

# Zmiany receptorów steroidowych macicy po antykoncepcji estrogenowej u suk<sup>\*)</sup>

PIOTR JURKA, MAREK SNOCHOWSKI\*, ZDZISŁAW BORYCZKO

Zakład Rozrodu, Andrologii i Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-766 Warszawa  
\*Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN, ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna

Jurka P., Snochowski M., Boryczko Z.

## Changes in uterine steroid receptors after estrogen contraception in bitches

### Summary

The aim of the present study was to evaluate the effect of estradiol benzoate (EB) treatment on estradiol (E2) and progesterone (P4) in blood, and on estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors in the uteri of mixed breed bitches. Injections of 10 µg EB/kg (Mesalin, Intervet) and 100 µg EB/kg (Oestradiolum benzoicum, Polfa) were given on day 3 and 5 after the first acceptance of males. Steroids were measured in samples collected from the vena cephalic using the immunofluorescent method. The average level of E2 was elevated to 190 and 260 pg/ml, respectively, and declined to control values within less than 12 days. An increase in P4 was observed only during the first 4 days. ER and PR were determined in uterine samples collected during hysterectomy performed on day 14 or 28 following the first EB injection. The radioligand assay was used for soluble (100.000 g cytosol) and structural (0.6 M NaCl extract) fractions. Typical binding characteristics for ER and PR were found in all analyzed samples. The amount of ER was unchanged over time in the untreated group, while PR significantly declined. The lower dose caused a 3-fold elevation of ER and PR (mainly soluble fractions) which on day 28 declined to control values with the exception of an uncompleted decline of soluble ER. The effect of higher doses on ER was only significant in its soluble fraction on day 14. However its influence on the PR (initially unchanged) occurred on day 28 and was elevated more than 10-times (mainly structural fraction). The results obtained indicate that uterine ER and PR responded differently to high and low doses of estrogen treatment.

**Keywords:** bitch, contraception, estradiol benzoate

Problem regulacji zdolności rozrodczych u suk zajmuje obecnie istotne znaczenie w praktyce lekarsko-weterynaryjnej. Podstawę do szerokiego stosowania iniekcyjnej formy estrogenów stanowią pozytywne wyniki badań klinicznych przeprowadzonych na ponad 300 sukach, którym podawano dwukrotnie dawkę 10 µg/kg benzoesu estradiolu w trzecim i piątym dniu po kryciu (26). W przypadku podejrzenia o powtórne krycie podawano również trzecią dawkę (w 7. dniu), co według naszych obserwacji jest zbędne. Aplikacja estrogenów w końcowym okresie rui powoduje długotrwałe zamknięcie cieśni jajowodu, zakłóca transport embriónów, wywołując w nich zmiany toksyczne, uniemożliwia implantację i w rezultacie zapobiega powstawaniu ciąży (28, 31).

Zarejestrowano wiele preparatów estrogenowych do stosowania w celu zapobiegania ciąży, są one tanie i łatwe do zastosowania, jednakże mogą wywoływać niepożądane efekty uboczne (1, 5, 7, 13). Z tego powodu szereg towarzystw weterynaryjnych wycofało rekomen-

dacje ich stosowania, uzasadniając to brakiem wyników badań prognostycznych oraz brakiem określenia skutecznej i bezpiecznej wielkości dawki (31). Wyniki dokonanej przez nas oceny histopatologicznej macicy suk w 14. i 28. dniu po aplikacji 10 lub 100 µg/kg benzoesu estradiolu (14) wykazały występowanie cech co najmniej rozrostu złożonego (complex hyperplasia).

Obserwowane zmiany komórek nabłonka powierzchniowego, jak i gruczołów podstawnych wykazywały cechy budowy nabłonka transformowanego działaniem progesteronu.

Zmiany zachodzące w macicy pod wpływem estradiolu i progesteronu regulowane są za pośrednictwem receptorów estrogenowych (ER) oraz receptorów progesteronowych (PR) pełniących rolę aktywatorów transkrypcji genów białek. Receptory NR3A1 i NR3A2 dla estrogenów kodowane są na dwóch różnych genach i znane jako ER $\alpha$  i ER $\beta$  (21). Struktura obu typów ER jest bardzo zbliżona i oba wiążą estradiol z podobnym powinowactwem, jednak ich aktywność transkrypcyjna nie jest jednakowa (16, 27). Receptory dla progesteronu kodowane są na jednym genie, ale jego transkrypcja

<sup>\*)</sup> Badania wykonano w ramach grantu promotorskiego KBN nr 5 PO6014 11.

może być inicjowana za pośrednictwem dwóch różnych promotorów odpowiedzialnych za syntezę form różniących się długością N-końcowego łańcucha aminokwasów receptorów PR-A i PR-B (29).

