

**Uniwersytet Pedagogiczny im. Komisji Edukacji Narodowej
w Krakowie**



Agnieszka Leśniak-Walentyn

Metaloproteiny w jajowodzie ptaków

**Praca doktorska wykonana
w Katedrze Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt
Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytetu Rolniczego
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Promotor: dr hab. inż. Anna Hrabia**

Kraków 2015

Praca finansowana z projektu NCN nr UMO-2012/07/N/NZ4/00165 oraz przez MNiSW w ramach dotacji na badania prowadzone przez młodych naukowców: BM-4229/2013, BM-4240/2014

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania
Pani dr hab. inż. Annie Hrabia
za cierpliwość, życzliwość oraz nieocenioną pomoc
udzieloną mi podczas wykonywania niniejszej pracy.*

*Dziękuję także Wszystkim Pracownikom
Katedry Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt
za pomoc oraz życzliwą atmosferę.*

*Ponadto, dziękuję moim Najbliższym
za wiarę we mnie, cierpliwość i wsparcie.*

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	10
2. CEL PRACY	23
3. MATERIAŁ I METODY	24
3.1. ZWIERZĘTA DOŚWIADCZALNE	24
3.2. STOSOWANE ZWIĄZKI	24
3.3. UKŁAD DOŚWIADCZEŃ.....	26
3.3.1. <i>Ekspresja, aktywność i lokalizacja MMPs i TIMPs w jajowodzie kury podczas dojrzewania płciowego.....</i>	26
3.3.2. <i>Ekspresja, aktywność i lokalizacja MMPs i TIMPs w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodzeniem</i>	26
3.3.3. <i>Ekspresja, aktywność i lokalizacja MMPs i TIMPs w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu</i>	27
3.4. METODY OZNACZEŃ	27
3.4.1. <i>Radioimmunologiczna metoda oznaczania stężenia progesteronu, testosteronu i estradiolu</i>	27
3.4.2. <i>Analiza ekspresji genów metodą Real-Time PCR.....</i>	27
3.4.3. <i>Analiza Western Blot.....</i>	31
3.4.4. <i>Oznaczanie aktywności MMPs metodą zymografii transferowej.....</i>	32
3.4.5. <i>Oznaczanie aktywności MMP-2 i -9 zestawem Biotrak</i>	33
3.4.6. <i>Oznaczanie białka metodą Bradford.....</i>	33
3.4.7. <i>Immunohistochemiczna lokalizacja MMPs i TIMPs</i>	34
3.4.8. <i>Barwienie metodą Feulgena.....</i>	35
3.4.9. <i>Barwienie metodą PAS.....</i>	35
3.5. ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW	36
4. WYNIKI.....	37
4.1. DOJRZEWANIE PŁCIOWE	37
4.1.1. <i>Masa jajowodu kury podczas dojrzewania płciowego</i>	37
4.1.2. <i>Stężenie progesteronu, testosteronu i estradiolu w osoczu krwi kury podczas dojrzewania płciowego.....</i>	37
4.1.3. <i>Ekspresja genów MMPs i TIMPs na poziomie mRNA w jajowodzie kury podczas dojrzewania płciowego.....</i>	39
4.1.4. <i>Ekspresja genów MMPs i TIMPs na poziomie białka w jajowodzie kury podczas dojrzewania płciowego.....</i>	42
4.1.5. <i>Histologiczna charakterystyka jajowodu kury podczas dojrzewania płciowego</i>	49
4.1.6. <i>Immunohistochemiczna lokalizacja MMPs i TIMPs w jajowodzie kury podczas dojrzewania płciowego.....</i>	49
4.1.7. <i>Żelatynolityczna aktywność MMPs w jajowodzie kury podczas dojrzewania płciowego</i>	51
4.2. PRZERWA W NIEŚNOŚCI WYWOŁANA GŁODZENIEM.....	53
4.2.1. <i>Masa jajowodu kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodzeniem.....</i>	53
4.2.2. <i>Stężenie progesteronu, testosteronu i estradiolu w osoczu krwi kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodzeniem</i>	55
4.2.3. <i>Ekspresja genów MMPs i TIMPs na poziomie mRNA w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodzeniem</i>	55

4.2.4. Ekspresja genów MMPs i TIMPs na poziomie białka w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem.....	58
4.2.5. Histologiczna charakterystyka jajowodu kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem.....	64
4.2.6. Immunohistochemiczna lokalizacja MMPs i TIMPs w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem.....	64
4.2.7. Aktywność MMP-2 i -9 w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem.....	72
4.3. PRZERWA W NIEŚNOŚCI WYWOŁANA PODAWANIEM TAMOKSYFENU	74
4.3.1. Masa jajowodu kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu.....	74
4.3.2. Stężenie progesteronu, testosteronu i estradiolu w osoczu krwi kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu.....	74
4.3.3. Ekspresja genów MMPs i TIMPs na poziomie mRNA w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu.....	76
4.3.4. Ekspresja genów MMPs i TIMPs na poziomie białka w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu.....	76
4.3.5. Histologiczna charakterystyka jajowodu kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu	76
4.3.6. Immunohistochemiczna lokalizacja MMPs i TIMPs jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu.....	84
4.3.7. Żelatynolityczna aktywność MMPs jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu	84
5. DYSKUSJA	90
6. PODSUMOWANIE:.....	108
7. WNIOSKI:.....	109
8. LITERATURA	110

STRESZCZENIE

Metaloproteinazy (MMPs) są kluczowymi regulatorami przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej w różnych tkankach w tym rozrodczych, zaangażowanymi w modulację szeregu procesów fizjologicznych i patologicznych. Chociaż liczne doniesienia wskazują na udział MMPs w remodelingu i funkcjonowaniu układu rozrodczego ssaków, informacje o ich udziale w rozrodcze ptaków są nieliczne. Jak dotąd w jajowodzie kury wykazano jedynie obecność mRNA MMP-2 i MMP-9 oraz tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP-2 i TIMP-3). Przedstawione w niniejszej pracy badania są próbą znalezienia odpowiedzi na pytanie czy wybrane komponenty systemu MMP są zaangażowane w rozwój i remodeling jajowodu ptaków. W tym celu postanowiono określić: 1) ekspresję wybranych MMPs i TIMPs w poszczególnych odcinkach jajowodu kury podczas dojrzewania płciowego oraz przerwy w nieśności, 2) aktywność wybranych MMPs w jajowodzie kur rosnących i poddanych wymuszonej przerwie w aktywności rozrodczej, 3) lokalizację MMPs i TIMPs w ścianie rozwijającego się oraz ulegającego przebudowie jajowodu, a także 4) udział estrogenów w regulacji ekspresji i aktywności wybranych MMPs w jajowodzie kury.

Podczas dojrzewania płciowego we wszystkich badanych odcinkach jajowodu kury, tj. lejku, magnum, cieśni i gruczole skorupowym, wykazano ekspresję MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-2 i TIMP-3, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Względna ekspresja mRNA badanych genów obniżała się w poszczególnych odcinkach jajowodu podczas dojrzewania płciowego. Ekspresja MMP-9 na poziomie białka zmniejszała się, podczas gdy MMP-7 i TIMP-3 zwiększała się w trakcie rozwoju jajowodu. Poziom białka MMP-2 i TIMP-2 był względnie stały, z niewielkim wzrostem ekspresji odnotowanym dla MMP-2 tuż przed osiągnięciem dojrzałości płciowej. Aktywność MMP-2 i -9 w jajowodzie, była znacznie wyższa u niedojrzałych kurek, niż u niosących ptaków. W ścianie jajowodu obserwowano także komórkowo- i tkankowo-specyficzną lokalizację MMPs i TIMPs. Podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem stwierdzono ekspresję badanych elementów systemu MMP na poziomie mRNA oraz białka we wszystkich odcinkach jajowodu: lejku, magnum, cieśni, gruczole skorupowym i pochwie. Regresji jajowodu towarzyszył wzrost ekspresji mRNA MMP-2, -7 i -9 oraz TIMP-2 i -3. W trakcie odbudowy tego narządu w większości odcinków stwierdzono zwiększoną

ekspresję MMP-2 oraz inhibitora TIMP-3. Ekspresja na poziomie białka oraz lokalizacja MMPs i TIMPs nie zmieniała się znacząco w większości odcinków jajowodu podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem. Zarówno podczas regresji, jak i odbudowy jajowodu obserwowano wzrost aktywności MMP-2 i -9. Podawanie tamoksyfenu, będącego modulatorem receptorów estrogenowych, zwiększyło ekspresję genu MMP-7 i -9, natomiast nie wpłynęło na poziom mRNA MMP-2, TIMP-2 i -3. U kur traktowanych tamoksyfenem stwierdzono zwiększoną ekspresję na poziomie białka oraz aktywność MMP-2 w lejku i gruczole skorupowym, a także obserwowano zwiększoną immunoreaktywność dla inhibitora TIMP-3 w gruczołach tubularnych magnum.

Wykazana obecność mRNA, jak i białka MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-2 i TIMP-3 we wszystkich odcinkach jajowodu kury wskazuje, że narząd ten jest miejscem syntezy badanych elementów systemu MMP, a ekspresja i aktywność MMPs i TIMPs jest zależna od odcinka jajowodu oraz stadium cyklu reprodukcyjnego. Tkankowo-specyficzna lokalizacja MMPs i TIMPs w ścianie jajowodu kury sugeruje odmienne funkcje poszczególnych elementów systemu MMP w tym narządzie. Obserwowane zmiany w ekspresji i aktywności badanych elementów systemu MMP podczas dojrzewania płciowego oraz przerwy w nieśności sugerują, że MMPs i TIMPs mogą być lokalnymi regulatorami rozwoju, przebudowy i czynności jajowodu kury. Zmiany w ekspresji i aktywności wybranych MMPs u ptaków po podaniu tamoksyfenu, wskazują na udział estrogenów w ich regulacji. Wyjaśnienie molekularnych mechanizmów regulujących syntezę i aktywność metaloproteinaz w poszczególnych odcinkach jajowodu oraz ich roli w tym narządzie wymagają dalszych badań.

SUMMARY

The matrix metalloproteinases (MMPs) are key regulators of extracellular matrix remodeling in several types of tissues, including reproductive ones, that have been postulated to be involved in multiple physiological and pathological events. Although, participation of MMP system in reproductive tract remodeling was strongly suggested in mammalian species there is little data so far about the role of MMPs in the avian oviduct. To date only mRNA expression of MMP-2, MMP-9 and tissue inhibitors of MMPs (TIMP-2 and TIMP-3) in the oviduct of hen has been revealed. Towards a better understanding of the MMP system involvement in the avian oviduct development and remodeling the following items were examined: 1) the expression of chosen MMPs and TIMPs in particular sections of the chicken oviduct during puberty and pause in egg laying, 2) the activity of selected MMPs in the oviduct of growing and molting hens, 3) the localization of chosen MMP system members in the wall of the chicken oviduct during maturation and pause in egg laying, and 4) the impact of estrogen on selected MMPs expression and activity in the chicken oviduct.

During puberty the expression of MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-2 and TIMP-3 in particular sections of the chicken oviduct, the infundibulum, magnum, isthmus, and shell gland was detected on both, mRNA and protein level. The relative expression of examined genes decreased in individual compartments of the chicken oviduct during maturation. MMP-9 protein level diminished, while MMP-7 and TIMP-3 concentration elevated in the oviduct of growing birds. MMP-2 and TIMP-2 protein level remained constant, with slight increase in MMP-2 concentration just before reaching maturity. The activity of MMP-2 and -9 was significantly higher in immature birds than in adult ones. Moreover, immunohistochemical studies revealed cell- and tissue-specific localization of MMPs and TIMPs in the wall of the chicken oviduct. During pause in egg laying, the expression of examined MMP system members on mRNA and protein level was shown in all sections of the chicken oviduct i.e., the infundibulum, magnum, isthmus, shell gland, and vagina. Regression of the oviduct was accompanied predominantly by an increase in MMP-2, -7 and -9, as well as TIMP-2 and TIMP-3 mRNA expression. Protein expression level and localization of MMPs and TIMPs did not show any significant changes during molting, whereas during oviduct regression and recrudescence elevated activity

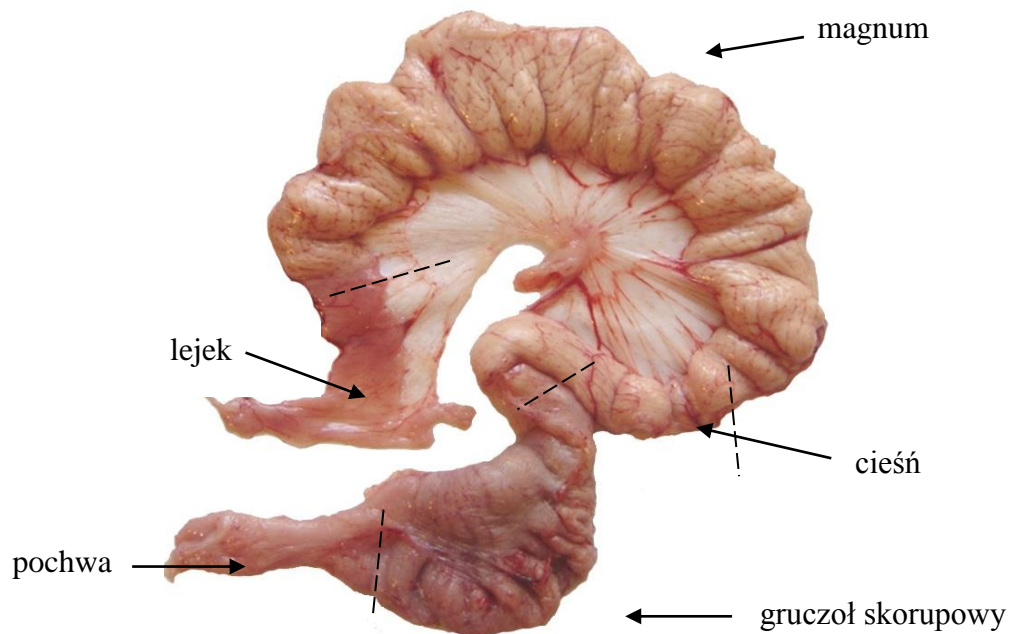
of MMP-2 and -9 was observed. Tamoxifen, estrogen receptor modulator, enhanced MMP-7 and -9 mRNA expression, while it did not influence MMP-2, TIMP-2 and -3 mRNA levels. Tamoxifen-treated birds showed higher protein level and activity of MMP-2 in the infundibulum and shell gland, as well as increased immunoreactivity for TIMP-3 in the tubular glands of magnum.

The results obtained suggest that the chicken oviduct is the site of synthesis of examined MMP system members, and MMP expression and activity depend on the oviductal section, as well as the stage of reproductive cycle. Cell- and tissue-specific localization of MMP system members in the wall of the oviduct indicates their distinct roles in this organ. Changes observed in the expression and activity of selected MMPs and TIMPs point to the significance that these molecules could be local regulators of development, remodeling, and functioning of the hen oviduct. Changes in the expression and activity of chosen MMPs following treatment with tamoxifen, suggest the involvement of estrogen in regulation of MMPs expression and activity. However, detailed mechanisms regulating synthesis and activity of MMP system members, as well as their precise roles in the avian oviduct require further research.

1. WSTĘP

Badania na ptakach przyczyniły się do licznych odkryć z zakresu biologii rozwoju, morfogenezy oraz odpowiedzi hormonalnej. Ze względu na specyfikę tworzenia i transportu jaja jajowód ptaków jest doskonałym modelem do badań z zakresu biologii komórki i biomineralizacji, która u ptaków jest jednym z najszybciej zachodzących procesów w przyrodzie (Hincke, 2012). Ponadto jajowód ptaków jest unikatowym modelem do oceny wpływu i mechanizmu działania hormonów steroidowych. Ze względu na zjawisko spontanicznie rozwijających się nowotworów układu rozrodczego u kur po około dwóch latach aktywności rozrodczej, podobnie jak u kobiet w okresie menopauzy, jajowód kury jest modelowym narzędziem do badań nad nowotworami układu rozrodczego (Berry i wsp., 2006). Z kolei wykorzystanie jajowodu kury jako bioreaktora daje nowe możliwości masowej produkcji białek terapeutycznych. Za takim zastosowaniem przemawiają: krótki cykl owulacyjny, wysoki potencjał białkotwórczy magnum, niższe koszty uzyskania transgenicznych białek, możliwość syntezy protein szkodliwych dla komórek ssaków oraz uzyskanie czystych mikrobiologicznie związków (Bednarczyk i wsp., 2006; Ivarie 2006; Roychoudhury i wsp., 2010). Jajowód ptaków jest także przedmiotem szczególnego zainteresowania hodowców drobiu, ponieważ każde zaburzenie w jego funkcjonowaniu ma bezpośredni wpływ na jakość znoszonych jaj, a w konsekwencji na wyniki produkcyjne i ekonomiczne.

Układ rozrodczy ptaków różni się, zarówno pod względem morfologicznym, jak i funkcjonalnym od układu rozrodczego ssaków. Zdecydowana większość samic ptaków posiada nieparzysty układ rozrodczy, bowiem jego prawa część ulega regresji już na etapie embriogenezy. Rozwijają się jajnik i jajowód położone po lewej stronie ciała samicy (Romanoff i Romanoff, 1949). Jajowód powstaje z górnych odcinków przewodu Müllera (Allard i wsp., 2000). U ptaków domowych ma postać długiego, pofałdowanego przewodu, w którym ze względu na budowę oraz pełnioną funkcję wyróżnia się pięć następujących po sobie odcinków. Są nimi: lejek (*infundibulum*), magnum (*magnum*), cieśń (*isthmus*), gruczoł skorupowy (*uterus*) oraz pochwa (*vagina*) (Aitken, 1971) (Fot. 1).

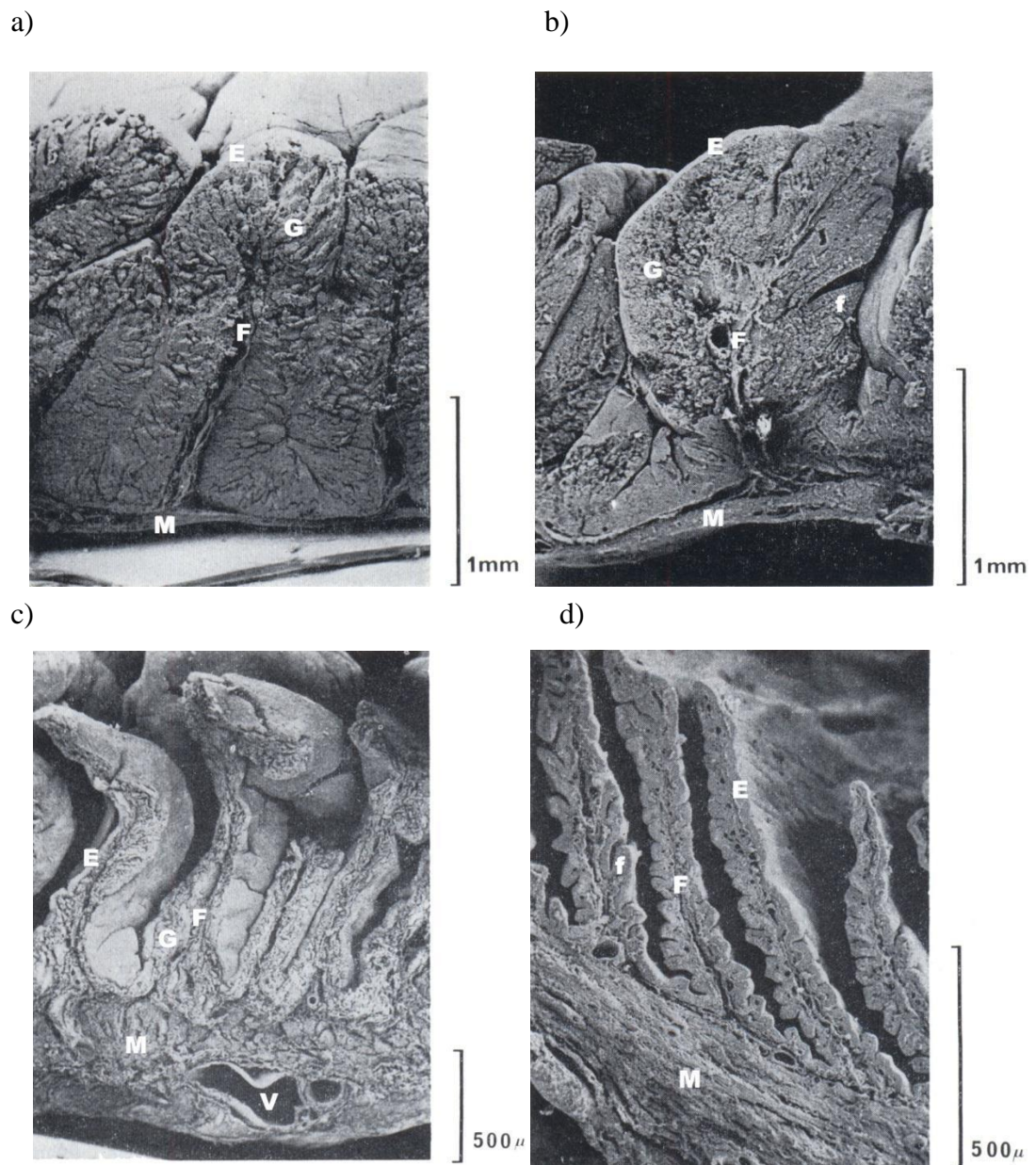


Fot. 1. Jajowód kury.

