P4 pod

wpływem TNF α stanowi jeden z mechanizmów regulujących produkcję tej cytokiny, a tym samym zapobiega utracie ciąży (ROMERO i wsp. 2007).

Transformujący czynnik wzrostu β należy do wielofunkcyjnych czynników, wykazujących wielokierunkowy wpływ na procesy wzrostu i różnicowania komórek, a także zaangażowanych w takie procesy fizjologiczne, jak apoptoza, angiogeneza, czy steroidogeneza (MOSES i wsp. 1987; MASSAGUE 1990; GODKIN i DORE 1998). W obrębie układu rozrodczego samicy, TGF β wykazuje ekspresję w endometrium (komórki nabłonka powierzchniowego oraz gruczołowego), zarówno w trakcie cyklu rujowego oraz ciąży i może on indukować specyficzne mechanizmy różnicowania i przekształcania komórek endometrium (CLARK i wsp. 1990; CHEGINI i wsp. 1994; WADA i wsp. 1996). Ekspresję mRNA i białka dla TGF β wykazano zarówno w części macicznej i płodowej łożyska (MUNSON i wsp. 1996). Ponadto, wykazano obecność TGF β w komórkach trofoblastu, co wskazuje na jego udział w proliferacji i różnicowaniu tych komórek w syncytiotrofoblast i cytotrofoblast, a także w kontroli rozwoju trofoblastu (GRAHAM i LALA 1991; GRAHAM i wsp. 1992). Podczas ciąży TGF β wpływa między innymi na: decydualizację i promowanie proliferacji komórek endometrium, inwazję i różnicowanie komórek trofoblastu, implantację blastocysty, hamowanie odpowiedzi immunologicznej organizmu matki, produkcję cytokin i hormonów, a także embriogenezę (GODKIN i DORE 1998). Należy zaznaczyć, że znaczny wzrost poziomu TGF β w prawidłowym przebiegu ciąży zapobiega jej utracie. W niniejszej pracy wykazano stymulujący wpływ TGF β na ekspresję mRNA błonowego receptora mPR γ w łożysku krowy. Błonowe białka mPR, podobnie jak TGF β , biorą udział w implantacji blastocysty, różnicowaniu komórek oraz procesach apoptotycznych (ZHANG i wsp. 2008; WU i wsp. 2011). Transformujący czynnik wzrostu β , regulując ekspresję receptorów mPR γ , może zmieniać wrażliwość komórek docelowych na działanie P4 i innych czynników regulacyjnych.

Cytokiny i czynniki wzrostu mogą wpływać na ekspresję białek mPR w łożysku, jednakże efekt jaki wywołują jest w znacznej mierze zależny od użytego w badaniach modelu doświadczalnego. Dotychczas wykazano, że interleukina 1 β hamuje ekspresję receptora mPR α w linii komórek BeWo ludzkiego łożyska (ZACHARIADES i wsp. 2012). Natomiast ekspresja mRNA PGRMC1, mPR α , mPR β oraz mPR γ w CL szczurów jest regulowana przez prolaktynę (CAI i STOCCO 2005). Brak wpływu większości zastosowanych w doświadczeniach cytokin i czynników wzrostu na regulację ekspresji błonowych receptorów P4 w łożysku może wskazywać na konieczność współdziałania kilku czynników i hormonów w obrębie łożyska lub istnienie różnic gatunkowych. Niezbędne są zatem dalsze

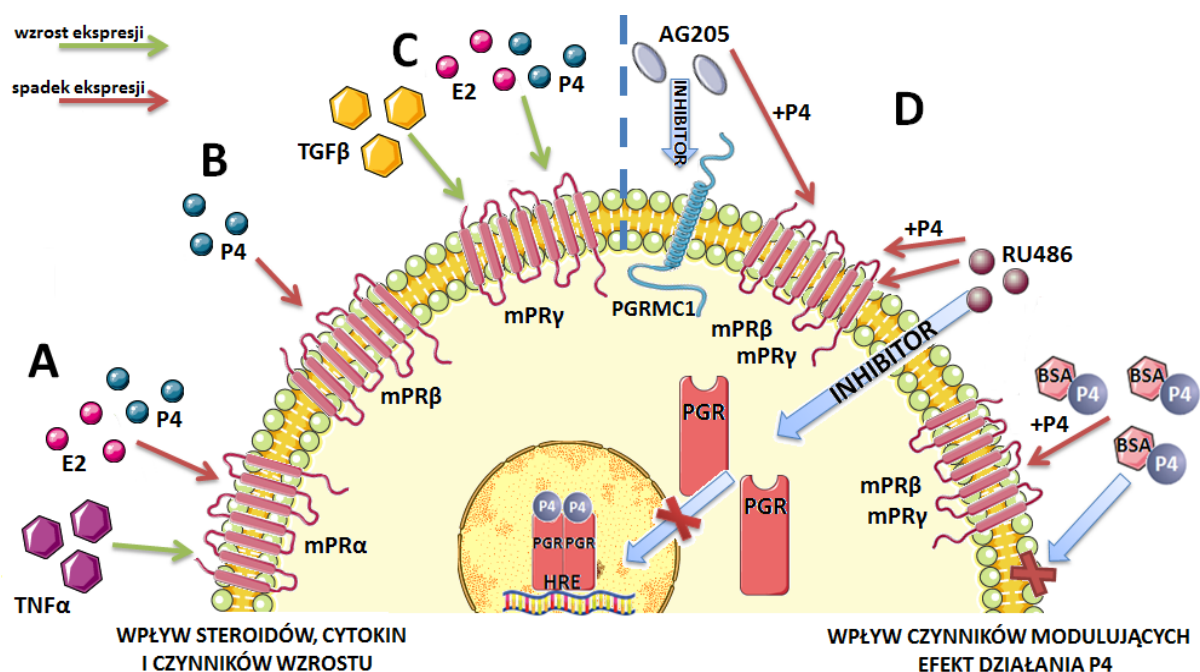
badania, które pozwolą w pełni zrozumieć mechanizmy regulacji ekspresji błonowych receptorów P4 w obrębie układu rozrodczego samicy.

