

animal an intervals of 6—7 days before parturition. A control group contained 22 cows and 16 heifers. Of 81 animals treated with levamisole some disturbances concerning uterine involution was found in 34.5% of

animals compared with 52.7% in the control group. In the experimental animals servis period was shorter at six days and a lower pregnant index than that in the control.

ANNA GRAŻUL-BILSKA, JADWIGA PRZAŁA, TERESA WIĘSAK, JOSEF ARENDARCIK\*, ANGELA STANIKOVA\*, ANNA MUSZYŃSKA, MAREK KOZIOROWSKI

## Ocena w warunkach *in vitro* luteolitycznych właściwości pochodnych prostaglandyny F<sub>2</sub>alfa zsyntetyzowanych w Polsce\*)

Instytut Fizjologii Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR-T,  
10-718 Olsztyn-Kortowo

\* Katedra Porównawczej Fiziologii, Wysoka Szkoła Weterynaryska,  
Košice, Komenskeho 73

Prostaglandyny są związkami o charakterze hormonów, wytwarzanymi w komórkach wielu narządów i tkanek. Zarówno związki naturalne, jak i ich syntetyczne pochodne (analogi) znalazły liczne zastosowanie w medycynie i weterynarii. W procesach rozrodczych szczególne znaczenie ma prostaglandyna F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>), która u bydła (6, 7, 13), owiec (5, 8) i koni (10, 17) ma działanie luteolityczne. Dlatego też może być wykorzystywana w praktyce weterynaryjnej i hodowlanej do synchronizacji rui (11, 12), do synchronizacji i wywoływania porodów (2) oraz w leczeniu niektórych zaburzeń funkcji rozrodczych.

Zastosowanie PGF lub jej analogów w Polsce jest ograniczone, gdyż nie podjęto dotąd jej produkcji, a na rynku krajowym dostępne są tylko niewielkie ilości preparatów importowanych.

W latach 1980—1985 w ramach Programu Międzyresortowego MR-II-10 podjęto w Instytucie Chemii Organicznej PAN w Warszawie, pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Wicny intensywne badania w celu zsyntetyzowania polskimi pochodnymi PGF (14). Prace zmierzające do uzyskania znanego na rynku światowym analogu PGF-16-(m-chlorfenoksy-omega-tetranol) PGF<sub>2</sub>α, występującego pod nazwą Cloprostenol, Estrumate, Oestrophan i innymi miały charakter odtwórczy.

Natomiast inne eksperymenty, w oparciu o oryginalne reakcje i metody syntezy (1), zmierzają do syntezy nowych, między innymi siarkowych analogów prostaglandyn, zawierających atom siarki w położeniu 14 (14-tiaprostaglandyny).

W ramach prac odtwórczych opracowano syntezę związku Cloprostenolu w skali laboratoryjnej i w 1982 r. zsyntetyzowano 250 dawek tego analogu w celu porównania jego biologicznej aktywności z preparatami importowanymi. W latach 1982—1985 zajmowano się dalszą optymalizacją metody, a dokumentację umożliwiającą podjęcie opracowania technologii produkcji wielkolaboratoryjnej przekazano do Zakła-

du Doświadczalnego „Chemipan” PAN w Warszawie. Szacunkowa kalkulacja opłacalności wytwarzania polskiego preparatu „Cloprostenol” na podstawie cen preparatów importowanych w 1984 roku wykazała, że wartość 1 dolara amerykańskiego, równoważona była wartością 10—20 złotych.

Oryginalne i korzystne ekonomicznie metody otrzymywania prostaglandyn zgłoszone zostały przez Instytut Chemii Organicznej PAN w Warszawie w Urzędzie Patentowym PRL w postaci dwóch patentów, a ich zmodyfikowana wersja skierowana została do Urzędów Patentowych BRL, CSRS, WRL, ZSRR, Wielkiej Brytanii, Francji, Włoch, USA i Japonii (14).

Wartość biologiczną otrzymanego w Instytucie Chemii Organicznej PAN preparatu Cloprostenol sprawazono w 1984 i 1986 r., porównując jego działanie luteolityczne z preparatem Oestrophan firmy czecnoślowska Spółka (15, 16). Badania farmakologiczne otrzymanych analogów zwróciły szczególną uwagę na dwie tiaprostaglandyny: kwas (d, 1) 9 alfa, 11 alfa dihydroksy-14-tiaprost-5-enowy oznaczony symbolem PW<sub>1</sub> oraz kwas (d, 1) 9 alfa, 11 alfa, 16 ksy-trihydroksy-14-tiaprost-5-enowy, oznaczony symbolem PW<sub>2</sub>. Ich aktywność luteolityczna nie była dotychczas zbadana.