Receptory ER i PR mogą pełnić rolę regulacyjną w wielu miejscach komórki. Sygnały hormonalne mogą być odbierane przez receptor znajdujący się na membranie cytoplazmatycznej, w cytozolu, w jądrze komórkowym jak również w mitochondriach (20). Dynamicznie zachodzące zmiany lokalizacji wewnątrzkomórkowej receptorów są precyzyjnie sterowane poprzez zawarte w ich strukturach tzw. miejsca sygnałowe lokalizacji jądrowej odpowiedzialne za ich eksport i import z przestrzeni jądrowej (22, 30). W tkankach macicy ilościowo dominują receptory ER $\alpha$  i PR-B, ale dystrybucja i ekspresja lub koekspresja innych form może mieć zasadnicze znaczenie dla indukcji aktywności specyficznych typów komórek.

Tak zróżnicowane właściwości obu receptorów powodują brak jednej, uniwersalnej metody ich pomiaru. Metody oparte o analizę mRNA lub detekcję białka receptorowego przeciwciałem informują o aktywności genów kodujących receptor czy też obecności białka określonego typu (izoforny) receptora i każda z nich niesie nieco inną informację. Natomiast technika radioligandu umożliwia ilościowe oszacowanie aktywności wszystkich form receptorów aktualnie zdolnych do reakcji z hormonem (funkcjonalny receptor). Połączenie jej z metodami biochemicznymi pozwala na wybiórczy pomiar frakcji receptorów znajdujących się w stanie wolnym (cytoplazma, nukleoplazma) oraz frakcji związanej ze strukturami wewnątrzkomórkowymi (24, 25). Sposób ten został zastosowany w niniejszej pracy, ponieważ pozwala na ogólną ocenę aktywności obu receptorów w narządach o zróżnicowanej strukturze, do których należy macica.

Dotychczas nie badano u suk wpływu estrogenów podawanych w końcowym okresie rui na stan receptorów steroidowych macicy we wczesnej fazie porującej (23). Wiadomo natomiast, że zaburzenia hormonalne w tym okresie mogą mieć różne niepożądane skutki z wystąpieniem ropomacicza włącznie (15). Uzyskane wyniki stanowią pierwszy opis zmian aktywności receptorów macicy w okresie cyklu, który wydaje się szczególnie istotny dla oceny przyczyn występowania zmian klinicznych oraz poprawności stosowania estrogenów w celu zapobiegania niepożądanemu ciąży.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu estrogenów, aplikowanych w dwóch różnych dawkach we wczesnej fazie porującej na stężenia estradiolu i progesteronu w krwi oraz na aktywność receptorów estrogenowego (ER) i progesteronowego (PR) macicy suk.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 30 sukach, mieszańcach w wieku od 1 do 3 lat (10-14 kg). Zwierzęta z fizjologicznym cyklem jajnikowym podzielono na grupę kontrolną (K; n = 6) oraz dwie grupy doświadczalne po 12 suk, którym podano dwukrotnie benzoestan estradiolu. Pierwsza z nich (grupa M)

otrzymała dawkę 10  $\mu$ g (Mesalin, Intervet), a druga (grupa O) 100  $\mu$ g (Oestradiolum benzoicum, Polfa) na kilogram masy ciała. Iniekcje wykonano domięśniowo w trzecim i piątym dniu po wystąpieniu odruchu tolerancji. Próbkę krwi pobierano w odstępach 2-dniowych z żyły odpromieniowej (*v. cephalica*), wirowano 15 min. przy 1500 g, a oddzielną surowicę przechowywano w  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania analiz hormonalnych.

Pomiary stężeń progesteronu i estradiolu wykonano metodą immunofluorescencyjną (TR-FIA) z wykorzystaniem komercyjnych zestawów Delfia Estradiol kit i Delfia Progesterone kit (Wallac Oy, Finland) po uprzedniej trzykrotnej ekstrakcji octanem etylu. Pomiar fluorescencji wykonano w aparacie Delfia Fluorometer 1232, Wallac Oy, Finland. Wszystkie analizy wykonano w jednej serii w duplikatach. Wydajność ekstrakcji dla obu hormonów wahała się od 92% do 99%, a czułość oznaczeń i błęd wewnątrzserijny wynosiły odpowiednio dla estradiolu 10 pg/ml (37 pmol/l) i 9,6%, a dla progesteronu 0,25 ng/ml (0,8 nmol/l) i 8,0%.

Zabieg usunięcia macicy i jajników wykonano u połowy zwierząt z każdej grupy w 17. dniu lub w 31. dniu po wystąpieniu odruchu tolerancji, co odpowiada u grup doświadczalnych 14. lub 28. dniu po pierwszej iniekcji estradiolu. Do badań pobierano wycinki z połowy długości obu rogów macicy, płukano w roztworze fizjologicznym, a po osuszeniu zmrażano w ciekłym azocie i przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu analizy. Czas od wycięcia macicy do momentu zamrożenia nie przekraczał 3 minut. Ocenę aktywności receptorów wykonano w 14. i 28. dniu po podaniu pierwszej dawki w odniesieniu do wartości fizjologicznych oznaczonych w 17. i 31. dniu po wystąpieniu odruch tolerancji.

