Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Biologii i Biotechnologii

Numer albumu: 1379

mgr Marlena Gudelska

Rola chemeryny w macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży

ROZPRAWA DOKTORSKA
składająca się z cyklu artykułów naukowych
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie nauki biologiczne

Praca doktorska wykonana
w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Promotor: *prof. dr hab. Nina Smolińska*
Promotor pomocniczy: *dr Kamil Dobrzyń*

Badania finansowane ze źródeł Narodowego Centrum Nauki
w ramach projektu OPUS-13 (2017/25/B/NZ9/00040)

Olsztyn 2023

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE 2
ABSTRACT 5
SPIS PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ 8
WSTĘP 9
HIPOTEZA, CEL ORAZ ZADANIA BADAWCZE 13
MATERIAŁ I METODY BADAWCZE 16
Zwierzęta doświadczalne 16
Metody badawcze 17
Pobieranie materiału i hodowle *in vitro* skrawków błony śluzowej 17
Real-time PCR 19
Western blot 21
Test immunoenzymatyczny (ELISA) 27
Test radioimmunologiczny (RIA) 27
Analiza statystyczna 27
WYNIKI 28
Zadanie nr 1 – ekspresja genów i białek systemu chemerynowego w macicy świni domowej 28
Zadanie nr 2 – koncentracja chemeryny w płynie macicznym świni domowej 30
Zadanie nr 3 – wpływ estradiolu i progesteronu na ekspresję genu i sekrecję chemeryny oraz ekspresję genów i białek receptorów chemeryny w błonie śluzowej macicy świni domowej 30
Zadanie nr 4 – wpływ chemeryny na sekrecję estradiolu i progesteronu oraz ekspresję białek czynników i enzymów steroidogenicznych w błonie śluzowej macicy świni domowej 32
Zadanie nr 5 – wpływ chemeryny na fosforylację białek ERK1/2 oraz Akt w komórkach błony śluzowej macicy świni domowej 33
PODSUMOWANIE I WNIOSKI 34
BIBLIOGRAFIA 35

STRESZCZENIE

ROLA CHEMERYNY W MACICY ŚWINI DOMOWEJ (*Sus scrofa domestica* L.) W CZASIE CYKLU RUJOWEGO I WCZESNEJ CIĄŻY

mgr Marlena Gudelska

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem *prof. dr hab. Niny Smolińskiej* oraz *dr. Kamila Dobrzynia* w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Występujące powszechnie nadwaga i otyłość oraz wiążące się z nimi zaburzenia metaboliczne stanowią istotny problem, którego konsekwencją może być, między innymi, coraz częstsze występowanie problemu niepłodności. Tkanka tłuszczowa, poza swoją rolą w magazynowaniu energii, jest również największym narządem wydzielania wewnętrznego. Stwierdzono, że tkanka tłuszczowa stanowi źródło wielu bioaktywnych czynników, do których zalicza się także adipokiny – hormony odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy energetycznej. Coraz więcej badań wskazuje na istotną rolę adipokin jako łączników między statusem metabolicznym zwierząt a ich zdolnością reprodukcyjną. Do adipokin należy szereg hormonów białkowych, w tym również chemeryna – produkt genu *RARRES2* (inaczej nazywanego również *TIG2*). Chemeryna oddziałuje na komórki docelowe wiążąc się ze swoistymi receptorami należącymi do rodziny receptorów związanych z białkiem G, receptorem 1 chemokin (CMKLR1), receptorem 1 związanym z białkiem G (GPR1) oraz receptorem 2 chemokin z motywem C-C (CCRL2). Adipokina ta wraz ze swoimi receptorami tworzy system chemerynowy. Chemeryna wykazuje działanie plejotropowe, a obecnie coraz więcej badań wskazuje na jej udział w regulacji funkcjonowania układu rozrodczego samic. Niemniej jednak niewiele wiadomo na temat funkcji jaką chemeryna pełni w macicy, szczególnie świni domowej.

Celem niniejszej pracy była weryfikacja hipotezy badawczej, zakładającej udział chemeryny w regulacji funkcjonowania macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w czasie cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży. W celu jej weryfikacji wykonano następujące zadania badawcze:

1. określono, metodami real-time PCR i Western blot, ekspresję genów i białek chemeryny i jej receptorów (CMKLR1, GPR1 i CCRL2) w błonie śluzowej i błonie mięśniowej macicy świni w różnych fazach cyklu rujowego (dni 2–3,

10–12, 14–16 i 17–19) i wczesnej ciąży (dni 10–11, 12–13, 15–16, 27–28 i 30–32), a także w trofoblastach i zarodkach;

2. określono, metodą immunoenzymatyczną (ELISA), koncentrację chemeryny w płynie macicznym (ULF) świni w różnych fazach cyklu rujowego (dni 2–3, 10–12, 14–16 i 17–19) oraz w okresie wczesnej ciąży (dni 10–11, 12–13, 15–16 i 27–28);
3. zbadano wpływ estradiolu (E_2) i progesteronu (P_4) na ekspresję genu *RARRES2* i sekrecję chemeryny (real-time PCR i ELISA), oraz ekspresję genów i białek receptorów CMKLR1, GPR1 i CCRL2 (real-time PCR i Western blot) w błonie śluzowej macicy świni w wyżej wymienionych okresach wczesnej ciąży, oraz w fazie środkowolutealnej cyklu rujowego (10–11 dzień cyklu);
4. określono, metodą radioimmunologiczną (RIA), wpływ chemeryny na sekrecję E_2 i P_4 oraz ekspresję białek czynników i enzymów steroidogenicznych (StAR, $P450_{SCC}$, 3βHSD, $P450_{C17}$, $P450_{AROM}$; Western blot) w błonie śluzowej macicy świni w wyżej wymienionych okresach wczesnej ciąży oraz w fazie środkowolutealnej cyklu rujowego (10–11 dzień cyklu);
5. zbadano, metodą Western blot, wpływ chemeryny na fosforylację ścieżek sygnałowych ERK1/2 oraz Akt w błonie śluzowej macicy w 10–11 dniu cyklu rujowego.

Wyniki uzyskane w trakcie badań pozwaliły stwierdzić, że:

1. obecność systemu chemerynowego w macicy, trofoblastach i zarodkach świni sugeruje, że chemeryna, również ta lokalnie wytwarzana, może wpływać na regulację funkcji rozrodczych macicy za pośrednictwem swoich receptorów;
2. zmiany zawartości transkryptów i białek systemu chemerynowego w macicy świni oraz koncentracji hormonu w ULF w trakcie cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży sugerują, że ekspresja chemeryny i jej receptorów zależy od statusu hormonalnego zwierząt;
3. E_2 i P_4 regulują ekspresję systemu chemerynowego w błonie śluzowej macicy w okresie wczesnej ciąży, co wskazuje, że hormony steroidowe mogą być istotnym regulatorem ekspresji chemeryny i jej receptorów w macicy świni domowej;
4. chemeryna wpływa na sekrecję E_2 i P_4 w błonie śluzowej macicy i reguluje ekspresję białek zaangażowanych w proces syntezy hormonów steroidowych,

w czym najprawdopodobniej pośredniczą ścieżki sygnałowe ERK1/2 oraz Akt, co sugeruje, że chemeryna może regulować procesy rozrodcze poprzez wpływ na proces steroidogenezy w macicy świni.

Chemeryna, poprzez wpływ na proces steroidogenezy w błonie śluzowej macicy, może pełnić istotną rolę w funkcjonowaniu układu rozrodczego samicy w czasie cyklu rujowego i w okresie okołoimplantacyjnym. Ponadto chemeryna może być czynnikiem utrzymującym prawidłowe środowisko dla rozwijających się zarodków.

Badania finansowane ze źródeł Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu
OPUS-13 (2017/25/B/NZ9/00040)

ABSTRACT

THE ROLE OF CHEMERIN IN THE UTERUS OF DOMESTIC PIG (*Sus scrofa domestica* L.) DURING THE OESTROUS CYCLE AND EARLY PREGNANCY

mgr Marlena Gudelska

The doctoral thesis was written under the supervision of *prof. dr hab. Nina Smolińska* and *dr Kamil Dobrzyń* in the Department of Animal Anatomy and Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn.

Ubiquitously occurring overweight and obesity are growing problems, resulting in an increased incidence of infertility. In addition to energy storage, the adipose tissue is also the largest organ of internal secretion. It has been found that the adipose tissue is a source of many factors, including the adipokines – bioactive peptides that affect many organs to maintain physiological homeostasis. More and more reports indicate the role of adipokines as a link between the metabolic status of animals and their reproductive capacity. Adipokines include several factors, among them chemerin – product of *RARRES2* (also known as *TIG2*) gene. Chemerin exhibits its biological activity through binding to specific G protein-coupled receptors, which include chemokine receptor 1 (CMKLR1), G protein-coupled receptor 1 (GPR1) and C-C motif chemokine receptor 2 (CCRL2). Adipokine and its receptors form the chemerin system. Chemerin has a pleiotropic effect, and numerous reports indicate its participation in the functioning of the female reproductive system. Nevertheless, little is known about the function of this adipokine in the uterus, particularly of the domestic pig.

The aim of this study was to confirm the research hypothesis, which assumes the participation of chemerin in the regulation of the functioning of the uterus of the domestic pig (*Sus scrofa domestica* L.) during the oestrous cycle and early pregnancy. In order to verify the hypothesis, the following research tasks were performed:

1. determination of the expression of chemerin and its receptors' (CMKLR1, GPR1 and CCRL2) genes and proteins by real-time PCR and Western blot, respectively, in the endometrium and myometrium of the porcine uterus in the different phases of the oestrous cycle (days 2 to 3, 10 to 12, 14 to 16 and 17 to 19) and during early pregnancy (days 10 to 11, 12 to 13, 15 to 16, 27 to 28 and 30 to 32) as well as in the trophoblasts and conceptuses;

2. determination of the concentrations of chemerin in the uterine luminal flushings (ULF) of pigs by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the different phases of the oestrous cycle (days 2 to 3, 10 to 12, 14 to 16 and 17 to 19) and during early pregnancy (days 10 to 11, 12 to 13, 15 to 16 and 27 to 28);
3. determination of the effect of oestradiol (E_2) and progesterone (P_4) on *RARRES2* gene expression and chemerin secretion (real-time PCR and ELISA) as well as expression of CMKLR1, GPR1 and CCRL2 genes and proteins (real-time PCR and Western blot) in the porcine endometrium during the above-mentioned periods of early pregnancy and in the mid-luteal phase of the oestrous cycle (days 10 to 11);
4. determination of the chemerin effect on the secretion of E_2 and P_4 (RIA) and the expression of steroidogenic factors/enzymes (StAR, $P450_{SCC}$, 3βHSD, $P450_{C17}$, $P450_{AROM}$; Western blot) in the endometrium of pigs during the above-mentioned periods of early pregnancy and in the mid-luteal phase of the oestrous cycle (days 10 to 11);
5. determination of the chemerin effect on the phosphorylation of ERK1/2 and Akt signalling pathways (Western blot) in the porcine endometrium on days 10 to 11 of the oestrous cycle.