Celem pracy była ocena właściwości luteolitycznych w warunkach *in vitro* trzech polskich prostaglandyn F<sub>2</sub>α: Cloprostenolu, PW<sub>1</sub> i PW<sub>2</sub> oraz ich porównanie z aktywnością luteolityczną preparatu Oestrophan czecnoślowska Spółka i preparatu Enzaprost węgierskiej firmy Chionoin.

### Materiał i metody

Ciałka żółte uzyskano od 10 krów w cyklu. Po uboju krowy pobierano jajnik i umieszczano go w płynie PBS (Wytwórnia Surowic i Szczepionek, Lublin) w temp. 4°C z dodatkiem antybiotyków (50 j.m. penicyliny i 50 µg streptomycyny/ml). Po przewiezieniu do laboratorium hodowli tkanek, jajniki płukano dwukrotnie w płynie PBS z dodatkiem antybiotyków. Następnie oddzielono tkankę lutealną od osłonki łącznotkankowej. Tkanekę cięto na skrawki, odważano po 400 mg i umieszczano w komorach wchodzących w

\* Praca wykonana w ramach Programu CPBP 05.06. koordynowanego przez Ministerstwo Edukacji Narodowej.

skład aparatu do perfuzji tkanek. W aparacie znajduje się 6 komór wykonanych z nietoksycznego tworzywa sztucznego, każda o pojemności 5 cm<sup>3</sup>. Tkanek umieszczano w jednej z części komory oddzielonej od pozostałych siateczką o drobnych oczkach. Przed użyciem aparat płukano płynem PBS z dodatkiem antybiotyków przez 0,5 godziny, a następnie wypełniano pożywką składającą się z Płynu Parkera (90%) i surowicy cielęcej (10%) (Wytwórnia Surowic i Szczepionek, Lublin) z dodatkiem antybiotyków (50 j.m. penicyliny i 50 µg streptomycyny/ml). Pożywka przepływała przez aparat z prędkością 0,25 ml/min. Pożywkę zbierano co 10 min. Perfuzję tkanki prowadzono przez 2 godziny; w ciągu pierwszych 50 min. przez komory zawierające tkankę lutealną przepływała sama pożywka, przez następne pół godziny pożywka zawierająca: Cloprostenol, FW<sub>1</sub>, FW<sub>2</sub>, Oestrophan i Enzaprost. Wszystkie hormony egzogenne podawano w ilości 1 µg/ml pożywki. W ciągu ostatnich 40 minut przez aparat przepływała pożywka bez egzogennych hormonów. Zebrane frakcje zamrażano i przechowywano w temp. -18°C do momentu oznaczenia poziomu progesteronu (P<sub>4</sub>) metodą radioimmunologiczną (9). Czułość metody wynosiła 143,4 pg/ml, błąd wewnątrzseryjny i międzyseryjny odpowiednio: 6,2% i 21%.

Po zakończeniu inkubacji tkankę lutealną umieszczano w roztworze formaliny. Następnie zatapiano w parafinie i cięto na skrawki grubości 5–7 µm. Tkanek barwiono hematoksyliną i eozyną. Na wybarwionych preparatach liczono 400 komórek różnicując je na duże i małe komórki lutealne oraz komórki śródmiąższowe.

Zastosowano test t-Studenta do oceny istotności różnic pomiędzy poziomem P<sub>4</sub> w trzech kolejnych próbach przed podaniem hormonów egzogennych i w trzech następujących po sobie próbach po ich dodaniu do pożywki, podobnie jak w pracy Demury i wsp. (3).

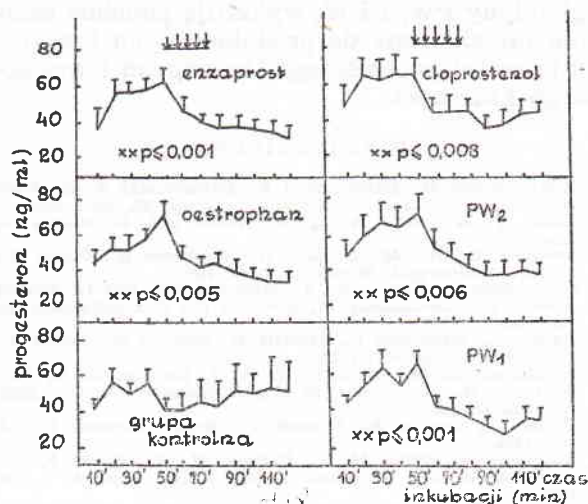
## Wyniki i omówienie

Stwierdzono, że wszystkie zastosowane prostaglandyny istotnie ( $p < 0,01$ ) hamowały sekrecję progesteronu przez bydłą tkankę lutealną (ryc. 1).