Pomiar receptorów, białka cytozolowego oraz DNA wykonano zgodnie z uprzednio opublikowaną procedurą (24, 25). Próbkę tkanki macicy rozcierano w ciekłym azocie, odważano 1 g i zawieszano w 5 ml buforu (10 mM TRIS-HCl, 1,5 mM EDTA, 1 mM tioglikolanu sodu, 10 mM molibdenianu sodu, 10% glicerolu; pH 7,4). Frakcję wolną receptorów przygotowywano w formie cytozolu po wirowaniu homogenatu przy 100 000 g przez 60 min. w  $4^{\circ}\text{C}$ . Frakcję związaną otrzymywano po 60 min. inkubacji pozostałego osadu z dodatkiem 2,5 ml 0,6 M NaCl ( $4^{\circ}\text{C}$ ), dodaniu 2,5 ml buforu i ponownym wirowaniu przez 60 min. przy 100 000 g w  $4^{\circ}\text{C}$ .

Porcje po 0,2 ml zawierające 0,1 ml frakcji receptorowej inkubowano w duplikatach w obecności 6 różnych stężeń radioligandu od 0,08 do 2,6 nM (ER:  $^3\text{H}$ -17 $\beta$ -estradiol, 3,18 TBq/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, UK; PR:  $^3\text{H}$ -promegeston, 3,2 TBq/mmol, New England Nuclear, USA) w ciągu 20 godz. w  $4^{\circ}\text{C}$ . Wolne steroidy oddzielano metodą adsorpcji na węglu aktywowanym, a pomiar radioaktywności wykonano w liczniku scyntytacji ciekłej (Beckman LC 6000 TA). Wielkość wiązania niespecyficznego oznaczano w równoległych inkubatach zawierających 200-krotny nadmiar dietylstilbestrolu (ER) lub nieznakowanego promegestonu (PR). Maksymalną ilość miejsc wiążących ( $B_{\text{max}}$ ) i pozorną stałą dysocjacji ( $K_d$ ) wyznaczano wg Scatcharda po uprzedniej korekcji na wiązanie niespecyficzne. Wartości wiązania frakcji wolnej wyrażono w odniesieniu do zawartego w niej białka, a frakcji strukturalnej do ilości DNA oznaczonego w osadzie. Całkowitą zawartość receptorów wyznaczano jako sumę obu frakcji w odniesieniu do masy świeżej tkanki. W celu bezpośredniego porównania zawartości receptorów w poszczególnych frakcjach wyniki przedstawiono w postaci średniej ilości cząsteczek receptora w komórce, mnożąc przez

współczynnik konwersji, który dla wartości receptora wyrażonego w jednostkach (fmol/mg DNA) wynosi  $F = 3,7338$  (25).

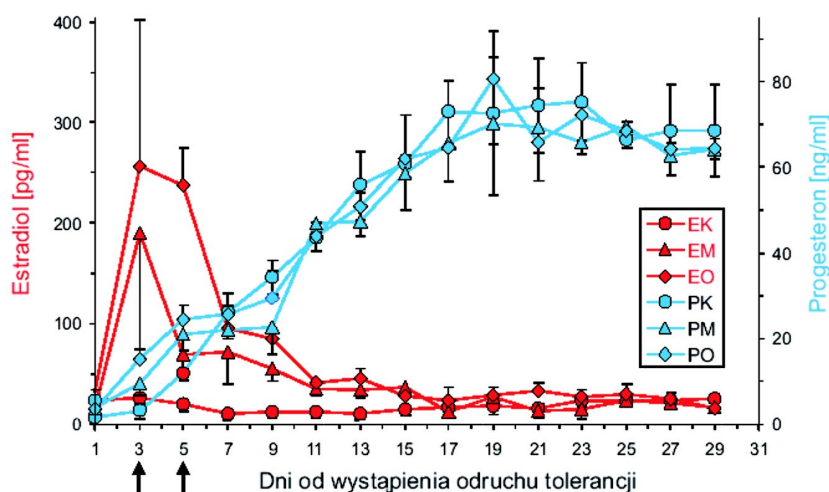
Istotność różnic pomiędzy grupami określono przy pomocy programu komputerowego Statistica™ PL, stosując test Kruskala-Wallisa oraz U-test Mann-Whitneya na poziomie  $p \leq 0,05$ .

