

Zwrotny i lokalnie docelowy transfer macicznej PGE₂ w cyklu rujowym u świni

JOLANTA CHŁOPEK, MICHAŁ RADOMSKI, STANISŁAWA STEFAŃCZYK-KRZYMOWSKA

Zakład Lokalnych Regulacji Fizjologicznych Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN,
ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn

Chłopek J., Radomski M., Stefańczyk-Krzymowska S.

Retrograde and local destination transfer of uterine prostaglandin E₂ during the porcine oestrous cycle

Summary

The aim of the present study was to establish: a) whether PGE₂ can permeate from venous and lymphatic vessels of the mesometrium to arterial blood and be retrograde transferred to the uterine horn during the porcine oestrous cycle; and b) whether PGE₂ can reach the ovary and oviduct by local destination transfer. The experiments were performed on days 9-10 (middle luteal phase), 13-14 (initiation of luteolysis), 16-18 (follicular phase) of the oestrous cycle. [³H]PGE₂ at a total dose of 5.5×10^7 d.p.m. (49 ng) was infused into the most superficial layer of the myometrium under the serosa. The results demonstrated the permeation of PGE₂ from venous blood, uterine lymph and mesometrial tissues into arterial blood and its retrograde transfer into the uterine horn. The efficiency of retrograde transfer of prostaglandin to the uterine horn was high in all phases of the oestrous cycle, excluding the period of luteolysis. The local destination transfer of PGE₂ from the uterus to the ovary and oviduct was also demonstrated. The efficiency of local destination transfer of PGE₂ to the ovary was the highest in the middle luteal phase. The authors conclude that retrograde and local destination transfer of PGE₂ may enable effective access of this hormone to target organs and reduce its outflow with venous blood.

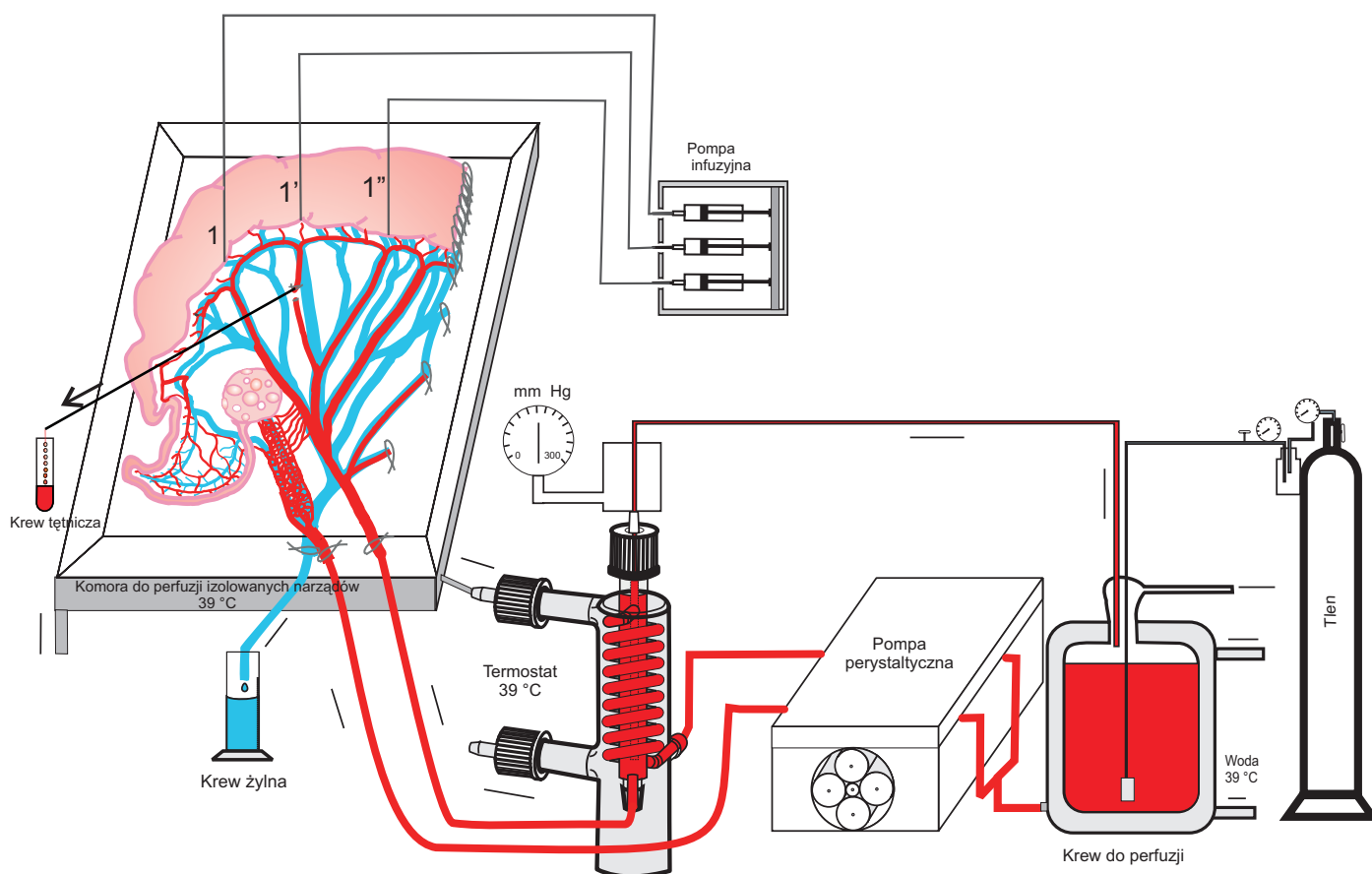
Keywords: reproduction, oestrous cycle, PGE₂, gilts