W celu zdefiniowania odpowiedzi komórek łożyska na P4, w zależności od ich genomowego lub niegenomowego pobudzenia, skrawki placentomów inkubowano z czynnikami modulującymi działanie P4, w tym: ActD, RU486, AG205, koniugatem P4-BSA oraz P4 podanym łącznie z każdym z wymienionych czynników. Wykazano, że P4 podany łącznie ze wszystkimi badanymi czynnikami po 6 godzinach inkubacji obniżał ekspresję mPR β i mPR γ , natomiast poza ActD i RU486, żaden z czynników podany samodzielnie nie zmieniał ekspresji tych receptorów. Pierwszy wymieniony czynnik, ActD, jest cytostatykiem, który odpowiada za hamowanie procesu transkrypcji (RILL i HECKER 1996). W przeprowadzonym doświadczeniu ActD podana samodzielnie, jak i łącznie z P4, obniżyła poziom ekspresji wszystkich genów mPR po 6 i 24 godzinach inkubacji, co potwierdza jej działanie jako inhibitora transkrypcji. Kolejny zastosowany w doświadczeniu czynnik, RU486, jest antagonistą progestagenów o wysokim powinowactwie do receptorów jądrowych P4, dlatego też jest stosowany jako inhibitor tego receptora (BAULLIEU 1989). Wiązanie antagonisty zakłóca tworzenie stabilnych dimerów receptora, przez co nie jest on w stanie aktywować transkrypcji genu indukowanej przez P4 (KLEIN-HITPASS i wsp. 1991). Obniżenie ekspresji mRNA mPR β i mPR γ pomimo zablokowania działania PGR wskazuje, że regulacja ekspresji tych receptorów może być efektem działania pozagenomowego. Z kolei, AG205 jest antagonistą błonowego receptora PGRMC1. Oddziałuje on z charakterystyczną dla PGRMC1 domeną o budowie zbliżonej do cytochromu b5, która odpowiada za wiązanie steroidów (AHMED i wsp. 2010). Obniżenie ekspresji mPR β i mPR γ pod wpływem P4 podanego z tym inhibitorem wskazuje, że mogło dojść do regulacji poprzez jądrowy receptor P4 lub błonowe receptory P4 inne niż zablokowany PGRMC1. Ostatni czynnik, koniugat P4-BSA, jest kompleksem nieprzenikającym przez błonę komórkową, dlatego też może oddziaływać jedynie z receptorami zlokalizowanymi w błonie komórkowej i wskazuje na pozagenomowe, niezależne od transkrypcji działanie P4 (GAETJENS i PERTSCHUK 1980). Inkubacja skrawków łożyska z koniugatem P4-BSA podanym samodzielnie nie zmieniła ekspresji receptora mPR β i mPR γ , natomiast P4-BSA z wolnym P4 doprowadził do obniżenia ekspresji tych genów. Wskazuje to, że tylko wolny P4, który mógł przeniknąć przez błonę komórkową, zmniejszył ekspresję receptorów, co wskazuje na genomowe działanie tego hormonu. Uzyskane wyniki wskazują, że zależna od P4 ekspresja receptorów mPR β i mPR γ , może być regulowana zarówno na drodze genomowej, jak i niegenomowej. Obecny stan wiedzy nie pozwala jednak zdefiniować, która z dróg działania

P4 jest dominująca. Sugeruje się, że możliwa jest integracja tych dwóch mechanizmów lub każdy z nich pełni odmienne funkcje w komórce.

Należy zwrócić uwagę, że oddziaływanie P4 ze swoistymi błonowymi receptorami jest jedynie częścią szerszego mechanizmu pozagenomowego wpływu tego hormonu. Wykazano, że steroidy mogą działać na poziomie błony komórkowej bez konieczności wiązania z receptorem. Jako lipofilne cząsteczki posiadają zdolność przechodzenia przez błonę komórkową, powodując zmiany w strukturze i płynności błony komórkowej. Prowadzi to do zmian powinowactwa innych błonowych receptorów do ich ligandów (BURGER i wsp. 1999; GIMPL i FAHRENHOLZ 2002). Wykazano, że P4 wpływa w ten sposób na wiązanie receptora z OT, hamując wpływ tego hormonu na komórki (GRAZZINI i wsp. 1998). Badania RAMIREZ i wsp. (2001) sugerują natomiast, że steroidy mogą łączyć się z niespecyficznymi dla siebie białkami receptorowymi, enzymatycznymi lub strukturalnymi obecnymi w błonie, indukując w ten sposób liczne procesy wewnątrzkomórkowe. Przykładem tego typu białek może być podjednostka Ca^{2+} ATP-azy, czy też dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa (RAMIREZ i wsp. 2001). W pozagenomowym mechanizmie działania P4 na komórki mogą uczestniczyć również wewnątrzkomórkowe receptory P4, które są zlokalizowane w pobliżu błony komórkowej (PELUSO 2006). Receptory te działają jako czynniki transkrypcyjne, ale mogą również uruchamiać wewnątrzkomórkowe szlaki kinaz białkowych, przy czym wiązanie PGR z P4 prowadzi głównie do aktywacji szlaków kinazy MAP. W badaniach PELUSO (2006) wykazano, że aktywacja tych receptorów prowadzi do dojrzewania oocytów u *Xenopus laevis*. Ponadto, steroidy mogą wywierać wpływ na czynniki wzrostu, takie jak czynnik wzrostu nerwów (NGF), EGF oraz IGF-1. Istnieje możliwość bezpośredniego wiązania steroidów z receptorami dla czynników wzrostu i modyfikacji ich funkcji, co prowadzi do uruchomienia kaskady wtórnych przekaźników informacji w komórce. Należy zaznaczyć, że w tym przypadku dochodzi głównie do aktywacji szlaków kinaz ERK1 i ERK2, co dodatkowo zwiększa możliwość oddziaływania steroidów na procesy wewnątrzkomórkowe zachodzące w komórce (FALKENSTEIN i wsp. 2000; CATO i wsp. 2000). Opisana złożoność mechanizmów działania P4 utrudnia zdefiniowanie czynników regulujących te procesy. Istotnym zagadnieniem jest określenie fizjologicznego znaczenia istnienia tak wielu możliwych dróg działania P4. Wydaje się, że każda z tych dróg działania pełni odmienną funkcję w homeostazie komórki, a uzyskany efekt fizjologiczny jest wypadkową aktywacji/dezaktywacji różnych ścieżek sygnałowych.

Podsumowując, dane uzyskane w niniejszej pracy wskazują na obecność błonowych receptorów P4 typu PGRMC i mPR w łożysku krowy oraz ich udział w pozagenomowym wpływie P4 w tej tkance. Ponadto, wyniki wskazują na wpływ steroidów na regulację ekspresji receptorów błonowych typu mPR. Wykazano, że P4 może regulować ekspresję receptorów mPR β i mPR γ zarówno na drodze genomowej, jak i pozagenomowej. Stwierdzono także stymulujący wpływ TNF α na ekspresję mRNA mPR α oraz TGF β na ekspresję mRNA mPR γ w łożysku krowy. Brak wpływu steroidów na ekspresję PGRMC1 oraz PGRMC2, a także pozostałych badanych cytokin i czynników wzrostu na ekspresję błonowych receptorów P4 wskazuje na większą złożoność procesów regulacyjnych oraz ich zależność od jednoczesnego działania wielu różnych czynników. Niezbędne są zatem dalsze badania, które pozwolą określić czynniki regulujące ekspresję genów PGRMC1, PGRMC2 oraz mPR α , mPR β i mPR γ w układzie rozrodczym samicy oraz wyjaśnią mechanizmy regulujące procesy fizjologiczne zachodzące pod wpływem pozagenomowego działania P4 w macicy i łożysku. Pozwoli to lepiej zrozumieć podłoże zmian fizjologicznych i patologicznych zachodzących w układzie rodny samicy w czasie cyklu rujowego oraz ciąży.



Ryc. 29. Schemat podsumowujący wyniki uzyskane w niniejszej pracy:

A. Wpływ steroidów: progesteronu (P4) i estradiolu (E2) oraz czynnika martwicy nowotworu α (TNF α) na ekspresję genu błonowego receptora mPR α . B. Wpływ P4 na ekspresję genu błonowego receptora mPR β . C. Wpływ steroidów: P4 i E2 oraz i transformującego czynnika wzrostu β (TGF β) na ekspresję genu błonowego receptora mPR γ . D. Wpływ czynników modulujących działanie P4: inhibitora PGRMC1 - AG205, inhibitora jądrowego receptora P4 - mifepristonu (RU486) oraz koniugatu P4-BSA na ekspresję genu błonowego receptora mPR β i mPR γ w skrawkach łożyska krowy w II trymestrze ciąży.