### Wyniki i omówienie

Zmiany stężeń estradiolu i progesteronu w krwi obwodowej u suk kontrolnych obserwowane od pierwszego dnia po wystąpieniu odruchu tolerancji miały typowy przebieg dla cyklu jajnikowego (6, 32, 33). W ciągu pierwszych 6 dni obserwowano spadek stężenia estradiolu z około 30 pg/ml do wartości ustalonych w pozostałym okresie na poziomie  $18 \pm 7$  pg/ml. Natomiast stężenia progesteronu były niskie w ciągu pierwszych 4 dni (około 2 ng/ml), a następnie stopniowo wzrastały, osiągając po 17. dniu stały, wysoki poziom (60-80 ng/ml), który utrzymywał się do końca obserwacji (ryc. 1). Zwiększone początkowo stężenia estradiolu przy niskich poziomach progesteronu oraz brak różnic pomiędzy grupami w okresie poprzedzającym iniekcje estradiolu wskazują, że okres cyklu, w którym rozpoczęto obserwacje był podobny u wszystkich zwierząt i odpowiadał fazie pęcherzykowej (4, 8). Wysokie stężenia progesteronu w końcowym okresie obserwacji były typowe dla fazy lutealnej trwającej u suk około 75 dni (17).

Iniekcje estrogeny spowodowały podobne i proporcjonalne do zastosowanej dawki zmiany stężeń tego hormonu w krwi. Podanie niskiej dawki, 10  $\mu\text{g/kg}$ , wywołało bezpośredni wzrost poziomu estradiolu, średnio do 190 pg/ml, który w okresie następujących 6 dni wynosił 50-60 pg/ml, po czym do 12. dnia następował dalszy spadek do wartości nieróżniących się od fizjologicznie występujących. Natomiast podanie dziesięciokrotnie wyższej dawki spowodowało gwałtowny wzrost poziomu estradiolu, średnio do 260 pg/ml, który sukcesywnie malał w ciągu następujących 6 dni, a dalszy przebieg zmian był zbliżony do poziomów obserwowanych w grupie traktowanej niższą dawką (ryc. 1).

W czasie pierwszych czterech dni po iniekcji estrogeny stwierdzono podwyższony poziom progesteronu, jednak bez wpływu na jego dalszy wzrost i czas wystąpienia maksymalnych stężeń. Może to wskazywać na przejściowy efekt wzmożonej sekrecji progesteronu do krwi obwodowej. Efekt podania estradiolu na stężenia obu hormonów w krwi zanikał po 12 dniach od iniekcji, niezależnie od stosowanej dawki. Wynika z tego, iż podanie zarówno niskiej, jak i wysokiej dawki estrogeny spowodowało wystąpienie stężeń estradiolu (przez okres 6 dni) znacznie przekraczających wartości szczytowe w okresie poprzedzającym owulację (5, 17). Zrównanie obwodowych stężeń obu hormonów we wszystkich badanych grupach nastąpiło po 15. dniu od wystąpienia odruchu tolerancji i nie podlegały one znaczącym zmianom do końca obserwacji. Stąd można stwier-



Ryc. 1. Zmiany stężeń estradiolu (E) oraz progesteronu (P) we krwi obwodowej suk z fizjologicznym cyklem jajnikowym (K) oraz po iniekcji benzoesanu estradiolu w dawce 10  $\mu\text{g/kg}$  (M) lub 100  $\mu\text{g/kg}$  (O) aplikowanej w 3. i 5. dniu (strzałki) po wystąpieniu odruchu tolerancji

dzić, iż w okresach, kiedy były pobierane wycinki macicy do analizy receptorów, średnie stężenie hormonów we krwi było podobne u wszystkich zwierząt i wynosiło dla estradiolu  $21 \pm 8$  pg/ml, a dla progesteronu  $68 \pm 8$  ng/ml.

Analiza receptorów wykazała obecność miejsc wiążących typowych dla ER i PR we wszystkich badanych próbach. Wartości stałej dysocjacji były podobne we wszystkich oznaczanych preparatach i były niższe dla ER ( $1,14 \pm 0,20$  nmol/l) aniżeli dla PR ( $1,81 \pm 0,55$  nmol/l). Wyjątek stanowiły wyższe wartości Kd dla PR oznaczone w próbach pobranych w 28. dniu po pierwszej iniekcji 100  $\mu\text{g/kg}$  (grupa O) zarówno dla frakcji wolnej ( $3,82 \pm 0,61$  nmol/l), jak i strukturalnej ( $3,33 \pm 0,81$  nmol/l). Podobny wzrost wartości Kd (do 6 nmol/l) występuje podczas szczytowych stężeń tego receptora w pierwszych dniach cyklu owulacyjnego (12).