The results obtained during the implementation of this work allow to conclude that:

1. the presence of the chemerin system in the porcine uterus, trophoblasts and conceptuses suggests that chemerin, also locally produced, may influence the regulation of uterine reproductive functions through its receptors;
2. changes of the abundance of chemerin system transcripts and proteins in the porcine uterus and concentration of the hormone in ULF during the oestrous cycle and early pregnancy suggest that the expression of chemerin and its receptors is dependent on the hormonal status of animals;
3. E_2 and P_4 have the effect on the chemerin system expression in the uterine endometrium during early pregnancy, which indicates that steroid hormones may be an important regulator of the chemerin and its receptors' expression in the uterus of domestic pig;
4. chemerin affects the secretion of E_2 and P_4 in the endometrium and regulates the expression of proteins involved in the formation of these two steroids, which is most likely mediated by ERK1/2 and Akt signalling pathways. It suggests that

chemerin may regulate reproductive processes by affecting the process of steroidogenesis in the uterus of pig.

Chemerin by influencing the process of steroidogenesis in the endometrium may play an important role in the functioning of the female reproductive system during the oestrous cycle and the peri-implantation period. In addition, chemerin may be a factor maintaining a proper environment for developing embryos.

Research financed by the Polish National Science Center as part of the OPUS-13 project (2017/25/B/NZ9/00040)

SPIS PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Rozprawa doktorska składa się z **trzech oryginalnych prac badawczych opublikowanych w latach 2020, 2022 oraz 2023**, których tematyka obejmuje rolę chemeryny w macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w czasie cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży.

PUBLIKACJA 1: GUDELSKA M., DOBRZYŃ K., KIEŻUN M., RYTELEWSKA E., KISIELEWSKA K., KAMIŃSKA B., KAMIŃSKI T., SMOLIŃSKA N. **2020**. The expression of chemerin and its receptors (CMKLR1, GPR1, CCRL2) in the porcine uterus during the oestrous cycle and early pregnancy and in trophoblasts and conceptuses. Animal, 14(10), 2116–2128. DOI: 10.1017/S175173112000097X

(IF[1] = 3,240; pkt.[2] = 200)

PUBLIKACJA 2: GUDELSKA M., DOBRZYŃ K., KIEŻUN M., KISIELEWSKA K., RYTELEWSKA E., KAMIŃSKI T., SMOLIŃSKA N. **2023**. The effect of oestradiol and progesterone on chemerin system expression in the porcine endometrium during early pregnancy and the mid-luteal phase of the oestrous cycle. Theriogenology, 196:186-201. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.11.011

(IF[1] = 2,923; pkt.[2] = 140)

PUBLIKACJA 3: GUDELSKA M., DOBRZYŃ K., KIEŻUN M., KISIELEWSKA K., RYTELEWSKA E., KAMIŃSKI T., SMOLIŃSKA N. **2022**. Chemerin affects P4 and E2 synthesis in the porcine endometrium during early pregnancy. International Journal of Molecular Sciences, 23(2), 945. DOI: 10.3390/ijms23020945

(IF[1] = 6,208; pkt.[2] = 140)

Sumaryczny IF[1] publikacji: 12,371

Łączna liczba punktów MEiN[2]: 480

[1]IF – wskaźnik cytowań (ang. *Impact Factor*) czasopisma z roku wydania pracy wg Web of Science

[2]Liczba punktów za publikację wg Komunikatu Ministra Edukacji i Nauki w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych z dnia 21 grudnia 2021 r.

WSTĘP

Okres wczesnej ciąży jest krytycznym etapem rozwoju embrionalnego, który ściśle zależy od sygnalizacji molekularnej między zarodkiem a organizmem matki. Zaburzenia produkcji składników odżywczych i hormonów mogą wpływać na procesy rozpoznania ciąży i implantacji oraz rozwój zarodków, a w konsekwencji mogą doprowadzić do utraty ciąży. Powszechnie wiadomo, że nawet 30% zarodków świni domowej może nie przetrwać okresu wczesnej ciąży (SZEKERES-BARTHO i in., 1985; GEISERT I YELICH 1997).

Obecnie na całym świecie nadwaga i otyłość stanowią rosnące wyzwanie dla zdrowia publicznego, a jedną z istotnych jej konsekwencji może być coraz częstsze występowanie niepłodności (BROUGHTON I MOLEY 2017; CRAIG i in., 2017). Otyłość może prowadzić do rozwoju aż 13 typów nowotworów, w tym nowotworu piersi (zwłaszcza w okresie postmenopauzalnym), jajnika i błony śluzowej macicy. Otyłość matek zwiększa również ryzyko występowania cukrzycy ciążowej oraz stanu przedrzucawkowego i chorób metabolicznych potomstwa (MA i in., 2016; LAUBY-SECRETAN i in., 2016). Tkanka tłuszczowa, poza magazynowaniem energii, głównie w postaci trójglicerydów, jest również największym narządem wydzielania wewnętrznego. Stwierdzono, że tkanka tłuszczowa wydziela wiele bioaktywnych czynników, takich jak lipidy, cytokiny, egzosomalne mikroRNA czy adipokiny – peptydy wpływające na szereg narządów docelowych (FASSHAUER I BLÜHER 2015). Badania kliniczne i eksperymentalne wykazały, że adipokiny, poza ich istotną funkcją w regulacji metabolizmu energetycznego, są odpowiedzialne za regulację funkcjonowania układu rozrodczego i prawidłowego przebiegu ciąży (MATHEW i in., 2018; REVERCHON i in., 2014). Do grupy adipokin, poza takimi hormonami, jak m.in. leptyna, adiponektyna, czy wisfatyna, zalicza się również chemerynę, białko kodowane przez gen *RARRES2* (ang. *retinoic acid receptor responder* 2; *TIG2;* ang. *tazarotene-induced gene* 2; WITTAMER i in., 2003; MEDER i in., 2003).

Chemeryna została po raz pierwszy odkryta w skórze pacjentów chorych na łuszczycę, poddanych leczeniu tazarotenem (NAGPAL i in., 1997). Białko to jest syntetyzowane jako preprohormon, a następnie wydzielane jako nieaktywna prochemeryna, powstała po odcięciu N-końcowego 20-aminokwasowego peptydu. Aktywacja adipokiny zależy od miejsca odcięcia jej końcowego fragmentu przez

proteazę, która bierze udział w procesach zapalnych, koagulacji lub fibrynolizie (DU i in., 2009). Ze względu na strukturę pierwszorzędową, chemeryna uznawana jest za katelicydynę/cystatynę (ROURKE i in., 2013).

Chemeryna jest ligandem trzech receptorów należących do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G: receptora 1 chemokin (CMKLR1; ang. *chemokine like receptor 1*), receptora 1 związanego z białkiem G (GPR1; ang. *G protein-coupled receptor 1*) oraz receptora 2 chemokin z motywem C-C (CCRL2; ang. *C-C chemokine receptor-like 2*) (WITTAMER i in., 2003; MEDER i in., 2003; BARNEA i in., 2008). Adipokina ta wraz ze swoimi receptorami (CMKLR1, GPR1 i CCRL2) znana jest pod wspólną nazwą systemu chemerynowego. Receptor CMKLR1 jest obecny w komórkach układu odpornościowego, głównie w makrofagach, komórkach dendrytycznych oraz komórkach NK, których chemotaksja zależy od tego receptora (WITTAMER i in., 2003). Obecność receptora CMKLR1 stwierdzono również w komórkach spoza układu odpornościowego, między innymi w adipocytach, hepatocytach oraz komórkach śródbłonka naczyniowego (GORALSKI i in., 2007; DOCKE i in., 2013; KENNEDY i in., 2016). Transkrypty genu kodującego kolejny z receptorów chemeryny – *GPR1*, zostały pierwotnie zlokalizowane w ludzkim hipokampie. Obecnie wiadomo, że gen *GPR1* ulega ekspresji również w jajnikach, tkance mięśniowej, białej tkance tłuszczowej oraz skórze (MARCHESE i in., 1994; ROURKE i in., 2014; YANG i in., 2016; BANAS i in., 2015).

Wiązanie chemeryny z receptorami CMKLR1 oraz GPR1 wyzwala sygnalizację wewnątrzkomórkową, co może być związane ze zmianami w stężeniu jonów wapnia, 3`5`-cyklicznego monofosforanu adenozynowego (cAMP; ang. *3`5`-cyclic adenosine monophosphate*) oraz aktywnością różnych kinaz białkowych (BOZAOGLU i in., 2010). Transdukcja sygnału wywołana przez chemerynę, po połączeniu z receptorem CMKLR1, opiera się na kinazie białkowej regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK1/2; ang. *extracellular signal-regulated kinase*) i kinazie białkowej B (Akt; ang. *protein kinase B*) (MATTERN i in., 2014). Dowiedziono, że poprzez wiązanie z CMKLR1 chemeryna wzmacnia chemotaksję leukocytów (PENG i in., 2015). Obecność CMKLR1 w makrofagach i niedojrzałych komórkach dendrytycznych również potwierdza udział chemeryny w regulacji funkcji układu immunologicznego (WITTAMER i in., 2003). Pomimo dużego podobieństwa strukturalnego do CMKLR1, GPR1 pełni odmienne funkcje w organizmie (MATTERN

i in., 2014). Uważa się, że poprzez wiązanie z GPR1 chemeryna może regulować homeostazę glukozy podczas rozwoju otyłości (ROURKE i in., 2014). W przypadku układu rozrodczego chemeryna, za pośrednictwem GPR1, reguluje wydzielanie progesteronu (P_4) indukowane prostaglandyną $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) przez komórki jajnika myszy podczas rozwoju pęcherzyka jajnikowego, tworzenia się ciałka żółtego (CL) i luteolizy (YANG i in., 2016). ROURKE i in. (2015) stwierdzili, że chemeryna może również aktywować szlak kinazy RhoA i kinazy białkowej związanej z rho (ROCK; ang. *rho-associated protein kinase*) poprzez wiązanie z receptorem GPR1. Autorzy doszli do wniosku, że podobnie jak CMKLR1, GPR1 jest sprzężony z białkiem $G_{ai/o}$ i aktywuje kinazy białkowe aktywowane mitogenem (MAPK; ang. *mitogen-activated protein kinase*) (ROURKE i in., 2015). Trzeci z receptorów, CCRL2, pełni zupełnie odmienną funkcję. Wiąże on N-końcowy region chemeryny nie indukując transdukcji sygnału. Receptor ten jest odpowiedzialny za wychwyt chemeryny z otoczenia i prezentację C-końcowego odcinka hormonu sąsiednim komórkom posiadającym CMKLR1 (TAKAHASHI i in., 2008).

Chemeryna jest hormonem o działaniu plejotropowym. Pierwotna funkcja, z jaką wiązana była chemeryna, to stymulowanie chemotaksji komórek układu odpornościowego oraz uczestniczenie w rozwoju ostrego stanu zapalnego. Chemeryna posiada chimeryczną naturę, ponieważ może również uczestniczyć w wyciszaniu reakcji zapalnej (MAIANI I RONCUCCI 2015; WITTAMER i in., 2003). Stężenie adipokiny w surowicy koreluje z koncentracją markerów stanu zapalnego, takich jak białko C-reaktywne (CRP; ang. *C-reactive protein*), czynnik martwicy nowotworu α (TNFα; ang. *tumor necrosis factor alpha*) oraz interleukina 6 (IL-6; ang. *interleukin 6*) (LEHRKE i in., 2009; WEIGERT i in., 2010). Wiadomo również, że chemeryna wpływa na metabolizm lipidów i węglowodanów w tkance tłuszczowej (SLEDZIŃSKA i in., 2017).