Prostaglandyna E₂ (PGE₂) uczestniczy w regulacji szeregu procesów rozrodczych u samicy. Głównym miejscem jej syntezy jest błona śluzowa macicy, której komórki nabłonkowe i komórki zrębu są wyposażone w syntazę cyklicznego nadttlenku prostaglandynowego (PGHS/COX) (5) oraz syntazę PGES (25). Ostatnio wykazano ekspresję COX-2 i PGES w błonie mięśniowej macicy świni, a także wydzielanie PGE₂ przez tę tkankę (11).

W cyklu rujowym PGE₂ uczestniczy w regulacji czynności ciała żółtego, wzrostu i różnicowania komórek błony śluzowej macicy, przepływu krwi w narządach rozrodczych, przepuszczalności naczyń krwionośnych oraz czynności skurczowych jajowodu i macicy. Regulacyjne działanie PGE₂ jest z reguły przeciwnostawne w stosunku do PGF_{2α}. PGE₂ ma działanie antyluteolityczne i luteotropowe (1), zwiększa ukrwienie macicy (4), a jednocześnie obniża ekspresję w *endometrium* czynnika HIF-1α (Hypoxia Inducible Factor), wytwarzanego w stanie niedokrwienia (9). Wpływ PGE₂ na aktywność skurczową macicy jest zależny od jej stężenia (6) i może mieć charakter kurczący (14) lub relaksujący (10). Wykazano także zróżnicowaną i zależną od fazy cyklu reaktywność skurczową różnych odcinków jajowodu na tę prostaglandynę (18).

Cząsteczki prostaglandyn łatwo podlegają metabolizmowi pod wpływem enzymów obecnych w komórkach tkanek narządów rozrodczych (2), a szczególnie po ich wniknięciu do krwi obwodowej i w trakcie przejścia przez krążenie płucne, nerkowe i wątrobowe (16, 19). W efekcie stężenie prostaglandyn w obwodowej krwi tętniczej, docierającej do narządów rozrodczych jest zbyt niskie, by mogły one spełniać funkcje regulacyjne. Skuteczne działanie prostaglandyn macicznych na jajnik, jajowód i macicę umożliwia ich akumulacja w narządach rozrodczych (20) oraz ich lokalny transfer (12, 24).