Wyróżniając od światła jajowodu ścianę tego narządu tworzą kolejno: warstwa nabłonka, blaszka właściwa błony śluzowej z gruczołami tabularnymi (cewkowymi), warstwa wewnętrzna tkanki łącznej, warstwa mięśni okrężnych, warstwa zewnętrzna tkanki łącznej, warstwa mięśni podłużnych oraz błona surowicza (Fot. 2). W nabłonku zlokalizowano dwa główne typy komórek, komórki urzęsione i komórki kubkowe (śluzowe). Wielokomórkowe gruczoły tubularne, otoczone komórkami wydzielniczymi, zbudowane są z trzech typów komórek: A, B i C (Wyburn i wsp., 1970; Chousalkar i Roberts, 2008). W komórkach typu A znajdują się ziarnistości o dużej gęstości elektronowej, komórki typu B wypełnione są znaczną ilością homogennych amorficznych substancji o niskiej gęstości, natomiast w komórkach typu C można z łatwością zaobserwować szorstką siateczkę śródplazmatyczną wraz z otaczającymi jądro aparatami Golgiego. Najwyraźniej to właśnie te komórki gruczołów tubularnych uczestniczą w syntezie protein białka jaja (Jung i wsp., 2011).

Jak wykazały badania histologiczne, u młodych osobników, warstwa nabłonka jest bardzo słabo zróżnicowana i nie można w niej wyróżnić jakichkolwiek komórek wydzielniczych (Boogaard i Finnegan, 1976). Gruczoły tabularne są nieobecne, a powierzchnia ściany jajowodu jest gładka z nielicznie występującymi zagłębieniami. Rozwój jajowodu następuje stopniowo i polega głównie na zmianach

w budowie morfologicznej gruczołów tubularnych (Yu i Marquard, 1973; Jung i wsp., 2011), skutkujących znacznym rozrostem błony śluzowej tego narządu.



Fot. 2. Przekrój poprzeczny przez ścianę jajowodu kury (Blom, 1973).

Zdjęcia wykonane elektronowym mikroskopem skaningowym (SEM). Oznaczenia: a - magnum, 21×; b - cieśń, 32×; c - gruczoł skorupowy, 32×; d – pochwa, 62×; E – nabłonek, F – fałd I – rzędowy, f – fałd II – rzędowy, G – gruczoły tubularne w blaszce właściwej błony śluzowej, M – mięśniówka (warstwa mięśni okrężnych i warstwa mięśni podłużnych), V – naczynie krwionośne.

Wraz z wejściem w okres rozrodczy jajowód znacznie zwiększa swoje rozmiary, osiągając u kury długość nawet 86 cm i wielokrotnie zwiększając swoją masę (Dunn i wsp., 1990). Błona śluzowa jajowodu, na całej jego długości, przybiera kształt nieznacznie skręconych fałd o różnej wielkości i liczbie, charakterystycznej dla każdego z poszczególnych odcinków jajowodu. Fałdy błony śluzowej występujące w początkowym fragmencie lejka, są niskie, proste i poprzerywane płytkimi rowkami. Ściana w tej części jajowodu jest niemal przezroczysta. Grzbiety fałd stają się bardziej widoczne w tylnej części lejka, gdzie występowanie wielu fałd II – rzędowych, rozdzielonych głębszymi szczelinami, tworzy nieregularne wypukłości. W magnum grzbiety fałd są proste, nieznacznie skręcone, z bardzo rzadko występującymi fałdami II - rzędu (Fot. 2a). Łącznikiem pomiędzy magnum a cieśnią jest wyraźny, biały pierścień (ok. 0,5 mm szerokości), gdzie brak jest gruczołów, a fałdowanie zanika. Tuż za tą granicą, grzbiety fałd ponownie wzrastają, przyjmując w cieśni postać cieńszych wypustek o coraz bardziej złożonej powierzchni. Tu przestrzenie między poszczególnymi fałdami są znacznie większe niż w magnum (Fot. 2b). W początkowym odcinku gruczołu skorupowego grzbiety fałd stają się wysokie i wąskie, z licznymi nacięciami (Fot. 2c). Przyjmując coraz bardziej „językowaty” kształt, tworzą regularne, podłużne fałdowania ciągnące się do końcowego odcinka pochwy (Fot. 2d) (Blom, 1973).

Formowanie jaja u kury domowej trwa od 24 do 26 h (Lofts i Murton, 1973). Uwolniona w wyniku owulacji komórka jajowa wychwytywana jest przez lejek jajowodu, gdzie dochodzi do ewentualnego zapłodnienia. W ciągu około 18 minut przebywania jaja w tym odcinku wytwarzana jest pierwsza warstwa białka (Gilbert, 1979). Następnie jajo przesuwane jest do magnum, najdłuższego z fragmentów jajowodu, którego główną funkcją jest synteza i stymulowana mechanicznie sekrecja białka otaczającego żółtko (Wyburn i wsp., 1970). Magnum charakteryzuje wysoka aktywność metaboliczna. W ciągu 3 h produkowane jest około 15 g białka jaja. Jest to możliwe dzięki obecności, szczególnie dobrze rozwiniętych w magnum, komórkom kubkowym nabłonka oraz komórkom gruczołów tubularnych (Jung i wsp., 2011) syntetyzujących i magazynujących siedemdziesiąt osiem różnych protein wchodzących w skład białka jaja (Mann, 2007). Ruchy perystaltyczne magnum przesuwają jajo do kolejnego odcinka jajowodu, jakim jest cieśń (Arjamaa i Talo, 1983). Ten odcinek jajowodu, w którym jajo przebywa około 1 h i 15 min. (Hoffer, 1971), odpowiada głównie za formowanie zewnętrznej i wewnętrznej błony

skorupowej (Solomon, 1975). W skład tych błon wchodzi włókienka białkowe. Rdzeń włókienek powstaje w gruczołach tubularnych (Simkiss i Taylor, 1971), a osłonka w komórkach nabłonkowych (Candlish, 1972). Po ich wytworzeniu jajo przechodzi do gruczołu skorupowego, zwanego również macicą, gdzie przebywa najdłużej, bo około 20 h (Nys i wsp., 2004). W ścianie gruczołu skorupowego znajdują się gruczoły cewkowe, produkujące do jego światła płyn, który dostarcza wodę i elektrolity pęczniącemu jajowi oraz jony wodorowęglanowe i wapniowe potrzebne do formowania skorupy jaja. Stwarza także właściwe środowisko plemnikom (Hoover i Smith, 1958; Breen i Debruyne, 1969). Jony wraz z wodą trafiają do białka jaja powodując jego pęcznienie (Salevsky i Leach, 1980). Jednocześnie rozpoczyna się proces powolnej kalcyfikacji skorupy, który znacznie przyspiesza po zakończeniu pęcznienia (Wyburn i wsp., 1973). Na około 5 h przed zniesieniem jaja powstaje pigment (Warren i Conrad, 1942), natomiast tuż przed zniesieniem kutykula (Persons, 1982). Ostatnim odcinkiem jajowodu, do którego jajo wypychane jest przez skurcze mięśni gładkich macicy, jest pochwa (Johnson, 2000). Nie bierze ona udziału w tworzeniu jaja, a jedynie pomaga w jego wydaleniu (Jull, 1952).

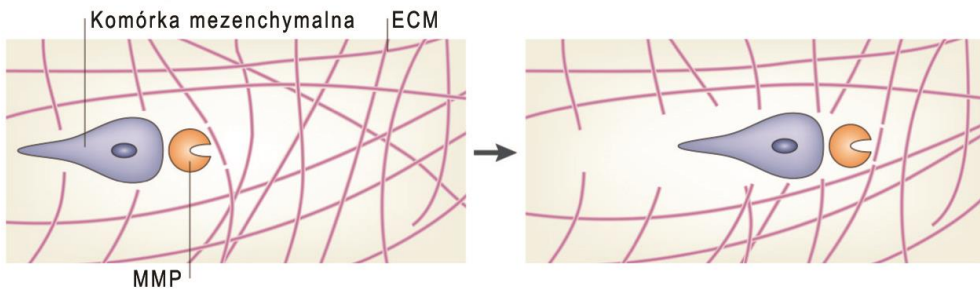
Rozwój oraz funkcjonowanie jajowodu ptaków pozostają głównie pod kontrolą hormonów steroidowych syntetyzowanych przez jajnik (Lofts i Murton, 1973), pobudzających wzrost i różnicowanie poszczególnych struktur tego narządu (Dougherty i Sanders, 2005). Ponadto, w prawidłową czynność jajowodu włączone są także substancje lokalnie w nim produkowane: między innymi aminy biogenne (Hrabia i wsp., 2001), prostaglandyny (Rzasa i Paczoska-Eliasiewicz, 1989), arginino-wazytocyna (Rzasa, 1984), czy hormon wzrostu (GH) (Donoghue, 1990; Hrabia i wsp., 2014).

Cykl reprodukcyjny ptaków zależy od gatunku i warunków środowiska. U ptaków dziko żyjących, a także u gęsi i samicy bażanta nieśność jest sezonowa, rozpoczyna się wraz z wydłużaniem się dnia świetlnego. U pozostałych gatunków ptaków domowych nieśność jest właściwie niezależna od pory roku. Kury produkują jaja w pewnym określonym rytmie, na który składają się serie kolejno znoszonych jaj i przerwy między tymi seriami. Przerwy w nieśności mogą wystąpić z powodu pauzy zimowej, kwoczenia lub corocznej wymiany piór. Naturalna wymiana piór, czyli pierzenie jest cyklicznym procesem fizjologicznym występującym u ptaków dzikich po zakończeniu sezonu rozrodczego, a u domowych po około roku nieśności. Okres

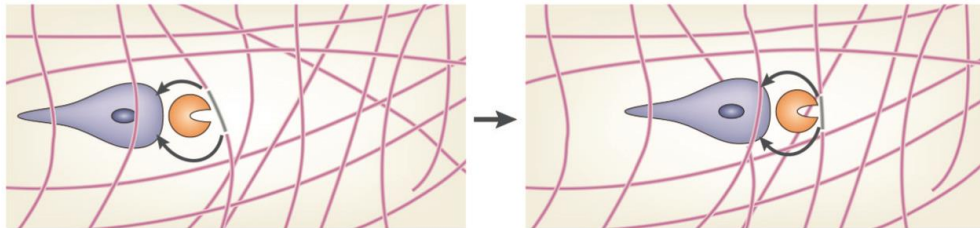
ten charakteryzuje się zmniejszoną „wrażliwością” przysadki na GnRH oraz obniżonym stężeniem hormonu luteinizującego (LH), estradiolu (E_2) i progesteronu (P_4) w osoczu (Etches i wsp., 1984; Proszkowiec i Rząsa, 2001). Towarzyszą im spadek masy ciała, regresja jajnika i jajowodu, a co za tym idzie przerwa w nieśności. Po zakończeniu pierzenia następuje regeneracja jajnika i jajowodu oraz istotnie poprawiają się funkcje rozrodcze (Berry, 2003). Zjawisko to zostało wykorzystane w produkcji drobiarskiej, w której w celu wydłużenia okresu użytkowania kur do dwóch okresów produkcyjnych, stosuje się zabieg wymuszonego przepierzania. Najbardziej powszechną metodą zsynchronizowanego przepierzania komercyjnych niosek jest głodzenie, ale involucję układu rozrodczego można także wywołać modyfikacją diety polegającą na obniżeniu zawartości wapnia lub zwiększeniu ilości cynku, a także podaniem egzogenego związku o działaniu antyestrogennym, takiego jak tamoksyfen. Przywrócenie ptakom standardowej diety skutkuje stopniowym wzrostem stężenia LH oraz steroidów jajnikowych stymulujących odbudowę układu rozrodczego i powrót do nieśności. Odmłodzenie tkanek jajowodu podczas przerwy w nieśności wpływa korzystnie na wyniki produkcyjne oraz jakość znoszonych jaj (Webster, 2003).

Podczas cyklu reprodukcyjnego (rozwój, regresja i odbudowa) w jajowodzie zachodzą intensywne zmiany morfologiczne, biochemiczne i funkcjonalne związane ze zmianami w dynamice proliferacji, różnicowania oraz apoptozy komórek (Heryanto i wsp., 1997; Anish i wsp., 2008; Jeong i wsp., 2013). Procesy te wymagają gruntownej przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix* - ECM) oraz angiogenezy. ECM stabilizuje strukturę tkanek, a jej składowe uczestniczą w procesach migracji komórek, a także wpływają na ich kształt i metabolizm. Skład i proporcje związków budujących ECM są charakterystyczne dla poszczególnych tkanek oraz wyznaczają ich strukturę i funkcję. Kolageny i elastyna tworzą rusztowanie ECM, zapewniając tym samym zachowanie prawidłowej struktury tkanki oraz transdukcję sygnałów międzykomórkowych (Werb, 1997). Kolagen typu IV, fibronektyna, laminina, entaktyna oraz siarczan heparanu są głównymi składnikami błon podstawnych będących jedną ze specyficznych form ECM (Ray i Stetler-Stevenson, 1997). Proteoglikany występujące w ECM ułatwiają migrację komórek (Egebland i Werb, 2002), natomiast glikoproteiny biorą udział w adhezji, migracji oraz różnicowaniu

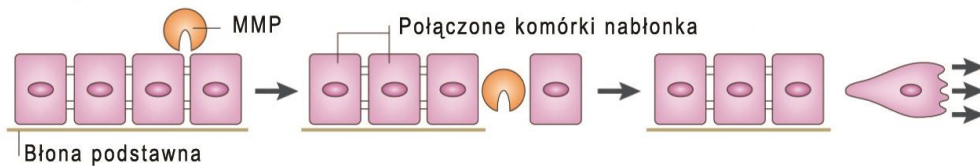
a Degradacja ECM w linii przemieszczania się komórki



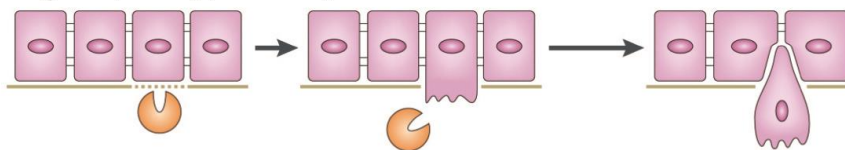
b Uwalnianie cząsteczek sygnałowych w wyniku proteolizy ECM



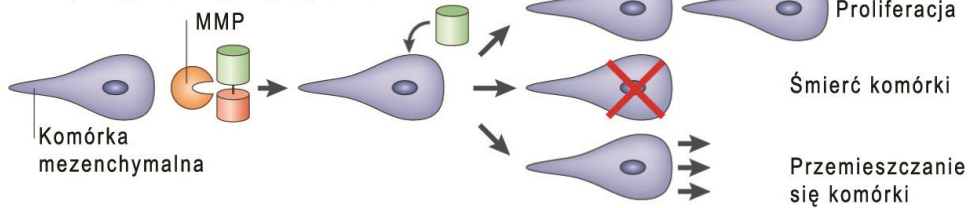
c Degradacja połączeń międzykomórkowych



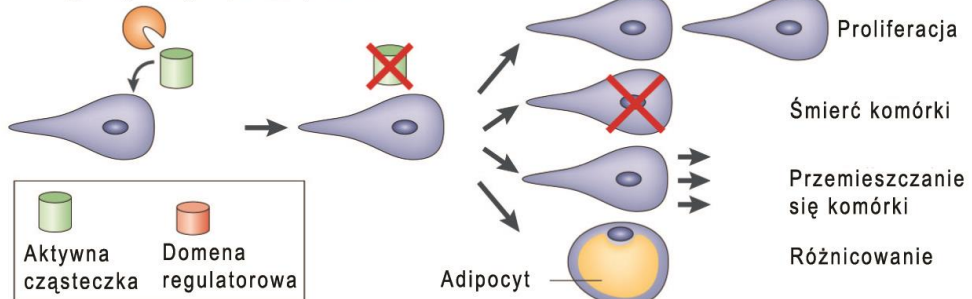
Degradacja błony podstawnej



d Aktywacja latentnych cząsteczek



e Regulacja aktywnych cząsteczek



Schemat 1. Sposoby działania metaloproteinaz (wg Page-McCaw i wsp., 2007).

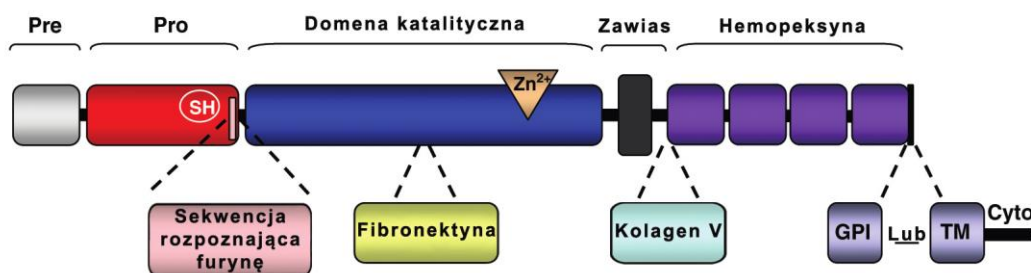
się komórek poprzez wiązanie z integrzynami. Spełnianie tych funkcji umożliwia stan dynamicznej równowagi między syntezą a degradacją zawartych w ECM cząsteczek.

Kluczową rolę w przebudowie ECM odgrywają metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *matrix metalloproteinases* - MMPs). Umiejscowione na powierzchni przodującej wędrujących komórek powodują degradację białek tylko w linii ich przemieszczania się. Właśnie to zjawisko ma szczególne znaczenie w przebudowie tkanki łącznej i angiogenezie (Nagase i Woessner, 1999; Page-McCaw i wsp., 2007; Murphy i Nagase, 2011) (Schemat 1). Metaloproteinazy stanowią rodzinę metalozależnych (Zn^{2+} i Ca^{2+}) endopeptydaz, oznaczonych numerami od MMP-1 do MMP-28, w budowie których można wyróżnić charakterystyczne domeny wspólne dla całej rodziny oraz domeny decydujące o odmiennych właściwościach poszczególnych enzymów. To właśnie budowa oraz specyfika substratowa stały się podstawą do wyróżnienia wśród nich kilku podgrup, takich jak:

- kolagenazy (MMP-1, MMP-8, MMP-13),
- żelatynazy (MMP-2, MMP-9),
- stromielizyny (MMP-3, MMP-10, MMP-11),
- matrylizyny (MMP-7, MMP-26),
- MMPs typu błonowego (membrane type MMPs - MT-MMPs) (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25)
- inne MMPs nie zakwalifikowane do żadnej z powyższych grup: metaloelastaza (MMP-12), MMP-19, enamelizyna (MMP-20), MMP-23, MMP-27, epilizyna (MMP-28) (Page-McCaw i wsp., 2007).

Metaloproteinazy syntetyzowane są w postaci pre-proenzymu. Odcięcie domeny sygnałowej powoduje ich uwolnienie w formie zymogenu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej lub ekspozycję na powierzchni błony komórkowej. Niektóre z MMPs mogą występować także wewnątrz komórki, jest tak w przypadku MMP-1, MMP-2 oraz posttranskrypcyjnego wariantu MMP-11 (Kwan i wsp., 2004; Limb i wsp., 2005). Dzięki domenie propeptydowej MMPs utrzymywane są w formie nieaktywnej (latentnej) i najczęściej w takiej formie występują w tkankach organizmu. Aktywacja polega na utracie peptydu o masie 10 kDa z N-terminalnego regionu białka. W proenzymie atom cynku (Zn^{2+}) w centrum aktywnym zablokowany jest wiązaniem koordynacyjnym przez grupę tiolową cysteiny. Odcięcie propeptydu powoduje rozerwanie wiązania Zn^{2+} -cysteina blokującego

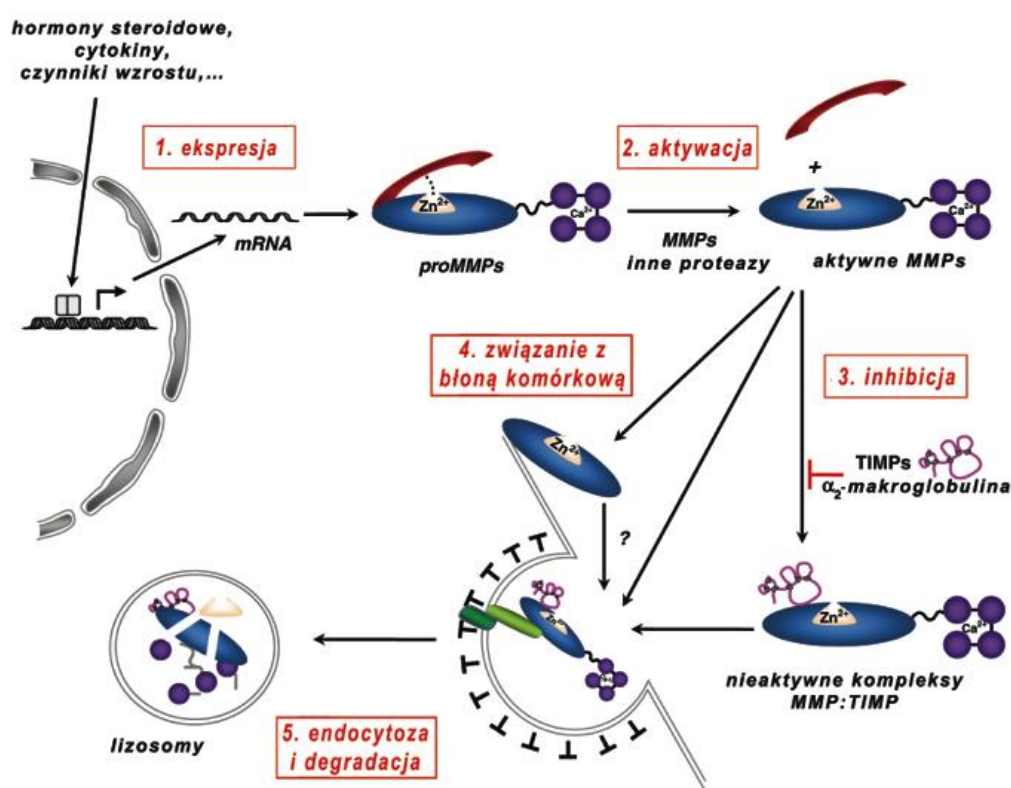
aktywność enzymu (Borkakoti, 2000; Nagase, 2006) (Schemat 2). Cztery domeny podobne do hemopeksyny, zaangażowane w rozpoznanie substratu i powiązane z domeną katalityczną regionem zawiasowym, budują większość MMPs, z wyjątkiem matrylizyn (MMP-7 i -26) oraz MMP-23, u której występuje inna domena. Związane z błoną MT-MMPs posiadają dodatkowo domenę kotwiczącą w postaci glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI) lub transbłonową (TM) i cytozolową (Cyto). Charakterystyczne dla żelatynaz (MMP-2 i MMP-9) są występujące w obrębie domeny katalitycznej, trzy powtórzone fragmenty podobne do fibronektyny typu II. Ponadto, MMP-9 w obrębie regionu zawiasowego posiada domenę kolagenową typu V odgrywającą istotną rolę w trawieniu niektórych substratów m.in. kolagenu (Borkakoti, 2000; Sternlicht i Werb, 2001; Chevronnay i wsp., 2012) (Schemat 2).