Sukces reprodukcyjny zwierząt jest ściśle powiązany z mechanizmami kontrolującymi metabolizm energetyczny. Rosnąca liczba badań wskazuje na istotną rolę chemeryny jako łącznika integrującego metabolizm energetyczny i funkcjonowanie układu rozrodczego. Stwierdzono obecność chemeryny i CMKLR1 w ludzkich komórkach ziarnistych jajnika (REVERCHON i in., 2012), a chemeryny i GPR1 w komórkach ziarnistych oraz CL myszy (YANG i in., 2016). Stwierdzono, że elementy systemu chemerynowego są obecne w strukturach osi podwzgórze–

przysadka–jajniki (HPG) świni w okresie cyklu rujowego i wczesnej ciąży (SMOLINSKA i in., 2019; KISIELEWSKA i in., 2020a, b; RYTELEWSKA i in., 2020). Dodatkowo badania przeprowadzone przez SMOLINSKĄ i in. (2019) wykazały, że poziom adipokiny w osoczu świni jest zależny od statusu hormonalnego zwierzęcia. Niewiele wiadomo na temat roli jaką chemeryna pełni w macicy. Zaobserwowano obecność chemeryny i jej receptorów w błonie śluzowej macicy kobiet, zwłaszcza w komórkach podścieliska (ST) podczas procesu decydualizacji (CARLINO i in., 2012; JIN i in., 2015) oraz w ludzkim i szczurzym łożysku (GORALSKI i in., 2007; GARCES i in., 2012). Badania CARLINO i in. (2012) wykazały ponadto, że P_4 i estradiol (E_2) stymulowały sekrecję chemeryny przez komórki ST pochodzące od kobiet w ciąży, płodnych, ale nie będących w ciąży, oraz w trakcie menopauzy. GARCES i in. (2013) stwierdzili, że poziom chemeryny w surowicy kobiet we wczesnej ciąży (od 10 do 14 tygodnia) był istotnie niższy niż u kobiet niebędących w ciąży. Zaobserwowano jednak, że poziom hormonu wzrastał wraz z postępem ciąży, osiągając w jej późnym okresie (od 34 do 37 tygodnia) poziom porównywalny z obserwowanym u kobiet niecięża rnych (GARCES i in., 2013). Odwrotną zależność zaobserwowano u szczurów, u których stężenie chemeryny w surowicy zmniejszało się wraz z postępem ciąży (GARCES i in., 2012). Jak dotąd nieznana była rola chemeryny w funkcjonowaniu macicy świni domowej w okresie cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży.

HIPOTEZA, CEL ORAZ ZADANIA BADAWCZE

Hipoteza badawcza prezentowanej rozprawy doktorskiej zakłada **udział chemeryny w regulacji funkcjonowania macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w czasie cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży**. Jak dotąd nie poznano roli chemeryny w regulacji funkcjonowania układu rozrodczego świni, szczególnie macicy. Ne stwierdzono także, czy chemeryna może wpływać na proces steroidogenezy w błonie śluzowej macicy. Nieznany był również potencjalny wpływ hormonów steroidowych na ekspresję systemu chemerynowego w błonie śluzowej macicy. Wymienione luki w dotychczasowej wiedzy pozwoliły na postawienie następujących hipotez szczegółowych:

a) w błonie śluzowej oraz błonie mięśniowej macicy, a także w trofoblastach i zarodkach świni domowej ma miejsce ekspresja genów i białek chemeryny oraz jej receptorów (CMKLR1, GPR1 i CCRL2) a poziom ich ekspresji zależy od statusu hormonalnego zwierzęcia;
b) chemeryna jest obecna w płynie macicznym (ULF) świni, a jej koncentracja zmienia się w poszczególnych fazach cyklu rujowego i/lub okresach wczesnej ciąży;
c) hormony steroidowe (E_2 i P_4) wpływają na sekrecję chemeryny oraz ekspresję genu chemeryny oraz genów i białek jej receptorów (CMKLR1, GPR1 i CCRL2) w błonie śluzowej macicy świni;
d) chemeryna wpływa na sekrecję E_2 i P_4 przez komórki błony śluzowej macicy świni;
e) chemeryna wpływa na fosforylację białek ścieżek sygnałowych ERK1/2 oraz Akt w komórkach błony śluzowej macicy świni.

W celu weryfikacji postawionych hipotez zaplanowano następujące zadania badawcze:

1. zbadanie ekspresji genów i białek systemu chemerynowego w błonie śluzowej i mięśniowej macicy świni w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży, a także w trofoblastach i zarodkach *(Publikacja 1)*;
2. określenie koncentracji chemeryny w ULF świni w czasie cyklu rujowego i wczesnej ciąży *(Publikacja 1)*;

3. zbadanie wpływu E_2 i P_4 na ekspresję genu i sekrecję białka chemeryny oraz ekspresję genów i białek receptorów CMKLR1, GPR1 i CCRL2 w błonie śluzowej macicy świni podczas wczesnej ciąży oraz w fazie środkowolutealnej cyklu rujowego (10–11 dzień cyklu) *(Publikacja 2)*;
4. zbadanie wpływu chemeryny na sekrecję E_2 i P_4 oraz ekspresję białek czynników i enzymów steroidogenicznych: białkowego regulatora steroidogenezy (StAR; ang. *steroidogenic acute regulatory protein*), cytochromu P450 odszczepiającego boczny łańcuch cholesterolu ($P450_{SCC}$; ang. *cholesterol side-chain cleavage enzyme*), dehydrogenzy 3β-hydroksysteroidowej (3βHSD; ang. *3β-hydroxysteroid dehydrogenase*), cytochromu $P450_{C17}$ ($P450_{C17}$; ang. *steroid 17-α-hydroxylase*) i aromatazy cytochromu P450 ($P450_{AROM}$; ang. *aromatase*) w błonie śluzowej macicy świni podczas wczesnej ciąży oraz w fazie środkowolutealnej cyklu rujowgo (10–11 dzień cyklu) *(Publikacja 3)*;
5. zbadanie wpływu chemeryny na fosforylację białek ścieżek sygnałowych ERK1/2 oraz Akt w błonie śluzowej macicy świni w fazie środkowolutealnej cyklu rujowego (10–11 dzień cyklu) *(Publikacja 3)*.

Hipotezę, plan badawczy oraz podsumowanie uzyskanych wyników przedstawiono na **Rycinie 1**.

Rycina 1 Hipoteza, plan badawczy oraz podsumowanie uzyskanych wyników (CMKLR1 – receptor 1 chemokin, ang. *chemokine like receptor 1*; GPR1 – receptor 1 związany z białkiem G, ang. *G protein-coupled receptor 1*; CCRL2 – receptor 2 chemokin z motywem C-C, ang. *C-C chemokine receptor-like 2*; E_2 – estradiol; P_4 – progesteron)

MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

Wszystkie doświadczenia przeprowadzono zgodnie z polską Ustawą o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych z dnia 15 stycznia 2015 r. oraz Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych z dnia 22 września 2010 r..

Zwierzęta doświadczalne

Wykorzystane w doświadczeniach tkanki zostały pobrane od dojrzałych płciowo loszek (mieszańce towarowe w wieku 7–8 miesięcy i o wadze 130–140 kg) pochodzących z prywatnych hodowli i przeznaczonych do uboju oraz przetwórstwa mięsnego. Zwierzęta podzielono na grupy doświadczalne (n = 5 w grupie) w następujący sposób:

- 2–3 dzień cyklu rujowego (faza wczesnolutealna, okres formowania się ciałek żółtych),
- 10–11/12 dzień cyklu rujowego (faza środkowolutealna, okres, w którym występują w pełni funkcjonalne ciałka żółte),
- 14–16 dzień cyklu rujowego (faza późnolutealna, okres luteolizy),
- 17–19 dzień cyklu rujowego (faza pęcherzykowa),
- 10–11 dzień ciąży (migracja zarodków w macicy),
- 12–13 dzień ciąży (matczyne rozpoznanie ciąży),
- 15–16 dzień ciąży (początek implantacji),
- 27–28 dzień ciąży (zakończenie implantacji),
- 30–32 dzień ciąży (powstawanie łożyska).

Schemat podziału zwierząt na grupy doświadczalne został przedstawiony na **Rycinie 2**. W zadaniu nr 1 wykorzystano błonę śluzową i błonę mięśniową macicy świń będących w czasie cyklu rujowego (dni 2–3, 10–12, 14–16 i 17–19) oraz we wczesnej ciąży (dni 10–11, 12–13, 15–16, 27–28 i 30–32) oraz trofoblasty i zarodki pochodzące z 15–16, 27–28 i 30–32 dnia ciąży. W zadaniu nr 2 wykorzystano ULF pobrany od świń będących zarówno w trakcie cyklu rujowego (dni 2–3, 10–12, 14–16 i 17–19) jak i wczesnej ciąży (dni 10–11, 12–13, 15–16 i 27–28). W zadaniach nr 3 i 4 wykorzystano błonę śluzową macicy pobraną od świń będących we wczesnej ciąży (dni 10–11, 12–13, 15–16 i 27–28) oraz w 10–11 dniu cyklu

rujowego. Błona śluzowa macicy pobrana od świń będących w fazie środkowolutealnej (10–11 dzień cyklu rujowego) została wykorzystana do realizacji zadania nr 5.



Rycina 2 Schemat podziału zwierząt na grupy doświadczalne

Metody badawcze

W trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano następujące metody:

- pobieranie materiału i hodowle *in vitro* skrawków błony śluzowej macicy (zadania nr 3–5),
- real-time PCR (zadania nr 1 i 3),
- Western blot (zadania nr 1 i 3–5),
- test immunoenzymatyczny (ELISA; zadania nr 2 i 3).
- test radioimmunologiczny (RIA; zadanie nr 4),
- analiza statystyczna (zadania nr 1–5)

W dalszej części przedstawiono szczegóły wykorzystanych metod.

Pobieranie materiału i hodowle *in vitro* skrawków błony śluzowej

Fazę cyklu rujowego określono na podstawie morfologii jajników (AKINS I MORRISSETTE 1968). Dzień wystąpienia drugiej rui został wyznaczony jako dzień 0 cyklu rujowego. W przypadku zwierząt ciężarnych, krycie następowało w 1–2 dniu cyklu rujowego, a pierwszy dzień po zapłodnieniu uznano za pierwszy dzień ciąży. Dzień ciąży został potwierdzony przez obecność i ocenę morfologiczną zarodków (ANDERSON 1978). Faza cyklu rujowego oraz okres wczesnej ciąży zostały potwierdzone dodatkowo przez określenie stężenia P_4 w osoczu (NITKIEWICZ i in., 2012; DOBRZYN i in., 2017). Po uboju macice transportowano do laboratorium

w sterylnym roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS; 0,1 M, pH = 7,4) z dodatkiem antybiotyków. W 15–16 dniu ciąży pobrano zarodki połączone z trofoblastem. W 27–32 dniu ciąży zarodki oraz trofoblasty (*chorioalantois*) pobrano osobno wycinając je z miejsca implantacji. Wszystkie tkanki mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz. Próby ULF pobrano poprzez przepłukanie macicy sterylnym PBS (20 ml na róg macicy). Po odwirowaniu (3 000 x g, 10 min, 4°C) próby przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz.