Przenikanie PGF_{2α} z krwi żyłnej i limfy odpływającej z macicy do krwi tętniczej oraz jej zwrotny transfer do rogu macicy i lokalnie docelowy transfer do jajnika wykryto w latach 80.-90. (22). Badania przeprowadzone ostatnio na loszках we wczesnej ciąży wykazały zwrotny i lokalnie docelowy transfer PGE₂ (21, 24). Celem niniejszej pracy było: 1) ustalenie, czy PGE₂ może przenikać z naczyń żylnych i limfatycznych kreski macicy do krwi tętniczej, 2) czy może być zwrotnie transportowana do rogu macicy i 3) czy podlega lokalnie docelowemu transferowi do jajnika i jajowodu w cyklu rujowym u świni.



Ryc. 1. Schemat doświadczenia do badań przenikania $^3\text{H-PGE}_2$ w obszarze krezki macicy do krwi tętniczej, jej zwrotnego transferu do rogu macicy oraz lokalnie docelowego transferu do jajnika i jajowodu; 1, 1', 1'' – miejsca infuzji $^3\text{H-PGE}_2$ pod perimetrium rogu macicy

Materiał i metody

Wszelkie czynności związane z wykonywaniem doświadczeń na zwierzętach zostały przeprowadzone zgodnie z wnioskiem Nr 59/2002/N zatwierdzonym przez Lokalną Komisję Etyczną. Badania przeprowadzono na loszkach mieszańców w ich trzecim cyklu rujowym. Pierwszy dzień rui przyjmowano jako „0” dzień cyklu. Użyto 3 grup loszek: A – faza środkowo-lutealna (9.-10. dzień cyklu, $n = 5$); B – rozpoczęcie luteolizy (13.-14. dzień cyklu, $n = 5$); C – faza pęcherzykowa (16.-18. dzień cyklu, $n = 5$). Po uboju zwierząt w odpowiednim dniu cyklu zbierano i uniekrzepiano krew, wycinano narządy rozrodcze i przygotowywano izolowane rogi macicy zgodnie z opisaną wcześniej metodą (8, 21). Polietylenowe kaniule wprowadzano do tętnicy macicznej i tętnicy jajnikowej w celu zaopatrzenia izolowanych narządów w krew oraz do żyły maciczno-jajnikowej w celu odprowadzania odpływającej z narządu krwi żylną. Ponadto wprowadzano kaniulę do łukowato przebiegającej w pobliżu rogu macicy gałązki tętnicy macicznej do pobierania krwi tętniczej zaopatrującej róg macicy, po jej przejściu przez obszar krezki macicy.

Izolowany róg macicy umieszczano w ogrzewanej komorze zestawu do izolowanych narządów (UNIPER UP-100, typ 834 firmy Hugo Sachs Elektronik-Harvard Aparatus GmbH, March-Hugstetten, Niemcy) i perfundowano ogrzaną (38°C) i natlenioną autologiczną krwią loszek dawczyń narządów rozrodczych. Krew była podawa-

na ze stałą prędkością $12,8 \pm 2,7$ ml/min. do tętnicy macicznej i $5,6 \pm 0,7$ ml/min. do tętnicy jajnikowej. Ciśnienie krwi w tętnicy macicznej utrzymywane było na poziomie 60-80 mmHg. Znakowana trytem prostaglandyna E_2 [^3H]-PGE₂ o aktywności właściwej 185 Ci/mmol, w dawce całkowitej $5,5 \times 10^7$ dpm (49 ng) była infundowana przez 30 minut pod błonę surowiczą macicy, wzdłuż długości rogu macicy, przez 3 igły iniekcyjne umieszczone około 10, 20, 30 cm od cieśni jajowodu, w odległości 0,5 cm od połączenia rogu macicy i krezki macicy. Próby krwi pobierano: przez 15 minut, przed infuzją (kontrolne), w trakcie infuzji $^3\text{H-PGE}_2$ i po jej zakończeniu przez 30 minut, co 5 minut. Schemat doświadczenia przedstawiono na ryc. 1.