WNIOSKI

1. Geny błonowych receptorów progesteronu: PGRMC1, PGRMC2, mPR α , mPR β i mPR γ ulegają ekspresji w tkance endometrium, kosmówki gładkiej i placentomów łożyska krwi w drugim trymestrze ciąży.
2. Białka błonowych receptorów progesteronu: PGRMC1, PGRMC2, mPR α , mPR β i mPR γ ulegają ekspresji zarówno w części maczynnej, jak i płodowej łożyska krwi w drugim trymestrze ciąży.
3. Steroidy oraz zastosowane w badaniach cytokiny i czynniki wzrostu nie mają wpływu na ekspresję błonowych receptorów progesteronu: PGRMC1 i PGRMC2.
4. Progesteron i estradiol regulują ekspresję genów błonowych receptorów mPR w placentomach łożyska krwi w drugim trymestrze ciąży, przy czym progesteron może regulować ekspresję mPR β i mPR γ zarówno na drodze genomowej i pozagenomowej.
5. Czynniki martwicy nowotworu α stymuluje ekspresję genu błonowego receptora mPR α w placentomach łożyska krwi w drugim trymestrze ciąży.
6. Transformujący czynnik wzrostu β stymuluje ekspresję genu błonowego receptora mPR γ w placentomach łożyska krwi w drugim trymestrze ciąży.

LITERATURA

1. Ahmed I.S., Rohe H.J., Twist K.E., Mattingly M.N., Craven R.J. 2010. Progesterone Receptor Membrane Component 1 (Pgrmc1): A Heme-1 Domain Protein That Promotes Tumorigenesis and Is Inhibited by a Small Molecule. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 333: 564-573.
2. Albrecht E.D., Pepe G.J. 2010. Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy. *Int. J. Dev. Biol.*, 54 (2-3): 397-408.
3. Amsterdam A., Keren-Tal I., Aharoni D., Dantes A., Land-Bracha A., Rimón E., Sasson R., Hirsh L. 2003. Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary. *Steroids*, 68: 861–867.
4. Aparicio I.M., Garcia-Herreros M., O'Shea L.C., Hensey C., Lonergan P., Fair T. 2011. Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol. Reprod.*, 84: 910–921.
5. Arosh J.A., Banu S.K., Chapdelaine P., Fortier M.A. 2004. Tissue-specific expression of prostaglandin receptors EP2, Ep3, Ep4, FP, and cyclooxygenase 1 and 2 in uterus and fetal membranes during bovine pregnancy. *Endocrinology*, 145(1): 407-417.
6. Ashley R.L., Clay C.M., Farmerie T.A., Niswender G.D., Nett T.M. 2006. Cloning and characterization of an ovine intracellular seven transmembrane receptor for progesterone that mediates calcium mobilization. *Endocrinology*, 147: 4151–4159.
7. Baghi M.K., Tsai M.J., Omalley B.W., Tsai S.Y. 1992. Analysis of the mechanism of steroid hormone receptor-dependent gene activation in cell-free systems. *Endocrinol. Rev.*, 13: 525-535.
8. Bairagi S., Grazul-Bilska A.T., Borowicz P.P., Reyaz A., Valkov V., Reynolds L.P. 2018. Placental development during early pregnancy in sheep: progesterone and estrogen receptor protein expression. *Theriogenology*, 114: 273-284.
9. Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M.S., Brem H., Tomic-Canic. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Rep. Reg.*, 16: 585-601.
10. Baullieu, E.E. 1989. Contragestion and other clinical applications of the RU486, an antiprogesterone at the receptor. *Science*, 245: 1351–1357.
11. Beyer N.M., Kowalik M.K., Kowalewski M.P., Boos A. 2017. Membrane bound progesterone receptors in the bovine uterine wall and placentome. *Reprod. Dom. Anim.*, 52(1): 10.

12. Bielańska-Osuchowska Z. 2001. Embriologia. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa, 403-459.
13. Bishop C.V. 2013. Progesterone inhibition of oxytocin signaling in endometrium. *Front. Neurosci.*, 7: 138.
14. Bogacki M., Silvia W.J., Rękawiecki R., Kotwica J. 2002. Direct inhibitory effect of progesterone on oxytocin-induced secretion of prostaglandin F2 α from bovine endometrial tissue. *Biol. Reprod.*, 67: 184–188.
15. Boos A., Kohtes J., Janssen V., Mulling C., Stelljes A., Zerbe H., Hassig M., Thole H.H. 2006. Pregnancy effect on distribution of progesterone receptors, oestrogen receptor alpha, glucocorticoid receptors, Ki-67 antigen and apoptosis in the bovine interplacentomal uterine wall and foetal membranes. *Anim. Reprod. Sci.*, 91(1-2): 55-76.
16. Bramley T. 2003. Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction*, 125: 3-15.
17. Brosens J.J., Tullet J., Varschochi R., Lam E. W.F. 2004. Steroid receptor action. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, 18(2): 265-283.
18. Bunch K., Tinnemore D., Huff S., Hoffer Z.S., Burney R.O., Stallings J.D. 2014. Expression patterns of progesterone receptor membrane components 1 and 2 in endometria from women with and without endometriosis. *Reprod. Sci.*, 21(2): 190-197.
19. Bunma T., Vonnahme K.A., Vasquez-Hidalgo M.A., Swanson K.C., Dorsam S.T., Ward A.K., Navanukrav C., Grazul-Bilska A.T. 2020. Nuclear and membrane progesterone receptors expression in placenta from early to late pregnancy in sheep: Effects of restricted nutrition and realimentation. *Theriogenology*, 148: 95-102.
20. Burger K., Fahrenholz F., Gimpl G. 1999. Non-genomic effect of progesterone on the signaling function of G protein – coupled receptors. *FEBS Lett.*, 464: 25-29.
21. Cahill M.A. 2007. Progesterone receptor membrane component 1: An integrative review. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 150: 16-36.
22. Cai Z., Stocco C. 2005. Expression and regulation of progestin membrane receptors in the rat corpus luteum. *Endocrinology*, 146: 5522-5532.
23. Cassatella M.A. 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today*, 16 (1): 21-26.
24. Cato A.C.B., Nesti A., Mink S. 2000. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Science's STKE*, 138: 9-20.