Hodowle *in vitro* skrawków błony śluzowej macicy niezbędne do realizacji zadań nr 3–5, przeprowadzono według procedury opisanej przez SMOLINSKA i in. (2016), w duplikatach, w pięciu niezależnych powtórzeniach biologicznych (n = 5 na grupę). Fragmenty błony śluzowej zostały wycięte ze środkowej części rogów macicy (100 mg ± 10%), wypłukane w medium M199 (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone) i preinkubowane (2 h, 37°C, 95% O_2 i 5% CO_2) w szklanych fiolkach zawierających 2 ml medium M199 z dodatkiem 5% płodowej surowicy bydlęcej (FBS; Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone), 0,1% surowiczej albuminy bydlęcej (BSA; MP Biomedicals, Stany Zjednoczone) i 1% mieszaniny antybiotyków i antymykotyków (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone) w łaźni wodnej z wytrząsaniem. Po preinkubacji, skrawki inkubowano (0, 2, 5, 10 lub 30 min lub 24 h, 37°C, 95% O_2 i 5% CO_2) w obecności odpowiednich czynników przedstawionych w **Tabeli 1**. Po zakończonej inkubacji fragmenty tkanek przechowywano w temperaturze -80°C, a medium pohodowlane w -20°C do czasu dalszych analiz.

Żywotność eksplantów tkankowych określono przez pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w medium po zakończeniu 24-godzinnej inkubacji (Liquick Cor-LDH; Cormay, Polska). Jako kontrolę pozytywną wskazującą na całkowitą śmierć komórek i maksymalne uwalnianie LDH wykorzystano fragmenty błony śluzowej poddane homogenizacji. Średnia aktywność LDH wynosiła w zadaniu nr 3: 55,1 ± 4,5 U/L (1,8% maksymalnego uwalniania LDH), natomiast w zadaniu nr 4: 128,7 ± 35,6 U/L (0,67% maksymalnego uwalniania LDH).

Tabela 1 Czynniki eksperymentalne użyte w zadaniach nr 3, 4 oraz 5

Zadanie nr 3	
Inkubacja: 24 h	
KONTROLA	bez czynników
CZYNNIKI	E_2 (1, 10, 100 nM) P_4 (10, 100, 1000 nM)
Zadanie nr 4	
Inkubacja: 24 h	
KONTROLA	bez czynników
CZYNNIKI	chemeryna (100, 200 ng/ml)
Zadanie nr 5	
Inkubacja: 0, 2, 5, 10, 30 min	
KONTROLA	bez czynników
CZYNNIKI	chemeryna (200 ng/ml)

E_2 – estradiol, P_4 – progesteron.

Real-time PCR

Izolacja RNA i odwrotna transkrypcja

Z fragmentów błony śluzowej macicy, błony mięśniowej macicy, trofoblastów oraz zarodków wyizolowano całkowite RNA z wykorzystaniem odczynnika peqGOLD TriFastTM (Peqlab, Niemcy). Izolacja przebiegała zgodnie z procedurą załączoną przez producenta. Ilość oraz czystość otrzymanego RNA określono poprzez pomiar spektrofotometryczny przy długości fali 260 oraz 280 nm. Do dalszych analiz wykorzystano próby, których stosunek absorbancji A_{260}/A_{280} mieścił się w przedziale 1,8–2,0.

Wyizolowane RNA zostało wykorzystane do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem zestawu Omniscript RT Kit (Qiagen, Stany Zjednoczone). Do przeprowadzenia pojedynczej reakcji wykorzystano 1 000 ng RNA, do którego dodano 4 jednostki odwrotnej transkryptazy, 2 µl buforu RT, po 0,5 mM deoksyrybotrifosfonukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 µg starterów Oligo-dT (Roche, Francja) oraz 10 jednostek inhibitora RNaz (Life Technologies, Stany

Zjednoczone). Mieszanina była inkubowana w temperaturze 37°C przez 1 h, a następnie w temperaturze 93°C przez 5 min. Próby przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz.

Real-time PCR

Ekspresję badanych genów określono opierając się na pomiarze przyrostu ilości produktu reakcji PCR w czasie rzeczywistym z użyciem PCR System 7300 (Applied Biosystems, Stany Zjednoczone; zadanie nr 1) lub AriaMX (Applied Biosystems, Stany Zjednoczone; zadanie nr 3). Mieszanina reakcyjna zawierała 10 ng cDNA, 12,5 µl Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Stany Zjednoczone), odpowiednie dla danego genu startery oraz wodę wolną od DNaz i RNaz (Ambion, Stany Zjednoczone) do końcowej objętości 20 µl. Startery (Sigma Aldrich, Stany Zjednoczone) użyte do amplifikacji genów *RARRES2*, *CMKLR1*, *GPR1*, *CCRL2* oraz genów referencyjnych: cyklofiliny A (*PPIA*; ang. *cyclophilin A*) i aktyny (*ACTB*; ang. *actin*) zostały scharakteryzowane w **Tabeli 2**. Reakcja amplifikacji genów *RARRES2*, *CMKLR1*, *GPR1*, *CCRL2* i *ACTB* odbywała się w następujących warunkach: początkowa denaturacja i aktywacja enzymu przez 10 min (95°C), następnie 40 cykli denaturacji przez 15 s (95°C), przyłączania starterów przez 1 min (60°C w przypadku genów *RARRES2*, *CMKLR1*, *GPR1* i *CCRL2*; 61°C w przypadku genu *ACTB*) i wydłużania powstałych produktów przez 1 min (72°C). W przypadku genu *PPIA* reakcja odbywała się w sposób następujący: wstępna denaturacja (2 min, 50°C oraz 10 min, 95°C), następnie 40 cykli denaturacji przez 15 s (95°C) i przyłączania starterów przez 1 min (60°C). W kontroli negatywnej reakcji real-time PCR (NTC) cDNA zostało zastąpione wodą wolną od DNaz i RNaz (Ambion, Stany Zjednoczone). Wszystkie reakcje zostały przeprowadzone w duplikatach. W celu określenia specyficzności reakcji wygenerowano krzywe topnienia oraz przeprowadzono rozdział elektroforetyczny uzyskanych produktów. Względną ekspresję genów systemu chemerynowego obliczono z użyciem metody ΔΔCt (LIVAK I SCHMITTGEN 2001) z wykorzystaniem średniej geometrycznej wartości Ct genów referencyjnych (*PPIA* i *ACTB*). Jako kontrolę pozytywną dla ekspresji genów *RARRES2, GPR1* i *CCRL2* wykorzystano wątrobę, natomiast dla genu *CMKLR1* – śledzionę.

Tabela 2 Charakterystyka starterów użytych w zadaniach nr 1 i 3

Gen	Sekwencja starterów	Numer dostępu	Stężenie (nM)	Literatura
RARRES2	F: 5'-TGGAGGAGTTCCACAAGCAC-3' R: 5'-GCTTTCTTCCAGTCCCTCTTC-3'	EU660865	500 500	SMOLINSKA i in., (2019)
CMKLR1	F: 5'-GGACTACCACTGGGTGTTCG-3' R: 5'-GCCATGTAAGCCAGTCGGA-3'	NM_001001617.1	200 200	SMOLINSKA i in., (2019)
GPR1	F: 5'-ACCGACTTGGAGGAGAAAGC-3' R: 5'-ATTGAGGAACCAGAGCGTGG-3'	EU660866	200 200	SMOLINSKA i in., (2019)
CCRL2	F: 5'-GAGCAGCAGCTACTTACTTCC-3' R: 5'-CTGCCCACTGACCGAGTTC-3'	FJ234899.1	200 200	SMOLINSKA i in., (2019)
ACTB	F: 5'-ACATCAAGGAGAAGCTCTGCTACG-3' R: 5'-GAGGGGCGATGATCTTGATCTTCA-3'	AY266299	500 500	SPAGNUOLO-WEAVER i in., (1990)
PPIA	F: 5'-GCACTGGTGGCAAGTCCAT-3' R: 5'-AGGACCCGTATGCTTCAGGA-3'	U07786	300 300	LORD i in., (2005)

RARRES2 – chemeryna, ang. *retinoic acid receptor responder 2*; *CMKLR1* – receptor 1 chemokin, ang. *chemokine like receptor 1*; *GPR1* – receptor 1 związany z białkiem G, ang. *G protein-coupled receptor 1*; *CCRL2* – receptor 2 chemokin z motywem C-C, ang. *C-C chemokine receptor-like 2*; *ACTB* – aktyna, ang. *actin*; *PPIA* – cyklofilina A, ang. *cyclophilin A*; F – starter sensowny; R – starter antysensowny

Western blot

Izolacja białka

Fragmenty błony śluzowej macicy, błony mięśniowej macicy oraz trofoblasty i zarodki wykorzystano do izolacji białka. Tkanki homogenizowano na lodzie w buforze litycznym zawierającym inhibitory proteaz. Po homogenizacji próby inkubowano na lodzie przez 30 min, a następnie oczyszczono poprzez trzykrotne odwirowanie (10 000 x g, 10 min, 4°C). Koncentrację białek w próbach zmierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 595 nm, z wykorzystaniem metody Bradford. Absorbancję prób porównano do absorbancji roztworów BSA o różnej koncentracji, wykorzystanych do wykonania krzywej standardowej. Próby przechowywano w -80°C do momentu wykonania dalszych analiz.

Analiza Western blot

Analiza Western blot została przeprowadzona zgodnie z opisem przedstawionym przez SMOLINSKĄ i in. (2019). Izolaty białkowe rozdzielono elektroforetycznie (SDS-PAGE) względem wzorca masy molekularnej w 12,5% żelu poliakrylamidowym, a następnie białka przeniesiono na membrany metodą transferu półsuchego (SEMI-DRY).