Uzyskane wyniki ilościowe pomiarów ER i PR przedstawiono w jednostkach charakterystycznych dla frakcji, a ich sumy jako całkowitą zawartość w gramie tkanki (tab. 1). Dane pozwalające na bezpośrednie porównanie ilości receptora frakcji wolnej i strukturalnej wyrażono w postaci średniej ilości cząsteczek receptora w komórce (ryc. 2). U suk z grupy kontrolnej całkowita ilość ER, jak również zawartość w poszczególnych frakcjach nie podlegała znaczącym zmianom w czasie. Wartości średnie liczone z obu okresów łącznie wynosiły dla frakcji wolnej  $53 \pm 14$  fmol/mg białka cytozolowego, dla strukturalnej  $823 \pm 324$  fmol/mg DNA, a ich sumaryczna zawartość w tkance  $5,97 \pm 2,18$  pmol/g. Analogicznie określona średnia zawartość cząsteczek ER w komórce wyniosła  $5500 \pm 2100$ , w której nieznaną większość stanowiła frakcja strukturalna (55% i 57%). Ilości ER i PR w pierwszym okresie były podobne, natomiast w drugim okresie obserwowano spadek całkowitego PR z  $4500 \pm 1050$  do  $1900 \pm 1530$  n/komórkę z zachowaniem przewagi frakcji strukturalnej (67% i 65%). Obserwowane ilości obu receptorów są charakterystyczne dla fazy lutealnej, w której u suk ER

**Tab. 1. Wyniki pomiarów receptora estrogenowego i progesteronowego macicy suk po wystąpieniu spontanicznej rui oraz po podaniu dwóch różnych dawek benzoesanu estradiolu ( $\bar{x} \pm SD$ )**

Badany receptor	Dawka estrogenu * ( $\mu\text{g/kg}$ )					
	0		10		100	
	14	28	14	28	14	28
<b>Estrogenowy</b>						
Wolny (fmol/mg białka)	50 <sup>a</sup> (14)	56 <sup>a</sup> (17)	352 <sup>b</sup> (161)	117 <sup>bc</sup> (41)	92 <sup>c</sup> (12)	55 <sup>a</sup> (9)
Strukturalny (fmol/mg DNA)	856 <sup>a</sup> (163)	790 <sup>a</sup> (482)	1520 <sup>b</sup> (71)	818 <sup>a</sup> (262)	1430 <sup>b</sup> (847)	1050 <sup>a</sup> (272)
Całkowity (pmol/g tkanki)	6,06 <sup>a</sup> (2,95)	5,88 <sup>a</sup> (1,79)	20,90 <sup>b</sup> (1,79)	8,17 <sup>a</sup> (2,48)	10,50 <sup>a</sup> (4,88)	5,64 <sup>a</sup> (2,74)
<b>Progesteronowy</b>						
Wolny (fmol/mg białka)	28 <sup>a</sup> (9)	18 <sup>a</sup> (6)	257 <sup>b</sup> (141)	16 <sup>a</sup> (3)	50 <sup>a</sup> (17)	142 <sup>b</sup> (60)
Strukturalny (fmol/mg DNA)	815 <sup>a</sup> (187)	331 <sup>b</sup> (90)	2160 <sup>c</sup> (1610)	385 <sup>b</sup> (124)	982 <sup>a</sup> (141)	7060 <sup>c</sup> (1130)
Całkowity (pmol/g tkanki)	4,68 <sup>a</sup> (1,09)	2,16 <sup>b</sup> (0,17)	18,70 <sup>c</sup> (3,76)	2,03 <sup>b</sup> (0,16)	6,88 <sup>a</sup> (1,42)	28,90 <sup>d</sup> (6,73)

Objaśnienia: \* – iniekcja i.m. benzoesanu estradiolu w 3. i 5. dniu po wystąpieniu odruchu tolerancji; \*\* – liczba dni po pierwszej iniekcji estrogenu. Różne oznaczenia literowe w wierszach wskazują istotne różnice wartości średnich ( $p < 0,05$ )

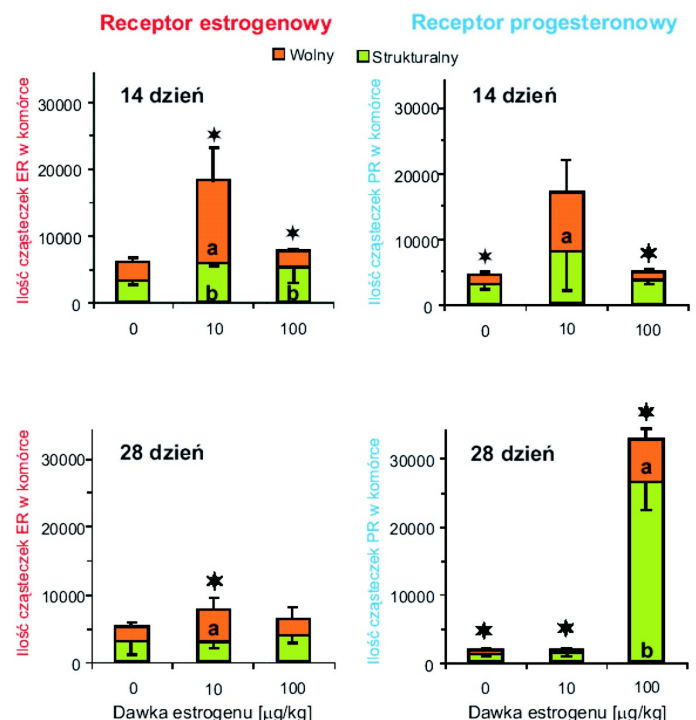
utrzymuje się na niskich poziomach, a PR ulega sukcesywnie zmniejszeniu pod wpływem wysokich stężeń progesteronu w krwi (9, 12, 19).