25. Charles N.J., Thomas P., Lange C.A. 2010. Expression of membrane progesterone receptors (mPR/PAQR) in ovarian cancer cells: implications for progesterone – induced signaling events. *Horm. Cancer.*, 1(4): 167-176.
26. Chegini N., Zhao Y., Williams R.S., Flanders K. 1994. Human uterine tissue throughout the menstrual cycle expresses transforming growth factor-b1 (TGF-b1), TGF-b2, TGF-b3, and TGF-b type II receptor Messenger ribonucleic acid and protein and contains [125I]TGF-b1-binding sites. *Endocrinology*, 135: 439–449.
27. Chen H.L., Yang Y.P. Hu X.L., Yelavarthi K.K., Fishback J.L., Hunt J.S. 1991. Tumor necrosis factor alpha mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation. *Am. J. Pathol.*, 139(2): 327-335.
28. Chomczyński P., Sachhi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162(1): 156-159.
29. Chow R.W., Handelsman D.J., Ng M.K. 2010. Minireview: rapid actions of sex steroids in the endothelium. *Endocrinology*, 151: 2411-2422.
30. Clark D.A., Flanders K.C., Banwatt D., Millar-Book W., Manuel J., Stedronska-Clark J., Rowley B. 1990. Murine pregnancy produces a unique immunosuppressive molecule related to transforming growth factor-b2. *J. Immunol.*, 144: 3008–3014.
31. Clark J.D., Lin L.L., Kriz R.W., Ramesha C.S., Sultzman L.A., Lin A.Y., Milton N., Knopf J.L. 1991. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca (2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*, 65: 1043-1051.
32. Clark J.D., Schievella A.R., Nalefski E.A., Lin L.L. 1995. Cytosolic phospholipase A₂. *J. Lipid Mediat. Cell signal.*, 12:83-117.
33. Conneely O.M. 2001. Perspective: female steroid hormone action. *Endocrinology*, 142: 2194-2199.
34. Csapo A. 1956. Progesterone block. *Am. J. Anat.*, 98(2): 273-291.
35. Cui J., Shen Y., Li R. 2013. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol. Med.*, 19(3): 197-209.
36. Davies C.J., Fisher P.J., Schlafer D.H. 2000. Temporal and regional regulation of major histocompatibility complex class I expression at the bovine uterine/placental interface. *Placenta*, 21: 194-202.
37. Day Y., Ivell R., Liu X., Janowski D., Anand-Ivell R. 2017. Relaxin-family peptide receptors 1 and 2 are fully functional in the bovine. *Front. Physiol.*, 8: 359.

38. Demir R., Yaba A., Huppertz B. 2010. Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. *Acta Histochem.*, 112(3): 203-214.
39. Diaugustine R.P., Petrusz P., Bell G.I., Brown C.F., Korach K.S., McLachlan J.A., Teng C.T. 1988. Influence of estrogens on mouse uterine epidermal growth factor precursor protein and Messenger ribonucleic acid. *Endocrinology*, 122: 2355-2363.
40. Diep C.H., Daniel A.R., Mauro L. J., Knutson T.P., Lange C.A. 2015. Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *J. Mol. Endocrinol.*, 54 (2): 31-53.
41. Dressing G.E., Goldberg J.E., Charles N.J., Schwertfeger K.L., Lange C.A. 2011. Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues; a review of regulation and physiological implications. *Steroids*, 76(1-2): 11-17.
42. Dressing G.E., Alyea R., Pang Y., Thomas P. 2012. Mambrane progesterone receptors (mPRs) mediate progestin induced antimorbidity in breast cancer cells and are expressed in human breast tumors. *Horm. cancer*, 3(3): 101-112.
43. Druckmann R., Druckmann M.A. 2005. Progesterone and the immunology of pregnancy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 97(5): 389-396.
44. Duras M., Młynarczyk J., Kotwica J. 2005. Non-genomic effect of steroids on oxytocin-stimulated intracellular mobilization of calcium and on prostaglandin F₂ α and E₂ secretion from bovine endometrial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 76: 105-116.
45. Eley R.M., Thatcher W.W., Bazer F.W. 1979. Hormonal and physical changes associated with bovine conceptus development. *J. Reprod. Fertil.*, 55: 181-190.
46. Engmann L., Losel R., Wehling M., Peluso J. J. 2006. Progesterone regulation of human granulosa/luteal cell viability by an RU486-independent mechanism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 91: 4962-4968.
47. Estergreen V.L., Frost O.L., Gomes W.R., Erb R.E., Bullard J.F. 1967. Effect of ovariectomy on pregnancy maintenance and parturition in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 50:1293-1295.
48. Falkenstein E., Meyer C., Eisen C., Scriba P.C., Wehling M. 1996. Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 229(1): 86-89.
49. Falkenstein E., Tillmann H.C., Christ M., Feuring M., Wehling M. 2000. Multiple actions of steroid hormones – a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological Rev.*, 52: 513-555.

50. Fernandes M.S., Pierron V., Michalovich D., Astle S., Thornton S., Peltoketo H., Lam E., Gellersen B., Huhtaniemi I., Allen J., Brosens J.J. 2005. Regulated expression of putative membrane progesterin homologues in human endometrium and gestational tissues. *J. Endocrinol.*, 187: 89-101.
51. Formby B. 1995. Immunologic response in pregnancy. Its role in endocrine disorders of pregnancy and influence on the course of maternal autoimmune diseases. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, 24(1): 187-205.
52. Franczak A., Kotwica G. 2008. Secretion of estradiol-17 β by porcine endometrium and miometrium during early pregnancy and luteolysis. *Theriogenology*, 69: 283-289.
53. Freedman L.P. 1992. Anatomy of the steroid Receptor Zinc Finger Region. *Endocrine Rev.*, 13(2): 129-145.
54. Friden B.E., Runesson E., Hahlin M., Brannstrom M. 2000. Evidence for nitric oxide acting as a luteolytic factor in the human corpus luteum. *Mol. Hum. Reprod.*, 6(5): 397-403.
55. Gaetjens E., Pertschuk L.P. 1980. Synthesis of fluorescein labelled steroid hormone-albumin conjugates for the fluorescent histochemical detection of hormone receptors. *J. Steroid Bioche.*, 13:1001–1003.
56. Gellersen B., Fernandes M.S., Brosens J.J. 2009. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Human Reprod. Update*, 15 (1): 119-138.
57. Giangrande P.H., Pollio G., McDonnell D.P. 1997. Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J. Biol. Chem.*, 272: 32889-32900.
58. Gimpl G., Fahrenholz F. 2002. Cholesterol as stabilizer of the oxytocin receptor. *Bioch. Biophys. Acta*, 1564: 384-392.
59. Godkin J.D., Dore J.J.E. 1998. Transforming growth factor β and the endometrium. *Rev. Reprod.*, 3:1-6.
60. Goff A.K. 2004. Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. *Biol. Reprod.*, 71: 11-16.
61. Goldman S., Shalev E. 2007. Progesterone receptor profile in the decidua and fetal membrane. *Front. Biosci.*, 12: 634-648.
62. Graham C.H., Lala P.K. 1991. Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. *J. Cell. Physiol.*, 148: 228-234.