Po zakończeniu perfuzji izolowanego preparatu krwią do jamy macicy wprowadzano bufor Hanseleita-Krebsa, dokładnie płukano i pobierano próby wypłuczyn. Następnie pobierano próby błony mięśniowej macicy (miometrium) ($n = 3$), błony śluzowej macicy (endometrium) ($n = 3$), tkanki ciała żółtego ($n = 3$) i rdzenia jajnika ($n = 2$) oraz pęcherzyki jajnikowe ($n = 3$) i fragmenty jajowodu ($n = 2$). Próby osocza krwi i wypłuczyn macicznych oraz tkanek przygotowywano do pomiaru radioaktywności i mierzono w liczniku do pomiaru promieniowania β zgodnie z metodą opisaną wcześniej (8, 21). Identyfikacja przeprowadzona z użyciem wysoko specyficznych przeciwciał dla PGE₂ (8) wykazała, że $90,7 \pm 4,4\%$ radioaktywności krwi tętniczej zaopatrującej róg macicy i $82,3 \pm 2,6\%$ radioaktywno-

ci krwi żyłnej odpływającej z izolowanego preparatu stanowi niezmienną, immunoreaktywną cząsteczkę $^3\text{H-PGE}_2$.

Z odciętego w trakcie przygotowywania izolowanego preparatu fragmentu rogu macicy i krezki macicy pobierano próby *miometrium*, *endometrium* i *mesometrium* do oznaczenia stężenia endogennej PGE_2 w tkankach według metody opisanej wcześniej (21).

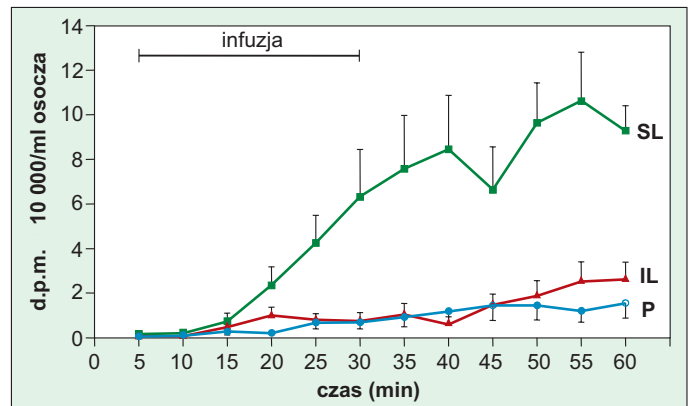
Wyniki i omówienie

W niniejszej pracy są prezentowane wyniki badań, w których po raz pierwszy wykazano lokalny transfer PGE_2 w narządach rozrodczych świni. System lokalnego transferu prostaglandyny obejmował jej zwrotny transfer w *mesometrium* z macicznej krwi żyłnej i limfy do krwi tętniczej i rogu macicy oraz docelowy transfer do jajnika i jajowodu. Stężenie $^3\text{H-PGE}_2$ we krwi zaopatrującej róg macicy przedstawiono na rycinie 2. Przenikanie PGE_2 do krwi tętniczej w obszarze krezki macicy zwiększa jej stężenie we krwi docierającej do drobnych naczyń błony mięśniowej, błony śluzowej, krezki macicy i umożliwia jej bezpośrednie działanie na te naczynia. W ten sposób PGE_2 może przeciwdziałać skutkom, jakie wywiera kurczący wpływ $\text{PGF}_{2\alpha}$ i progesteronu, prowadzącym do niedokrwienia macicy, a szczególnie jej błony śluzowej (13, 22).