Spadek poziomu P<sub>4</sub> rozpoczął się tuż po podaniu hormonów egzogennych i utrzymywał się do końca inkubacji. Najsilniejsze właściwości luteolityczne (wyraźne procentem obniżenia koncentracji P<sub>4</sub> w trzech kolejnych próbach po dodaniu prostaglandyn w stosunku do koncentracji P<sub>4</sub> w trzech następujących po sobie próbach przed dodaniem PGF) wykazał preparat PW<sub>1</sub>. Spowodował on obniżenie poziomu P<sub>4</sub> z  $63,2 \pm 3,9$  do  $39,9 \pm 3,4$  ng/ml, co stanowi 36,9%, następnie Cloprostenol z  $66,1 \pm 6,4$  do  $44,2 \pm 4,5$  ng/ml czyli o 33,2%, dalej PW<sub>2</sub>, który obniżył zawartość badanego steroidu o 31% (z  $67,4 \pm 5,6$  do  $46,5 \pm 4,7$  ng/ml). Natomiast Enzaprost obniżył poziom P<sub>4</sub> o 29,6%, z  $59,9 \pm 4,0$  do  $42,2 \pm 3,1$  ng/ml i Oestrophan o 26,1% czyli z  $60,0 \pm 4,4$  do  $44,3 \pm 3,0$  ng/ml.

Badania histologiczne wykazały, że wszystkie stosowane preparaty luteolityczne nie zmieniały stosunku ilościowego dużych i małych komórek lutealnych oraz komórek śródmiąższowych w ciałku żółtym (tab. 1), co można tłumaczyć bardzo krótkim czasem ekspozycji na działanie użytych prostaglandyn.

Stwierdzone w badaniach własnych właściwości luteolityczne preparatów otrzymanych w Instytucie Chemii Organicznej PAN: Cloprostenolu, PW<sub>1</sub> i PW<sub>2</sub>, podobnie do znajdujących się na



Ryc. 1. Wpływ różnych preparatów luteolitycznych na sekrecję progesteronu. Strzałki oznaczają czas perfuzji tkanki lutealnej hormonem egzogennym. Na wykresach przedstawiono wartości średnie  $\pm$  s

Tab. 1. Procentowy udział dużych i małych komórek lutealnych oraz komórek śródmiąższowych w ciałku żółtym po dwugodzinnej perfuzji tkanki samą pożywką i z dodatkiem preparatu Cloprostenol, PW<sub>1</sub>, PW<sub>2</sub>, Oestrophan i Enzaprost

Perfuzja tkanki lutealnej	Komórki	
	lutealne %	środmiaższowe %
Pożywka kontrolna	37,78	48,58
Pożywka z dodatkiem		
- Cloprostenolu	25,91	56,08
- PW <sub>1</sub>	42,08	44,75
- PW <sub>2</sub>	34,49	52,18
- Oestrophanu	25,33	61,08
- Enzaprostu	55,25	51,00
		43,64
		48,00
		43,16
		16,33
		43,58
		43,75

rynku preparatów Oestrophan i Enzaprost są bardzo wyraźne i polskie pochodne PGF można zalecić do zastosowania w praktyce weterynaryjnej i zootechnicznej. Ocenę Cloprostenolu w warunkach *in vivo* wykonali wcześniej Woyno i wsp. (15, 16). Autorzy ci wykazali, że otrzymany w Instytucie Chemii Organicznej PAN Cloprostenol posiada właściwości luteolityczne, gdyż obniża istotnie poziom P<sub>4</sub> w osoczu krwi i w mleku, a ponadto jest przysadny w synchronizacji rui u bydła. Właściwości luteolityczne Cloprostenolu, PW<sub>1</sub> i PW<sub>2</sub> zostały również potwierdzone przez Dynarowicza i Watkowskiego (4) w badaniach *in vivo* prowadzonych na szczurach.

Zastosowana w badaniach własnych metoda perfuzji tkanki, w której pożywka przepływała przez skrawki ciała żółtego, zbliża warunki doświadczenia do warunków fizjologicznych, gdyż w pożywkę nie następuje nagromadzenie metabolitów i pozwala to na uzyskiwanie miarodajnych wyników.