Schemat 2. Budowa metaloproteinaz (wg Chevronnay i wsp., 2012).

Prometaloproteinazy znajdujące się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej mogą być aktywowane przez proteazy serynowe takie jak plazmina oraz inne aktywne już MMPs (Nagase, 1999; Sternlicht i Werb, 2001; Itoh i wsp., 2008). Dziesięć spośród metaloproteinaz, w tym MMP-11 i wszystkie MT-MMPs, posiadają na końcu domeny propeptydowej sekwencję rozpoznającą podobną do furyny konwertazę prekursorów białek, dlatego też mogą być wydzielane i eksponowane na powierzchni błony komórkowej już jako aktywne enzymy. Dodatkowo, MMP-8, -9 i -25 mogą być magazynowane w ziarnistościach leukocytów wielojądrzastych i uwalniane w miejscu zapalenia (Kang i wsp., 2001). Efektywna aktywacja pro-MMP-2 może nastąpić także na drodze zależnej od MMP-14 (MT1-MMP), metaloproteinazy transbłonowej, której cząsteczki związane są z błoną komórkową komórek tkanki łącznej. Aktywacja MMP-2 poprzez ten szlak wymaga powstania kompleksu enzymu MMP-14 i inhibitora TIMP-2 na powierzchni błony komórkowej (Itoh

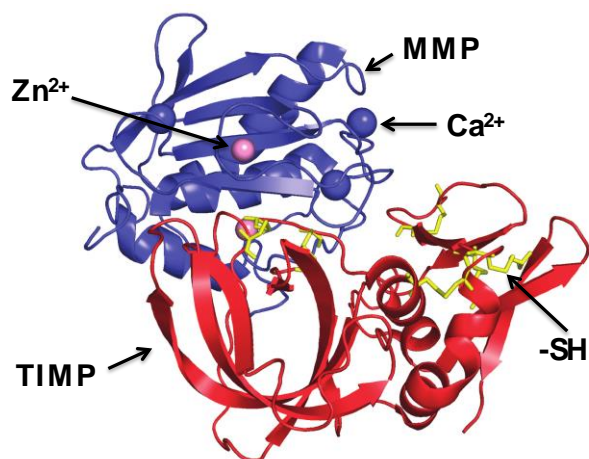
i wsp., 2008). W warunkach *in vitro* proces aktywacji pro-MMPs, poprzez zmiany konformacyjne poprzedzające odłączenie peptydu regulatorowego, może zachodzić w wyniku działania różnych związków nieorganicznych (cyjanek, jodek potasu, siarczan dodecylu sodu), związków organicznych zawierających rtęć (octan 4-aminofenylortęciowy-APMA), mocznika oraz pod wpływem stresu oksydacyjnego (Borkakoti, 2000; van Beurden i wsp., 2005). Udowodniono, że zdolność działania MMPs zależy od pH tkanki. Większość MMPs działa w pH neutralnym lub lekko zasadowym, podczas gdy inne proteazy są aktywne w środowisku kwaśnym („zapalnym”) (Korostoff i wsp., 2000).



Schemat 3. Regulacja aktywności metaloproteinaz (wg Chevronnay i wsp., 2012; schemat zmodyfikowany).

Aktywność proteolityczna MMPs może być regulowana na kilku poziomach: transkrypcji, obróbki posttranslacyjnej, aktywacji proenzymu, ale także przez obecność ich fizjologicznych inhibitorów (Schemat 3). Należą do nich działająca niespecyficznie α_2 -makroglobulina oraz specyficzne tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMPs) (Nagase, 1999; Murphy, 2011). Produkowana przez wątrobę α_2 -makroglobulina tworzy z MMPs kompleksy, które następnie usuwane są

na drodze endocytozy, za pośrednictwem białka związanego z receptorem LDL (LRP-1) (Chevronnay i wsp., 2012; Yamamoto i wsp., 2015). Z kolei TIMPs są rodziną czterech strukturalnie spokrewnionych ze sobą białek, zawierających w swej strukturze 12 reszt cysteinowych, które tworzą 6 mostków disiarczkowych oraz 6 pętli polipeptydowych. Pętle 1-3 znajdują się w C-końcowym fragmencie struktury, natomiast pętle 4-6 w N-końcowym fragmencie białka (Gacko, 2001). Obie domeny mają zdolność do tworzenia połączeń z MMPs, natomiast największa aktywność inhibicyjna związana jest głównie z możliwością tworzenia wiązań pomiędzy N-końcem TIMP a N-końcem enzymu. Te specyficzne inhibitory sprawują podwójną kontrolę nad MMPs. Stwierdzono, że zarówno hamują one proces przejścia pro-MMPs w MMPs, jak też ich aktywne formy. TIMP-1, -2, -3 i -4 tworzą klasyczne niekowalencyjne wiązania, łącząc się w dwucząsteczkowe kompleksy z MMPs (Schemat 4), prowadzą do zahamowania ich proteolitycznej aktywności (Murphy, 2011).



Schemat 4. Krystalograficzny model kompleksu MMP-TIMP (wg Murphy, 2011, schemat zmodyfikowany).

Kompleks taki może ulec dysocjacji z odzyskaniem pełnej aktywności TIMPs oraz MMPs (Emara i Woźniak, 1999). Aktywność inhibicyjna poszczególnych TIMPs jest różna w stosunku do różnych MMPs. TIMP-1 ma większe powinowactwo do domeny hemopeksynopodobnej MMP-9 niż MMP-2, natomiast C-końcowa domena TIMP-2 ma znacznie większe zdolności do wiązania z domeną hemopeksynopodobną MMP-2, działając znacznie słabiej na MMP-9. TIMP-3 wykazuje znacznie większe powinowactwo w stosunku do MMP-9 niż pozostałe białkowe inhibitory. Oprócz inhibicji metaloproteinaz TIMPs mają zdolność do

pobudzania wzrostu komórek oraz hamowania sygnałów stymulujących mitozę oraz apoptozę (Gacko, 2001; Sternlicht i Werb, 2001). Inhibitory produkowane są przez te same komórki, które wytwarzają metaloproteinazy. Obecne w przestrzeniach międzykomórkowych, w osoczu krwi i w innych płynach ustrojowych TIMPs przejawiają tkankowo-specyficzną ekspresję, która może być regulowana na poziomie transkrypcji przez różne cytokiny, czynniki wzrostu oraz hormony steroidowe (Murphy i Nagase, 2008; Zhu i wsp., 2014).

Wykazano, iż u ssaków TIMP-1 produkowany jest przez większość komórek i tkanek, w tym budujących narządy rozrodcze. Jego ekspresja regulowana jest przez cytokiny, głównie przez interleukinę-1 (IL-1) i czynnik martwicy nowotworów (TNF- α), czy też czynnik wzrostu nowotworów (TGF- β). Wytwarzany przez fibroblasty i komórki endotelialne TIMP-2, wykazuje z kolei konstytutywną ekspresję, która nie jest podatna na działania czynników wzrostu oraz cytokin (Stearns i wsp., 1999). TIMP-3 jest nierozpuszczalnym, związanym z macierzą inhibitorem, regulowanym przez czynniki pobudzające mitozę, między innymi przez TGF- β , a hamowany przez TNF- α (Leco i wsp., 1994; Curry i Osteen, 2003).

Metaloproteinazy macierzy oddziałując na otaczającą je tkankę pośredniczą w szeregu procesów fizjologicznych, jak i patologicznych. Poza rolę w przebudowie tkanki łącznej, MMPs zaangażowane są w proteolityczną aktywację oraz uwalnianie cząsteczek sygnałowych (Murphy i Nagase, 2011). W warunkach fizjologicznych regulują procesy rozwoju organizmu, odgrywają ważną rolę w gojeniu się ran, przebudowie tkanek oraz angiogenezie. Nadmierną i niekontrolowaną aktywację MMPs obserwuje się w chorobach zapalnych i nowotworowych. MMPs mogą również wykazywać działanie pronowotworowe nasilając rozwój i metastazę guzów, dlatego też stały się celem w pracach nad lekami przeciwnowotworowymi (Fingleton i wsp., 2003). Zwiększona ekspresja MMPs, często korelująca z degradacją tkanek, została bardzo dobrze udokumentowana w chorobach zapalnych kości i stawów (Murphy i Nagase i wsp., 2008). Ponadto, MMPs zaangażowane są w patogenezę chorób autoimmunologicznych takich jak stwardnienie rozsiane oraz większość chorób układu krążenia (miażdżyca, zawał mięśnia sercowego) (Page-McCaw i wsp., 2007).

Liczne doniesienia wskazują na istotną rolę elementów systemu MMP w procesie zapłodnienia, implantacji oraz wczesnego rozwoju embrionalnego u ludzi i różnych gatunków zwierząt (Vu i Werb, 2000; Gabler i wsp. 2001; Curry

i Osteen, 2003; Bai i wsp., 2005; Chevronnay i wsp., 2012). Z przeprowadzonych badań wynika, że ekspresja MMPs w układzie rozrodczym zależy od rodzaju komórek i tkanek, a także stadium cyklu reprodukcyjnego (Curry i Osteen, 2003; Hu i wsp., 2004; Russo i wsp., 2009). Ponadto zaobserwowano, że zróżnicowane profile ekspresji elementów systemu MMP w ludzkim endometrium odzwierciedlają cykliczne zmiany w stężeniach hormonów steroidowych we krwi podczas cyklu menstruacyjnego (Goffin i wsp., 2003; Diaz i wsp., 2012). Te hormonalne sygnały modulują syntezę poszczególnych MMPs i ich inhibitorów w celu kontroli miejsca i zakresu degradacji macierzy. Jednak, warunkiem precyzyjnej przebudowy ECM jest zachowanie równowagi pomiędzy MMPs i TIMPs w celu ograniczenia nadmiernej proteolitycznej degradacji. Niekontrolowana proteoliza prowadzi do stanów patologicznych takich jak endometrioza, zwłóknienia macicy, niewłaściwa implantacja zarodka, spontaniczne poronienia, przedwczesne przerwanie błon płodowych lub nowotwory. Podejmowane są badania skupiające się na dokładniejszym poznaniu roli jakich elementów systemu MMP odgrywają w różnych aspektach fizjologii i patologii układu rozrodczego (Vandenbroucke i Libert, 2014).

Pomimo licznych danych sugerujących udział systemu MMP w remodelingu i funkcjonowaniu układu rozrodczego ssaków, jego rola w czynności tego układu u ptaków jest stosunkowo słabo poznana. Informacje dotyczące MMPs i ich tkankowych inhibitorów ograniczają się do wykazania obecności kilku MMPs i TIMPs w strukturach jajnika kury (Asem i wsp., 2000; Leśniak i Hrabia, 2012; Zhu i wsp., 2014) oraz ekspresji mRNA MMP-2, MMP-9, TIMP-2 i TIMP-3 w jajowodzie kury (Rehault-Godbert i wsp., 2008; Dunn i wsp., 2009; Song i wsp., 2011; Hrabia i wsp., 2013b). Sugerowano, także udział MMP-2 w procesie regresji prawego przewodu Müllera u embrionów żeńskich (Ha i wsp., 2004).

2. CEL PRACY

Metaloproteiny są kluczowymi regulatorami przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej w różnych tkankach w tym rozrodczych i są włączone w modulację szeregu procesów fizjologicznych i patologicznych. Chociaż liczne doniesienia sugerują rolę metaloproteinaz w remodelingu i funkcjonowaniu układu rozrodczego ssaków, informacje dotyczące MMPs w jajowodzie ptaków są bardzo skąpe. Jak dotąd wykazano jedynie obecność mRNA MMP-2 i MMP-9 oraz tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP-2 i TIMP-3) w jajowodzie kury (Rehault-Goldberg i wsp., 2008; Dunn i wsp., 2009; Song i wsp., 2011). Na podstawie tych wyników, a także udziału MMPs w regulacji funkcji rozrodczych u ssaków wysunięto hipotezę, że wybrane komponenty systemu MMP są zaangażowane w rozwój i przebudowę (regresja i odnowa) jajowodu ptaków.

W celu weryfikacji tej hipotezy przeprowadzono doświadczenia, których bezpośrednim celem było określenie:

- 1) ekspresji wybranych metaloproteinaz i ich tkankowych inhibitorów w poszczególnych odcinkach jajowodu kury:
 - a) podczas dojrzewania płciowego
 - b) podczas przerwy w aktywności rozrodczej (przerwy w nieśności)
- 2) aktywności wybranych metaloproteinaz w jajowodzie kur rosnących i poddanych wymuszonej przerwie w aktywności rozrodczej
- 3) lokalizacji MMPs i TIMPs w ścianie rozwijającego się oraz ulegającego przebudowie jajowodu
- 4) udziału estrogenów w regulacji ekspresji i aktywności wybranych metaloproteinaz w jajowodzie kur.

Przedstawicielami systemu MMPs były MMP-2, MMP-7 i MMP-9 oraz tkankowe inhibitory TIMP-2 i TIMP-3. Jako zwierzę modelowe do badań wybrano kurę domową (*Gallus gallus domesticus*) ze względu na dostępność materiału badawczego oraz łatwość określenia stadium fizjologicznego układu rozrodczego. Wzięto także pod uwagę aspekt biotechnologiczny wykorzystania jajowodu kury domowej jako bioreaktora do produkcji ludzkich białek terapeutycznych.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Zwierzęta doświadczalne

Doświadczenia wykonano na 48 niedojrzałych płciowo kurkach i 48 dojrzałych kurach Hy-Line Brown, które utrzymywano w indywidualnych klatkach w cyklu świetlnym 14L:10D (światło od 6:00 do 20:00) z wolnym dostępem do wody i paszy. Ptaki żywiono mieszanką pełnoporcjową zawierającą w okresie wzrostu ptaków 15% białka i 11,5MJ/kg energii, a natomiast po rozpoczęciu i w okresie nieśności 17,5% białka i 11,5MJ/kg energii. U kur niosących w celu określenia czasu owulacji, przez co najmniej 2 tygodnie poprzedzające doświadczenia i w trakcie doświadczeń rejestrowano czas zniesienia każdego jaja. Ptaki zabijano przez dekapitację i natychmiast izolowano jajowód. Ptaki, które znosiły jaja dekapitowano około 2h po owulacji, tj. kiedy jajo przebywało w środkowej części magnum. Przed dekapitacją z żyły skrzydłowej pobierano krew. Wszystkie doświadczenia zostały przeprowadzone za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej w Krakowie.

3.2. Stosowane związki

Abcam, UK: królicze przeciwciało poliklonalne skierowane przeciwko ludzkiej MMP-2, królicze przeciwciało poliklonalne skierowane przeciwko mysiej MMP-9, królicze przeciwciało poliklonalne skierowane przeciwko ludzkiemu TIMP-3

Advansta, USA: kozie przeciwciało anty-królicze skoniugowane z peroksydazą chrzanową, Western Bright Quantum Chemiluminescent HRP Substrate

Applied Biosystems, USA: High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, TaqMan Gene Expression Assays, TaqMan Gene Expression Master Mix, Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control

Bio-Rad, USA: Bradford Protein Assay, Coomassie Brilliant Blue R-250, TGX FastCast acrylamide kit, membrany nitrocelulozowe, Laemmli Sample Buffer, Zymogram Sample Buffer, β -merkaptioetanol, białkowy marker molekularny Precision Plus Protein Dual Xtra Standards

DIAsource ImmunoAssays, Belgia: DIAsource E2-RIA-CT Kit, DIAsource PROG-RIA-CT Kit, DIAsource TESTO-RIA-CT Kit

BioVision, USA: bufor lizujący

Fluka, USA: żywica syntetyczna (DPX)

Fermentas, Litwa: bufor TBE, woda jałowa

GE Healthcare, UK: Amersham Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) Biotrak Activity Assay System, Amersham Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Biotrak Activity Assay System

ICN Biomedicals, USA: 3,3'-diaminobenzzydina (DAB), dwuwodorofosforan sodu, wodorofosforan dwusodowy, Tween 20, kwas edetynowy (EDTA), Triton-X, glicerol, glicyna, dodecylosiarczan sodu (SDS), błękit bromofenolowy, Coomassie Blue R-250, nadsiarczan amonu (APS)

Life Technologies, USA: iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose

Merck, Niemcy: odczynnik Schiffa

Molecular Research Center, USA: TRI-reagent

POCH, Gliwice: alkohol etylowy, alkohol metylowy, chlorek sodu, cytrynian sodu, formalina, 30% H₂O₂, ksylen, aceton, kwas cytrynowy, kwas octowy, wodorotlenek sodu, chlorek wapnia

Santa Cruz Biotechnology, USA: królicze przeciwciało poliklonalne skierowane przeciwko ludzkiej MMP-7, królicze przeciwciało poliklonalne skierowane przeciwko ludzkiemu TIMP-2, mysie przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko ptasiej β-aktynie

Sigma, USA: agaroz, albumina surowicy bydlęcej (BSA), bromek etydy, surowica kozia, trizma base, alkohol izopropylowy, 3-aminopropylotrietoksylian, bromochloropropan, paraplast, RNAlater, 30% akrylamid, cytrynian tamoksyfenu, żelatyna, kazeina, kwas nadjodowy, N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED), azydek sodu (NaN₃)

Thermo Scientific: PageRuler Prestained Protein Ladder

Vector Laboratories, USA: biotynylowane przeciwciało kozie anty-królicze, kompleks awidyna-biotyna-peroksydaza (Vectastain ABC System)

Warszawskie Zakłady Farmaceutyczne Polfa, Polska: heparyna

3.3. Układ doświadczeń

3.3.1. Ekspresja, aktywność i lokalizacja MMPs i TIMPs w jajowodzie kury podczas dojrzewania płciowego

Kurki (n=48) dekapitowano w odstępach 2-tygodniowych, w wieku od 10. do 16. tyg. życia oraz w 17. tyg. tj. po zniesieniu pierwszego jaja. W każdym przedziale wiekowym pobierano jajowód (n=15 w 10. i 12. tyg., n=6 w 14, 16 i 17 tyg.), a po zważeniu izolowano cztery jego odcinki: lejek, magnum, cieśń oraz gruczoł skorupowy (Schemat 1). Tkanki natychmiast umieszczano w odczynniku RNAlater, aby zapobiec degradacji RNA i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu izolacji całkowitego RNA i oznaczenia ekspresji genów metodą Real-Time PCR. W celu oznaczenia ekspresji genów na poziomie białka metodą Western blot oraz aktywności metodą zymografii tkanki zamrażano i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania analiz. Ponadto, fragmenty tkanek jajowodu zostały utrwalone w 10% formalinie i zatopione w parapłacie, a następnie poddane analizom histologicznym i immunohistochemicznym. W osoczu krwi, pobranej z żyły skrzydłowej tuż przed dekapitacją ptaków, oznaczono również stężenie progesteronu (P_4) testosteronu (T) i estradiolu (E_2) metodą radioimmunologiczną (RIA).

3.3.2. Ekspresja, aktywność i lokalizacja MMPs i TIMPs w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem

Niosące kury (n=36) w wieku 40 tygodni, o średniej masie ciała $1,94 \pm 0,03$ podzielono losowo na dwie grupy: kontrolną (n=18) i eksperymentalną (n=18) poddaną wymuszonej przerwie w nieśności poprzez całkowite pozbawienie paszy przez 5 dni, a następnie przez podawanie paszy co drugi dzień. Od 13 dnia doświadczenia paszę podawano codziennie. Kury kontrolne i doświadczalne dekapitowano w 6., 13. i 17. lub 20. dniu doświadczenia (n=6 w każdej grupie). Izolowano fragmenty wszystkich odcinków jajowodu: lejka, magnum, cieśni, gruczołu skorupowego i pochwy. Wykonano takie same oznaczenia jak w poprzednim doświadczeniu. Podobnie jak w doświadczeniu 3.3.1. w osoczu oznaczono stężenie hormonów steroidowych: P_4 , T i E_2 metodą RIA.