63. Graham C.H., Lysiak J.J., McCrae K.R., Lala P.K. 1992. Localization of transforming growth factor β at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. *Biol. Reprod.*, 46: 561-572.
64. Graham J.D., Clarke C.L. 1997. Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocrine Rev.*, 18 (4): 502-519.
65. Grazzini E., Guillon G., Mouillac B., Zingg H. H. 1998. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature*, 392: 509-512.
66. Gross T.S., Willimas W.F. 1988. Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cell synthesis as modulated by binucleate cell. *Biol. Reprod.*, 38(5): 1027-1034.
67. Halasz M., Szekeres-Bartho J. 2013. The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *J. Reprod. Immunol.*, 97: 43-50.
68. Ham J., Thomson A., Needham M., Webb P., Parker M. 1988. Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumour virus. *Nucleic Acids Res.*, 16: 5263–5276.
69. Heap R.B. 1994. Paracrine and autocrine functions of the placenta: a key to the success of viviparity? *Exp. Clin. Endocrinol.*, 102(3): 262-268.
70. Hoffman L.H., Wooding F.B.P. 1993. Giant and binucleate trophoblast cells of mammals. *J. Exp. Zool.*, 266: 559–577.
71. Hoffmann B., Goes de Pinho T., Schuler G. 1997. Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.*, 105: 296-303.
72. Howles C.M. 2000. Role of LH and FSH in ovarian function. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 161: 25-30.
73. Hughes A.L., Powell D.W., Bard M., Eckstein J., Barbuch R., Link A.J., Espenshade P.J. 2007. DAP1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes. *Cell Metab.*, 5 (2): 143-149.
74. Hunt J.S., Chen H.L., Hu X.L., Chen T.Y., Morrison D.C. 1992. Tumor necrosis factor alpha gene expression in the tissues of normal mice. *Cytokine*, 4(5): 340-346.
75. Hunt J.S. 1993. Endocrine regulation of tumor necrosis factor α . *Reprod. Fertil. Dev.*, 5: 141-148.
76. Hunt J.S., Chen H.L., Miller L. 1996. Tumor Necrosis Factors: Pivotal Components of Pregnancy? *Biol. Reprod.*, 54(3): 554-562.

77. Jainudeen M.R., Hafez E.S.E. 1980. Gestation, prenatal physiology and parturition. In: Hafez ESE, editor. Reproduction in farm animals. Lea & Febiger. Philadelphia, 207-213 ss.
78. Janowski T., Zduńczyk S. 1995. Aktualne poglądy na syntezę estrogenów w łożysku oraz ich rolę w hormonalnej regulacji porodu u krów. *Med. Wet.*, 51: 578–580.
79. Jiang H., Whitworth K.M., Bivens N.J., Ries J.E., Woods R.J., Forrester L.J., Springer G.K., Mathialagan N., Agca C., Prather R.S., Lucy M.C. 2004. Large-scale generation and analysis of expressed sequence tags from porcine ovary. *Biol. Reprod.*, 71: 1991-2002.
80. Johnson W.H., Manns J.G., Adams W.M., Mapletoft R.J. 1981. Termination of pregnancy with cloprostenol and dexamethasone in intact or ovariectomized cows. *Can. Vet. J.*, 22: 288-290.
81. Jura Cz., Klag J. 2005. Podstawy embriologii zwierząt i człowieka. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, 294-305.
82. Karteris E., Zervou S., Pang Y., Dong J., Hillhouse E.W., Randeva H.S., Thomas P. 2006. Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Mol. Endocrinol.*, 20: 1519–1534.
83. Kastner P., Krust A., Turcotte B., Stropp U., Tora L., Gronemeyer H., Chambon P. 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.*, 9: 1603-1614.
84. Keator C.S., Mah K., Slayden O.D. 2012. Alterations in progesterone receptor membrane component 2 (PGRMC2) in the endometrium of macaques afflicted with advanced endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.*, 18: 308-319.
85. Kim J.J., Chapman-Davis E. 2010. Role of progesterone in endometrial cancer. *Semin Reprod. Med.*, 28(1): 81-90.
86. Kim J.J., Kurita T., Bulin S.E. 2013. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr. Rev.*, 34(1): 130-162.
87. Klein-Hitpass L., Cato A.C., Henderson D., Ryffel G.U. 1991. Two types of antiprogestins identified by their differential action in transcriptionally active extracts from T47D cells. *Nucleic. Acids. Res.*, 19: 1227–1234.
88. Kovar V., Charvat J., Sarudy L. 1985. Położnictwo i unasienianie zwierząt. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa, 39-47.

89. Kowalik M.K., Słonina D., Kotwica J. 2009. Genomic and non-genomic effect of progesterone (P4) and pregnenolone (P5) on the function of bovine endometrial cells. *Vet. Med.-Czech*, 54: 205–214.
90. Kowalik M.K., Słonina D., Rękawiecki R., Kotwica J. 2013. Expression of progesterone receptor membrane component (PGRMC) 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1 (SERBP1) and nuclear progesterone receptor (PGR) in the bovine endometrium during the estrus cycle and first trimester of pregnancy. *Reprod. Biol.*, 13: 15-23.
91. Kowalik M.K., Rękawiecki R., Kotwica J. 2013b. The putative roles of nuclear and membrane-bound progesterone receptors in the female reproductive tract. *Reprod. Biol.*, 13 (4): 279-289.
92. Kowalik M.K., Rękawiecki R., Kotwica J. 2014. Expression and localization of progesterone receptor membrane component (PGRMC) 1 and 2 and serpine mRNA binding protein 1 (SERBP1) in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and the first trimester of pregnancy. *Theriogenology*, 82: 1086-1093.
93. Kowalik M.K., Rękawiecki R., Kotwica J. 2015. Messenger RNA expression and protein localization of membrane progestin receptors α , β and γ in the bovine endometrium and myometrium during the estrous cycle. *Reprod. Dom. Anim.*, 50 (Suppl. 1): 1-77.
94. Kowalik M.K., Martyniak M., Rękawiecki R., Kotwica J. 2016. Expression and immunolocalization of membrane progesterone receptors in the bovine oviduct. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 55: 83-96.
95. Kowalik M.K., Dobrzyn K., Rękawiecki R., Kotwica J. 2019. Expression of membrane progestin receptors (mPRs) α , β and γ in the bovine uterus during the oestrous cycle and pregnancy. *Theriogenology*, 140: 171-179.
96. Krebs C.J., Jarvis E.D., Chan J., Lydon J.P., Ogawa S., Pfaff D.W. 2000. A membrane-associated progesterone-binding protein, 25-Dx, is regulated by progesterone in brain regions involved in female reproductive behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 97: 12816–12821.
97. Krzymowski T., Przała J. 2005. *Fizjologia zwierząt*. Państwowe wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa, 658-659, 662-669.
98. Kwack K., Lynch R.G. 1999. A new Non-radioactive Method for IL-2 Bioassay. *Mol. Cells*, 10(5):575-578.