Do detekcji chemeryny wykorzystano 30 µg białka oraz membranę nitrocelulozową (Whatman, Wielka Brytania). Do detekcji CMKLR1, GPR1, CCRL2, StAR, $P450_{SCC}$, 3βHSD, $P450_{C17}$ oraz $P450_{AROM}$ wykorzystano 40 µg białka oraz membrany z polifluorku winylidenu (PVDF; Merck Millipore, Stany Zjednoczone). Natomiast do detekcji ERK1/2, fosfo-ERK1/2, Akt i fosfo-Akt wykorzystano 10 µg białka oraz membrany PVDF. W celu zablokowania miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał po transferze, membrany inkubowano przez 1 h (temp. pokojowa) w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w proszku rozpuszczonego w buforze Tris z dodatkiem Tween-20 (TBST). Następnie membrany inkubowano w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych przez 12 h (4°C). Po zakończonej inkubacji membrany płukano w buforze TBST, a następnie inkubowano w roztworze przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z fosfatazą alkaliczną (AP) lub peroksydazą chrzanową (HRP). Wykorzystane przeciwciała w zadaniach nr 1, 3, 4 i 5 zostały opisane odpowiednio w **Tabelach 3, 4, 5** i **6**. W przypadku chemeryny oraz aktyny do wizualizacji uzyskanych produktów wykorzystano światłoczułe substraty AP (NBT/BCIP; Promega, Stany Zjednoczone), następnie membrany zostały zeskanowane. W przypadku pozostałych analizowanych białek wykorzystano zjawisko chemiluminescencji (Immobilon HRP Substrate; Merck Millipore, Stany Zjednoczone), która była obserwowana, wizualizowana i archiwizowana z użyciem G:Box EF z systemem do obrazowania chemiluminescencyjnego (Syngene, Wielka Brytania). Wyniki uzyskane podczas realizacji zadania nr 1, 3 i 4 określono ilościowo za pomocą analizy gęstości optycznej (OD) immunokompleksówz wykorzystaniem Image Studio Lite v.5.2 (LI-COR, Stany Zjednoczone) i zaprezentowano jako względną ekspresję badanych białek względem ekspresji białka aktyny. Jako kontrolę pozytywną dla ekspresji białek chemeryny, GPR1 i CCRL2 wykorzystano wątrobę, natomiast dla CMKLR1 – śledzionę. W zadaniu nr 5 również wykorzystano analizę OD z wykorzystaniem Image Studio Lite v.5.2, a wyniki zaprezentowano jako stosunek koncentracji białek fosforylowanych względem całkowitej koncentracji białek niefosforylowanych.

Tabela 3 Charakterystyka przeciwciał użytych w zadaniu nr 1

Białko	Przeciwciała pierwszorzędowe			Przeciwciała drugorzędowe			
	Gatunek	Rozcieńczenie	Producent i nr kat.	Gatunek	Rozcieńczenie	Metoda detekcji	Producent i nr kat.
chemeryna	mysz	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone; sc-373797	koza	1:2000	AP	Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone; sc-2008
aktyna	królik	1:200	Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone; A2066	koza	1:5000		Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone; sc-2054
GPR1	koza	1:150	Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone; sc-48179	osioł	1:2000	HRP	Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone; sc-2020
CMKLR1	królik	1:150	Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone; sc-66829	koza	1:5000		Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone; sc-2054
CCRL2		1:600	Abcam, Wielka Brytania; ab85224				
aktyna		1:200	Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone; A2066				

GPR1 – receptor 1 związany z białkiem G (ang. *chemokine like receptor 1*); CMKLR1 – receptor 1 chemokin (ang. *G protein-coupled receptor 1*) ; CCRL2 – receptor 2 chemokin z motywem C-C (ang. *C-C chemokine receptor-like 2*); AP – fosfataza alkaliczna; HRP – peroksydaza chrzanowa.

Tabela 4 Charakterystyka przeciwciał użytych w zadaniu nr 3

Białko	Przeciwciała pierwszorzędowe			Przeciwciała drugorzędowe			
	Gatunek	Rozcieńczenie	Producent i nr kat.	Gatunek	Rozcieńczenie	Metoda detekcji	Producent i nr kat.
GPR1	mysz	1:500	Abcam, Wielka Brytania; ab169331	koza	1:2500	HRP	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Stany Zjednoczone; 115-035-003
CMKLR1	królik	1:1000	Abcam, Wielka Brytania; ab230442	koza	1:5000		Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone; sc-2054
CCRL2		1:600	Abcam, Wielka Brytania; ab85224				
aktyna		1:200	Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone; A2066				

GPR1 – receptor 1 związany z białkiem G (ang. *chemokine like receptor 1*); CMKLR1 – receptor 1 chemokin (ang. *G protein-coupled receptor 1*) ; CCRL2 – receptor 2 chemokin z motywem C-C (ang. *C-C chemokine receptor-like 2*); HRP – peroksydaza chrzanowa.

Tabela 5 Charakterystyka przeciwciał użytych w zadaniu nr 4

Białko	Przeciwciała pierwszorzędowe			Przeciwciała drugorzędowe			
	Gatunek	Rozcieńczenie	Producent i nr kat.	Gatunek	Rozcieńczenie	Metoda detekcji	Producent i nr kat.
StAR	królik	1:250	Abcam, Wielka Brytania; ab96637	koza	1:2000	HRP	Merck Millipore, Stany Zjednoczone; AP156P
$P450_{SCC}$		1:250	Abcam, Wielka Brytania; ab175408		1:2000		
$P450_{C17}$		1:250	Abcam, Wielka Brytania; ab125022		1:2000		
$P450_{AROM}$		1:250	Abclonal, Stany Zjednoczone; A2161		1:2000		
3βHSD		1:200	Sigma-Adrich, Stany Zjednoczone; SAB2101086		1:2000		
aktyna		1:200	Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone; A2066		1:5000		

StAR – białkowy regulator steroidogenezy (ang. *steroidogenic acute regulatory protein*); $P450_{SCC}$ – cytochrom P450 odszczepiający boczny łańcuch cholesterolu (ang. *cholesterol side-chain cleavage enzyme*); $P450_{C17}$ – cytochrom $P450_{C17}$ (ang. *steroid 17-α-hydroxylase*); $P450_{AROM}$ – aromataza cytochromu P450 (ang. *aromatase*); 3βHSD – dehydrogenaza 3β-hydroksysteroidowa (ang. *3β-hydroxysteroid dehydrogenase*); HRP – peroksydaza chrzanowa.

Tabela 6 Charakterystyka przeciwciał użytych w zadaniu nr 5

Białko	Przeciwciała pierwszorzędowe			Przeciwciała drugorzędowe			
	Gatunek	Rozcieńczenie	Producent i nr kat.	Gatunek	Rozcieńczenie	Metoda detekcji	Producent i nr kat.
ERK 1/2	królik	1:1000	Cell Signaling Technology, Stany Zjednoczone; #9102	koza	1:5000	HRP	Merck Millipore, Stany Zjednoczone; AP156P
fosfo-ERK 1/2		1:1000	Cell Signaling Technology, Stany Zjednoczone; #9101				
Akt		1:1000	Cell Signaling Technology, Stany Zjednoczone; #9272				
fosfo-Akt		1:500	Cell Signaling Technology, Stany Zjednoczone; #9271				

ERK1/2 – kinaza białkowa regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym (ang. *extracellular signal-regulated kinase*); Akt – kinaza białkowa B (ang. *protein kinase B*).

Test immunoenzymatyczny (ELISA)

Koncentrację chemeryny w ULF (zadanie nr 2) oraz w mediach pohodowlanych (zadanie nr 3) określono używając komercyjnych zestawów ELISA (EP0169; FineTest, Chiny) zgodnie z procedurą załączoną przez producenta. Zakres krzywej standardowej zestawów wynosił od 0,156 do 10 ng/ml. Absorbancję mierzono przy użyciu czytnika Infinite M200 PRO przy długości fali 450 nm, z oprogramowaniem Tecan i-control (Tecan, Szwajcaria). Czułości, zakresy krzywych standardowych oraz błędy wewnątrz- oraz międzyseryjne metody ELISA zostały przedstawione w rozdziale *Enzyme-linked immunosorbent assay*, *Publikacja 1* (zadanie nr 2) oraz w rozdziale *2.4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*, *Publikacja 2* (zadanie nr 3).

Test radioimmunologiczny (RIA)

Koncentrację P_4 i E_2 w mediach po inkubacji z chemeryną oznaczono metodą RIA zgodnie z procedurą opisaną przez CIERESZKO i in. (1998) oraz GRZESIAK i in. (2014). Reakcje krzyżowe wykorzystanych przeciwciał zostały opisane przez DZIADKOWIEC i in. (1982) oraz SZAFRAŃSKĄ i in. (2002). Podczas oznaczania koncentracji E_2 zastosowano dodatkowy etap ekstrakcji, której wydajność wynosiła 90,67% ± 0,73. Czułości, zakresy krzywych standardowych oraz błędy wewnątrz- oraz międzyseryjne metody RIA zostały przedstawione w rozdziale *4.3. Radioimmunoassay (RIA)*, *Publikacja 3*.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wszystkich uzyskanych wyników wykonano z wykorzystaniem programu Statistica (StatSoft, Stany Zjednoczone). Zgodność rozkładu wyników w każdej grupie (n = 5 w grupie) z rozkładem normalnym został potwierdzony za pomocą testu Shapiro-Wilka. Za pomocą testu Levene'a potwierdzono, że wariancje w porównywanych grupach są do siebie podobne (potwierdzona homogenność grup). Istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami określono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) uzupełnionej o test *post-hoc* Tukeya (zadania nr 1 i 2) lub Duncana (zadania nr 3–5). Jako istotne statystycznie uznano różnice, dla których wartość $p < 0,05$.

WYNIKI

Ze względu na bardzo dużą ilość uzyskanych danych w niniejszym opracowaniu opisano jedynie wybraną część wyników. Wszystkie uzyskane wyniki zostały szczegółowo opisane i omówione w odpowiednich rozdziałach publikacji składających się na rozprawę doktorską:

- zadanie nr 1 i 2 – rozdziały *Results* i *Discussion – Publikacja 1*;
- zadanie nr 3 – rozdziały *3.Results* i *4.Discussion – Publikacja 2*;
- zadanie nr 4 i 5 – rozdziały *2.Results* i *3.Discussion – Publikacja 3*.

Zadanie nr 1 – ekspresja genów i białek systemu chemerynowego w macicy świni domowej

Ekspresja genów i białek systemu chemerynowego w błonie śluzowej macicy świni domowej

W trakcie cyklu rujowego najwyższą ekspresję genu *RARRES2* zaobserwowano w 17–19, a najniższą w 14–16 dniu cyklu. Białko chemeryny ulegało najwyższej ekspresji w 10–12, natomiast najniższej w 17–19 dniu cyklu rujowego. Najwyższy poziom ekspresji *CMKLR1* zanotowano w 17–19, a najniższy w 14–16 dniu cyklu. Najwyższą koncentrację białka CMKLR1 stwierdzono w 14–16 dniu cyklu rujowego. Gen *GPR1* ulegał najwyższej ekspresji w 14–16 dniu, niższej w 10–12 i najniższej w 2–3 i 17–19 dniu cyklu. Najwyższą koncentrację białka GPR1 w błonie śluzowej macicy stwierdzono w 10–12, a najniższą w 17–19 dniu cyklu rujowego. Ekspresja genu *CCRL2* była najwyższa w 14–16, niższa w 17–19 i najniższa w 10–12 dniu cyklu. Najwyższa koncentracja białka CCRL2 została stwierdzona w 17–19 dniu cyklu w porównaniu z dniami 2–16 cyklu rujowego (*Rycina 1a, Publikacja 1*).