Zwrotne przenoszenie PGE_2 przez krew tętniczą podnosi lokalnie jej stężenie w tkankach macicy, gdzie uczestniczy ona w regulacji różnicowania i wzrostu komórek błony śluzowej (17) oraz czynności skurczowych błony mięśniowej macicy (6). Ponadto transfer ten ogranicza odpływ PGE_2 do krążenia obwodowego i chroni ją przed metabolizmem (16). Efektem zwrotnego transferu $^3\text{H-PGE}_2$ była jej obecność w błonie śluzowej i błonie mięśniowej macicy (ryc. 3) oraz w wypłuczynach z jamy macicy (wyniki nie zamieszczone, 8).

Prostaglandyny uwalniane z wytwarzających je komórek mogą działać jako czynniki parakryne do momentu ich przejścia do krążenia obwodowego, gdzie ulegają metabolizmowi. Zasięg działania parakrynego jest więc ograniczony do receptorów przyległych do komórek syntetyzujących prostaglandyny, a czas działania do sekund (7).

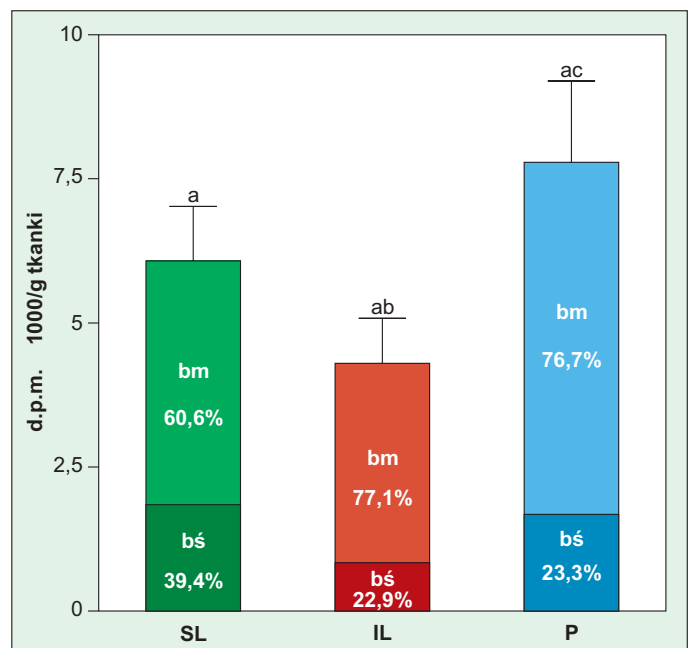
Tkanki macicy wyposażone w transporter prostaglandyn – PGT (3) wykazują zdolność do ich aktywnego wychwytu i gromadzenia (20). Potwierdzają to wyniki uzyskane w niniejszych badaniach. Wykazano bowiem, że stężenie endogennej PGE_2 w błonie śluzowej i mięśniowej macicy oraz krezce macicy było we wszystkich badanych fazach cyklu wysokie i wyrównane (8), pomimo znacznych zmian w aktywności jej syntezy w *endometrium* (25). Ponadto wykazano, że $^3\text{H-PGE}_2$ lub $^3\text{H-PGF}_{2\alpha}$ wprowadzone do naczyń limfatycznych są gromadzone także w krezce macicy i krezce jajnika (8, 23). Wiązanie prostaglandyn z białkami tkankowymi umożliwia ich okresowe zatrzymywanie oraz ponowne wykorzystanie w lokalnym transferze (13).