3.3.3. Ekspresja, aktywność i lokalizacja MMPs i TIMPs w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu

Niosące kury (n=12), w wieku 25 tygodni, o średniej masie ciała $1,86 \pm 0,036$ podzielono losowo na dwie grupy: kontrolną (n=6) i eksperymentalną (n=6). Kury kontrolne otrzymywały podskórne iniekcje rozpuszczalnika (etanol), natomiast kury doświadczalne iniekcje tamoksyfenu (niesteroidowy modulator receptorów estrogenowych) w dawce 3 mg/kg masy ciała w objętości 0,3 ml (Paczoska-Eliasiewicz, 1999; Rząsa i wsp., 2009). Iniekcje wykonywano codziennie, aż do wywołania przerwy w nieśności tj. przez 6 dni. W 7 dniu ptaki dekapitowano. Izolowano wszystkie odcinki jajowodu i wykonano oznaczenia jak w doświadczeniu 3.3.1.

3.4. Metody oznaczeń

3.4.1. Radioimmunologiczna metoda oznaczania stężenia progesteronu, testosteronu i estradiolu

Krew odwirowywano (5 min, 3000 x g) bezpośrednio po pobraniu do probówek z heparyną. Stężenie P_4 , T i E_2 w osoczu krwi oznaczano radioimmunologicznie za pomocą zestawów komercyjnych. Stosowano hormony znakowane izotopem jodu [^{125}J] oraz probówki opłaszczone wysoce specyficznymi przeciwciałami dla każdego z hormonów. W przypadku P_4 używano standardów o stężeniach: 0; 0,12; 0,9; 3,0; 7,9; 15 i 36 ng/ml, dla T: 0; 0,11; 0,48; 1,55; 5,4; 16,4 ng/ml, a dla E_2 : 0, 18, 35, 152, 433, 1818 i 3604 pg/ml. Czułość metody dla P_4 wynosiła 0,05 ng/ml, a reakcje krzyżowe przeciwciał: 5- α -pregnan-3,20-dion 3,51%, 20- β -dihydroprogesteron 3,27%, 17 α -hydroksyprogesteron 1,5%. Czułość metody dla T była równa 0,5 ng/ml, wiązania krzyżowe: dihydrotestosteron 0,31%, androstenodion 0,28%. W przypadku E_2 czułość metody wynosiła 6,4 pg/ml, a wiązania krzyżowe: estron 1,0%, estriol 0,6%. Pomiaru radioaktywności próbek dokonywano w 5-kanalowym sprzężonym z komputerem liczniku gamma „Wizard” [LKB, Wiedeń, Austria].

3.4.2. Analiza ekspresji genów metodą Real-Time PCR

3.4.2.1. Zasada metody Real-Time PCR z użyciem sond TaqMan

Technika PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy, ang. *Polymerase Chain Reaction*) z ilościową analizą w czasie rzeczywistym (ang. *Real-Time PCR*) stała się w ostatnich latach wszechstronną i uznaną metodą analityczną, gdyż pozwala na wykrycie i ilościowe oznaczenie bardzo małych ilości specyficznych sekwencji kwasów nukleinowych. Największą zaletą tego narzędzia badawczego jest szybki i dokładny pomiar zmian ekspresji genów w tkankach. Technika Real-Time PCR opiera się na analizie przyrostu ilości produktu reakcji PCR w czasie rzeczywistym poprzez pomiar zmiany fluorescencji w każdym cyklu reakcji. Pomiar oparty jest na różnicy w długości fali wzbudzenia i emisji fluoroforu stanowiącego na przykład fragment sondy molekularnej. Sondy TaqMan to krótkie odcinki DNA wyposażone na końcu 5' we fluorofor emitujący światło (reporter), a na końcu 3' wygaszacz pochłaniający światło fluoroforu. Sonda taka po związaniu się z komplementarną sekwencją na etapie wydłużania jest degradowana przez polimerazę Taq posiadającą aktywność 5'-egzonukleolityczną, przez co fluorochrom ulega oddzieleniu od wygaszacza. Rozdział obu cząsteczek umożliwia emisję fluorescencji, które mierzona jest po każdym cyklu.

3.4.2.2. Izolacja całkowitego RNA

Izolację całkowitego RNA przeprowadzano w oparciu o metodę Chomczyńskiego i Sacchi (1987) z zastosowaniem TRI-Reagentu. Tkanki homogenizowano w proporcji 100 mg tkanki/1 ml TRI-reagentu, dodawano 0,1 ml 1-bromo-3-chloro-propanu (BCP), energicznie wytrząsano przez 1 min, a następnie inkubowano przez 15 min na lodzie. W celu rozdzielenia poszczególnych frakcji próbki wirowano (15 min, 12000 x g, 4°C), a frakcję zawierającą RNA przenoszono do nowych probówek i dodawano 0,5 ml izopropanolu w celu precypitacji RNA, którą prowadzono przez noc w temperaturze 4°C. Po odwirowaniu (8 min, 12000 x g, 4°C) nadsącz usuwano, a osad RNA przemywano w 1 ml 75% etanolu. Próbkę ponownie wirowano (5 min, 7600 x g, 4°C), nadsącz odrzucano, a pelet RNA rozpuszczano w wodzie wolnej od rybonukleaz. Po inkubacji w temperaturze 55-60°C (10 min), wykonywano pomiar stężenia otrzymanego RNA spektrofotometrem BioPhotometer (Eppendorf, Niemcy) przy długości fali 260 nm. Czystość uzyskanego RNA szacowano na podstawie stosunku wartości odczytów OD 260/280 nm, które mieściły się w zakresie 1,6-1,9. W celu określenia ewentualnego stopnia

degradacji wyizolowanego RNA przeprowadzano rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny w buforze 0,5x TBE.

3.4.2.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)

Reakcje odwrotnej transkrypcji przeprowadzano korzystając z zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit zawierającego niezbędne do przeprowadzenia reakcji odczynniki, w tym pulę przypadkowych starterów (ang. *random primers*). Reakcję przeprowadzono w sterylnych probówkach, do których dodano 2 µg całkowitego RNA w 10 µl wody oraz 10 µl mieszaniny reakcyjnej. Mieszanina reakcyjna składała się z: 2 µl 10x stężonego buforu do RT, 0,8 µl 100 mM mieszaniny trifosforanów deoksynukleozydów (dNTP), 2 µl Random Primers (10x stężonych), 1 µl odwrotnej transkryptazy (MultiScribe) oraz 4,2 µl H₂O (wolnej od rybonukleaz). Próbki inkubowano w termocyklerze (Mastercycler Gradient; Eppendorf, Germany) zgodnie z następującym profilem temperaturowym: (i) 25°C przez 10 min, (ii) 37°C przez 120 min, (iii) 85°C przez 5 min. Uzyskany cDNA stanowił matrycę w reakcji PCR. Kontrole negatywne stanowiły próbki bez dodatku odwrotnej transkryptazy lub bez dodatku RNA.

3.4.2.4. Real-Time PCR

Reakcje Real-Time PCR przeprowadzano w termocyklerze StepOne Plus (Applied Biosystems, USA) na płytkach 96-dołkowych, z użyciem zestawu odczynników TaqMan Gene Expression Master Mix i odpowiednich starterów oraz sond TaqMan MGB (TaqMan Gene Expression Assay) dla genów kodujących enzymy MMP-2, -7 i -9 oraz inhibitory TIMP-2 i -3 (Tab. 1.). Reakcje prowadzono w następujących warunkach: 50°C przez 2 min, 95°C przez 10 min oraz 40 cykli amplifikacji w 95°C przez 15 s i 60°C przez 60 s. W multipleksowej reakcji amplifikacji użyto 10 µl mieszaniny zawierającej: 5 µl TaqMan Gene Expression Master Mix, 0,5 µl TaqMan Gene Expression Assay (para starterów i sonda TaqMan MGB dla danego genu), 0,5 µl Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control (para starterów i sonda znakowana VIC/TAMRA), 3 µl wody oraz 1 µl cDNA (próbki rozcieńczone 10x po reakcji odwrotnej transkrypcji). Każda reakcja została powtórzona dwukrotnie, a próby bez matrycy służyły jako kontrole negatywne. Względną ekspresję badanych genów RQ (ang. *Relative Quantitation*) obliczano w odniesieniu do genu referencyjnego (18S rRNA) za pomocą oprogramowania

Tabela. 1. Charakterystyka zestawów stosowanych do badania ekspresji mRNA genów MMPs i TIMPs metodą Real-time PCR.

Symbol genu	Ref. Seq.	Sekwencja sondy (FAM5'→3'NFQ)	Długość produktu (pz)
MMP-2	U07775.1	CCTGGCCCTGGTCCTG	69
MMP-7	NM_001006278.1	TACAATCAAGGAGTTAATTTGTTCC	92
MMP-9	NM_204667.1	AGTACCTCTATGGTCGTGGCTCTGG	78
TIMP-2	NM_204298.1	ATCGCCCTCGGATTTG	88
TIMP-3	NM_205487.2	ACGCGGCCTGTAATC	70

StepOne Software v2.1. (Applied Biosystems) korzystając z metody $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, gdzie Ct jest cyklem progowym dla amplifikacji badanego genu (Livak i Schmittgen, 2001):

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ próbki} - \Delta Ct \text{ kalibratora}$

$\Delta Ct \text{ próbki} = (Ct \text{ badanego genu dla próbki} - Ct \text{ genu referencyjnego dla próbki})$

$\Delta Ct \text{ kalibratora} = (Ct \text{ badanego genu dla kalibratora} - Ct \text{ genu referencyjnego dla kalibratora})$

W doświadczeniu 3.3.1 kalibratorem była wartość ekspresji badanego genu w lejku w 10 tyg., natomiast w doświadczeniach 3.3.2 i 3.3.3 w lejku kur z grupy kontrolnej. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SE względnej ekspresji oszacowanej metodą RQ.

3.4.3. Analiza Western Blot

3.4.3.1. Izolacja białka

Fragmenty tkanek homogenizowano w schłodzonym buforze lizującym w proporcji 100 mg tkanki/0,5 ml buforu, a następnie wirowano (10 000 x g, 5 min, 4°C). Supernatanty przenoszono do nowych probówek i używano do dalszych analiz. Stężenie białka w nadsącach oznaczano metodą Bradforda przy użyciu odczynnika Bradford Protein Assay.

3.4.3.2. Elektroforeza SDS-PAGE

Odpowiednią objętość nadsącza, zawierającą 50 μ g białka, mieszano z buforem obciążającym Laemmli Sample Buffer (Tris pH 6,8; 26% glicerol; 2% SDS; 10% β -merkaptolanol; 0,01% błękit bromofenolowy), a następnie denaturowano (10 min, 95°C). Próbki poddawano rozdzielaniu SDS-PAGE (ang. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) w 12% żelach poliakryamidowych (TGX FastCast acrylamide kit) w aparacie Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad, USA) równolegle z markerem białkowym Precision Plus Protein Dual Xtra Standards. Rozdzielone białka przenoszono z żelu na membranę nitrocelulozową metodą transferu pół-suchego za pomocą urządzenia iBlot Gel Transfer System (Invitrogen, USA).

3.4.3.3. *Western blotting*

Metaloproteinazy oraz inhibitory identyfikowano na membranach przy użyciu poliklonalnych króliczych przeciwciał skierowanych przeciwko MMP-2, -7, -9, TIMP-2 i -3. W celu zablokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał do membrany inkubowano ją w 5% roztworze BSA w buforze TBST (Tris–chlorek sodu–Tween 20; pH 7,5) przez 1 h. Następnie prowadzono inkubację z przeciwciałem pierwszorzędowym o stężeniu 1 µg/ml przez 17 h w temperaturze 4°C. Po trzykrotnym płukaniu w TBST membrany umieszczono w roztworze drugorzędowego przeciwciała (0,1 µg/ml) skoniugowanego z peroksydazą chrzanową (ang. *horseradish peroxidase* - HRP) i skierowanego przeciwko przeciwciałom króliczym na 2 h w temperaturze pokojowej. Miejsca wiązania przeciwciał wizualizowano za pomocą metody ECL (ang. *enhanced chemiluminescence*) przy użyciu odczynnika WesternBright Quantum. Detekcji sygnału dokonano aparatem ChemiDoc-It 410 Imaging System (UVP, USA) wykorzystującym oprogramowanie VisionWorks Life Science Software. Kontrolę wewnętrzną przeprowadzono inkubując membrany z mysim przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko β-aktynie (0,4 µg/ml). Wyniki przedstawiono jako iloraz sygnału badanego białka do białka referencyjnego.

3.4.4. **Oznaczanie aktywności MMPs metodą zymografii transferowej**

W celu określenia żelatynolitycznej aktywności w homogenatach jajowodu kury wykonano zymografię transferową wg Pan i wsp. (2011). Odpowiednią objętość nadsącza (przygotowanego tak jak w podrozdziale 3.4.3.1), zawierającą 50 µg białka, mieszano z buforem obciążającym Zymogram Sample Buffer (Tris pH 6,8; 25% glicerol; 4% SDS; 0,01% błękit bromofenolowy) i poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w warunkach denaturujących i nieredukujących w 10% żelach poliakrylamidowych (4°C). Po zakończeniu SDS-PAGE przeprowadzono transfer białek z żelu rozdzielającego na żel kopolimeryzowany z żelatyną (0,5 mg/ml) przy pomocy aparatu Invitrogen Gel Transfer System (Invitrogen, USA). Następnie żel przemywano (3 x 15 min) w buforze zawierającym 2,5% (v/v) Triton X-100 w celu usunięcia SDSu i umieszczano w buforze do inkubacji (50 mM Tris-HCl; 10 mM CaCl₂; 200 mM NaCl; 0,05% NaN₃; pH 7,5) na 17 h w temperaturze 37°C. W kolejnych etapach, żele barwiono 0,5% (v/w) Coomassie Brilliant Blue R-250, odbarwiano w wodzie destylowanej do momentu pojawienia się jasnych prążków

i fotografowano (Nikon, Japonia). Enzymy rozkładając żelatynę znajdującą się w żelu poliakrylamidowym, pozostawiają odbarwiony prążek na tle granatowo wybarwionego żelu, a wielkość uzyskanego prążka jest wprost proporcjonalna do aktywności enzymu. Zmiany aktywności metaloproteinaz analizowano densytometrycznie przy użyciu programu Image J (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Masę molekularną prążków szacowano przy pomocy markera PageRuler Prestained Protein Ladder. Kontrola negatywna polegała na zastosowaniu w buforze do inkubacji 10 mM EDTA jako czynnika chelatującego jony Zn^{2+} i Ca^{2+} i tym samym hamującego aktywność MMPs.

3.4.5. Oznaczanie aktywności MMP-2 i -9 zestawem Biotrak

Analiza oparta jest na zmodyfikowanej pro-urokinazie, w której rozpoznawana przez plazminę sekwencja odpowiadająca za aktywację, została zastąpiona sekwencją rozpoznawaną specyficznym przez MMPs. Chromogeny peptyd będący substratem dla urokinazy jest wykorzystywany do pomiaru jej aktywności. Test przeprowadza się na płytkach opłaszczonych przeciwciałami skierowanymi przeciwko badanej metaloproteinazie, warunkującymi specyficzność oznaczenia.

Zestawy Amersham Biotrak Activity Assay System dla MMP-2 i -9 zawierały wszystkie odczynniki niezbędne do przeprowadzenia analizy. Oznaczenie wykonano według zaleceń producenta. W skrócie, do kolejnych studzienek płytki 96 dołkowej nakładano po 100 μ l standardów MMP-2 o stężeniach 0; 0,19; 0,38; 0,75; 1,5; 3,0 ng/ml lub MMP-9 o stężeniach 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 ng/ml lub homogenatu tkanek przygotowanego jak w punkcie 3.4.3.1 i rozcieńczonego buforem do prób tak, aby nakładana objętość zawierała 200 μ g białka. Po inkubacji (17 h, 4°C) usunięto zawartość studzienek i czterokrotnie przemywano je buforem. Następnie dodawano 50 μ l APMA (0,5 mM) oraz 50 μ l odczynnika do detekcji zawierającego pro-urokinazę i substrat. Po 6 h inkubacji w temperaturze 37°C, dokonano pomiaru OD za pomocą czytnika BioTek ELx808 (Biokom) przy długości fali 405 nm.

3.4.6. Oznaczanie białka metodą Bradford

Procedura oznaczenia białka wykorzystuje zjawisko tworzenia się kompleksu białko-barwnik (Coomassie Brilliant Blue R-250). Kompleks ten powoduje

przesunięcie długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji barwnika z 465 do 595 nm, a wartość absorbancji jest proporcjonalna do stężenia białka.

Do 50 μ l rozcieńczonego homogenatu tkanek przygotowanego jak w punkcie 3.4.3.1 dodawano 750 μ l wody destylowanej oraz 200 μ l odczynnika Bradford Protein Assay. W studzienkach płytek 96 dołkowych umieszczano po 100 μ l mieszaniny i wykonywano pomiar OD za pomocą czytnika BioTek ELx808 (Biokom) przy długości fali 595 nm. Krzywą standardową stanowiły roztwory BSA o stężeniach 0, 10, 20, 50, 100 i 200 μ g/ml.

3.4.7. Immunohistochemiczna lokalizacja MMPs i TIMPs

Fragmety tkanek jajowodu utrwalano przez 48 h w 10% formalinie w 0,1M buforze fosforanowym (pH 7,4). Po wypłukaniu w buforze fosforanowym tkanki odwadniano we wzrastających stężeniach alkoholu etylowego (70% - 80% - 96% - absolutny). Następnie tkanki prześwietlano w ksylenie, zatapiano w paraplaście i krojono na mikrotomie na skrawki o grubości 6 μ m, które naklejano na szkiełka pokryte 3-aminopropylotrietoksyilanem. Preparaty deparafinizowano w ksylenie, uwadniano w malejących stężeniach alkoholu etylowego (absolutny - 96% - 80% - 70% - 50%) i przemywano w wodzie. Następnie skrawki inkubowano 10 min w 0,5% H₂O₂ w metanolu w celu zahamowania aktywności endogennej peroksydazy i po przepłukaniu w wodzie destylowanej inkubowano 20 min w buforze cytrynianowym (pH 6,0) w temperaturze 75°C w celu wzmocnienia antygenowości tkanki. Po przemyciu w buforze TBS (Tris-chlorek sodu; pH 7,4), skrawki inkubowano 10 min z 5% normalną surowicą kozią w buforze TBST (Tris-chlorek sodu-Tween 20; pH 7,4), aby zablokować niespecyficzne wiązanie drugorzędowego przeciwciała. Inkubację skrawków z pierwszorzędowym króliczym przeciwciałem skierowanym przeciwko MMP-2, -MMP-7, MMP-9, TIMP-2 i TIMP-3 (4 μ g/ml) prowadzono przez 17 h w temperaturze 4°C. Kolejno skrawki przemywano kilkakrotnie w buforze TBS i nakładano drugorzędowe przeciwciało biotynyłowane kozie antykrólicze (rozcieńczenie 1:300). Po 60 min skrawki ponownie przemywano w buforze TBST i inkubowano 30 min z kompleksem awidyna-biotyna-peroksydaza (rozcieńczenie 1:100). Reakcję barwną przeprowadzano w buforze TBS, który w 15 ml zawierał 1 tabletkę 3,3'-diaminobenzzydiny (DAB) i 20 μ l 30% H₂O₂. Wykonano kontrole negatywne, które stanowiły skrawki inkubowane z normalną surowicą kozią zamiast przeciwciała pierwszorzędowego. Po odwodnieniu we wzrastających

stężeniach alkoholu etylowego i ksylenie preparaty zamykano w żywicy syntetycznej DPX. Badane tkanki obserwowano pod mikroskopem (Junamed, Zeiss, Niemcy lub Nikon, Japonia) sprzężonym z kamerą analogową. Zdjęcia preparatów wykonywano przy użyciu programu komputerowego do analizy obrazu MultiScanBase v. 14.02 firmy Computer Scanning System, Ltd (Warszawa, Polska).

3.4.8. Barwienie metodą Feulgena

Metoda Feulgena służy do wykrywania kwasów deoksyrybonukleinowych (DNA) i składa się z dwóch etapów. W pierwszym z nich tkankę poddaje się hydrolizie w 1M kwasie solnym (HCl), co prowadzi do pęknięcia pierścienia pentozowego deoksyrybozy i wytworzenia grupy aldehydowej. Etap drugi polega na wykrywaniu grupy aldehydowej odczynnikiem Schiffa (fuksyna zasadowa odbarwiona kwasem siarkowym). W wyniku tej reakcji DNA zawarte w jądrach komórkowych barwi się na kolor purpurowo-czerwony. Hydroliza nie powoduje pęknięcia pierścienia rybozy dzięki czemu metoda Feulgena jest DNA-selektywna.

Skrawki tkanek (6 μm), po odparafinowaniu w ksylenie i uwodnieniu w malejących stężeniach etanolu, traktowano 1M HCl (6 min) w temperaturze 60°C, a następnie opłukiwano zimnym HCl i inkubowano z odczynnikiem Schiffa (30 min). Kolejnym etapem było różnicowanie w siarczynie sodu (Na_2SO_3) 3 x 1 min. Następnie preparaty odwadniano w malejących stężeniach etanolu i ksylenie oraz zamykano w DPX.

3.4.9. Barwienie metodą PAS

Reakcja PAS (Periodic acid-Schiff) jest reakcją histochemiczną wykrywającą wielocukry obojętne zawierające pierścienie heksozowe. Polega na utlenieniu reszt glikolowych poddanych działaniu kwasu nadjodowego oraz barwnej reakcji powstałych grup aldehydowych z odczynnikiem Schiffa. Dodatnią reakcję PAS (zabarwienie w kolorze purpurowo-czerwonym) dają wszystkie struktury komórkowe i tkankowe wykazujące obecność większych ilości wielocukrów (glikokaliks brzeżków szczotczkowych, błony podstawne, wewnątrzkomórkowe złogi glikogenu, glikoproteidowe oraz śluzowe ziarna wydzielnicze).