99. Lachowicz-Ochędalska A. 2005. Membrane receptors for estradiol – new way of biological action. *End. Pol.*, 3: 322-326.
100. Leidl W., Heigner D., Rockel P. 1980. Investigations on the PGF₂ α concentrations in maternal and fetal cotyledons of cows with and without retained fetal membranes. *Zbl. Vet. Med. A.*, 27: 691-696.
101. Leonhardt S.A., Boonyaratanakornkit V., Edwards D.P. 2003. Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanism. *Steroids*, 68: 761-770.
102. Lösel R., Dorn-Beineke A., Falkenstein E., Wehling M., Feuring M. 2004. Porcine spermatozoa contain more than one membrane progesterone receptor. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 36:1532–1541.
103. Lösel R., Breiter S., Seyfert M., Wehling M., Falkenstein E. 2005. Classic and non-classic progesterone receptors are both expressed in human spermatozoa. *Horm. Metab. Res.*, 37: 10-14.
104. Luciano A. M., Corbani D., Lodde V., Tessaro L., Franciosi F., Peluso J. J., Modina S. 2011. Expression of progesterone receptor membrane component-1 in bovine reproductive system during estrous cycle. *Eur. J. Histochem.*, 55 (3): e27.
105. MacLean M.R., Templeton A.G.B., McGrath J.C. 1992. The influence of endothelin-1 on human foeto-placental blood vessels: a comparison with 5-hydroxytryptamine. *Br. J. Pharmacol.*, 106: 937-941.
106. Madore E., Harvey N., Paernt J., Chapdelaine P., Arosh J.A., Fortier M.A. 2003. An aldose reductase with 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin F₂ α in the bovine endometrium. *J. Biol. Chem.*, 278: 11205-11212.
107. Magness R.R., Huie J.M., Hoyer G.L., Huecksteadt T.P., Reynolds L.P., Seperich G.J., Whysong G., Weems C.W. 1981. Effect of chronic ipsilateral or contralateral intrauterine infusion of prostaglandin E₂ (PGE₂) on luteal function of unilaterally ovariectomized ewes. *Prostaglandins Med.*, 6(4): 389-401.
108. Massague J. 1990. The transforming growth factor- β family. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 6: 597-641.
109. McRae R.S., Johnson H.M., Mim M., O'Shaughnessy P.J. 2005. Changes in Mouse granulosa cell gene expression during early luteinization. *Endocrinology*, 146: 309-317.
110. McCracken J.A., Custer E.E., Lamsa J.C. 1999. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.*, 79: 263-323.

111. Meng Y., Murtha A.P., Feng L. 2016. Progesterone, inflammatory cytokine (TNF- α), and oxidative stress (H₂O₂) regulate progesterone receptor membrane component I expression in fetal membrane cells. *Reprod. Sci.*, 23: 1168-1178.
112. Messinis I.E. 2006. From menarche to regular menstruation: endocrinological background. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1092: 49-56.
113. Meyer M.E., Quirin-Stricker C., Lerouge T., Bocquel M.T., Gronemeyer H. 1992. A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the human progesterone receptor isoforms. *J. Biol. Chem.*, 267: 10882-10887.
114. Meyer H.H. 1994. Luteal versus placental progesterone: the situation in the cow, pig and bitch. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 102: 190-192.
115. Meyer C., Schmid R., Scriba P.C., Wehling M. 1996. Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *Eur. J. Biochem.*, 239: 726-731
116. Minshall R.D., Pavcnik D, Browne D.L., Hermsmeyer K. 2002. Nongenomic vasodilator action of progesterone on primate coronary arteries. *J. Appl. Physiol.*, 92(2): 701-708.
117. Mitchell B.F., Taggart M.J. 2009. Are animal models relevant to key aspects of human parturition? *Am J Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 297: R525-545.
118. Monkkonen K.S., Aflatoonian R., Lee K.F., Yeung W.S.B., Tsao S.W., Laitinen J.T., Fazeli A. 2007. Hormonal regulation of Galphai2 and mPRalpha in immortalized human oviductal cell line OE-E6/E7. *Mol. Hum. Reprod.*, 13(12): 845-851.
119. Mordak R. 2011. Zatrzymanie błon płodowych u krów w zależności od przebiegu porodu oraz zastosowania dimeru lizozymu po wyparciu płodu. *Współczesne problemy medycyny weterynaryjnej*. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Wrocław, 9-12.
120. Moses H.L., Coffey R.J. Jr, Leof E.B., Lyons R.M., Keski-Oja J. 1987. Transforming growth factor beta regulation of cell proliferation. *J. Cell Physiol.*, 5: 1-7
121. Mulac-Jericevic B., Mullinax R.A., DeMayo F. J., Lydon J P., Conneely O.M. 2000. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science*, 289: 1751–1754.
122. Mulac-Jericevic B., Lydon J.P., DeMayo F.J., Conneely O.M. 2003. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 9744-9749.

123. Mulac-Jericevic B., Connneely O.M. 2004. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction*, 128: 139-146.
124. Munson L., Wilhite A., Boltz V.F., Wilkinson J.E. 1996. Transforming growth factor β in bovine placentas. *Biol. Reprod.*, 55: 748-755.
125. Murakami S., Miyamoto Y., Skarzynski D.J., Okuda K. 2001. Effects of tumor necrosis factor-alpha on secretion of prostaglandins E2 and F2alpha in bovine endometrium throughout the estrous cycle. *Theriogenology*, 55(8): 1667-1678.
126. Nathan J.C., Thomas P., Lange C.A. 2010. Expression of membrane progesterone receptors (mPR/PAQR) in ovarian cancer cells: implications for progesterone-induced signaling events. *Horm. Cancer.*, 1 (4): 167-176.
127. Neubauer H., Clare S.E., Wozny W., Schwall G.P., Poznanovie S., Stegmann W., Vogel U., Sotlar K., Wallwiener D., Kurek R., Fehm T., Hafill M.A. 2008. Breast cancer proteomics reveals correlation between estrogen receptor status and differential phosphorylation of PGRMC1. *Breast. Cancer. Res.*, 10(5): R85.
128. Niswender G.D., Juengel J.L., Mcguire W.J., Belfiore C.J., Wiltbank M.C. 1994. Luteal Function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.*, 50: 239-247.
129. Niswender G.D., Nett T.M. 1988. The corpus luteum and its control. *The Physiology of Reproduction*, 489-525.
130. Niswender G.D., Juengel J.L., Silva P.J., Rollyson M.K., McIntush E.W. 2000. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. *Physiol. Rev.*, 80 (1).
131. Niswender G.D. 2002. Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*, 123: 333-339.
132. Nutu M., Weijdega B., Thomas P., Thurin-Kjellberg A., Billig H., Larsson D.G.J. 2009. Distribution and hormonal regulation of membrane progesterone receptors β and γ in ciliated epithelial cells of mouse and human fallopian tubes. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 7: 89.
133. O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.*, 267: 5421-5426.
134. Okuda K., Miyamoto Y., Skarzynski D.J. 2002. Regulation of endometrial prostaglandin F(2alpha) synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 23(1-2): 255-264.

135. Pang Y., Dong J., Thomas P. 2013. Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors δ and (epsilon) (mPR δ and mPR(epsilon)) and mPR δ involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis. *Endocrinology*, 154(1): 283-295.
136. Pedroza D.A., Rajamanickam V., Subramani R., Bencomo A., Galvez A., Lakshmanaswamy R. 2020. Progesterone receptor membrane component 1 promotes the growth of breast cancer by altering the phosphoproteome and augmenting EGFR/PI3K/AKT signalling. *Br. J. Cancer.*, 123: 1326-1335.
137. Peluso J.J., Pappalardo A. 1998. Progesterone mediates its anti-mitogenic and anti-apoptotic actions in rat granulosa cells through a progesterone-binding protein with gamma aminobutyric acid receptor-like features. *Biol. Reprod.*, 58: 1131-1137.
138. Peluso J.J., Pappalardo A., Fernandez G., Wu C.A. 2004. Involvement of an unnamed protein, RDA288, in the mechanism through which progesterone mediates its antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells. *Endocrinology*, 145: 3014-3022.
139. Peluso J.J., Pappalardo A., Losel R., Wehling M. 2005. Expression and function of PAIRBP1 within gonadotropin-primed immature rat ovaries: PAIRBP1 regulation of granulosa and luteal cell viability. *Biol. Reprod.*, 73: 261-270.
140. Peluso J.J. 2006. Multiplicity of progesterone's actions and receptors in the mammalian ovary. *Biol. Reprod.*, 75: 2-8.
141. Peluso J.J., Pappalardo A., Losel R., Wehling M. 2006. Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action. *Endocrinology*, 147: 3133–3140.
142. Peluso J.J., Pru J.K. 2014. Non-canonical progesterone signaling in granulosa cell function. *Reproduction*, 147 (5): 169-178.
143. Pepe G.J., Albrecht E.D. 1999. Regulation of functional differentiation of the placental villous syncytiotrophoblast by estrogen during primate pregnancy. *Steroids*, 64: 624-627.
144. Perrot-Applanat M, Deng M, Fernandez H, Lelaidier C, Meduri G, Bouchard P. 1994. Immunohistochemical localization of estradiol and progesterone receptors in human uterus throughout pregnancy: expression in endometrial blood vessels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 78: 216-224.