Ryc. 2. Średnie (\pm SE) stężenie $^3\text{H-PGE}_2$ we krwi tętniczej zaopatrującej róg macicy loszek w cyklu rujowym. SL – faza środkowo-lutealna (9.-10. dzień cyklu); IL – inicjacja luteolizy (13.-14. dzień cyklu); P – faza pęcherzykowa (16.-18. dzień cyklu); SL/IL, SL/P – $p < 0,001$

Transfer $\text{PGF}_{2\alpha}$ do jajnika na zasadzie bezpośredniego przenikania (counter-current transfer) z żyły macicznej do tętnicy jajnikowej u owcy został wykazany po raz pierwszy przez McCrackena (15). Wcześniejsze badania własne zespołu wykazały, że lokalnie docelowy transfer PGs do jajnika jest złożonym, wielostopniowym procesem oraz że głównym źródłem prostaglandyn dla zwrotnego i docelowego transferu nie jest krew żylna, lecz maciczna limfa (12, 21, 24).

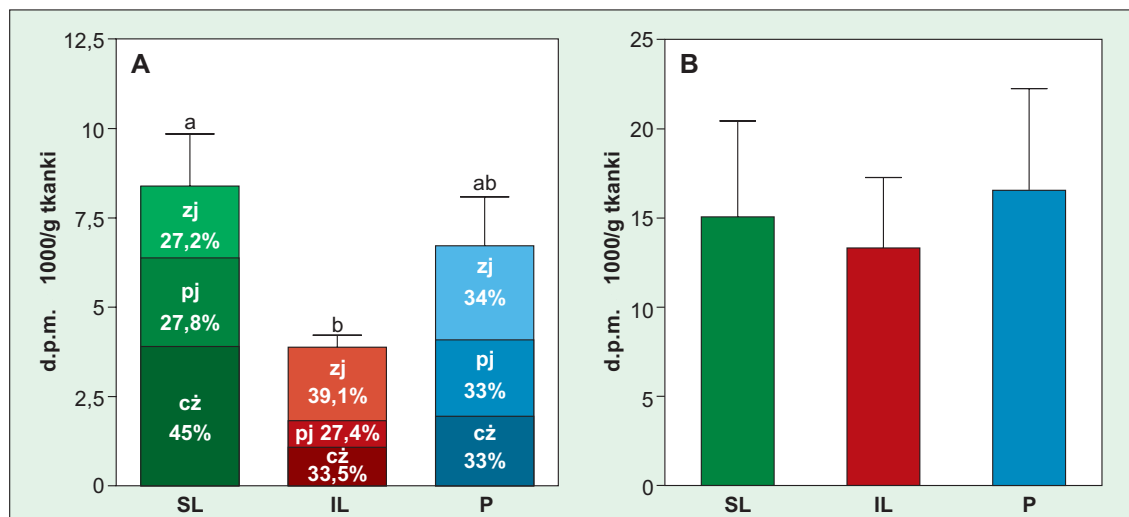
Efektywność lokalnie docelowego transferu PGE_2 do jajnika podlegała w cyklu dużym zmianom (ryc. 4a). Należy podkreślić, że ilość PGE_2 docierającej drogą lokalną z macicy do ciała żółtego była 4-krotnie większa w fazie lutealnej niż w okresie luteolizy. Taki prze-



Ryc. 3. Średnie (\pm SE) stężenie $^3\text{H-PGE}_2$ w macicy loszek w cyklu rujowym. SL – faza środkowo-lutealna (9.-10. dzień cyklu); IL – inicjacja luteolizy (13.-14. dzień cyklu); P – faza pęcherzykowa (16.-18. dzień cyklu); bś – błona śluzowa macicy; bm – błona mięśniowa macicy; ab/ac – $p < 0,05$; a/ab, a/ac – $p > 0,05$

bieg zmian intensywności docelowego transferu, decydującej o ilości PGE_2 dostarczanej do jajnika, jest zgodny z rolą tej prostaglandyny w kontroli czynności ciała żółtego, tj. jej luteotropowym działaniem (1, 24). Jak wykazano wcześniej, lokalnie docelowy transfer działającej luteolitycznie $\text{PGF}_{2\alpha}$ był zredukowany w okresie funkcji ciała żółtego (23). Szczególnie efektywny był docelowy transfer PGE_2 do jajowodu (ryc. 4b), w którym stężenie $^3\text{H-PGE}_2$ było kilkakrotnie większe niż w jajniku niezależnie od fazy cyklu. Wiadomo, że utrzymanie drożności jajowodu wymaga odpowiednio wysokiego stężenia tej prostaglandyny.