W czasie ciąży najwyższą ekspresję genu *RARRES2* obserwowano w 12–13, niższą w 30–32, a najniższą w 10–11 i 15–28 dniu ciąży. Koncentracja białka adipokiny była wyższa w 27–28 dniu ciąży w porównaniu z dniami 12–13. Ekspresja genu *CMKLR1* była najwyższa w 30–32, a najniższa w 27–28 dniu ciąży. Najwyższe stężenie białka CMKLR1 odnotowano w 30–32, a najniższe w 10–13 dniu ciąży. Zawartość transkryptu *GPR1* była wyższa w 15–16 dniu ciąży w porównaniu z dniami 12–13. Najwyższą zawartość białka GPR1 zaobserwowano w 10–11, niższą w 30–32, a najniższą w 12–13 dniu ciąży. Ekspresja genu *CCRL2* była najwyższa w 15–16, niższa w 10–13 i 30–32, a najniższa w 27–28 dniu ciąży. Wyższe stężenia białka

CCRL2 zaobserwowano w 15–16 dniu ciąży w porównaniu z dniami 10–13 i 30–32 (*Rycina 1b, Publikacja 1*).

Ekspresja genów i białek systemu chemerynowego w błonie mięśniowej macicy świni domowej

W błonie mięśniowej macicy pobranej od świń będących w trakcie cyklu rujowego, najwyższą zawartość mRNA *RARRES2* odnotowano w 10–12, a najniższą w 2–3 i 17–19 dniu cyklu rujowego. Zwiększoną ekspresję białka chemeryny stwierdzono w 2–3 dniu cyklu w porównaniu do pozostałych badanych faz. Najwyższą ekspresję genu *CMKLR1* zaobserwowano w 17–19, a najniższą w 2–3 i 14–16 dniu cyklu rujowego. Zawartość białka CMKLR1 była wyższa w 17–19 dniu cyklu w porównaniu do pozostałych badanych okresów. Zanotowano niższą ekspresję genu *GPR1* w 14–16 dniu cyklu rujowego w porównaniu do pozostałych badanych faz. Ekspresja białka GPR1 była wyższa w 17–19 dniu cyklu rujowego w porównaniu z dniami 2–16. Istotnie wyższy poziom transkryptu *CCRL2* zaobserwowano w 10–12 dniu, w porównaniu do pozostałych badanych faz cyklu. Wyższą zawartość białka CCRL2 zaobserwowano w błonie mięśniowej macicy pobranej w 17–19 dniu cyklu w porównaniu do dnia 2–3 (*Rycina 3a, Publikacja 1*).

W błonie mięśniowej macicy pobranej od świń będących we wczesnej ciąży, najwyższy poziom mRNA *RARRES2* stwierdzono w 12–13, niższy w 10–11 i 27–28, a najniższy w 30–32 dniu ciąży. Stwierdzono większą zawartość białka chemeryny w błonie mięśniowej macicy w 15–32 dniu ciąży w porównaniu z dniami 10–13. Poziom ekspresji *CMKLR1* był najwyższy w 27–28, natomiast najniższy w 15–16 i 30–32 dniu ciąży. Najwyższą zawartość białka CMKLR1 odnotowano w 15–16, natomiast najniższą w 12–13 i 27–28 dniu ciąży. Ekspresja genu *GPR1* była najwyższa w 10–11, niższa w 15–16, a najniższa w 30–32 dniu ciąży. Stwierdzono wyższą ekspresję białka GPR1 w 27–28 dniu ciąży w porównaniu z dniami 12–16 i 30–32. Najwyższą ekspresję genu *CCRL2* stwierdzono w dniach 10–11 i 15–16, niższą w 30–32, a najniższą w 27–28 dniu ciąży. Zawartość białka CCRL2 była niższa w 10–13 dniu ciąży w porównaniu z dniami 15–32 (*Rycina 3b, Publikacja 1*).

Ekspresja genów i białek systemu chemerynowego w trofoblastach i zarodkach świni domowej

W zarodkach wyższą zawartość mRNA *RARRES2* wykazano w 27–32 dniu ciąży w porównaniu z 15–16 dniem. Większą koncentrację białka chemeryny stwierdzono w zarodkach pochodzących z 30–32 dnia ciąży w porównaniu do dnia 15–16. Wyższą ekspresję genu *CMKLR1* stwierdzono w zarodkach pochodzących z 27–28 dnia, natomiast niższą ekspresję białka receptora w zarodkach z 15–16 dnia w porównaniu z pozostałymi okresami wczesnej ciąży. Ekspresja genu *GPR1* była wyższa w 15–28 dniu ciąży w porównaniu do dnia 30–32. Wyższą zawartość białka GPR1 w zarodkach zanotowano w 30–32 dniu ciąży w porównaniu z pozostałymi badanymi okresami. Najwyższą zawartość transkryptów *CCRL2* stwierdzono w 15–16, niższą w 27–28, a najniższą w 30–32 dniu ciąży. Poziom ekspresji białka CCRL2 w zarodkach był wyższy w 30–32 dniu ciąży w porównaniu do 15–28 dnia ciąży (*Rycina 3a, Publikacja 1*).

W trofoblastach świni ekspresja genów *RARRES2*, *CMKLR1*, *GPR1* i *CCRL2* była wyższa w 27–28 dniu ciąży w porównaniu do 30–32 dnia. Z kolei zawartość białek systemu chemerynowego, poza CCRL2, była wyższa w 30–32 dniu, w porównaniu do dnia 27–28 (*Rycina 4b, Publikacja 1*).

Zadanie nr 2 – koncentracja chemeryny w płynie macicznym świni domowej

W czasie cyklu rujowego najwyższą koncentrację chemeryny w ULF stwierdzono w 10–12, niższą w 14–16, a najniższą w 17–19 dniu cyklu rujowego. W czasie ciąży najwyższy poziom adipokiny w ULF zaobserwowano w 12–13 dniu, niższy w 15–16 i najniższy w dniach 10–11 i 27–28 (*Rycina 5, Publikacja 1*).

Zadanie nr 3 – wpływ estradiolu i progesteronu na ekspresję genu i sekrecję chemeryny oraz ekspresję genów i białek receptorów chemeryny w błonie śluzowej macicy świni domowej

Wpływ E_2 na ekspresję genu i sekrecję chemeryny oraz ekspresję genów i białek receptorów chemeryny w błonie śluzowej macicy świni domowej

W 10–11 dniu ciąży E_2 stymulował ekspresję genów *RARRES2*, *CMKLR1* i *GPR1*, natomiast obniżał ekspresję genu *CCRL2* oraz koncentrację białek wszystkich receptorów. Nie zaobserwowano wpływu E_2 na wydzielanie chemeryny przez komórki błony śluzowej macicy w tym okresie. W 12–13 dniu ciąży E_2 wpływał stymulująco

na ekspresję genu *RARRES2* i *CMKLR1* oraz obniżał ekspresję genów pozostałych receptorów chemeryny. W tym okresie sekrecja chemeryny oraz koncentracja białek GPR1 i CCRL2 ulegała zwiększeniu, natomiast ekspresja białka CMKLR1 ulegała obniżeniu pod wpływem działania E_2. W 15–16 dniu ciąży E_2 regulował ekspresję genów receptorów chemeryny zwiększając ekspresję *GPR1*, zmniejszając ekspresję *CCRL2* oraz zwiększając lub zmieniając ekspresję *CMKLR1* w zależności od zastosowanej koncentracji. Nie zaobserwowano wpływu E_2 na ekspresję genu *RARRES2* w błonie śluzowej macicy w tym okresie. W przypadku białka, hormon ten powodował obniżenie sekrecji chemeryny i ekspresji CMKLR1 oraz podwyższenie ekspresji GPR1 i CCRL2 w tkance. W 27–28 dniu ciąży zaobserwowano obniżenie ekspresji genów całego systemu chemerynowego pod wpływem E_2. Estradiol stymulował ekspresję białek CMKLR1 i CCRL1, obniżał zawartość białka GPR1 i nie wpływał na wydzielanie chemeryny przez błonę śluzową macicy. W środkowolutealnej fazie cyklu rujowego E_2 pobudzał ekspresję genów i obniżał ekspresję białek receptorów CMKLR1 i CCRL2. W tym okresie E_2 stymulował ekspresję białka GPR1 w błonie śluzowej macicy, nie wpływając na ekspresję genu *GPR1* i *RARRES2* oraz sekrecję chemeryny (*Ryciny 1–4, Publikacja 2*).

Wpływ P_4 na ekspresję genu i sekrecję chemeryny oraz ekspresję genów i białek receptorów chemeryny w błonie śluzowej macicy świni domowej

W 10–11 dniu ciąży P_4 powodował wzrost ekspresji genów *RARRES2, GPR1* oraz *CCRL2* i hamował ekspresję genu *CMKLR1*. W tym samym okresie P_4 spowodował zwiększenie koncentracji białek GPR1 i CCRL2 oraz, w zależności od zastosowanego stężenia, zwiększenie lub zmniejszenie koncentracji białka CMKLR1. Nie stwierdzono wpływu P_4 na sekrecję chemeryny przez komórki błony śluzowej w 10–11 dniu ciąży. W 12–13 dniu ciąży P_4 zwiększał zawartość mRNA *RARRES2* i *CMKLR1*, obniżał natomiast ekspresję genów *GPR1* i *CCRL2*. W 12–13 dniu ciąży P_4 obniżał koncentrację białek CMKLR1 i CCRL2, nie wpływał natomiast na ekspresję GPR1 oraz sekrecję chemeryny. W 15–16 dniu ciąży P_4 spowodował wzrost ekspresji genów systemu chemerynowego, z wyjątkiem *CCRL2*, na którego ekspresję wpływał hamująco. P_4 nie miał wpływu na wydzielanie chemeryny, natomiast zwiększał koncentrację białek GPR1 i CCRL2 a obniżał ilość białka CMKLR1. W 27–28 dniu ciąży, odwrotnie niż w przypadku początku implantacji, P_4 zmniejszał ekspresję genów *RARRES2, CMKLR1* i *GPR1* oraz zwiększał

ekspresję *CCRL2*. W tym czasie P_4 zwiększał koncentrację białek CMKLR1 i CCRL2 i zmniejszał zawartość GPR1 bez wpływu na sekrecję chemeryny przez komórki błony śluzowej macicy. W 10–11 dniu cyklu rujowego P_4 obniżał ekspresję *RARRES2*, powodował wzrost ilości transkryptów *CMKLR1* i *GPR1* i nie wpływał na ekspresję *CCRL2*. W tym samym okresie P_4 wpływał jedynie na poziom CCRL2, obniżając zawartość białka tego receptora (*Ryciny 5–8, Publikacja 2*).

Zadanie nr 4 – wpływ chemeryny na sekrecję estradiolu i progesteronu oraz ekspresję białek czynników i enzymów steroidogenicznych w błonie śluzowej macicy świni domowej

Wpływ chemeryny na sekrecję E_2 i P_4 przez komórki błony śluzowej macicy świni domowej

W 10–11 dniu ciąży chemeryna obniżała sekrecję P_4 i podwyższała wydzielanie E_2 przez komórki błony śluzowej macicy. W 12–13 dniu ciąży adipokina zmniejszała wydzielanie zarówno P_4 jak i E_2. W 10–11 dniu cyklu rujowego zaobserwowano obniżenie sekrecji P_4 pod wpływem chemeryny oraz brak wpływu chemeryny na wydzielanie E_2. W pozostałych badanych okresach wczesnej ciąży chemeryna nie wpływała na sekrecję P_4 i E_2 (*Rycina 1, Publikacja 3*).