W celu wykonania barwienia po odparafinowaniu w ksylenie i uwodnieniu w malejących stężeniach etanolu skrawki tkanek (6 μm) inkubowano z 1% kwasem nadjodowym (10 min), a następnie z odczynnikiem Schiffa (15 min). Po zakończeniu

barwienia preparaty odwadniano w malejących stężeniach etanolu oraz ksylenie i zamykano w DPX.

3.5. Analiza statystyczna wyników

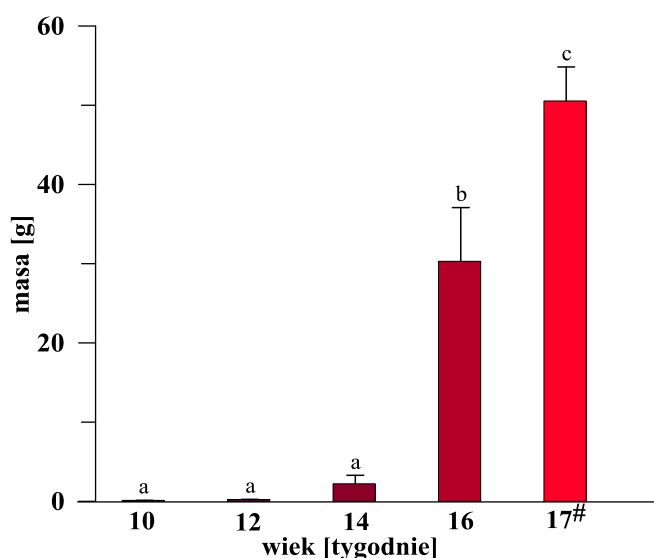
Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej stosując jedno- lub dwuczynnikową analizę wariancji. Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi określano testem Duncana przy użyciu programu SigmaStat 2.03 firmy Systat Software GmbH (Niemcy). W przypadku gdy zmienne losowe nie miały rozkładu normalnego, dane poddano transformacji logarytmicznej, po której przeprowadzono analizę wariancji. Porównując średnie dwóch grup stosowano test t-studenta lub Manna-Whitney'a. Prawdopodobieństwo na poziomie 0,05 uznawane było za istotny wskaźnik różnic statystycznych pomiędzy średnimi. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SE. Wykresy wykonano za pomocą programu Grapher 10.0 firmy Golden Software Inc. (USA).

4. WYNIKI

4.1. Dojrzewanie płciowe

4.1.1. Masa jajowodu kury podczas dojrzewania płciowego

Na rycinie 1 przedstawiono dane dotyczące masy jajowodu kurek podczas dojrzewania płciowego. U 10-tyg. kurek średnia masa jajowodu była równa $0,12 \pm 0,004$ g i stopniowo zwiększała się podczas dojrzewania osiągając wartość $50,54 \pm 4,29$ g w 17. tyg. życia ptaków tj. po rozpoczęciu nieśności (osiągnięcie dojrzałości płciowej). Największy, 12-krotny wzrost masy jajowodu nastąpił pomiędzy 14. a 16. tyg. W 17. tyg. masa jajowodu zwiększyła się jeszcze o 67%.



Ryc. 1. Masa jajowodu kury podczas dojrzewania płciowego. Każda wartość przedstawia średnią \pm SE z 6 ptaków; średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($P < 0,05$). # - osiągnięcie dojrzałości płciowej.

4.1.2. Stężenie progesteronu, testosteronu i estradiolu w osoczu krwi kury podczas dojrzewania płciowego

Na rycinie 2 przedstawiono stężenie hormonów steroidowych w osoczu krwi kurek podczas dojrzewania płciowego. Stężenie P_4 (ng/ml) zmieniało się od wartości $1,12 \pm 0,13$ w 10. tyg. do $1,23 \pm 0,05$ w 15. tyg. życia ptaków, po czym istotnie wzrosło do wartości $2,72 \pm 0,51$ w 16. tyg., tj. tydzień przed osiągnięciem dojrzałości płciowej. Stężenie T (pg/ml) zwiększało się stopniowo podczas dojrzewania od wartości $119,63 \pm 4,87$ w 10. tyg. do $364,17 \pm 63,02$ w 17. tyg. Stężenie E_2 (pg/ml) stopniowo zwiększało się między 10. a 14. tyg. od wartości $36,6 \pm 9,21$ do

116,9 ± 14,58, a następnie istotnie wzrosło w 15. tyg. o 196% (z 116,9 ± 14,58 do 347,1 ± 56,15) i najwyższą wartość osiągnęło u kur niosących (526,8 ± 19,02).

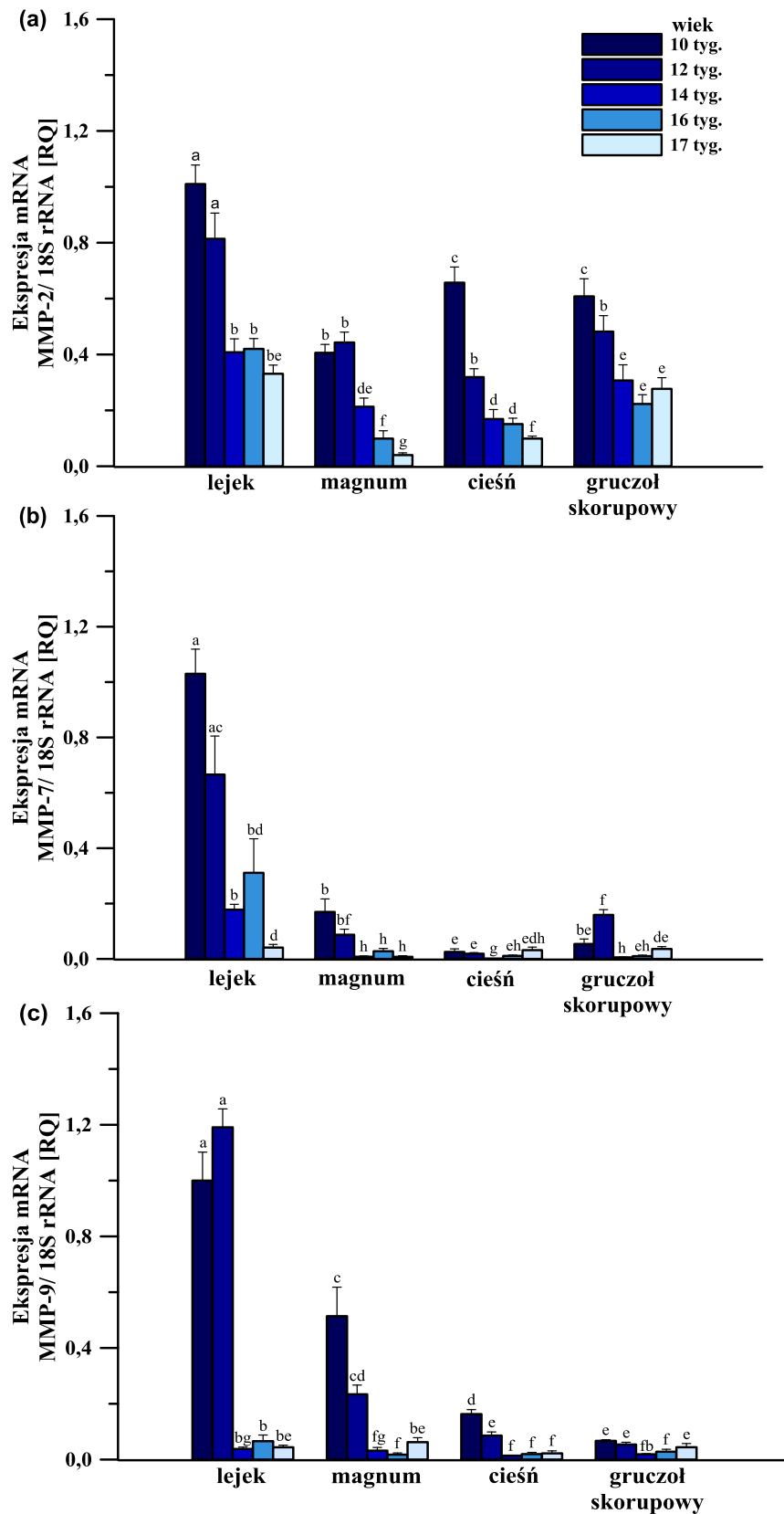
4.1.3. Ekspresja genów MMPs i TIMPs na poziomie mRNA w jajowodzie kury podczas dojrzewania płciowego

Stwierdzono ekspresję wszystkich badanych MMPs i TIMPs w tkankach jajowodu kury podczas dojrzewania płciowego. Poziom ekspresji genów zależał od odcinka jajowodu oraz wieku ptaków. Względna ekspresję (RQ) MMP-2, -7 i -9 oraz TIMP-2 i -3 przedstawiono na rycinie 3 i 4.

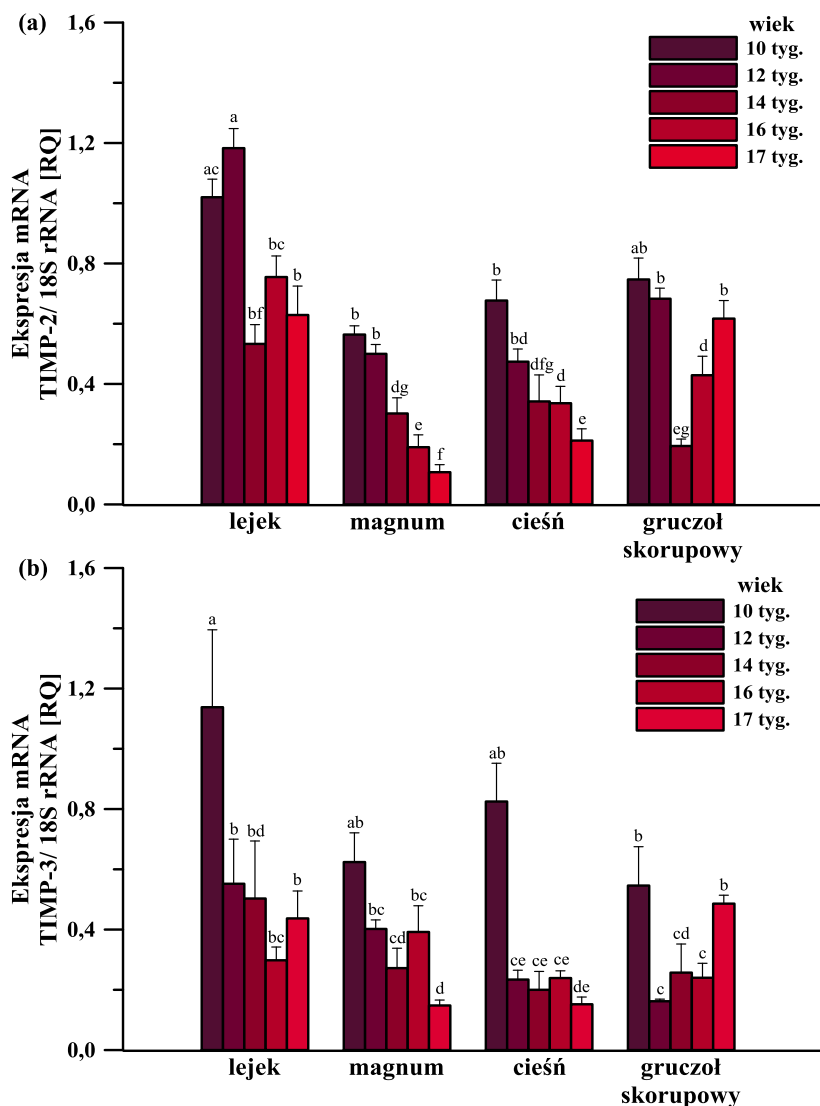
Najwyższą względną ekspresję mRNA MMP-2 obserwowano w lejku, a najniższą w magnum (Ryc. 3a). W okresie dojrzewania płciowego we wszystkich odcinkach jajowodu najwyższą ekspresję mRNA MMP-2 wykazano w 10. tyg. W 12. tyg. odnotowano zmniejszenie ekspresji MMP-2 w cieśni (o 51%) i gruczole skorupowym (o 21%). Z kolei w wieku 14 tyg. ekspresja mRNA MMP-2 obniżyła się istotnie we wszystkich badanych odcinkach jajowodu: lejku, magnum, cieśni i gruczole skorupowym, odpowiednio o 50%, 52%, 47% i 36%. W 16. tyg. poziom ekspresji zmniejszył się w magnum o 54%, a w 17. tyg., tj. u kur niosących w magnum i cieśni, odpowiednio o 60% i 35% (Ryc. 3a).

W jajowodzie rosnących kurek, najwyższy poziom mRNA dla MMP-7 obserwowano w lejku, a najniższy w cieśni (Ryc. 3b). W okresie dojrzewania płciowego najwyższą ekspresję mRNA MMP-7 obserwowano w 10. tyg. w większości odcinków jajowodu. W 12. tyg. ekspresja wzrosła istotnie w gruczole skorupowym (o 194%), podczas gdy w wieku 14 tyg. obniżyła się we wszystkich odcinkach jajowodu: lejku, magnum, cieśni i gruczole skorupowym, odpowiednio o 73%, 91%, 94% i 96% do poziomu graniczącego z czułością metody. Niewielki wzrost ekspresji odnotowano w 16. tyg. życia kurek, natomiast jedynie w cieśni zmiany te były statystycznie istotne (o 900%). Po rozpoczęciu nieśności nie obserwowano istotnych zmian w poziomie mRNA dla MMP-7 w żadnym z badanych odcinków (Ryc. 3b).

Najwyższy poziom ekspresji mRNA dla MMP-9 odnotowano w lejku, natomiast najniższy w gruczole skorupowym (Ryc. 3c). W okresie dojrzewania



Ryc. 3. Ekspresja mRNA MMP-2 (a), MMP-7 (b) i MMP-9 (c) w jajowodzie kury podczas dojrzewania płciowego określona metodą Real-time PCR. Każda wartość przedstawia średnią \pm SE z minimum 6 oznaczeń; średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($P < 0,05$).



Ryc. 4. Ekspresja mRNA dla TIMP-2 (a) i TIMP-3 (b) w jajowodzie kury podczas dojrzewania płciowego określona metodą Real-time PCR. Każda wartość przedstawia średnią \pm SE z minimum 6 oznaczeń; średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($P < 0,05$).

płciowego najwyższą ekspresję mRNA MMP-9 stwierdzono w 10. tyg. w większości odcinków jajowodu. W 12. tyg. ekspresja istotnie obniżyła się w cieśni o 47%. Podobnie jak w przypadku MMP-2 i MMP-7, istotny spadek poziomu mRNA MMP-9 wystąpił między 12 a 14 tyg. (w lejku o 97%, magnum o 86%, cieśni o 84%, a gruczole skorupowym o 65%). W wieku 16 tyg. ekspresja MMP-9 nie zmieniła się, natomiast znaczący jej wzrost stwierdzono w magnum i gruczole skorupowym kur niosących, odpowiednio o 255% i 57% (Ryc. 3c).

Inhibitor TIMP-2 charakteryzował się zbliżonym profilem ekspresji do MMP-2 z najwyższym poziomem mRNA w lejku i najniższym w magnum (Ryc. 4a).

W okresie dojrzewania płciowego najwyższą ekspresję mRNA TIMP-2 wykazano w 10. i 12. tyg. we wszystkich odcinkach jajowodu. Istotny spadek ekspresji obserwowano między 12. a 14. tyg. w lejku (o 55%), magnum (o 40 %) i gruczole skorupowym (o 72%). Poziom mRNA TIMP-2 zmniejszył się w magnum 16-tyg. ptaków o 37%, natomiast w gruczole skorupowym wzrósł o 121%. U niosących kur ekspresja obniżyła się w magnum i cieśni, odpowiednio o 44% i 37%, podczas gdy w gruczole skorupowym zwiększyła się o 47% (Ryc. 4a).

Najwyższy poziom mRNA inhibitora TIMP-3 wykryto w lejku, a najniższy w magnum i cieśni kur niosących. W okresie dojrzewania płciowego najwyższą ekspresję mRNA TIMP-3 wykazano w 10. tyg. we wszystkich odcinkach jajowodu. Obniżenie ekspresji stwierdzono w 12. tyg. w lejku, cieśni i gruczole skorupowym, odpowiednio o 51%, 72% i 70%. Na kolejnych etapach rozwoju ekspresja nie zmieniała się istotnie, aż do momentu rozpoczęcia nieśności, kiedy to zmniejszyła się w magnum o 62% i wzrosła w gruczole skorupowym o 103% (Ryc. 4b).

4.1.4. Ekspresja genów MMPs i TIMPs na poziomie białka w jajowodzie kury podczas dojrzewania płciowego

Za pomocą metody Western blot określono ekspresję białek MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-2 i TIMP-3 w poszczególnych odcinkach jajowodu rosnących kurek (Ryc. 5-9). Wszystkie badane elementy systemu zidentyfikowano w tkankach jajowodu, a ich ilość była zależna od odcinka oraz wieku ptaków.

Na każdym etapie rozwoju w poszczególnych odcinkach jajowodu stwierdzono obecność formy latentnej (72 kDa) oraz aktywnej (66 kDa) MMP-2 (Ryc. 5). Na wykresie przedstawiono względne wartości będące sumą obydwu form. Największą ekspresją białka MMP-2 charakteryzował się lejek i cieśń, a najniższą magnum. U 10-tyg. ptaków stwierdzono umiarkowaną ekspresję MMP-2. Pomiędzy 12. a 14. tyg. życia ptaków wzrost ekspresji białka MMP-2 odnotowano w lejku o 65%, natomiast w 16. tyg. ekspresja wzrosła w magnum oraz cieśni. Odpowiednio, o 115% i 164%. U kur niosących wzrost poziomu białka stwierdzono w gruczole skorupowym (49%). Ponadto, w 16. i 17. tyg., szczególnie w cieśni obserwowano zwiększony udział formy aktywnej MMP-2 w porównaniu z wcześniejszymi stadiami rozwoju (Ryc. 5).

Podczas dojrzewania w jajowodzie stwierdzono, także obecność MMP-7, a przede wszystkim jej aktywnej formy o masie ~20 kDa (Ryc. 6). Odcinkiem, który charakteryzował się największym poziomem białka MMP-7 było magnum, a najniższym lejek i gruczoł skorupowy. W 10. tyg. ekspresja MMP-7 była bardzo niska. 3-krotne zwiększenie ekspresji MMP-7 odnotowano w magnum oraz gruczole skorupowym 14-tyg. ptaków, natomiast największy wzrost ekspresji nastąpił w 16. tyg. w lejku (22-krotny), magnum (33-krotny), cieśni (35-krotny) i gruczole skorupowym (5-krotny). Po rozpoczęciu nieśności nie wykazano istotnych zmian w ekspresji białka MMP-7 (Ryc. 6).

Podczas dojrzewania płciowego w jajowodzie stwierdzono ekspresję MMP-9, którą wykryto głównie w formie aktywnej (~82 kDa) (Ryc. 7). Wysoki poziom ekspresji obserwowano w cieśni, natomiast niski w magnum. U 10-tyg. kurek ekspresja białka MMP-9 była stosunkowo wysoka we wszystkich badanych odcinkach. Istotny spadek poziomu ekspresji MMP-9 wykazano w gruczole skorupowym między 12. a 14. tyg. (o 26%), podczas gdy prawie we wszystkich odcinkach ekspresja obniżyła się w 16. tyg. (lejku – 83%, magnum – 96% i gruczole skorupowym – 92%) (Ryc. 7).

W jajowodzie rosnących kurek określono, także ekspresję białka TIMP-2. Inhibitor był obecny w jajowodzie w stosunkowo niewielkiej ilości i w żadnym z badanych odcinków nie stwierdzono zmian w jego ekspresji w czasie dojrzewania (Ryc. 8).

Białko TIMP-3 wykryto zarówno w formie glikozylowanej jak i nieglikozylowanej (Ryc. 8). W 10. tyg. stwierdzono umiarkowaną ekspresję TIMP-3, która istotnie zwiększyła się w wieku 14 tyg. w magnum (o 156%), natomiast w wieku 16 tyg. w lejku, magnum oraz cieśni, odpowiednio o 66%, 200% i 195%. Po rozpoczęciu nieśności poziom ekspresji TIMP-3 zmniejszył się w lejku o 25% oraz magnum o 16%. U 16- i 17-tyg. ptaków, wykazano zwiększony udział nieglikozylowanej formy TIMP-3, co było szczególnie widoczne w magnum oraz cieśni, które charakteryzowały się największym poziomem ekspresji inhibitora (Ryc. 9).

4.1.5. Histologiczna charakterystyka jajowodu kury podczas dojrzewania płciowego

Parafinowe skrawki poszczególnych odcinków jajowodu kury, poddano procedurze barwienia metodą PAS. Zmiany zachodzące w strukturze ściany jajowodu podczas rozwoju przedstawiono na przykładzie magnum – głównego odcinka białkotwórczego (Ryc. 10a-c). Ze względu na niewielkie różnice w budowie ściany jajowodu kury pomiędzy 10 a 14 tyg., jako reprezentatywne wybrano mikrofotografie z 12 tyg. Ściana magnum niedojrzałych ptaków zbudowana była ze słabo zróżnicowanego nabłonka wyścielającego od strony światła jajowodu, znajdującej się pod nabłonkiem stromy oraz warstwy mięśni gładkich przeplatanych tkanką łączną (Ryc. 10a). U 16-tyg. kurek obserwowano różnicujące się komórki gruczołów tubularnych i nabłonka (Ryc. 10b), a w 17. tyg. rozwinięte były wszystkie struktury charakterystyczne dla ściany dojrzałego narządu (Ryc. 10c). U niedojrzałych, 10-14-tyg. ptaków barwienie PAS pozwoliło na zaobserwowanie tkanki łącznej, w tym także błony podstawnej (Ryc. 10a), natomiast w 16. i 17. tyg. intensywne barwienie występowało w apikalnej części nabłonka oraz w komórkach gruczołów tubularnych, co może świadczyć m.in. o znacznych ilościach proteoglikanów obecnych w materiale syntetyzowanym i wydzielanym przez komórki nabłonka i gruczołów tubularnych (Ryc. 10b i c). Ponadto, obserwowano zróżnicowanie w intensywności zabarwienia tkanki łącznej poszczególnych odcinków jajowodu, co może wskazywać na różnice w jej składzie pomiędzy odcinkami.