Podsumowując, przeprowadzone badania dowodzą, że PGE_2 wytwarzana w macicy podlega lokalnej dystrybucji w narządach rozrodczych. W wyniku zwrotnego transferu dociera ona do rogu macicy, a w wyniku docelowego transferu do jajnika i jajowodu. Stwierdzono zdolność wychwytu, magazynowania i uwalniania PGE_2 przez tkanki macicy i krezki macicy, a różnice w ukierunkowaniu transferu PGE_2 w zależności od fazy cyklu wykazują zgodność z rolą, jaką pełni ona w regulacji czynności jajnika, jajowodu i macicy.



Ryc. 4. Średnie (\pm SE) stężenie $^3\text{H-PGE}_2$ w jajniku (A) i jajowodzie (B) loszek w cyklu rujowym. SL – faza środkowo-lutealna (9.-10. dzień cyklu); IL – inicjacja luteolizy (13.-14. dzień cyklu); P – faza pęcherzykowa (16.-18. dzień cyklu); cz – ciało żółte; pj – pęcherzyk jajnikowy; zj – zrąb jajnika; a/b – p < 0,05; a/ab, b/ab – p > 0,05

metrium and its regulation by prostaglandin E-series prostanoid receptor 2 (EP2). *Endocrinology* 2006, 147, 744-753.

- Duckworth N., Marshall K., Clayton J. K.: An investigation of the effect of the prostaglandin EP2 receptor agonist, butaprost, on the human isolated myometrium from pregnant and non-pregnant women. *J. Endocrinol.* 2002, 172, 263-269.
- Franczak A., Kurowicka B., Oponowicz A., Petroff B. K., Kotwica G.: The effect of progesterone on oxytocin-stimulated intracellular mobilization of Ca^{2+} and prostaglandin E₂ and $\text{F}_{2\alpha}$ secretion from porcine myometrial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2006, 81, 37-44.
- Krzyszowski T., Czarnocki J., Koziorowski M., Kotwica J., Stefańczyk-Krzyszowska S.: Counter current transfer of $^3\text{H-PGF}_{2\alpha}$ in the mesometrium: a possible mechanism for prevention of luteal regression. *Anim. Reprod. Sci.* 1986, 11, 259-272.
- Krzyszowski T., Stefańczyk-Krzyszowska S.: The role of the endometrium in endocrine regulation of the animal oestrous cycle. *Reprod. Dom. Anim.* doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00859.x.
- Lyons C., Beharry K., Akmal Y., Attenello F., Nageotte M. P.: In vitro response of prostaglandin E₂ receptor (EP3) in the term pregnant rat uterus and cervix to misoprostol. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2003, 70, 317-329.
- McCracken J. A., Carlson J. C., Glew M. E., Goding J. R., Green K., Samuelson N.: Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nature, New Biol.* 1972, 238, 129-134.
- McCracken J. A., Custer E. E., Lamsa J. C.: Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.* 1999, 79, 263-323.
- Orlicky D. L., Liberman L., Gerschenson L. E.: Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ and E₂ regulation in primary cultures of rabbit endometrial cells. *J. Cell. Physiol.* 1986, 127, 55-60.
- Rodriguez-Martinez H., Einarsson S.: Influence of prostaglandins on the spontaneous motility of pig oviducts. *Anim. Reprod. Sci.* 1985, 8, 259-279.
- Schuster V. L.: Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002, 68-69, 633-647.
- Stefańczyk-Krzyszowska S.: Rola przeciwpłodowego przenikania hormonów w regulacji czynności jajnika i macicy u świni. *Acta Acad. Agric. Tech. Olst.* 527, Zootech. Suppl. A, 1996, 45, 1-59.
- Stefańczyk-Krzyszowska S., Chłopek J., Grzegorzewski W., Radomski M.: Local transfer of prostaglandin E₂ into the ovary and its retrograde transfer into the uterus in early pregnant sows. *Exp. Physiol.* 2005, 90, 807-814.
- Stefańczyk-Krzyszowska S., Krzyszowski T.: Docelowy i zwrotny transfer macicznych prostaglandyn $\text{F}_{2\alpha}$ i E₂ oraz jego znaczenie w regulacji czynności macicy, jajowodu i jajnika. *Medycyna Wet.* 2008 (oddano do druku).
- Stefańczyk-Krzyszowska S., Krzyszowski T., Einer-Jensen N., Kamiński T., Kotwica J.: Local transfer of prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ from the uterine lumen into the venous and arterial blood and into the uterine, mesometrial and ovarian tissue on day 18 of pregnancy in the pig. *Anim. Reprod. Sci.* 1990, 23, 223-235.
- Stefańczyk-Krzyszowska S., Wąsowska B., Chłopek J., Gilun P., Grzegorzewski W., Radomski M.: Retrograde and local destination transfer of uterine prostaglandin E₂ in early pregnant sow and its physiological consequences. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2006, 81, 71-79.
- Waclawik A., Rivero-Muller A., Blitek A., Kaczmarek M. M., Brokken L. J. S., Watanabe K., Rahman N. A., Zięcik A. J.: Molecular cloning and spatiotemporal expression of prostaglandin F synthase and microsomal prostaglandin E synthase-1 in porcine endometrium. *Endocrinology* 2006, 147, 210-221.