Reasumując należy stwierdzić, że polskie pochodne PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  otrzymane w Instytucie Chemii Organicznej PAN — Cloprostenol oraz triapros-

taglandyny PW<sub>1</sub> i PW<sub>2</sub> wykazują podobne działanie luteolityczne do produkowanych fabrycznie preparatów: czeskiego Oestrophan i węgierskiego Enzaprost.

## Piśmiennictwo

1. Achmatowicz B., Baranowska E., Danielewski A. R., Pankowski J., Wicha J.: *Tetradron Letters* 26, 5597, 1935.
2. Bazer F. W., First N. L.: *J. Anim. Sci.* 57 (Suppl. 2) 423, 1983.
3. Demura R., Ono M., Demura H., Schizume K., Oucki H.: *J. clin. Endocrinol. Metab.* 54, 1246, 1982.
4. Dynarowicz I., Watkowski T.: *Nowości Wet.* 1988 (w druku).
5. Ebrard M., Lebouilleux P., Herrier C.: *Prostaglandins* 16, 491, 1978.
6. Heath E., Weinstein P., Merritt B., Shanks R., Hixon J.: *Biol. Reprod.* 29, 917, 1983.
7. Henderson K. M., McNatty K. P.: *J. Endocr.* 73, 71, 1977.
8. Nett T. M., McCleuan M. C., Niswender G. D.: *Biol. Reprod.* 15, 66, 1976.
9. Przała J., Grażul A., Więsak T.: *Anim. Reprod. Sci.* 7, 351, 1984.
10. Sharp D. C., Zavy M. T., Vernon M. W., Bazer F. W., Trichter W. W., Berglund L. A.: *Anim. Reprod.* 7, 269, 1984.
11. Smorąg Z., Wierżchoś E.: *Centralna Bibl. Rol., Oprac. problemowe*, 1980.
12. Watts T. L., Fuquay J. W.: *Theriogenology* 23, 655, 1985.
13. Weston P. G., Hixon J. E.: *Biol. Reprod.* 22, 259, 1980.
14. Wicha J.: Sprawozdanie z prac w okresie 1981—1985 w ramach tematu MR-II-10 „Synteza eikozanoidów ze szczególnie uwzględnieniem związków luteolitycznych” 1985. Instytut Fizjologii Zwierząt, ART w Olsztynie.
15. Woyno W., Stupnicki R., Romanowicz K., Borkowski L., Bai K., Kotodziejek W.: *Zesz. probl. Post. Nauk roln.* 309, 211, 1984.
16. Woyno W., Stupnicki R., Zdrada M., Strzemżalski Z., Bai K.: *medycyna Wet.* 42, 90, 1986.
17. Zavy M. T., Vernon M. W., Asquith R. L., Bazer F. W., Sharp D. C.: *Prostaglandins* 27, 2, 311, 1984.

Adres autora: dr Anna Grażul-Bilska, 10-740 Olsztyn-Kortowo, bl. 10, pok. 310

Гражуль-Бильская А., Пшала Я., Венсак Т., Арендардик Ю., Станикова А., Мушиицкая А., Козиоровский М. — Оценка в условиях *in vitro* лутеоли- тических свойств производных простагландина F<sub>2</sub> α, синтезированных в Польше

Цель настоящей работы состояла в оценке лутеоли- тических свойств 3 польских производных простагландина F<sub>2</sub> α (PGF): Cloprostenol PW<sub>1</sub>, PW<sub>2</sub> и сравнении их лутеоли- тическими свойствами Oestrophan (Spofa, Чехословакия) и Enzaprost (Chinoin, Венгрия) с использованием лутеоальной ткани ско-

та, содержащейся в перфузионной системе *in vitro*. Срезы этой ткани помещали в 6 камерах, входящих в состав перфузионной системы, через которую протекала питательная среда со скоростью 0,25 мл/мин. Среду собирали каждые 10 мин в течение 2 часов. До истечения первых 30 мин, протекающей среды, не содержащей экзогенных гормонов, использовали среду, содержащую или нет разные виды простагландинов в концентрации 1 мкг/мл: Cloprostenol, PW<sub>1</sub>, PW<sub>2</sub>, Oestrophan, Enzaprost. В течение последних 40 мин. опыта ткань перфундировали раствором среды, не содержащей простагландинов. Пробы хранили в темн. -16°C перед определением в них содержания прогестерона (P<sub>4</sub>) радиоиммунологическим методом. Показали, что все примененные простагландины тормозили (P<0,01) освобождение P<sub>4</sub> лутеоальной тканью скота. Польские производные PGF<sup>1</sup> показывают похожие лутеоалитические свойства как препараты Oestrophan и Enzaprost. Все 3 польские производные PGF можно рекомендовать для применения в ветеринарно-экологической практике.