Wpływ chemeryny na ekspresję białek czynników i enzymów steroidogenicznych w błonie śluzowej macicy świni domowej

W 10–11 dniu ciąży chemeryna stymulowała ekspresję białek StAR, $P450_{SCC}$, 3βHSD, $P450_{C17}$ oraz $P450_{AROM}$ w błonie śluzowej macicy. W 12–13 dniu ciąży chemeryna powodowała zmniejszenie koncentracji wszystkich białek biorących udział w powstawaniu P_4 i E_2, z wyjątkiem $P450_{C17}$, którego ekspresję stymulowała. W 15–16 dniu ciąży ekspresja wszystkich badanych białek uległa zwiększeniu pod wpływem działania chemeryny. W 27–28 dniu ciąży chemeryna powodowała wzrost koncentracji białek StAR i $P450_{C17}$ oraz zmniejszenie ilości białka 3βHSD. Nie stwierdzono wpływu chemeryny na ekspresję białka $P450_{SCC}$ oraz $P450_{AROM}$ w tym okresie ciąży. W fazie środkowolutealnej cyklu rujowego, chemeryna powodowała wzrost koncentracji białek StAR, $P450_{SCC}$, 3βHSD, $P450_{C17}$ oraz $P450_{AROM}$ w błonie śluzowej macicy (*Ryciny 2*–4, *Publikacja 3*).

Zadanie nr 5 – wpływ chemeryny na fosforylację białek ERK1/2 oraz Akt w komórkach błony śluzowej macicy świni domowej

Chemeryna powodowała obniżenie fosforylacji białka ERK1/2 po 2, 5, 10 i 30 min inkubacji w porównaniu do kontroli (0 min). Zaobserwowano fosforylację ścieżki sygnałowej Akt w błonie śluzowej macicy po 2, 5 i 30 min inkubacji z chemeryną w porównaniu do kontroli (0 min; *Rycina 5, Publikacja 3*).

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Przeprowadzone badania umożliwiły realizację postawionych celów pracy oraz potwierdzenie założonych hipotez. Uzyskane dane pozwoliły na poszerzenie wiedzy na temat roli chemeryny w funkcjonowaniu macicy świni domowej. Wyniki uzyskane w trakcie badań pozwalają stwierdzić, że:

1) ekspresja genów i białek chemeryny oraz jej receptorów (systemu chemerynowego) w błonie śluzowej i mięśniowej macicy, trofoblastach i zarodkach sugeruje, że adipokina jest w nich lokalnie wytwarzana i może wpływać na regulację funkcji rozrodczych macicy świni domowej za pośrednictwem swoich receptorów;
2) zmiany zawartości transkryptów i białek systemu chemerynowego w macicy świni oraz koncentracji hormonu w ULF w trakcie cyklu rujowego oraz wczesnej ciąży sugerują, że ekspresja chemeryny i jej receptorów zależy od statusu hormonalnego zwierząt;
3) E_2 i P_4 regulują ekspresję systemu chemerynowego w błonie śluzowej macicy w okresie wczesnej ciąży, co wskazuje, że hormony steroidowe mogą być istotnym regulatorem ekspresji chemeryny i jej receptorów w macicy świni;
4) chemeryna wpływa na sekrecję E_2 i P_4 w błonie śluzowej macicy i reguluje ekspresję białek zaangażowanych w proces syntezy hormonów steroidowych, w czym najprawdopodobniej pośredniczą ścieżki sygnałowe ERK1/2 oraz Akt, co sugeruje, że chemeryna może regulować procesy rozrodcze poprzez wpływ na proces steroidogenezy w macicy świni.

Chemeryna, poprzez wpływ na proces steroidogenezy w błonie śluzowej macicy, może pełnić istotną rolę w funkcjonowaniu układu rozrodczego samicy w czasie cyklu rujowego i w okresie okołoimplantacyjnym. Ponadto chemeryna może być czynnikiem utrzymującym prawidłowe środowisko dla rozwijających się zarodków.

BIBLIOGRAFIA

AKINS EL, MORRISSETTE MC. Gross ovarian changes during estrous cycle of swine. Am J Vet Res. 1968 Oct;29(10):1953-7. PMID: 5692889.

ANDERSON LL. Growth, protein content and distribution of early pig embryos. Anat Rec. 1978 Jan;190(1):143-53. doi: 10.1002/ar.1091900112. PMID: 626412.

BANAS M, ZEGAR A, KWITNIEWSKI M, ZABIEGLO K, MARCZYNSKA J, KAPINSKA-MROWIECKA M, LAJEVIC M, ZABEL BA, CICHY J. The expression and regulation of chemerin in the epidermis. PLoS One. 2015 Feb 6;10(2):e0117830. doi: 10.1371/journal.pone.0117830. PMID: 25659101; PMCID: PMC4320080.

BOZAOGLU K, CURRAN JE, STOCKER CJ, ZAIBI MS, SEGAL D, KONSTANTOPOULOS N, MORRISON S, CARLESS M, DYER TD, COLE SA, GORING HH, MOSES EK, WALDER K, CAWTHORNE MA, BLANGERO J, JOWETT JB. Chemerin, a novel adipokine in the regulation of angiogenesis. J Clin Endocrinol Metab. 2010 May;95(5):2476-85. doi: 10.1210/jc.2010-0042. Epub 2010 Mar 17. PMID: 20237162; PMCID: PMC2869547.

BROUGHTON DE, MOLEY KH. Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. Fertil Steril. 2017 Apr;107(4):840-847. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.01.017. Epub 2017 Mar 11. PMID: 28292619.

CARLINO C, TROTTA E, STABILE H, MORRONE S, BULLA R, SORIANI A, IANNITTO ML, AGOSTINIS C, MOCCI C, MINOZZI M, ARAGONA C, PERNIOLA G, TEDESCO F, SOZZANI S, SANTONI A, GISMONDI A. Chemerin regulates NK cell accumulation and endothelial cell morphogenesis in the decidua during early pregnancy. J Clin Endocrinol Metab. 2012 Oct;97(10):3603-12. doi: 10.1210/jc.2012-1102. Epub 2012 Jul 12. PMID: 22791765; PMCID: PMC3462933.

CIERESZKO RE, PETROFF BK, OTTOBRE AC, GUAN Z, STOKES BT, OTTOBRE JS. Assessment of the mechanism by which prolactin stimulates progesterone production by early corpora lutea of pigs. J Endocrinol. 1998 Nov;159(2):201-9. doi: 10.1677/joe.0.1590201. PMID: 9795359.

CRAIG JR, JENKINS TG, CARRELL DT, HOTALING JM. Obesity, male infertility, and the sperm epigenome. Fertil Steril. 2017 Apr;107(4):848-859. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.02.115. PMID: 28366411.

DOBRZYN K, SMOLINSKA N, SZESZKO K, KIEZUN M, MALESZKA A, RYTELEWSKA E, KAMINSKI T. Effect of progesterone on adiponectin system in the porcine uterus during early pregnancy. J Anim Sci. 2017 Jan;95(1):338-352. doi: 10.2527/jas.2016.0732. PMID: 28177362.

DÖCKE S, LOCK JF, BIRKENFELD AL, HOPPE S, LIESKE S, RIEGER A, RASCHZOK N, SAUER IM, FLORIAN S, OSTERHOFF MA, HELLER R, HERRMANN K, LINDENMÜLLER S, HORN P, BAUER M, WEICKERT MO, NEUHAUS P, STOCKMANN M, MÖHLIG M, PFEIFFER AF, VON LOEFFELHOLZ C. Elevated hepatic chemerin mRNA expression in human non-alcoholic fatty liver disease. Eur J Endocrinol. 2013 Oct 1;169(5):547-57. doi: 10.1530/EJE-13-0112. PMID: 23935128.

DU XY, ZABEL BA, MYLES T, ALLEN SJ, HANDEL TM, LEE PP, BUTCHER EC, LEUNG LL. Regulation of chemerin bioactivity by plasma carboxypeptidase N, carboxypeptidase B (activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), and platelets. J Biol Chem. 2009 Jan 9;284(2):751-8. doi: 10.1074/jbc.M805000200. Epub 2008 Nov 14. PMID: 19010784; PMCID: PMC2613638.

DZIADKOWIEC I, DANILCZYK U, REMBIESA R. Biosynteza progesteronu w łozysku szczura [Biosynthesis of progesterone in the rat placenta]. Endokrynol Pol. 1982;33(4-6):201-7. Polish. PMID: 7185566.

FASSHAUER M, BLÜHER M. Adipokines in health and disease. Trends Pharmacol Sci. 2015 Jul;36(7):461-70. doi: 10.1016/j.tips.2015.04.014. Epub 2015 May 25. PMID: 26022934.

GARCES MF, SANCHEZ E, ACOSTA BJ, ANGEL E, RUÍZ AI, RUBIO-ROMERO JA, DIÉGUEZ C, NOGUEIRAS R, CAMINOS JE. Expression and regulation of chemerin during rat pregnancy. Placenta. 2012 May;33(5):373-8. doi: 10.1016/j.placenta.2012.02.007. Epub 2012 Feb 25. PMID: 22369992.

GARCES MF, SANCHEZ E, RUÍZ-PARRA AI, RUBIO-ROMERO JA, ANGEL-MÜLLER E, SUAREZ MA, BOHÓRQUEZ LF, BRAVO SB, NOGUEIRAS R, DIÉGUEZ C, CAMINOS JE.

Serum chemerin levels during normal human pregnancy. Peptides. 2013 Apr;42:138-43. doi: 10.1016/j.peptides.2013.01.003. Epub 2013 Jan 8. PMID: 23313148.

GEISERT RD, YELICH JV. Regulation of conceptus development and attachment in pigs. J Reprod Fertil Suppl. 1997;52:133-49. PMID: 9602725.

GORALSKI KB, MCCARTHY TC, HANNIMAN EA, ZABEL BA, BUTCHER EC, PARLEE SD, MURUGANANDAN S, SINAL CJ. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. J Biol Chem. 2007 Sep 21;282(38):28175-88. doi: 10.1074/jbc.M700793200. Epub 2007 Jul 16. PMID: 17635925.

GRZESIAK M, KNAPCZYK-STWORA K, CIERESZKO RE, WIECIECH I, SLOMCZYNSKA M. Alterations in luteal production of androstenedione, testosterone, and estrone, but not estradiol, during mid- and late pregnancy in pigs: effects of androgen deficiency. Theriogenology. 2014 Sep 15;82(5):720-33. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.06.005. Epub 2014 Jun 11. PMID: 25011982.

JIN CH, YI KW, HA YR, SHIN JH, PARK HT, KIM T, HUR JY. Chemerin Expression in the Peritoneal Fluid, Serum, and Ovarian Endometrioma of Women with Endometriosis. Am J Reprod Immunol. 2015 Oct;74(4):379-86. doi: 10.1111/aji.12405. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26059828.