Podanie niskiej dawki estrogenu (grupa M) spowodowało w 14. dniu po pierwszej iniekcji ponad 3-krotny wzrost całkowitej ilości ER oraz 4-krotny wzrost PR, osiągając poziomu wartości szczytowych występujących w pierwszych dniach cyklu jajnikowego (9, 12, 19). Wzrost ten dotyczył głównie frakcji wolnej, udział frakcji strukturalnej ER zmalał do 32%, a w przypadku PR nastąpiło zrównanie ilościowe obu frakcji. Wywołane zmiany prawie całkowicie zanikły w drugim okresie obserwacji, ustalając się na poziomach oznaczonych w grupie kontrolnej z wyjątkiem frakcji wolnej ER, której ilość pomimo znacznego spadku, pozostała istotnie wyższa (ryc. 2).

Podanie wysokiej dawki estrogenu (grupa O) wywołało zaskakująco niewielkie zmiany ER, powodując jedynie w 14. dniu po iniekcji wzrost frakcji strukturalnej do wartości obserwowanych w grupie M. Brak istotnych zmian całkowitego ER świadczy o procesie translokacji, w wyniku której aż 72% cząsteczek zostało związanych ze strukturami komórkowymi. Natomiast zmiany PR stwierdzono jedynie w drugim okresie, którego ilości początkowo nieróżniące się od występujących fizjologicznie wzrosły do najwyższych zmierzonych, przewyższając niemal dwukrotnie ilości obserwowane w 14. dniu po podaniu niskiej dawki estradiolu. Wartości te wskazują na brak hamującego wpływu wysokich stężeń obwodowych progesteronu (down regulation), a ilości całkowitego PR odpowiadały wartości 28 pmol/g określonej dla końcowej fazy rujowej (19).

Istotny jest również fakt, że wzrost ten był dominujący dla frakcji strukturalnej, zwiększając jej udział procentowy do 81%.

Przedstawione dane stanowią pierwszy opis zmian ER i PR macicy po zastosowaniu antykoncepcji hormonalnej u suk. Uzyskane wyniki wykazują jednoznaczne zmiany aktywności obu receptorów. Jednak charakter obserwowanych zmian wskazuje na dwa jakościowo różne procesy zależne od zastosowanej dawki. Dwukrotna iniekcja 10  $\mu\text{g/kg}$  estrogenu spowodowała zmiany charakterystyczne dla wzmożonej aktywności ER $\alpha$ , który pod wpływem hormonu stymuluje ekspresję zarówno własnego genu, jak i genu kodującego PR (16, 18, 20). Natomiast spadek ilości obu receptorów z czasem może być konsekwencją działania hamującego PR na ekspresję własnego genu, jak i stymulowaną hormonem aktywność ER (22). Analogicznie podana dawka 100  $\mu\text{g/kg}$  spowodowała efekty wskazujące na antagonistyczne działanie ER $\alpha$  i ER $\beta$ , których równoczesna aktywacja hormonem prowadzi do zablokowania ekspresji kodujących ich genów (16). Natomiast opóźniony w czasie wzrost ilości PR może być związany



**Ryc. 2. Zmiany ilościowe frakcji wolnej i strukturalnej receptora estrogenowego oraz progesteronowego macicy suk po podaniu dwóch różnych dawek benzoesanu estradiolu stosowanych w celach antykoncepcyjnych. Wyniki pomiarów wykonanych w tkankach pobranych w 14. i 28. dniu po pierwszej iniekcji (patrz tab. 1) wyrażono w postaci średniej ilości cząsteczek receptora w komórce. Istotność różnic wartości średnich ( $p \leq 0,05$ ) zaznaczono dla grup, w których wystąpiły różnice pomiędzy frakcjami receptora w tkance (\*) oraz dla różnic pomiędzy grupami szacowanymi oddzielnie dla frakcji wolnej (a) i strukturalnej (b)**

z odblokowaniem jednego z trzech niezależnych poznanych szlaków działania estrogenów na PR w macicy (I) poprzez klasyczny ER $\alpha$  (II), poprzez ER $\beta$  lub (III) tzw. mechaniczny z udziałem progesteronu, który stymuluje różnicowanie komórek doczesnowych w podścielisku (11, 18). Wyniki te wskazują jednoznacznie na brak proporcjonalności efektów do wielkości stosowanej dawki, co pozwala na wysunięcie hipotezy o istnieniu wartości progowej dawki estrogenów, powyżej której następuje zmiana w lokalnym systemie regulacji estrogenowej macicy.