Adres autora: lek. wet. Jolanta Chłopek, ul. Pana Tadeusza 8/82, 10-461, Olsztyn; e-mail: jolach@pan.olsztyn.pl

Piśmiennictwo

- Akinlosotu B. A., Diehl J. R., Gimenez T.: Sparing effect of uterine treatment with prostaglandin E₂ on luteal function in cycling gilts. *Prostaglandins* 1986, 32, 291-293.
- Arosh J. A., Banu S. K., Chapdelaine P., Madore E., Sirois J., Fortier M. A.: Prostaglandin biosynthesis, transport and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology* 2004, 145, 2551-2560.
- Banu S. K., Arosh J. A., Chapdelaine P., Fortier M. A.: Molecular cloning and spatio-temporal expression of the prostaglandin transporter: a basis for the action of prostaglandins in the bovine reproductive system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2003, 100, 11747-11752.
- Bell L. A., Gimenez T., Diehl J. R., Chakraborty P. K.: Prostaglandin E₂ and progesterone during the estrous cycle of pig. *Anim. Reprod. Sci.* 1990, 22, 325-337.
- Blitek A., Waclawik A., Kaczmarek M. M., Stadejek T., Pejsak Z., Zięcik A. J.: Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in the porcine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy. *Reprod. Domest. Anim.* 2006, 41, 251-257.
- Cao J., Yosida M., Kitazawa T., Taneike T.: Uterine region-dependent differences in responsiveness to prostaglandins in the non-pregnant porcine myometrium. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2005, 75, 105-122.
- Chan B. S., Satriano J. A., Pucci M. L., Schuster V. L.: Mechanism of prostaglandin E₂ transport across the plasma membrane of HeLa cells and Xenopus oocytes expressing the prostaglandin transporter PGT. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 6689-6697.
- Chłopek J.: Lokalny dojajnikowy i zwrotny domaciczny transfer prostaglandyny E₂ w cyklu rujowym i w wczesnej ciąży u świni. Praca doktorska, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Olsztyn 2007.
- Critchley H. O., Osei J., Henderson T. A., Boswell L., Sales K. J., Jabbour H. N., Hirani N.: Hypoxia-inducible factor-1 α expression in human endo-