145. Pollard J.W. 1990. Regulation of polypeptide growth factor synthesis and growth factor-related gene expression in the rat and mouse uterus before and after implantation. *J. Reprod. Fert.*, 88: 721-731.
146. Pratt B.R., Butcher R.L., Inskeep E.K. 1977. Antiluteolytic effect of the conceptus and of Pge2 in ewes. *J. Anim. Sci.*, 45(4): 784-791.
147. Pru J.K., Clark N.C. 2013. PGRMC1 and PGRMC2 in uterine physiology and disease. *Front. Neurosci.*, 7:168.
148. Qiu H.B., Lu S.S., Ji K.L., Song X.M., Lu Y.Q., Zhang M., Lu K.H. 2008. Membrane progesterin receptor beta (mPR-beta): a protein related to cumulus expansion that is involved in in vitro maturation of pig cumulus-oocyte complexes. *Steroids*, 73 (14): 1416-1423.
149. Ramirez R.J., Gibson M., Kalenic J., Einzig S., Omar H.A. 1998. In vitro vascular relaxation to progesterone and its metabolites in human umbilical and placental blood vessels. *J. Matern. Fetal. Investig.*, 8: 61-65.
150. Ramirez V.D., Kipp J.L., Joe I. 2001. Estradiol, in the CNS, targets several physiologically relevant membrane-associated proteins. *Brain. Res. Rev.*, 37: 141-152.
151. Reinhart K.C., Dubey R.K., Cometti B., Keller P.J., Rosselli M. 2003. Differential effects of natural and environmental estrogens on endothelin synthesis in bovine oviduct cells. *Biol. Reprod.*, 68:1430-1436.
152. Reynolds L.P., Haring J.S., Johnson M.L., Ashley R.L., Redmer D.A., Borowicz P.P., Grazul-Bilska A.T. 2015. Placental development during early pregnancy in sheep: estrogen and progesterone receptor messenger RNA expression in pregnancies derived from in vivo-produced and in vitro-produced embryos. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 53: 60-69.
153. Rill R.L., Hecker K.H. 1996. Sequence-specific actinomycin D binding to single-stranded DNA inhibits HIV reverse transcriptase and other polymerases. *Biochemistry*, 35: 3525–3533.
154. Robertson S.A., Brännström M., Seamark R.F. 1992. Cytokines in rodent reproduction and the cytokine-endocrine interaction. *Curr. Opin. Immunol.*, 4(5): 585-590.
155. Robertson S.A., Seamark R.F., Guilbert L.J., Wegmann T.G. 1994. The role of cytokines in gestation. *Crit. Rev. Immunol.*, 14: 239-292.

156. Romanowska-Prochnicka K., Felis-Giemza A. 2021. The role of TNF- α and anti-TNF- α agents during preconception, pregnancy, and breastfeeding. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(6): 2922.
157. Romero R., Espinoza J., Goncalves L.F., Kusanovic J.P., Friel L., Hassan S. 2007. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin. Reprod. Med.*, 25(1): 21-39.
158. Saint-Dizier M., Sandra O., Ployart S., Chebrouit M., Constant F. 2012. Expression of nuclear progesterone receptor and progesterone receptor membrane components 1 and 2 in the oviduct of cycling and pregnant cows during the postovulation period. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 10: 76.
159. Salisbury G.W., VanDemark N.L. 1961. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. San Fransisco (& London): W.H. Freeman and Company.
160. Sartorius C.A., Melville M.Y., Hovland A.R., Tung L., Takimoto G.S., Horwitz K. B. 1994. A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol. Endocrinol.*, 8: 1347-1360.
161. Sasson R., Rimon E., Dantes A. 2004. Gonadotrophin-induced gene regulation in human granulose cells obtained from IVF patients. Modulation of steroidogenic genes, cytoskeletal genes and genes coding for apoptotic signaling and protein kinases. *Mol. Hum. Reprod.*, 10: 299-311.
162. Sawyer G.J., Fulkerson W.J., Martin G.B., Gow C. 1986. Artificial induction of lactation in cattle: initiation of lactation and estrogen and progesterone concentrations in milk. *J. Dairy Sci.*, 69(6): 1536-1544.
163. Schams D., Kohlenberg S., Amselgruber W., Berisha B., Pfaffl M.W., Sinowatz F. 2003. Expression and localization of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. *J. Endocrinol.*, 177(2): 305-317.
164. Schlafer D.H. 2002. Bovine Placental Development, Anatomy and Pathology: Before and After Birth *Cattle Pract.*, 10: 2–6.
165. Schuler G., Wirth Ch., Klisch K., Pfarrer Ch., Leiser R., Hoffmann B. 1999. Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid an late gestation and at parturition. *Biol. Reprod.*, 61(3): 797-801.

166. Schuler G., Wirth C., Klish K., Failing K., Hoffmann B. 2000. Characterization of proliferative activity in bovine placentomes between day 150 and parturition by quantitative immunohistochemical detection of Ki67-antigen. *Reprod. Domest. Anim.*, 35(3-4): 157-162.
167. Schuler G., Furbass R., Klisch K. 2018. Placental contribution of the endocrinology of gestation and parturition. *Anim. Reprod.*, 15 (Suppl. 1): 822-842.
168. Schumacher M., Corini H., Robert F., Guennoun R., El-Etr M. 1999. Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behavior. *Behav. Brain. Res.*, 105: 37-52.
169. Simoncini T., Genazzani A.R. 2003. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur. J. Endocrinol.*, 148: 281-292.
170. Simoncini T., Mannella P., Fornari L., Caruso A., Willis M.Y., Garibaldi S., Baldacci C., Genazzani A.R. 2004. Differential signal transduction of progesterone and medroxyprogesterone acetate in human endothelial cells. *Endocrinology*, 145(12): 5745-56.
171. Singh M., Su C., Ng S. 2013. Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain. *Front. Neurosci.*, 7: 159.
172. Sinreih M., Knific T., Thomas P., Grazio S.F., Rizner T.L. 2018. Membrane progesterone receptors β and γ have potential as prognostic biomarkers of endometrial cancer. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 178: 303-311.
173. Sirois J., Sayasith K., Brown K.A., Stock A.E., Bouchard N., Dore M. 2004. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. *Hum. Reprod.*, Update 10: 373-385.
174. Skarżyński D.J., Bogacki M., Kotwica J. 1997. Changes in ovarian oxytocin secretion as an indicator of corpus luteum response to prostaglandin F(2 α) treatment in cattle. *Theriogenology*, 48(5): 733-742.
175. Skarżyński D.J., Okuda K. 1999. Sensitivity of corpora lutea to prostaglandin F2 α is dependent on progesterone, oxytocin and prostaglandins. *Biol. Reprod.*, 60: 1292-1298.
176. Skarżyński D.J., Jaroszewski J.J., Okuda K. 2001. Luteotropic mechanisms in the bovine corpus luteum: Role of oxytocin, prostaglandin F2 α , progesterone and noradrenaline. *J. Reprod. Dev.*, 47(3): 125-137.
177. Słomczyńska M. 1995. Receptory hormonów steroidowych. *Post. Biol. Kom.*, 22: 3-21.