Obecnie wiadomo, iż stosowanie estrogenów (szczególnie w wysokich dawkach) może prowadzić do przedłużonego występowania rui, ropomacicza, supresji szpiku kostnego i anemii aplastycznej. Z danych w piśmiennictwie wynika, że ryzyko występowania efektów ubocznych może być znacznie ograniczone w przypadku stosowania estrogenów w końcowym okresie rui u suk (3, 26). Wyniki ostatnio przeprowadzonych badań populacyjnych u ludzi wskazują, iż stosowanie estrogenów w okresie naturalnie występujących ich zwiększonych stężeń, nie powoduje zmian nowotworowych i jest bardziej bezpieczne aniżeli podawanie w kombinacji z progestagenami (10). Przyjmując wzmożoną aktywność ER za wskaźnik zagrożenia nowotworowego, to uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że zastosowanie wysokiej dawki (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) jest stosunkowo bezpieczne. Wskazują na to również wyniki opisanej przez nas oceny histopatologicznej, z której wynika, iż dawka ta powoduje całkowity zanik figur mitotycznych komórek nabłonka gruczołowego macicy (14). Brak jest jednak danych odnośnie do implikacji klinicznych zaobserwowanego znacznego wzrostu PR, który zlokalizowany głównie we frakcji strukturalnej jest chroniony przed degradacją (2). Nie jest jednak wykluczone, iż stosowanie niskich dawek może być równie bezpieczne, ponieważ wysokie wartości ER znacząco maleją w okresie pomiędzy 14. a 28. dniem po aplikacji estrogenu, a ilość PR ustala się na poziomach występujących fizjologicznie.

Podsumowując, można stwierdzić zróżnicowane jakościowo działanie niskich i wysokich dawek estrogenów na aktywność receptorów estrogenowych i progesteronowych w macicy. Aby estrogeny mogły być wykorzystane jako bezpieczny środek zapobiegania niepożądanego ciąży u suk, konieczne jednak są dalsze badania nad mechanizmem ich działania oraz ustalenie minimalnej i efektywnej dawki.