Grażul-Bilska A., Przała J., Więsak T., Arendarcik J., Stanikova A., Muszynska A., Koziorowski M. — The *in vitro* estimation of luteolytic properties of prostaglandin F<sub>2</sub> α derivatives synthesized in Poland

Luteolytic activity of three Polish prostaglandin F<sub>2</sub> α derivatives (PGF): Cloprostenol PW<sub>1</sub> and PW<sub>2</sub> in comparison to Oestrophan (Spofa, Czechoslovakia) and Enzaprost (Chinoin, Hungary) was investigated using a bovine luteal tissue in the *in vitro* perfusion system. The slices of luteal tissue were placed into 6 chambers with a medium flow rate 0.25 ml/min in 37°C. Medium was collected at 10 min. intervals for 2 hours. After the first 30 min. of tissue perfusion without exogenous prostaglandins for the next 30 min. was used medium with or without Cloprostenol, PW<sub>1</sub> and PW<sub>2</sub>, Oestrophan or Enzaprost at a concentration 1 μg/ml. By the last 40 min. tissues were perfused again with media without exogenous hormones. The samples were stored at -18°C until the determination of the content of progesterone (P<sub>4</sub>) by radioimmunoassay. It was found that all used prostaglandins inhibited (P<0.01) P<sub>4</sub> secretion by a bovine luteal tissue. Polish PGF derivatives show a similar luteolytic activity as Oestrophan and Enzaprost. All three Polish PGF derivatives may be recommended in veterinary and husbandry practice.

ERGANIS O., CORLU O., ATEŞ M.: Izolacja *Actinobacter calcoaceticus* od kur z posocznicą. (Isolation of *Actinobacter calcoaceticus* from septicaemic hens). *Vet. Rec.* 123, 374, 1988 (14)

Zakażenia wywołane przez *Actinobacter* występują coraz częściej u ludzi i u zwierząt. Od kur z typowymi objawami posocznicy pochodzących ze stada, w którym występowało osłabienie, duszność, biegunka, sinica wyosobniono w czystej hodowli *Actinobacter calcoaceticus*. Odsetek padnięć w stadzie wynosił około 15%. Badania sekcyjne wykazały obecność drobnych ognisk martwicy w wątrobie i zielonkawę zabarwienie wątroby oraz drobne wybroczyny w pęcherzykach jajowych. Wszystkie szczepy wyosobnione z wątroby nie wytwarzały hemolizy, były pozbawione właściwości sacharolitycznych, wytwarzały katalazę, nie wytwarzały oksydazy i siarkowodoru, nie rozkładały mocznika, nie redukowały azotanów i nie rozkładały cytrynianu. Wszystkie szczepy były wrażliwe na chloramfenikol, gentamycynę, kolistynę, karbenicylinę, erytromycynę i tetracyklinę. *A. calcoaceticus* oprócz kur izolowano też od krów z zapaleniem macicy lub zapaleniem gruczołu mlekowego.

G.

RYCKOCK J. F., ALLEN W. E.: Przedchemotaktyczne i chemotaktyczne właściwości płynu macicznego klaczy z doświadczalnym zapaleniem macicy (Pre-chemotactic and chemotactic properties of uterine fluid from mares with experimentally induced endometritis). *Vet. Rec.* 123, 193—195, 1988 (8)

Endometritis na tle zakażenia *Streptococcus zooepidemicus* inokowano u klaczy (kucyki) w okresie rui wprowadzając do jamy macicy 5×10<sup>7</sup> cfu zarazka w 5 ml podłoża. Wydzielinę z jamy macicy pobierano do badań po 30, 60, 120 i 240 minutach i badano jej wpływ na morfologię i chemotaksję neutrofilów krwi koni. Neutrofile izolowano metodą sedimentacji z krwi żyłnej stosując Percoll. Morfologię neutrofilów określano wg zmodyfikowanej metody Forsell i wsp. i metodą miliporową. Maksymalną odpowiedź uzyskano między 30 a 60 minutą po zakażeniu. Odpowiedź utrzymywała się do 240 minuty po zakażeniu. Substancja o działaniu chemotaktycznym występująca w wydzielinie macicy zawierała komponenty ciepłochwienne i ciepłostale. Te ostatnie działały chemotaktycznie w stężeniach niższych niżeli komponenty ciepłochwienne.

G.