178. Słonina D., Kowalik M.K., Kotwica J. 2012. Expression of progesterone receptor membrane component 1, serpine mRNA binding protein 1 and nuclear progesterone receptor isoforms α and β in the bovine myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *J. Reprod. Dev.*, 58 (3): 288–294.
179. Smith D.F., Toft D.O. 1993. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol.*, 7: 4-11.
180. Smith F. 2000. Chaperones in progesterone receptor complexes. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 11: 45-52.
181. Spencer T.E., Bazer F.W. 1995. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol. Reprod.*, 53(6): 1527-1543.
182. Spencer T.E., Bazer F.W. 2004. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. *J. Anim. Sci.*, 82: 4-13.
183. Stefano G.B. 2003. Estrogen genomic and nongenomic signaling process may really be working in harmony. *Neuroendocrinol. Letters*, 24: 128-129.
184. Stocco D.M. 2000. Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1486: 184-197.
185. Stocco C., Telleria C., Gibori G. 2007. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr. Rev.*, 28:117 -149.
186. Suchanek M., Radzikowska A., Thiele C. 2005. Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat. methods*, 2: 261-267.
187. Szereday L., Varga P., Szekeres-Bartho J. 1997. Cytokine production by lymphocytes in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 38: 418-422.
188. Tahir M.Z., Reynaud K., Grimard B., Thoumire S., Chastant-Maillard S., Saint-Dizier M. 2012. Expression of nuclear and membrane progesterone receptors in the canine oviduct during the periovulatory period. *Reprod. Fertil. Dev.*, 25(7): 1065-1076.
189. Terranova P.F., Hunter V.J., Roby K.F., Hunt J.S. 1995. Tumor necrosis factor α in the female reproductive tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 209(4): 325-342.
190. Terranova P.F. 1997. Potential roles of tumor necrosis factor α in follicular development, ovulation, and the life span of the corpus luteum. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 14(1): 1-15.

191. Thijssen J.H. 2005. Progesterone receptors in the human uterus and their possible role in parturition. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 97: 397-400.
192. Tora L., Gronemeyer H., Turcotte B., Gaub M.P., Chambon P. 1988. The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature*, 333: 185–188.
193. Wada K., Nomura S., Mori E., Kitamura Y., Nishizawa Y., Miyake A., Terada N. 1996. Changes in levels of mRNAs of transforming growth factor (TGF)-beta 1, beta 2, beta 3, TGF-beta type II receptor and sulfated glycoprotein-2 during apoptosis of mouse uterine epithelium. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 59: 367–375.
194. Wehling M. 1997. Specific nongenomic actions of steroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.*, 59: 365-393.
195. Wehling M., Lösel R.M. 2006. Non-genomic steroid hormone effects: membrane or intracellular receptors? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 102: 180-183.
196. Wehling M., Schultz A., Lösel R.M. 2007. To be or not to be (a receptor). *Steroids*, 72: 107-110.
197. Wei L.L., Miner R. 1994. Evidence for the existence of a third progesterone receptor protein in human breast cancer cell line T47D. *Cancer Res.*, 54: 340-343.
198. Wei L.L., Hawkins P., Baker C., Norris B., Sheridan P.L., Quinn P.G. 1996. An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity. *Mol. Endocrinol.*, 10: 1379-1387.
199. Wei L.L., Norris B.M., Baker C.J. 1997. An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR (B) but interferes in PR(B)-DNA binding. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 62: 287-297.
200. Wendler A., Wehling M. 2013. PGRMC2, a yet uncharacterized protein with potential as tumor suppressor, migration inhibitor, and regulator of cytochrome P450 enzyme activity. *Steroids*, 78 (6): 555-558.
201. Wierman M.E. 2007. Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Adv. Physiol. Educ.*, 31: 26-33.
202. Wijayagunawardane M.P., Miyamoto A., Sato K. 1999. Prostaglandin E2, prostaglandin F2 alpha and endothelin-1 production by cow oviductal epithelial cell monolayers: effect of progesterone, estradiol 17 beta, oxytocin and luteinizing hormone. *Theriogenology*, 52:791-801.

203. Wojciechowska A., Mlynarczyk J., Kotwica J. 2015. Short-term incubation of bovine placentome sections as a tool to study xenobiotic mechanism of action. *Reprod. Biol.*, 15:238–246.
204. Wojciechowska A., Mlynarczyk J., Kotwica J. 2017. Changes in the mRNA expression of structural proteins, hormone synthesis and secretion from bovine placentome sections after DDT and DDE treatment. *Toxicology*, 375: 1-9.
205. Wojciechowska A., Mlynarczyk J., Kotwica J. 2018. The protein expression disorders of connexins (Cx26, Cx32 and Cx43) and keratin 8 in bovine placenta under the influence of DDT, DDE and PCBs. *Prol. J. Vet. Sci.*, 21(4): 721-729.
206. Wooding F.B.P. 1992. Current Topic: The Synepitheliochorial Placenta of Ruminants. Binucleate Cell Fusions and Hormone Production. *Placenta*, 13, 101–113.
207. Wu W., Shi S.Q., Huang H.J., Balducci J., Garfield R.E. 2011. Changes in PGRMC1, a potential progesterone receptor, in human myometrium during pregnancy and labour at term and preterm. *Mol. Hum. Reprod.*, 17: 233–242.
208. Xie F., Xiao P., Chen D., Xu L., Zhang B. 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol. Biol.*, 80(1): 75-84.
209. Zachariades E., Mparmpakas D., Pang Y., Rand-Weaver M., Thomas P., Karteris E. 2012. Changes in placental progesterone receptors in term and preterm labour. *Placenta*, 33 (5): 367-372.
210. Zhang L., Kanda Y., Roberts D. J., Ecker J.L., Losel R., Wehling M., Peluso J.J., Pru J.K. 2008. Expression of progesterone receptor membrane component 1 and its partner serpine 1 mRNA binding protein in uterine and placental tissues of the mouse and human. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 287: 81–89.
211. Zhao S., Fernald R.D. 2005. Comprehensive algorithm for quantitative realtime polymerase chain reaction. *J. Comput. Biol.*, 12: 1047–1064.
212. Zhu Y., Bond J., Thomas P. 2003a. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (5): 2237–2242.
213. Zhu Y., Rice C.D., Pang Y., Pace M., Thomas P. 2003b. Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (5): 2231–2236.