4.1.6. Immunohistochemiczna lokalizacja MMPs i TIMPs w jajowodzie kury podczas dojrzewania płciowego

W obecnej pracy wykazano specyficzną immunoreaktywność dla MMP-2, -7 i -9 oraz inhibitorów TIMP-2 i -3 w ścianie wszystkich badanych odcinków jajowodu kury. Lokalizacja MMPs i TIMPs w ścianie jajowodu kurek podczas dojrzewania została przedstawiona na przykładzie magnum na rycinie 10.

U kurek między 10-14 tyg. życia obecność immunopoztywnej reakcji dla MMP-2, MMP-7 oraz TIMP-2 i TIMP-3 stwierdzono w nabłonku oraz stromie magnum, w tym także, w tkance łącznej i mięśniach (Ryc. 10d, g, m, p). Białko MMP-9 zlokalizowano w sąsiadującej z nabłonkiem części stromy, natomiast

w samym nabłonku, tkance łącznej oraz mięśniach enzym ten nie występował (Ryc. 10j). U ptaków w wieku 16 tyg. barwienie o średniej intensywności dla MMP-2, TIMP-2 i TIMP-3 obserwowano przede wszystkim w nabłonku oraz różnicujących się gruczołach tubularnych magnum (Ryc. 10e, n, r). Po rozpoczęciu nieśności występowanie tych elementów systemu MMP ograniczone było już tylko do nabłonka (Ryc. 10f, o, s). Bardzo silna immunopozytywna reakcja dla MMP-7 była obecna w komórkach gruczołów tubularnych, a także w apikalnej części nabłonka, zarówno u 16- jak i 17-tyg. kurek (Ryc. 10h, i). Na tym etapie rozwoju MMP-9 zlokalizowana była wyłącznie w tkance łącznej (Ryc. 10k, l). W lejku, cieśni i gruczole skorupowym również wykazano tkankowo-specyficzną lokalizację MMPs i TIMPs, a intensywność reakcji immunopozytywnej na poszczególnych etapach rozwoju jajowodu układała się podobnie jak w magnum (zdjęcia nie prezentowane).

4.1.7. Żelatynolityczna aktywność MMPs w jajowodzie kury podczas dojrzewania płciowego

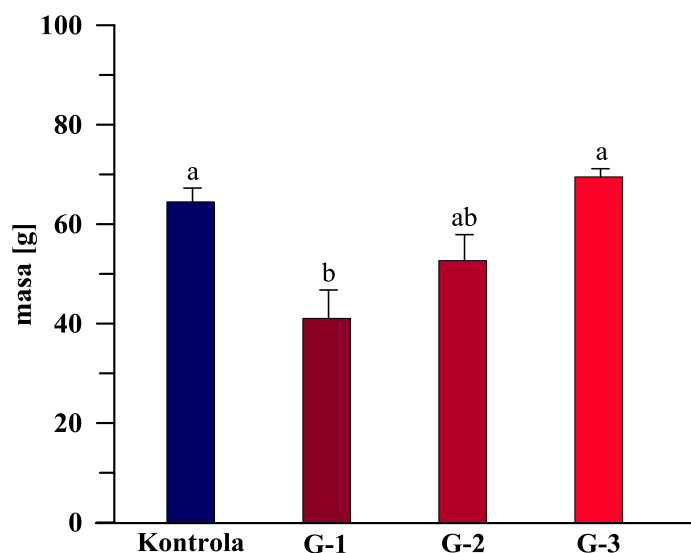
Zarówno u niedojrzałych jak i niosących ptaków stwierdzono obecność latentnej oraz aktywnej formy MMP-2 (Ryc. 11). Największą aktywność żelatynazy A odnotowano w lejku, podczas gdy najniższą aktywność obserwowano w magnum kur niosących. W jajowodzie 17-tyg. ptaków aktywność MMP-2 była istotnie niższa we wszystkich badanych odcinkach jajowodu: lejku (o 22%), magnum (o 77%), cieśni (o 46%) i gruczole skorupowym (o 63%). Zymografia wykazała także obecność latentnej (~94 kDa) i aktywnej (~88 kDa) formy MMP-9, w jajowodzie 10-tyg. kurek, natomiast u kur niosących aktywność żelatynazy B była poniżej czułości metody. Ponadto, w 10. tyg. zaobserwowano obecność dwóch prążków o masie około 50-60 kDa, co sugerowałoby latentną i aktywną formę MMP-1 lub MMP-13 (Ryc. 11).

4.2. Przerwa w nieśności wywołana głodzeniem

4.2.1. Masa jajowodu kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodzeniem

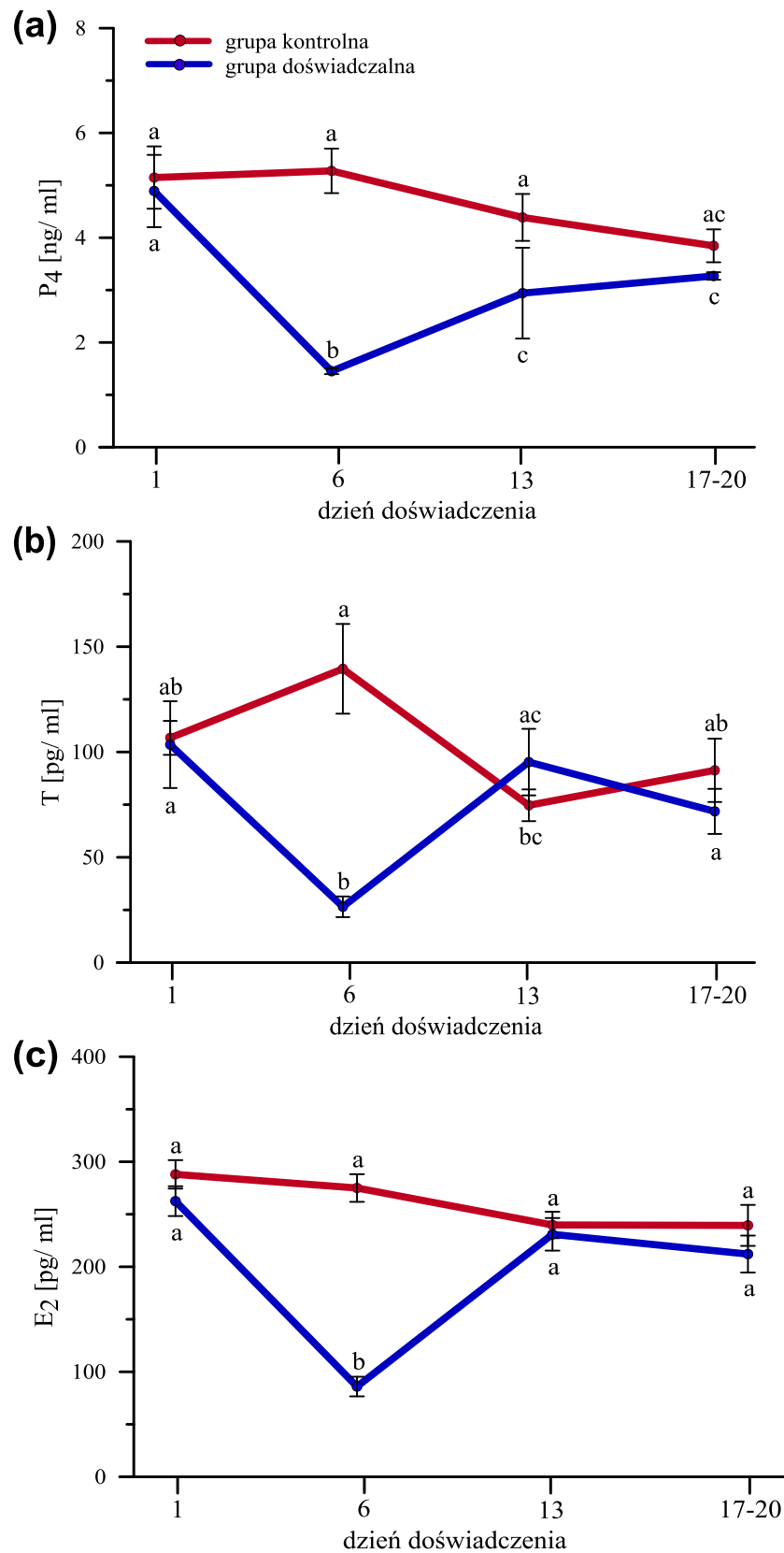
U kur godzonych przerwa w nieśności wystąpiła między 6. a 13. dniem eksperymentu, natomiast między 17. a 20. dniem obserwowano powrót do nieśności.

Dane dotyczące masy jajowodu kur podczas przerwy w nieśności wywołanej głodzeniem przedstawia rycina 12. Ze względu na brak różnic pomiędzy grupami kontrolnymi z poszczególnych etapów doświadczenia, tj. 6., 13., i 17. dzień, wyniki połączono w jedną grupę kontrolną. Masa jajowodu ptaków kontrolnych (niosących) wyniosła $64,98 \pm 1,91$ g. U kur poddanych głodzeniu dekapitowanych w 6. dniu doświadczenia (grupa G-1) masa jajowodu była istotnie niższa o 37%, natomiast u ptaków dekapitowanych w 13. (grupa G-2) i 17. lub 20. (grupa G-3) dniu nie różniła się istotnie od wartości w grupie kontrolnej. Utrata masy jajowodu, obserwowana w 6. dniu doświadczenia (grupa G-1), świadczy o jego regresji, natomiast częściowy wzrost masy jajowodu między 6. a 13. dniem eksperymentu (grupa G-2), wskazuje o zachodzącym procesie odbudowy. W 17.-20. dniu doświadczenia masa jajowodu osiągnęła wartości podobne do tych w grupie kontrolnej, co wskazuje na zakończony proces odbudowy jajowodu.



Ryc. 12. Masa jajowodu kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodzeniem.

Każda wartość przedstawia średnią \pm SE z 6 ptaków; średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($P < 0,05$). Kontrola – grupa kontrolna, G-1, G-2, G-3 – kury dekapitowane, odpowiednio w 6., 13., 17-20. dniu doświadczenia.



Ryc. 13. Stężenie progesteronu (P₄) (a), testosteronu (T) (b) i estradiolu (E₂) (c) w osoczu krwi kur podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem. Każda wartość przedstawia średnią ± SE z 6 ptaków; średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie względem grupy kontrolnej (P<0,05).

4.2.2. Stężenie progesteronu, testosteronu i estradiolu w osoczu krwi kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem

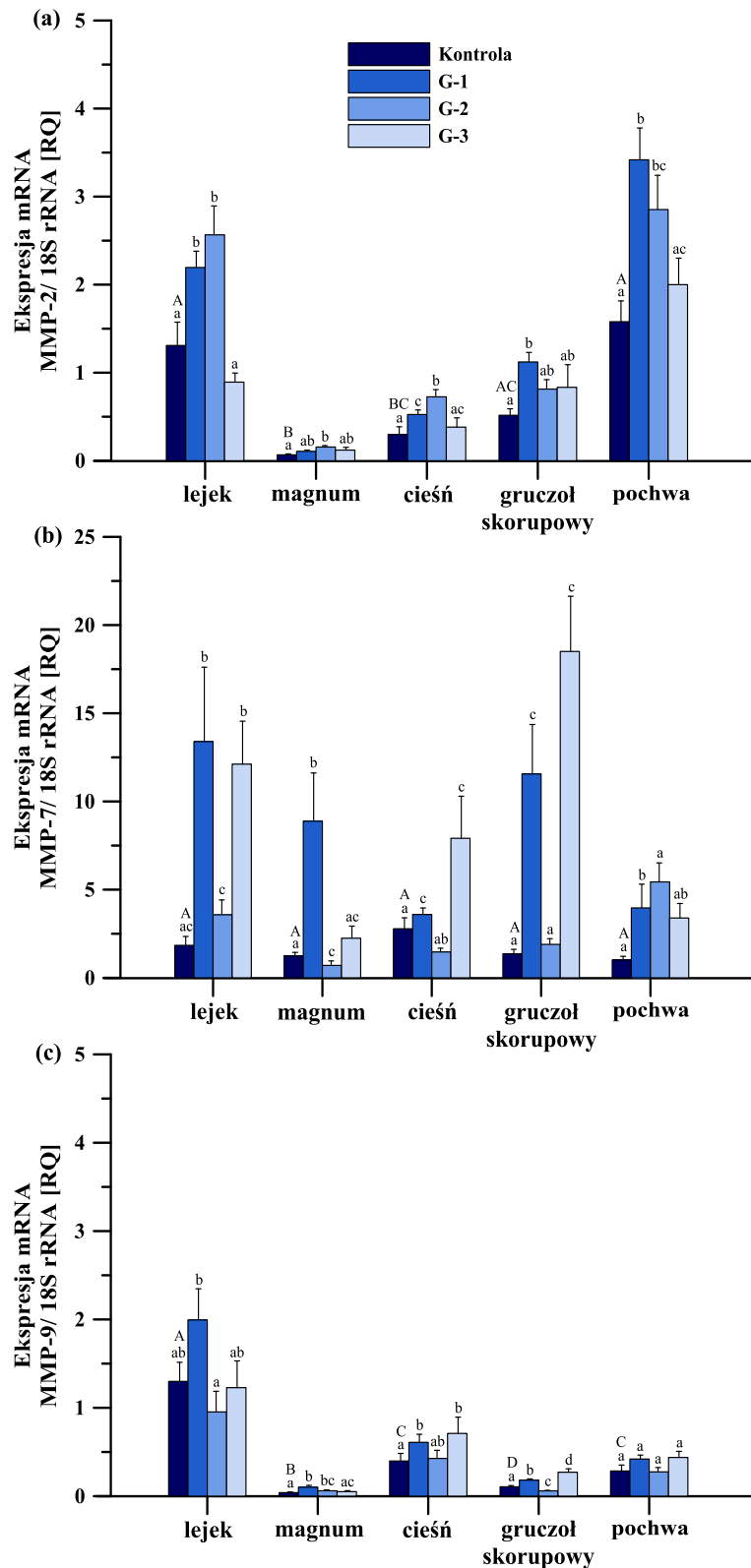
Stężenie hormonów steroidowych w osoczu krwi kur kontrolnych i poddanych wymuszonej przerwie w nieśności przedstawia rycina 13. U kur kontrolnych stężenie P_4 (ng/ml) wahało się w granicach od $3,85 \pm 0,31$ do $5,15 \pm 0,60$, T (pg/ml) od $91,33 \pm 15,04$ do $106,67 \pm 8,06$, a E_2 (pg/ml) od $239 \pm 19,51$ do $288,02 \pm 13,56$. W grupie poddanej głodzeniu obserwowano istotne zmniejszenie stężenia P_4 w 6. i 13. dniu eksperymentu, odpowiednio o 72% i 33% oraz zmniejszenie stężenia T i E_2 w 6. dniu doświadczenia, odpowiednio o 81% i 69%.

4.2.3. Ekspresja genów MMPs i TIMPs na poziomie mRNA w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem

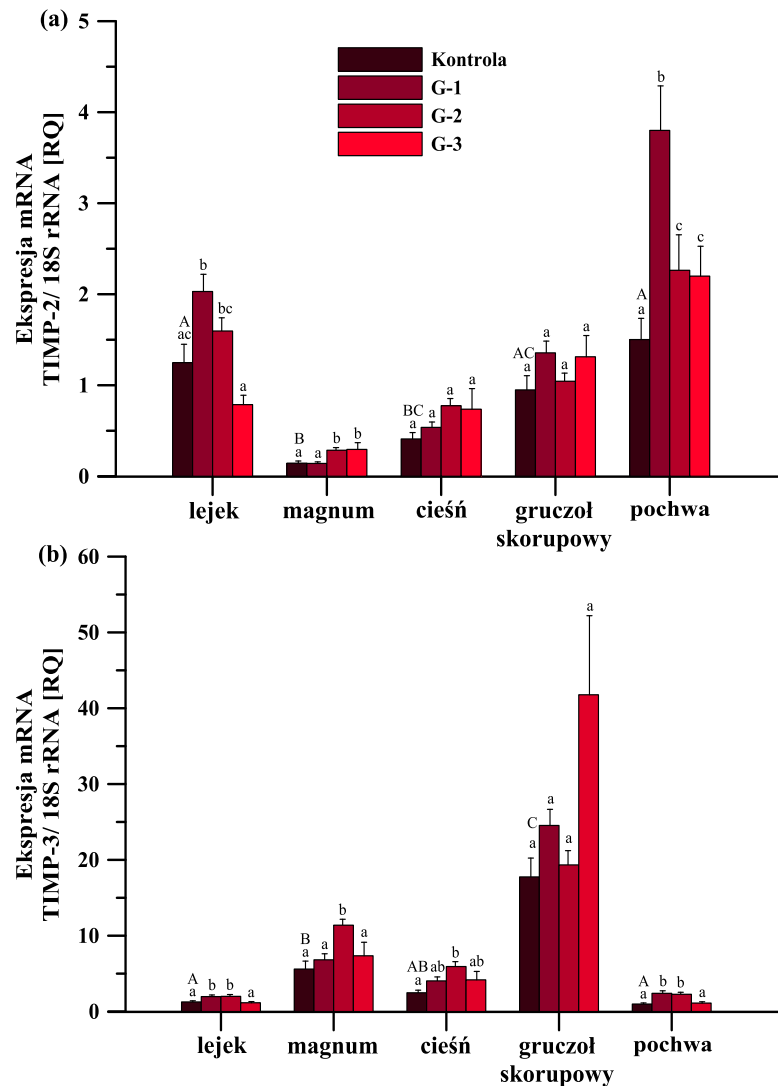
Ekspresja mRNA MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-2 i TIMP-3 została oznaczona we wszystkich odcinkach jajowodu kur kontrolnych i podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem (Ryc. 14 i 15).

Najwyższą względną ekspresją mRNA MMP-2 charakteryzował się lejek oraz pochwa, natomiast najniższą magnum (Ryc. 14a). W 6. dniu eksperymentu (G-1) obserwowano znaczny wzrost ekspresji mRNA MMP-2 w lejku, cieśni, gruczole skorupowym oraz pochwie, odpowiednio o 68%, 76%, 117% i 116%. W porównaniu do kontroli, u ptaków z grupy G-2 zwiększoną ekspresję odnotowano w lejku, magnum, cieśni i pochwie, odpowiednio o 96%, 133%, 143% i 81%. Nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie mRNA MMP-2 w jajowodzie pomiędzy grupą eksperymentalną G-3 a grupą kontrolną (Ryc. 14a).

Najwyższy poziom mRNA MMP-7 w grupie kontrolnej, obserwowano w cieśni, natomiast najniższy w pochwie (Ryc. 14b). U kur z grupy G-1 stwierdzono zwiększoną ekspresję mRNA MMP-7 we wszystkich odcinkach jajowodu; lejku - 628%, magnum - 611%, cieśni - 29%, gruczole skorupowym - 749%, pochwie - 292%. W grupie G-2 ekspresja obniżyła się jedynie w magnum o 44%, a w gruczole skorupowym wzrosła o 439%. U ptaków z grupy G-3 zwiększony poziom mRNA MMP-7 obserwowano w lejku, cieśni i gruczole skorupowym, odpowiednio o 558%, 184% i 1260% (Ryc. 14b).



Ryc. 14. Ekspresja mRNA MMP-2 (a), MMP-7 (b) i MMP-9 (c) w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem określona metodą Real-time PCR. Każda wartość przedstawia średnią \pm SE z 6 oznaczeń; A-D – średnie dla odcinków w grupie kontrolnej oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($P < 0,05$); a-d – średnie oznaczone różnymi literami w obrębie odcinka różnią się istotnie ($P < 0,05$).



Ryc. 15. Ekspresja mRNA TIMP-2 (a) i TIMP-3 (b) w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodzeniem określona metodą Real-time PCR. Każda wartość przedstawia średnią \pm SE z 6 oznaczeń; A-C – średnie dla odcinków w grupie kontrolnej oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($P < 0,05$); a-c – średnie oznaczone różnymi literami w obrębie odcinka różnią się istotnie ($P < 0,05$). Kontrola – grupa kontrolna, G-1, G-2, G-3 – kury dekapitowane, odpowiednio w 6., 13., 17-20. dniu doświadczenia.

Najwyższą względną ekspresją mRNA MMP-9 charakteryzował się lejek, natomiast najniższą magnum (Ryc. 14c). W porównaniu z kontrolą, w grupie G-1 obserwowano istotny wzrost ekspresji mRNA tej metaloproteiny w magnum, cieśni oraz gruczole skorupowym - odpowiednio o 152%, 53% i 71%. W grupie G-2 ekspresja zwiększyła się w magnum o 44%, a obniżyła w gruczole skorupowym o 43%. Zwiększony poziom mRNA MMP-9 u ptaków z grupy G-3 stwierdzono w cieśni i gruczole skorupowym, odpowiednio o 78% i 156% (Ryc. 14c).