## Piśmiennictwo

- Boryczko Z., Katkiewicz M., Bostedt H., Gajewski Z.: Ropomacicze u suk – etiopatogeneza, objawy, rozpoznawanie i leczenie. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 246-250.
- Botos J., Xian W., Smith D. F., Smith C. L.: Progesterone receptor deficient in chromatin binding has an altered cellular state. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 15231-15239.
- Bowen R. A., Olson P. N., Behrendt M. D., Wheeler S. L., Husted W., Nett T. M.: Efficacy and toxicity of estrogens commonly used to terminate canine pregnancy. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1985, 186, 783-788.
- Concannon P. W., McCann J. P., Temple M.: Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1989, 39, 3-25.
- Concannon P. W., Meyers-Wallen V. N.: Current and proposed methods for contraception and termination of pregnancy in dogs and cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1991, 198, 1214-1225.
- Edqvist L. E., Johansson E. D., Kasstrom H., Olsson S. E., Richkind M.: Blood plasma levels of progesterone and oestradiol in the dog during the oestrous cycle and pregnancy. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1975, 78, 554-564.
- Eilts B. E.: Pregnancy termination in the bitch and queen. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 2002, 17, 116-123.
- England G., Concannon P. W.: Determination of the optimal breeding time in the bitch: Basic considerations, [w:] Concannon P. W., England G., Verstegen III J., Linde-Forsberg C. (wyd.): *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. International Veterinary Information Service, Ithaca NY 2002.
- Fernandes P. A., Bowen R. A., Sawyer H. R., Nett T. M., Gorell T. A.: Concentration of receptors for estradiol and progesterone in canine endometrium during estrus and diestrus. *Am. J. Vet. Res.* 1989, 50, 64-67.
- Gadducci A., Biglia N., Sismondi P., Genazzani A. R.: Breast cancer and sex steroids: Critical review of epidemiological, experimental and clinical investigations on etiopathogenesis, chemoprevention and endocrine treatment of breast cancer. *Gynecol. Endocrinol.* 2005, 20, 343-360.
- Grümmer R., Hewitt S. W., Traub O., Korach K. S., Winterhager E.: Different regulatory pathways of endometrial connexin expression: preimplantation hormonal-mediated pathway versus embryo implantation-initiated pathway. *Biol. Reprod.* 2004, 71, 273-281.
- Johnston S. D., Kiang D. T., Seguin B. E., Hegstad R. L.: Cytoplasmic estrogen and progesterone receptors in canine endometrium during the estrous cycle. *Am. J. Vet. Res.* 1985, 46, 1653-1658.
- Jurka P.: Ocena zmian zachodzących w macicy i jajnikach po stosowaniu steroidowych preparatów antykoncepcyjnych u suk. Praca doktorska, SGGW, Warszawa 1999.
- Jurka P., Snochowski M., Boryczko Z.: Wpływ dawki estrogenu na zmiany morfologiczne jajnika i macicy u suk. *Medycyna Wet.* 2007, w druku.
- Karczewski W., Ostrzeszewicz G., Nagajewski M.: Analiza czynników usposabiających do występowania ropomacicza oraz wyników leczenia operacyjnego tego schorzenia *Medycyna Wet.* 1984, 4, 487-488.
- Koehler K. F., Helguero L. A., Haldosén L. A., Warner M., Gustafsson J. A.: Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor  $\beta$ . *Endocr. Rev.* 2005, 26, 465-478.
- Kooistra H. S., den Hertog E., Okkens A. C., Mol J. A., Rijnberk A.: Pulsatile secretion pattern of growth hormone during the luteal phase and mid-anoestrus in beagle bitches. *J. Reprod. Fert.* 2000, 119, 217-222.
- Kurita T., Lee K. J., Saunders P. T. K., Cooke P. S., Taylor J. A., Lubahn D. B., Zhao C., Mäkelä S., Gustafsson J. A., Dahiya R., Cunha G. R.: Regulation of progesterone receptors and decidualization in uterine stroma of the estrogen receptor- $\alpha$  knockout mouse. *Biol. Reprod.* 2001, 64, 272-283.
- Lessey B. A., Gorell T. A.: A cytoplasmic estradiol receptor in the immature Beagle uterus. *J. Steroid. Biochem.* 1980, 13, 211-217.
- Levin E. R.: Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol. Endocrinol.* 2001, 19, 1951-1959.
- Nuclear Receptors. Nomenclature Committee. *Cell* 1999, 97, 161-163.
- Qiu M., Olsen A., Faivre E., Horwitz K. B., Lange C. A.: Mitogen-activated protein kinase regulates nuclear association of human progesterone receptors. *Mol. Endocrinol.* 2003, 17, 628-642.
- Reynaud K., Fontbonne A., Marseloo N., Thoumire S., Chebrou M., de Lesegno C. V., Chastant-Maillard S.: In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction* 2005, 130, 193-201.
- Snochowski M.: Receptory tkankowe. Metody radioimmunologiczne i radiokompetycyjne stosowane w klinice (Red. Kokot F., Stupnicki R.) PZWL, Warszawa 1985, 3, 55-66.
- Snochowski M., Romanowicz K.: The use of estrogen receptor for evaluation of phytoestrogens activities in mammals. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2003, 51, 175-187.
- Sutton D. J., Geary M. R., Bergman J. G.: Prevention of pregnancy in bitches following unwanted mating: a clinical trial using low dose oestradiol benzoate. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1997, 51, 239-243.
- Tata J. R.: One hundred years of hormones: A new name sparked multidisciplinary research in endocrinology, which shed light on chemical communication in multicellular organisms. *EMBO Rep.* 2005, 6, 490-496.
- Tsutsui T., Mizutani W., Hori T., Oishi K., Sugi Y., Kawakami E.: Estradiol benzoate for preventing pregnancy in mismated dogs. *Theriogenology* 2006, 66, 1568-1572.
- Turgeon J. L., McDonnell D. P., Martin K. A., Wise P. M.: Hormone therapy: physiological complexity belies therapeutic simplicity. *Science* 2004, 304, 1269-1273.
- Tyagi R. K., Amazit L., Lescop P., Milgrom E., Guiochon-Mantel A.: Mechanisms of progesterone receptor export from nuclei: role of nuclear localization signal, nuclear export signal, and Ran guanosine triphosphate. *Mol. Endocrinol.* 1998, 12, 1684-1695.
- Wanke M. M., Romagnoli S., Verstegen J., Concannon P. W.: Pharmacological approaches to pregnancy termination in dogs and cats including the use of prosta-glandins, dopamine agonists, and dexamethasone, [w:] Concannon P. W., England G., Verstegen J., Linde-Forsberg C. (wyd.): *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Ithaca 2002.
- Weilenmann R., Arnold S., Dobeli M., Rusch P., Zerobin K.: Estradiol and progesterone concentrations in the plasma of nonpregnant bitches during the sexual cycle. *Schweiz Arch. Tierheilkd.* 1993, 135, 51-57.
- Weng B. C., Chew B. P., Wong T. S., Park J. S., Kim H. W., Lepine A. J.: Beta-carotene uptake and changes in ovarian steroids and uterine proteins during the estrous cycle in the canine. *J. Anim. Sci.* 2000, 78, 1284-1290.