KENNEDY AJ, YANG P, READ C, KUC RE, YANG L, TAYLOR EJ, TAYLOR CW, MAGUIRE JJ, DAVENPORT AP. Chemerin Elicits Potent Constrictor Actions via Chemokine-Like Receptor 1 (CMKLR1), not G-Protein-Coupled Receptor 1 (GPR1), in Human and Rat Vasculature. J Am Heart Assoc. 2016 Oct 14;5(10):e004421. doi: 10.1161/JAHA.116.004421. PMID: 27742615; PMCID: PMC5121526.

KISIELEWSKA K, RYTELEWSKA E, GUDELSKA M, KIEZUN M, DOBRZYN K, BOGUS-NOWAKOWSKA K, KAMINSKA B, SMOLINSKA N, KAMINSKI T. Expression of chemerin receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2 in the porcine pituitary during the oestrous cycle and early pregnancy and the effect of chemerin on MAPK/Erk1/2, Akt and AMPK signalling pathways. Theriogenology. 2020a Nov;157:181-198. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.07.032. Epub 2020 Jul 29. PMID: 32814246.

KISIELEWSKA K, RYTELEWSKA E, GUDELSKA M, KIEZUN M, DOBRZYN K, BOGUS-NOWAKOWSKA K, KAMINSKA B, SMOLINSKA N, KAMINSKI T. Relative abundance of chemerin mRNA transcript and protein in pituitaries of pigs during the estrous cycle and early pregnancy and associations with LH and FSH secretion during the estrous cycle. Anim Reprod Sci. 2020b Aug;219:106532. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106532. Epub 2020 Jun 21. PMID: 32828407.

LAUBY-SECRETAN B, SCOCCIANTI C, LOOMIS D, GROSSE Y, BIANCHINI F, STRAIF K. International Agency for Research on Cancer Handbook Working Group. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. N Engl J Med. 2016 Aug 25;375(8):794-8. doi: 10.1056/NEJMsr1606602.

LEHRKE M, BECKER A, GREIF M, STARK R, LAUBENDER RP, VON ZIEGLER F, LEBHERZ C, TITTUS J, REISER M, BECKER C, GÖKE B, LEBER AW, PARHOFER KG, BROEDL UC. Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis. Eur J Endocrinol. 2009 Aug;161(2):339-44. doi: 10.1530/EJE-09-0380. Epub 2009 Jun 4. PMID: 19497986.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.

LORD E, LEDOUX S, MURPHY BD, BEAUDRY D, PALIN MF. Expression of adiponectin and its receptors in swine. J Anim Sci. 2005 Mar;83(3):565-78. doi: 10.2527/2005.833565x. PMID: 15705753.

MA RCW, SCHMIDT MI, TAM WH, MCINTYRE HD, CATALANO PM. Clinical management of pregnancy in the obese mother: before conception, during pregnancy, and post partum. Lancet Diabetes Endocrinol. 2016 Dec;4(12):1037-1049. doi: 10.1016/S2213-8587(16)30278-9. Epub 2016 Oct 12. PMID: 27743977; PMCID: PMC6691730.

MARCHESE A, DOCHERTY JM, NGUYEN T, HEIBER M, CHENG R, HENG HH, TSUI LC, SHI X, GEORGE SR, O'DOWD BF. Cloning of human genes encoding novel G protein-coupled receptors. Genomics. 1994 Oct;23(3):609-18. doi: 10.1006/geno.1994.1549. PMID: 7851889.

MARIANI F, RONCUCCI L. Chemerin/chemR23 axis in inflammation onset and resolution. Inflamm Res. 2015 Feb;64(2):85-95. doi: 10.1007/s00011-014-0792-7. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25548799.

MATHEW H, CASTRACANE VD, MANTZOROS C. Adipose tissue and reproductive health. Metabolism. 2018 Sep;86:18-32. doi: 10.1016/j.metabol.2017.11.006. Epub 2017 Nov 16. PMID: 29155136.

MATTERN A, ZELLMANN T, BECK-SICKINGER AG. Processing, signaling, and physiological function of chemerin. IUBMB Life. 2014 Jan;66(1):19-26. doi: 10.1002/iub.1242. Epub 2014 Jan 20. PMID: 24446308.

MEDER W, WENDLAND M, BUSMANN A, KUTZLEB C, SPODSBERG N, JOHN H, RICHTER R, SCHLEUDER D, MEYER M, FORSSMANN WG. Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23. FEBS Lett. 2003 Dec 18;555(3):495-9. doi: 10.1016/s0014-5793(03)01312-7. PMID: 14675762.

MONNIER J, LEWÉN S, O'HARA E, HUANG K, TU H, BUTCHER EC, ZABEL BA. Expression, regulation, and function of atypical chemerin receptor CCRL2 on endothelial cells. J Immunol. 2012 Jul 15;189(2):956-67. doi: 10.4049/jimmunol.1102871. Epub 2012 Jun 13. PMID: 22696441; PMCID: PMC3428203.

NAGPAL S, PATEL S, JACOBE H, DISEPIO D, GHOSN C, MALHOTRA M, TENG M, DUVIC M, CHANDRARATNA RA. Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin. J Invest Dermatol. 1997 Jul;109(1):91-5. doi: 10.1111/1523-1747.ep12276660. PMID: 9204961.

NITKIEWICZ A, SMOLINSKA N, MALESZKA A, KIEZUN M, KAMINSKI T. Localization of orexin A and orexin B in the porcine uterus. Reprod Biol. 2012 Jul;12(2):135-55. doi: 10.1016/s1642-431x(12)60082-5. PMID: 22850467.

PENG L, YU Y, LIU J, LI S, HE H, CHENG N, YE RD. The chemerin receptor CMKLR1 is a functional receptor for amyloid-β peptide. J Alzheimers Dis. 2015;43(1):227-42. doi: 10.3233/JAD-141227. PMID: 25079809.

REVERCHON M, CORNUAU M, RAMÉ C, GUERIF F, ROYÈRE D, DUPONT J. Chemerin inhibits IGF-1-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa

cells. Hum Reprod. 2012 Jun;27(6):1790-800. doi: 10.1093/humrep/des089. Epub 2012 Mar 23. PMID: 22447628.

REVERCHON M, RAMÉ C, BERTOLDO M, DUPONT J. Adipokines and the female reproductive tract. Int J Endocrinol. 2014;2014:232454. doi: 10.1155/2014/232454. Epub 2014 Feb 18. PMID: 24695544; PMCID: PMC3948585.

ROURKE JL, DRANSE HJ, SINAL CJ. CMKLR1 and GPR1 mediate chemerin signaling through the RhoA/ROCK pathway. Mol Cell Endocrinol. 2015 Dec 5;417:36-51. doi: 10.1016/j.mce.2015.09.002. Epub 2015 Sep 9. PMID: 26363224.

ROURKE JL, DRANSE HJ, SINAL CJ. Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease. Obes Rev. 2013 Mar;14(3):245-62. doi: 10.1111/obr.12009. Epub 2012 Dec 6. PMID: 23216632.

ROURKE JL, MURUGANANDAN S, DRANSE HJ, MCMULLEN NM, SINAL CJ. Gpr1 is an active chemerin receptor influencing glucose homeostasis in obese mice. J Endocrinol. 2014 Aug;222(2):201-15. doi: 10.1530/JOE-14-0069. Epub 2014 Jun 3. PMID: 24895415.

RYTELEWSKA E, KISIELEWSKA K, KIEZUN M, DOBRZYN K, GUDELSKA M, RAK A, DUPONT J, KAMINSKA B, KAMINSKI T, SMOLINSKA N. Expression of chemerin and its receptors in the ovaries of prepubertal and mature gilts. Mol Reprod Dev. 2020 Jun 17. doi: 10.1002/mrd.23391. Epub ahead of print. PMID: 32557981.

SLEDZIŃSKA M, SZLAGATYS-SIDORKIEWICZ A, BRZEZINSKI M, KAŹMIERSKA K, SLEDZIŃSKI T, KAMIŃSKA B. Serum chemerin in children with excess body weight may be associated with ongoing metabolic complications - A pilot study. Adv Med Sci. 2017 Sep;62(2):383-386. doi: 10.1016/j.advms.2017.04.002. Epub 2017 May 25. PMID: 28551507.

SMOLINSKA N, KIEZUN M, DOBRZYN K, RYTELEWSKA E, KISIELEWSKA K, GUDELSKA M, ZAOBIDNA E, BOGUS-NOWAKOWSKA K, WYREBEK J, BORS K, KOPIJ G, KAMINSKA B, KAMINSKI T. Expression of Chemerin and Its Receptors in the Porcine Hypothalamus and Plasma Chemerin Levels during the Oestrous Cycle and Early Pregnancy. Int J Mol Sci. 2019 Aug 9;20(16):3887. doi: 10.3390/ijms20163887. PMID: 31404950; PMCID: PMC6719988.

SPAGNUOLO-WEAVER M, FUERST R, CAMPBELL ST, MEEHAN BM, MCNEILLY F, ADAIR B, ALLAN G. A fluorimeter-based RT-PCR method for the detection and quantitation of porcine cytokines. J Immunol Methods. 1999 Nov 19;230(1-2):19-27. doi: 10.1016/s0022-1759(99)00114-3. PMID: 10594350.

SZAFRAŃSKA B, ZIECIK A, OKRASA S. Primary antisera against selected steroids or proteins and secondary antisera against gamma-globulins--an available tool for studies of reproductive processes. Reprod Biol. 2002 Jul;2(2):187-204. PMID: 14666157.

SZEKERES-BARTHO J, KILAŃ F, FALKAY G, CSERNUS V, TÖRÖK A, PACSA AS. The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: I. Progesterone-treated lymphocytes release a substance inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. Am J Reprod Immunol Microbiol. 1985 Sep;9(1):15-8. doi: 10.1111/j.1600-0897.1985.tb00334.x. PMID: 3863495.

WEIGERT J, NEUMEIER M, WANNINGER J, FILARSKY M, BAUER S, WIEST R, FARKAS S, SCHERER MN, SCHÄFFLER A, ASLANIDIS C, SCHÖLMERICH J, BUECHLER C. Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. Clin Endocrinol (Oxf). 2010 Mar;72(3):342-8. doi: 10.1111/j.1365-2265.2009.03664.x. Epub 2009 Jun 24. PMID: 19558533.

WITTAMER V, FRANSSEN JD, VULCANO M, MIRJOLET JF, LE POUL E, MIGEOTTE I, BRÉZILLON S, TYLDESLEY R, BLANPAIN C, DETHEUX M, MANTOVANI A, SOZZANI S, VASSART G, PARMENTIER M, COMMUNI D. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. J Exp Med. 2003 Oct 6;198(7):977-85. doi: 10.1084/jem.20030382. PMID: 14530373; PMCID: PMC2194212.

YANG YL, REN LR, SUN LF, HUANG C, XIAO TX, WANG BB, CHEN J, ZABEL BA, REN P, ZHANG JV. The role of GPR1 signaling in mice corpus luteum. J Endocrinol. 2016 Jul;230(1):55-65. doi: 10.1530/JOE-15-0521. Epub 2016 May 5. PMID: 27149986; PMCID: PMC5064765.