Najwyższy poziom mRNA inhibitora TIMP-2 odnotowano w lejku oraz pochwie, a najniższy w magnum (Ryc. 15a). W porównaniu do kontroli wyższą ekspresję stwierdzono w lejku i pochwie w grupie G-1, odpowiednio o 63% i 153%. Zwiększony poziom mRNA TIMP-2 obserwowano również w magnum i pochwie kur z grupy G-2, odpowiednio o 99% i 57%, jak i G-3, odpowiednio o 105% i 46% (Ryc. 15a).

Największą ekspresją mRNA inhibitora TIMP-3 stwierdzono w gruczole skorupowym, a najniższą w pochwie (Ryc. 15b). W grupie G-1 wzrost ekspresji stwierdzono w lejku o 56% oraz pochwie o 143%. U ptaków w grupie G-2 zwiększoną ekspresję wykazano w większości odcinków jajowodu (lejku - 58%, magnum - 103%, cieśni - 140%, pochwie - 131%). Nie stwierdzono, natomiast istotnych różnic pomiędzy grupą G-3 a kontrolą (Ryc. 15b).

4.2.4. Ekspresja genów MMPs i TIMPs na poziomie białka w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem

Metodą Western blot oznaczono ekspresję białek MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-2 i TIMP-3 w poszczególnych odcinkach jajowodu kur podczas jego regresji i odnowy (Ryc. 16-20).

Zarówno w grupie kontrolnej jak i w każdej z grup doświadczalnych stwierdzono obecność formy latentnej (72 kDa) oraz aktywnej (66 kDa) MMP-2 (Ryc. 16a). Na wykresie przedstawiono względne wartości będące sumą obydwu form. Największą ekspresję białka MMP-2 obserwowano w cieśni, natomiast najniższą w magnum. Nie wykazano istotnych różnic w ekspresji MMP-2, pomiędzy grupą kontrolną, a grupami eksperymentalnymi (Ryc. 16b).

Podczas przerwy w nieśności w jajowodzie stwierdzono obecność przede wszystkim aktywnej formy MMP-7 (~20 kDa), a także latentnej (32 kDa) (Ryc. 17a). Odcinkiem który charakteryzował się największą ekspresją białka MMP-7 było magnum. W żadnym z badanych odcinków nie stwierdzono różnic pomiędzy kontrolą a grupami G-1, G-2 i G-3 (Ryc. 17b).

MMP-9 wykryto w jajowodzie w formie latentnej (~92 kDa) oraz aktywnej (~82 kDa). Najwyższy poziom MMP-9 odnotowano w cieśni, a najniższy w magnum (Ryc. 18a). Istotnie większą jej względną ekspresję stwierdzono w grupie G-1

w cieśni (81%). W grupie G-2 poziom ekspresji zwiększył się w lejku i pochwie, odpowiednio o 55% i 56%, a zmniejszył w cieśni o 25%. W lejku, magnum i pochwie ptaków z grupy G-3 ekspresja obniżyła się, odpowiednio o 35%, 44% i 21%, natomiast w cieśni zwiększyła się o 45% (Ryc. 18b).

W przypadku inhibitora TIMP-2 nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji pomiędzy odcinkami, ani grupami eksperymentalnymi w porównaniu z grupą kontrolną (Ryc. 19).

Inhibitor TIMP-3 wykryto głównie w formie nieglikozylowanej, a jego ekspresja była najwyższa w magnum. Istotnie mniejszy poziom transkryptu dla TIMP-3 odnotowano w gruczole skorupowym w grupie G-2 i G-3, odpowiednio o 62% i 60% w stosunku do kontroli. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji białka TIMP-3 w pozostałych odcinkach jajowodu (Ryc. 20).

4.2.5. Histologiczna charakterystyka jajowodu kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem

Barwienie metodą PAS skrawków ściany poszczególnych odcinków jajowodu kury przedstawiono na rycinie 21. Błonę śluzową jajowodu wyścielał nabłonek urzęsiony pseudowielorzędowy płaski. W blaszce właściwej błony śluzowej magnum, cieśni oraz gruczołu skorupowego kur kontrolnych (niosących) można było zaobserwować dobrze rozwinięte gruczoły tubularne (Ryc. 21e, i, m). U kur poddanych wymuszonej przerwie w nieśności (G-1) nabłonek wyścielający jajowód był znacznie cieńszy, a gruczoły tubularne uległy częściowej involucji (Ryc. 21f, j, n). W grupie G-2 gruczoły w pewnym stopniu odbudowały się (Ryc. 21g, k, o), natomiast w grupie G-3, zarówno nabłonek jak i gruczoły tubularne zostały w znacznym stopniu zregenerowane, przypominając struktury obserwowane w jajowodzie ptaków kontrolnych (Ryc. 21h, l, p).

4.2.6. Immunohistochemiczna lokalizacja MMPs i TIMPs w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem

Immunopozytywną reakcję dla MMP-2 obserwowano w nabłonku i stromie lejka oraz pochwy (Ryc. 22a-d, r-u), a także w nabłonku i gruczołach tubularnych magnum, cieśni i gruczołu skorupowego (Ryc. 22e-p). Intensywność reakcji pomiędzy odcinkami układała się następująco: cieśń > lejek > gruczoł skorupowy >

pochwa > magnum. Intensywność barwienia nie różniła się w znacznym stopniu pomiędzy grupami.

Reakcję immunopozytywną dla MMP-7 obserwowano w nabłonku lejka oraz pochwy (Ryc. 23a-d, r-u). MMP-7 zlokalizowana była również w nabłonku i gruczołach tubularnych magnum, cieśni oraz gruczołu skorupowego (Ryc. 23e-p). Intensywność reakcji pomiędzy odcinkami układała się następująco: magnum > gruczoł skorupowy > cieśń > pochwa > lejek. Większą intensywność barwienia obserwowano w gruczole skorupowym w grupie G-1 i G-2 niż w grupie kontrolnej (Ryc. 23m-o). MMP-9 zlokalizowano immunohistochemicznie w tkance łącznej wszystkich odcinków jajowodu (24a-u), a także w gruczołach tubularnych cieśni (Ryc. 24i-l). Intensywność reakcji pomiędzy odcinkami układała się następująco: cieśń > lejek > gruczoł skorupowy > pochwa > magnum. Większą intensywność barwienia obserwowano w magnum oraz cieśni w grupie G-1 niż w grupie kontrolnej (Ryc. 24e, f, i, j).

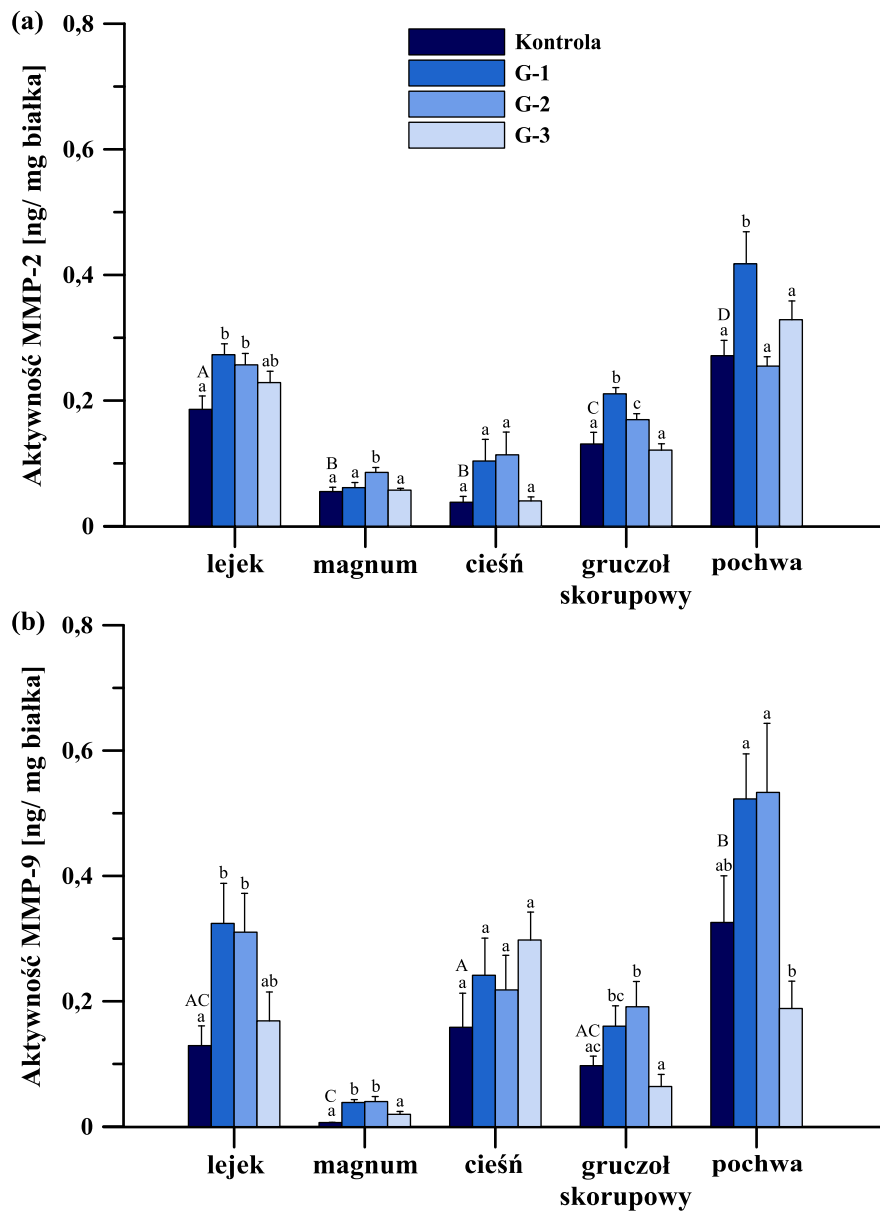
Immunopozytywną reakcję dla TIMP-2 obserwowano w nabłonku pochwy (Ryc. 25r-u) oraz gruczołach tubularnych cieśni i gruczołu skorupowego (Ryc. 25i-p). Intensywność reakcji pomiędzy odcinkami układała się następująco: gruczoł skorupowy > cieśń > pochwa > lejek > magnum. Większą intensywność barwienia obserwowano w magnum i cieśni w grupie G-1 niż w grupie kontrolnej (Ryc. 25e, f, i, j).

Słabą immunopozytywną reakcję dla TIMP-3 obserwowano w nabłonku pochwy i magnum (Ryc. 26e-h, r-u), a także w gruczołach tubularnych cieśni oraz gruczołu skorupowego (Ryc. 26i-p). Intensywność reakcji pomiędzy odcinkami układała się następująco: gruczoł skorupowy > magnum > cieśń = pochwa = lejek. Większą intensywność barwienia obserwowano w pochwie w grupie G-1 (Ryc. 26r i s) oraz cieśni w grupie G-1 i G-2 (Ryc. 26k i l), niż w grupie kontrolnej.

4.2.7. Aktywność MMP-2 i -9 w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem

W grupie kontrolnej największą aktywność MMP-2 (ng/mg białka) wykryto w pochwie, a najniższą w magnum. W grupie G-1 stwierdzono istotnie większą aktywność MMP-2 w lejku, gruczole skorupowym oraz pochwie, odpowiednio o 47%, 61% i 54%. W grupie G-2, także obserwowano zwiększoną aktywność MMP-2 w 3 odcinkach jajowodu tj. w lejku o 38%, magnum o 56% i gruczole skorupowym o 30%. Nie stwierdzono, natomiast istotnych różnic w aktywności MMP-2 u ptaków z grupy G-3 w porównaniu z kontrolą (Ryc. 27a).

Profil aktywności MMP-9 (ng/mg białka) charakteryzował się wysokimi wartościami dla pochwy, a niskimi dla magnum. W grupie G-1 obserwowano istotnie większą aktywność MMP-9 w lejku o 151% i magnum o 457%. W grupie G-2 istotny wzrost aktywności MMP-9 obserwowano w lejku, magnum i gruczole skorupowym, odpowiednio o 140%, 471% i 97%. W grupie G-3 nie stwierdzono zmian w aktywności MMP-9 względem grupy kontrolnej (Ryc. 27b).

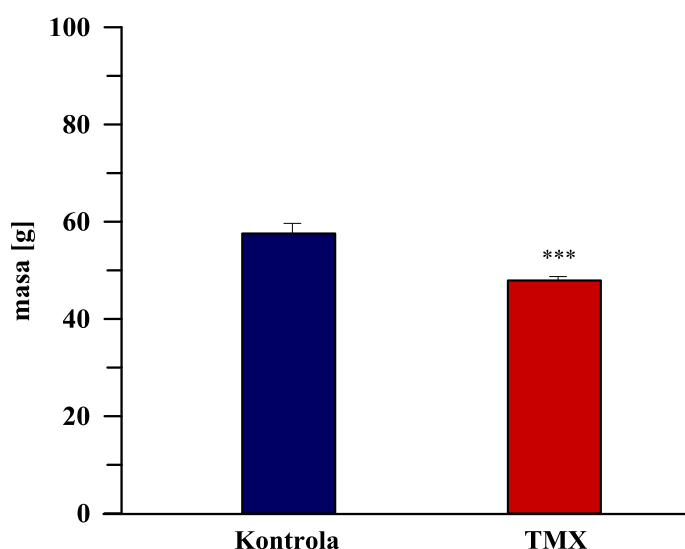


Ryc. 27. Aktywność MMP-2 (a) i MMP-9 (b) w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem. Każda wartość przedstawia średnią \pm SE z minimum 4 oznaczeń; A-D – średnie dla odcinków w grupie kontrolnej oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($P < 0,05$); a-c - średnie oznaczone różnymi literami w obrębie odcinka różnią się istotnie ($P < 0,05$).

4.3. Przerwa w nieśności wywołana podawaniem tamoksyfenu

4.3.1. Masa jajowodu kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu

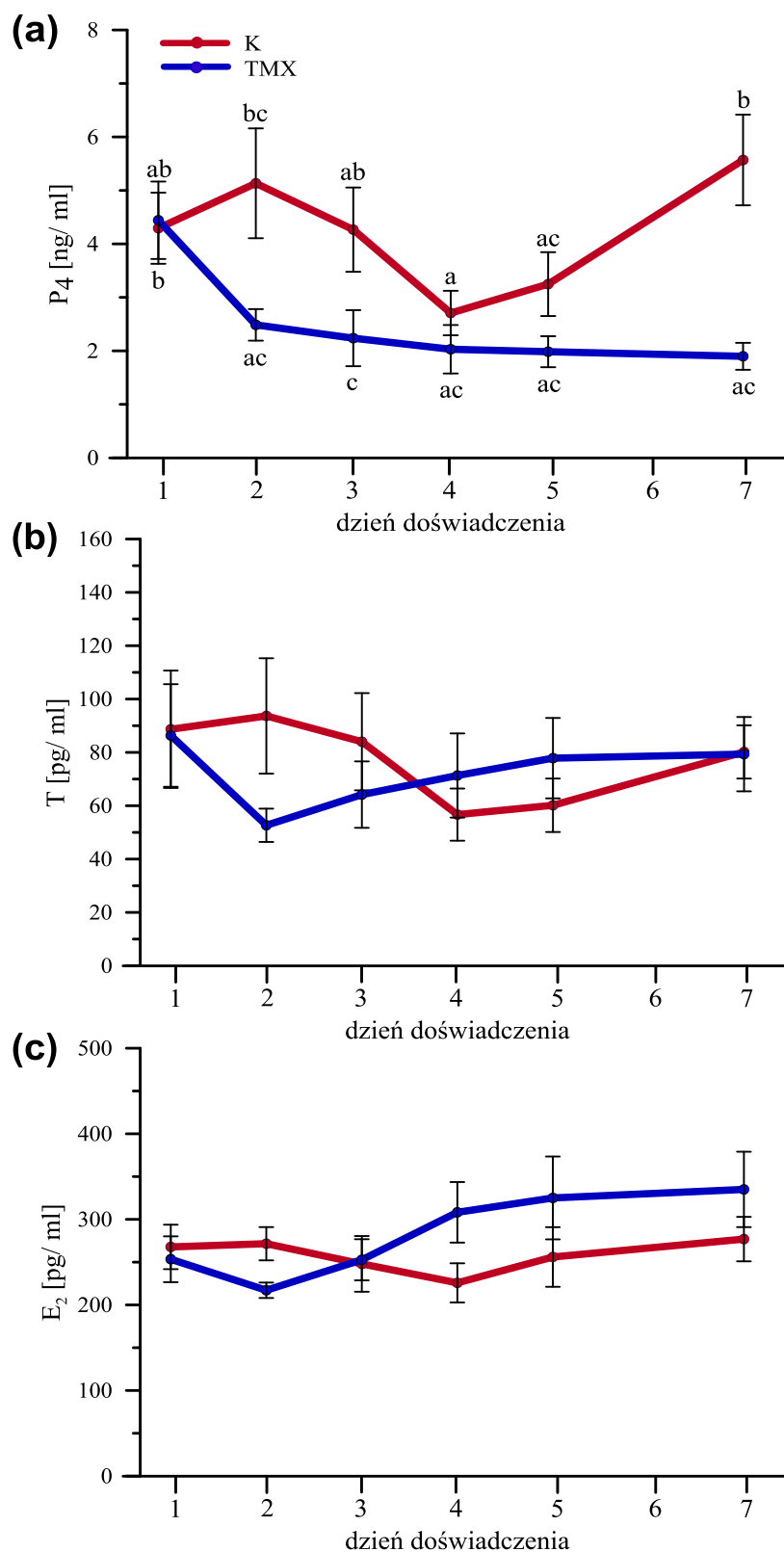
Kury otrzymujące tamoksyfen przerwały nieśność w 6. dniu eksperymentu. Dane dotyczące masy jajowodu kur z grupy kontrolnej i traktowanej tamoksyfenem przedstawiono na rycinie 28. W grupie kontrolnej masa jajowodu wynosiła $57,58 \pm 2,08$ g. Podawanie tamoksyfenu spowodowało istotnie zmniejszenie masy jajowodu o 17% względem kontroli ($47,92 \pm 0,80$ g).



Ryc. 28. Masa jajowodu kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu. Wartości przedstawiają średnią \pm SE z 6 ptaków; *** $P < 0,001$ – w porównaniu z grupą kontrolną. Kontrola – grupa kontrolna, TMX– grupa otrzymująca tamoksyfen.

4.3.2. Stężenie progesteronu, testosteronu i estradiolu w osoczu krwi kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu

Stężenie hormonów steroidowych w osoczu krwi kurek podczas przerwy w nieśności wywołanej iniekcjami tamoksyfenu przedstawiono na rycinie 29. Podawanie tamoksyfenu spowodowało istotne zmniejszenie stężenia P_4 (ng/ml) w osoczu krwi ptaków o 66% w 7. dniu eksperymentu. Nie wpłynęło natomiast na stężenie T (pg/ml) i E_2 (pg/ml).



Ryc. 29. Stężenie progesteronu (P₄) (a), testosteronu (T) (b) i estradiolu (E₂) (c) w osoczu krwi kur podczas przerwy w nieśności wywołanej tamoksyfenem. Każda wartość przedstawia średnią ± SE z 6 ptaków; średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie (P<0,05). K – grupa kontrolna, TMX– grupa otrzymująca tamoksyfen.

4.3.3. Ekspresja genów MMPs i TIMPs na poziomie mRNA w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu

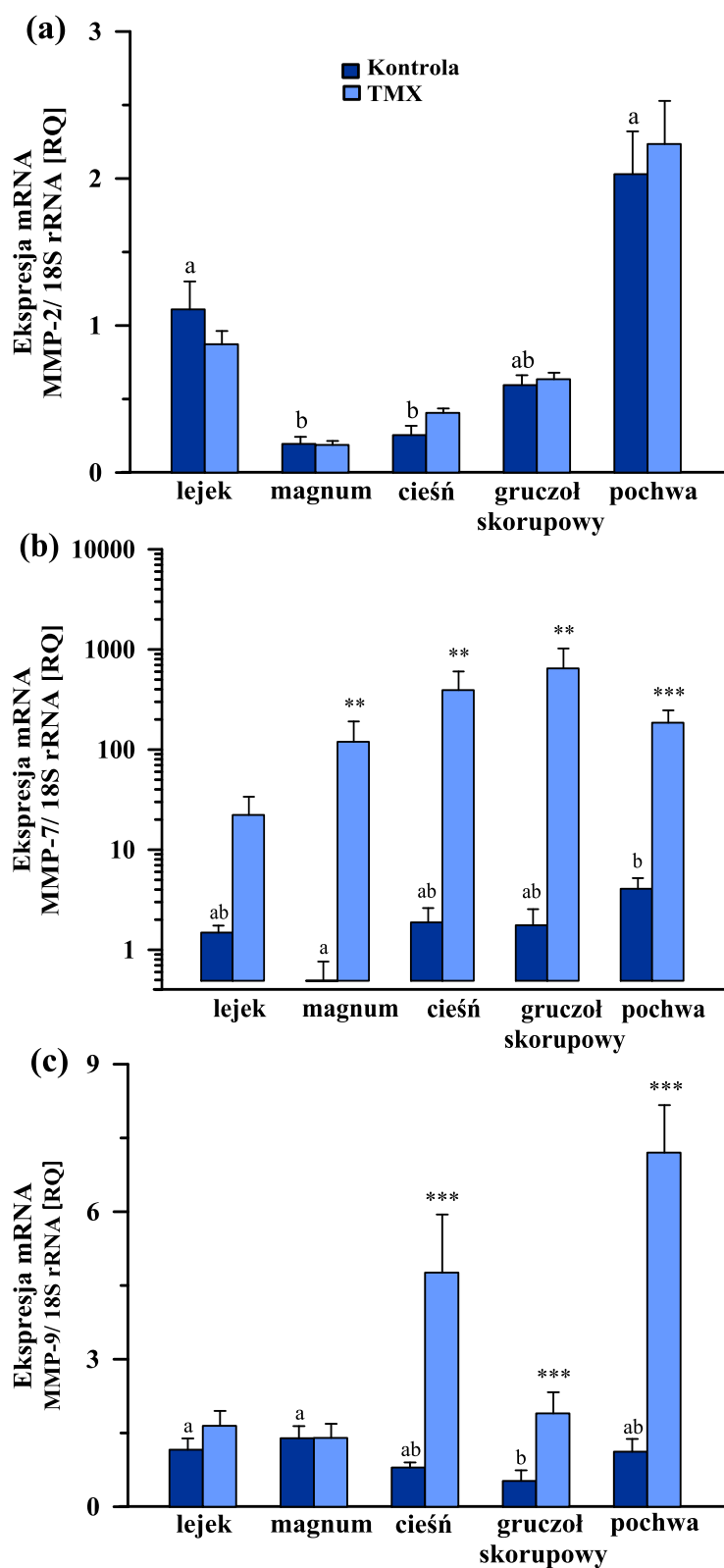
Wykazano ekspresję mRNA MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-2 i TIMP-3 we wszystkich odcinkach jajowodu kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu (Ryc. 30 i 31). Tamoksyfen nie wpłynął istotnie na ekspresję mRNA MMP-2 w żadnym z badanych odcinków jajowodu (Ryc. 30a). Zwiększył natomiast ekspresję mRNA MMP-7 w magnum 243-krotnie, cieśni 208-krotnie, gruczole skorupowym 367-krotnie i pochwie 45-krotnie (Ryc. 30b). Podawanie tamoksyfenu zwiększyło również ekspresję mRNA MMP-9 w cieśni, gruczole skorupowym oraz pochwie, odpowiednio 5-krotnie, 2,6-krotnie i 5,4-krotnie. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji mRNA TIMP-2 i TIMP-3 pomiędzy grupą kontrolną a doświadczalną.

4.3.4. Ekspresja genów MMPs i TIMPs na poziomie białka w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu

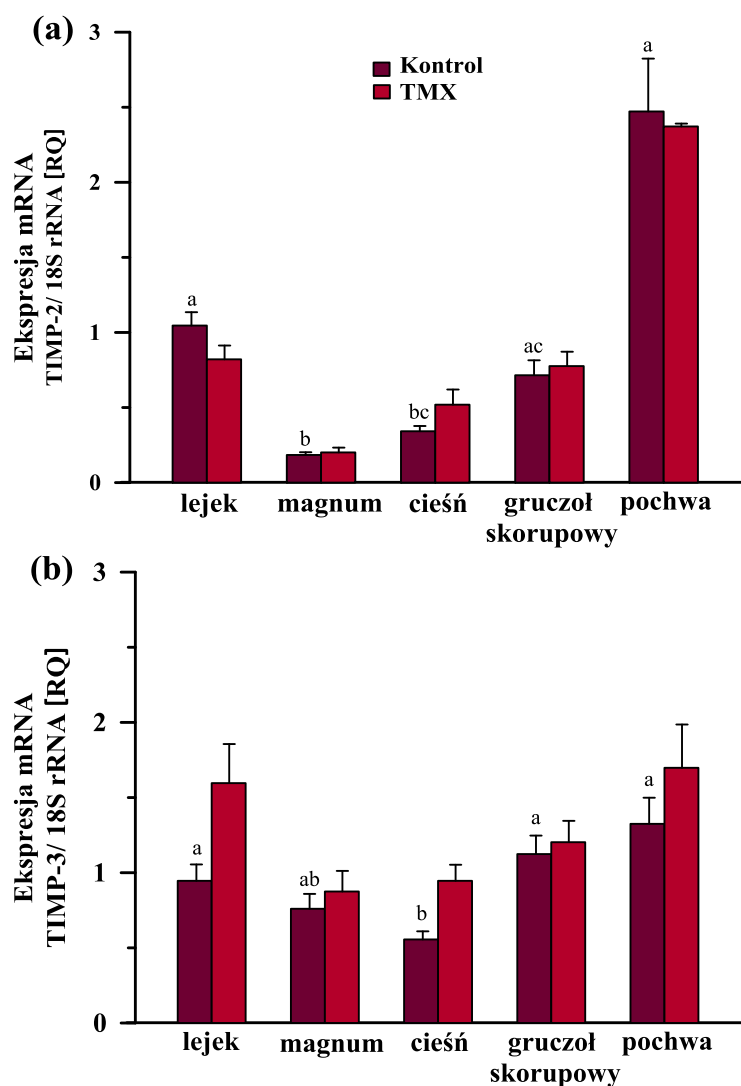
Ekspresję elementów systemu MMP na poziomie białka przedstawiono na rycinach 32-36. W grupie traktowanej tamoksyfenem stwierdzono istotny wzrost ekspresji MMP-2 w lejku, gruczole skorupowym oraz pochwie, odpowiednio o 37%, 43% i 34% (Ryc. 32b). Zwiększoną ekspresję białka MMP-7 odnotowano z kolei w lejku (114%) (Ryc. 33). W żadnym z badanych odcinków nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji MMP-9 (Ryc. 34), TIMP-2 (Ryc. 35) oraz TIMP-3 (Ryc. 36) pomiędzy grupą kontrolną, a doświadczalną.

4.3.5. Histologiczna charakterystyka jajowodu kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu

Barwienie skrawków tkanek jajowodu metodą Feulgena pozwoliło na obserwację jąder komórkowych, które w tej metodzie barwią się na kolor purpurowo-czerwony. W ścianie jajowodu, głównie magnum, ptaków traktowanych tamoksyfenem stwierdzono zmniejszoną liczbę komórek tworzących gruczoły tubularne, co świadczy o ich regresji. Wyraźne zmiany odnotowano również w grubości nabłonka, który w grupie eksperymentalnej był znacznie cieńszy w porównaniu z grupą kontrolną. Zmianom w liczbie i wyglądzie komórek towarzyszyły zmiany w ich organizacji (Ryc. 37).



Ryc. 30. Ekspresja mRNA MMP-2 (a), MMP-7 (b) i MMP-9 (c) w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenem określona metodą Real-time PCR. Każda wartość przedstawia średnią \pm SE z 6 oznaczeń; a, b – średnie dla odcinków w grupie kontrolnej oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($P < 0,05$); ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ – w porównaniu z grupą kontrolną. Kontrola – grupa kontrolna, TMX– grupa otrzymująca tamoksyfen.



Ryc. 31. Ekspresja mRNA TIMP-2 (a) i TIMP-3 (b) w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu określona metodą Real-time PCR. Każda wartość przedstawia średnią \pm SE z 6 oznaczeń; a-c – średnie dla odcinków w grupie kontrolnej oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($P < 0,05$). Kontrola – grupa kontrolna, TMX– grupa otrzymująca tamoksyfen.

W wyniku reakcji PAS wyraźne barwienie obserwowano w nabłonku cieśni i pochwy (Ryc. 38e, f, i, j), a także w gruczołach tubularnych magnum i cieśni (Ryc. 38c-f). Intensywne barwienie występowało również w stromie lejka oraz tkance łącznej gruczołu skorupowego (Ryc. 38a, b, g, h). W grupie doświadczalnej obserwowano inwolucję gruczołów tubularnych magnum oraz cieśni (Ryc. 38c-f).

4.3.6. Immunohistochemiczna lokalizacja MMPs i TIMPs jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu

Immunopozytywną reakcję dla MMP-2 obserwowano głównie w nabłonku wszystkich odcinków jajowodu. Intensywność barwienia nie różniła się w znacznym stopniu pomiędzy grupą kontrolną i otrzymującą tamoksyfen (Ryc. 38k-u).

MMP-7 zlokalizowano w nabłonku lejka i pochwy (Ryc. 39a, b, i, j) oraz nabłonku i gruczołach tubularnych magnum, cieśni i gruczołu skorupowego (Ryc. 39c-h). Większą intensywność barwienia obserwowano w gruczole skorupowym kur z grupy eksperymentalnej niż z grupy kontrolnej (Ryc. 39g i h).

Immunoreaktywność dla MMP-9 stwierdzono w tkance łącznej wszystkich odcinków jajowodu oraz gruczołach tubularnych cieśni (Ryc. 39k-u). Nie obserwowano różnic w intensywności barwienia pomiędzy grupą doświadczalną, a kontrolną.

TIMP-2 zlokalizowano w nabłonku magnum oraz pochwy (Ryc. 40c, d, i, j), a także w gruczołach tubularnych cieśni i gruczołu skorupowego (Ryc. 40e-h). Ponadto, stwierdzono silne barwienie w tkance łącznej lejka (Ryc. 40a i b). W grupie doświadczalnej zwiększoną intensywność immunopozytywnej reakcji dla TIMP-2 w porównaniu do kontroli obserwowano w gruczole skorupowym oraz pochwie (Ryc. 40g-j).

Inhibitor TIMP-3 zlokalizowano w nabłonku magnum u kur obydwu grup, a także w gruczołach tubularnych magnum kur traktowanych tamoksyfenem (Ryc. 40m i n). W pozostałych odcinkach reakcja immunopozytywna była bardzo słaba i nie stwierdzono różnic w intensywności barwienia pomiędzy grupą kontrolną a eksperymentalną.

4.3.7. Żelatynolityczna aktywność MMPs jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej podawaniem tamoksyfenu

Zymografia żelatynowa wykazała obecność pro-MMP-2, zarówno w grupie kontrolnej jak i doświadczalnej. Największa jej ilość występowała w lejku i pochwie, natomiast najmniejsza w cieśni. Podawanie tamoksyfenu istotnie zwiększyło aktywność MMP-2 w lejku oraz gruczole skorupowym o 55% i 113% (Ryc. 41). Nie stwierdzono aktywności MMP-9 w jajowodzie kur w żadnej z grup.

5. DYSKUSJA

W obecnej pracy po raz pierwszy wykazano ekspresję MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-2 i TIMP-3 na poziomie mRNA oraz białka, a także aktywność MMP-2 i -9 w poszczególnych odcinkach jajowodu kury podczas dojrzewania płciowego oraz przerwy w aktywności rozrodczej. Dotychczasowe badania dotyczące MMPs były fragmentaryczne i wykazały jedynie obecność transkryptów MMP-2, MMP-9, TIMP-2 i TIMP-3 w jajowodzie kury (Réhault-Godbert i wsp., 2008; Dunn i wsp., 2009; Song i wsp., 2011; Hrabia i wsp., 2013b).

W okresie kilku tygodni poprzedzających osiągnięcie dojrzałości płciowej, stosując metodę real-time PCR, w jajowodzie kury określono ekspresję wybranych metaloproteinaz i ich inhibitorów. Najwyższy poziom mRNA MMPs i TIMPs odnotowano u 10-tyg. kurek. Podczas dojrzewania ekspresja zmniejszała się, osiągając najniższe wartości u ptaków niosących. We wcześniejszych badaniach, Dunn i wsp. (2009), przy użyciu techniki mikromacierzy cDNA porównali profile transkrypcyjne w gruczole skorupowym niedojrzałych (12-tyg.) i dojrzałych (25-tyg.) ptaków identyfikując 266 genów o zróżnicowanej ekspresji. Jednym z nich był gen kodujący inhibitor TIMP-3, którego zwiększoną ekspresję obserwowano w gruczole skorupowym dojrzałych ptaków. Podobnych obserwacji dokonano w niniejszej pracy porównując poziom transkryptu dla TIMP-3 w gruczole skorupowym 12-tyg. (niedojrzałych) i 17-tyg. (niosących) kur. Song i wsp. (2011) również stosując metodę mikromacierzy zidentyfikowali geny, których ekspresja istotnie zmieniała się podczas wzrostu, rozwoju i różnicowania układu rozrodczego kurek. Wśród wyłonionej przez autorów grupy genów, których ekspresja zmieniała się istotnie podczas rozwoju jajowodu, znajdowały się te kodujące MMP-2 i MMP-9. Stwierdzono, że ekspresja mRNA MMP-2 obniżyła się podczas dojrzewania. Odwrotny efekt obserwowano w przypadku MMP-9, której ekspresja zwiększyła się, ale tylko u ptaków o częściowo zróżnicowanym jajowodzie. W obecnej pracy poziom mRNA MMP-2 i MMP-9 obniżył się znacznie we wszystkich odcinkach jajowodu między 10. a 14. tyg., natomiast w magnum i gruczole skorupowym ekspresja MMP-9 zwiększyła się w momencie rozpoczęcia nieśności, tj. w 17. tyg.

W dostępnej literaturze brak jest jednak informacji na temat udziału MMPs i ich inhibitorów w rozwoju układu rozrodczego ptaków, a nieliczne prace dotyczą ssaków. Z badań przeprowadzonych na myszach (Hu i wsp., 2004; Nuttall i wsp.,

2004) wynika, że podczas rozwoju embrionalnego i postnatalnego macicy wysoką ekspresją charakteryzuje się MMP-2 oraz TIMP-3. Inhibitor TIMP-2 wykazuje umiarkowaną ekspresję, natomiast obecność transkryptów dla MMP-7 i -9 jest znikoma. Wyniki otrzymane w niniejszej pracy podobnie wskazują na bardzo niską ekspresję MMP-7 i -9 w większości odcinków jajowodu. Stosując technikę mikromacierzy Hu i wsp. (2004) nie obserwowali istotnych zmian w ekspresji wymienionych elementów systemu MMP na żadnym z etapów doświadczenia, które obejmowało pierwsze dwa tygodnie postnatalnego rozwoju myszy. Weryfikacja metodą Real-time PCR pozwoliła, natomiast na obserwację wzrostowej tendencji w ekspresji MMP-2, TIMP-2 i -3. W obecnej pracy odnotowano zmniejszający się poziom ekspresji wyżej wymienionych genów w jajowodzie kury. Odmienne rezultaty mogą wynikać z różnic międzygatunkowych. Nie można wykluczyć także, że spadek ekspresji wystąpiłby na dalszych etapach rozwoju macicy myszy, których nie obejmowało doświadczenie przeprowadzone przez autorów.

W niniejszej pracy wykazano także ekspresję na poziomie białka wszystkich badanych elementów systemu MMP podczas dojrzewania. W przypadku MMP-7 oraz inhibitora TIMP-3 obserwowano istotny wzrost ekspresji w 16 tyg. życia ptaków, co może mieć związek z różnicowaniem komórek gruczołów tubularnych, które pojawiły się na tym etapie rozwoju jajowodu. Co szczególnie interesujące, w przedstawionej pracy ekspresja MMP-2 i -7 oraz TIMP-3 na poziomie białka zwiększyła się w większości badanych odcinków jajowodu podczas dojrzewania w przeciwieństwie do ekspresji na poziomie mRNA. Rozbieżność w ekspresji na poziomie białka i mRNA mogła być spowodowana np. regulacyjnymi mechanizmami posttranskrypcyjnymi. Najnowsze doniesienia (Nothnick, 2012) sugerują, że modyfikacje posttranskrypcyjne odgrywają znacznie ważniejszą rolę w funkcjonowaniu komórek, tkanek, czy też całych narządów, niż do tej pory sądzono. W ciągu ostatnich kilku lat wykazano, że ekspresję genów oraz rozwój organów mogą w znacznym stopniu regulować cząsteczki micro-RNAs (mi-RNAs). mi-RNAs łącząc się z kompleksem białkowym RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*) zawierającym jedno z czterech różnych białek Argo (ang. *Argonaute*) oraz Dicer (Hutvagner i Simard, 2008), mogą prowadzić do inhibicji translacji docelowego transkryptu mRNA poprzez wiązanie się do jego regionu 3'UTR (ang. *3' untranslated region*). Chociaż, zdecydowana większość doniesień wskazuje na hamujący wpływ mi-RNAs na proces translacji, istnieją pewne dowody na to, że

cząsteczki mi-RNA mogą również zwiększać efektywność syntezy białek poprzez zmiany w komponentcie Argo kompleksu RISC (Vasudevan i wsp., 2007). Wykazano, że mi-RNAs są niezbędne do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania wielu układów w tym układu rozrodczego (Harris i wsp., 2006; O'Rourke i wsp., 2007). Otsuka i wsp. (2008) jako pierwsi udowodnili, że hipomorficzna mutacja allelu *Dicer1* u myszy prowadzi do niepłodności. Niezdolność samic do utrzymania ciąży powiązano także z brakiem cząsteczek *mi-17-5p* oraz *let7b*, będących regulatorami ekspresji inhibitora TIMP-1 przejawiającego działanie antyangiogenne. W kolejnych badaniach stwierdzono występowanie szeregu nieprawidłowości w budowie i funkcjonowaniu jajowodu u samic z delecją w genie *Dicer1*, w tym także zmniejszoną liczbę gruczołów śluzówki macicy (Hong i wsp., 2008; Nagaraja i wsp., 2008; Gonzalez i Behringer 2009). Liu i wsp. (2011) obserwowali również zdolność *miR-29* do hamowania ekspresji kilku typów kolagenu oraz stymulowania ekspresji MMP-2 i MMP-9 (Chen i wsp., 2011), co może wskazywać na potencjalną rolę *miR-29* w regulowaniu migracji komórek. Nie wykluczone, że cząsteczki mi-RNA wpływają na posttranskrypcyjną ekspresję MMPs w tkankach jajowodu kury podczas dojrzewania. Jednak, pomimo odkrycia kilku mi-RNAs zaangażowanych w mechanizmy regulujące rozwój i różnicowanie jajowodu kury (Jeong i wsp., 2013), nie zidentyfikowano cząsteczek mogących bezpośrednio wpływać na ekspresję MMPs w tym narządzie u ptaków.

Metodą immunodetekcji i zymografii potwierdzono obecność obydwu form MMP-2, latentnej oraz aktywnej w jajowodzie dojrzewającej kury. Ekspresja MMP-2 na poziomie białka zwiększyła się podczas dojrzewania, szczególnie w cieśni, podczas gdy aktywność tej metaloproteinazy zmniejszyła się we wszystkich odcinkach jajowodu. Może to świadczyć o występowaniu mechanizmów regulujących aktywność tego enzymu w jajowodzie kury. Jedną z przyczyn obniżonej aktywności MMP-2, pomimo zwiększonej ekspresji na poziomie białka, mogła być nieodpowiednia ilość inhibitora TIMP-2, którego ekspresja nie zmieniła się na żadnym z etapów dojrzewania. Jak wynika z literatury TIMP-2 jest niezbędny w procesie aktywacji pro-MMP-2 (Wang i wsp., 2000; Cantemir i wsp., 2004), przebiegającej w trójskładnikowym kompleksie: MT1-MMP, TIMP-2 i pro-MMP-2. TIMP-2 wiąże się poprzez swoją domenę N-końcową z miejscem aktywnym MT1-MMP, a przez domenę C-końcową z domeną hemopeksyny pro-MMP-2. Następnie druga cząsteczka MT1-MMP, wolna od TIMP-2, trawi prodomenę w miejscu N37 –

L38, a dalsza autoproteoliza wywołuje pełną aktywację MMP-2. Aby ten proces zaszedł, istotne jednak jest stężenie TIMP-2, które musi być stosunkowo niskie, tak aby mógł zostać utworzony kompleks, ale jednocześnie nie wszystkie MT1-MMP uległy wysyceniu. Podobnie aktywacja MMP-2 przebiega z udziałem MT3-MMP i TIMP-2 lub TIMP-3 (Zhao i wsp., 2004; Hua i wsp., 2011), którego ekspresja na poziomie białka istotnie zwiększyła się podczas rozwoju jajowodu. Nie można jednak wykluczyć działania innych czynników aktywujących MMP-2, takich jak kładyny, których obecność stwierdzono w jajowodzie ptaków (Ariyadi i wsp., 2013). Zarówno ekspresja mRNA, jak i aktywność MMP-9 zmniejszyły się podczas dojrzewania. Znaczna ilość MMP-9 obecna między 10. a 14. tyg. może sugerować jej udział w procesach zachodzących na wczesnych etapach rozwoju jajowodu. Hu i wsp. (2004) również potwierdzili obecność i aktywność MMP-2 i -9 w trakcie rozwoju macicy myszy. Podobnie jak w obecnej pracy badacze obserwowali przewagę formy aktywnej MMP-9.

W ścianie jajowodu obserwowano komórkowo- i tkankowo-specyficzną lokalizację badanych elementów systemu MMP, zwłaszcza w 16 i 17 tyg., kiedy pojawiły się zróżnicowane komórki budujące gruczoły tubularne. MMP-9 zlokalizowana była głównie w tkance łącznej, natomiast MMP-2 w stromie, jak i komórkach nabłonkowych i gruczołowych. Obecność MMP-7 stwierdzono wyłącznie w komórkach nabłonka i gruczołów tubularnych. Inhibitory TIMP-2 i -3 zlokalizowano w nabłonku oraz w niewielkiej ilości w stromie. Ponadto, intensywność immunopoztywnej reakcji dla badanych elementów systemu MMP zmniejszała się wraz z wiekiem kur, z wyjątkiem MMP-7, dla której intensywność reakcji zwiększała się podczas dojrzewania. Podobnie, Hu i wsp. (2004) stwierdzili, komórkowo- i tkankowo-specyficzną lokalizację MMPs w ścianie macicy myszy podczas jej rozwoju. Huh i Jung (2013) obserwowali natomiast zmniejszającą się intensywność reakcji immunohistochemicznej dla inhibitora TIMP-2 w jądrach kogutów podczas dojrzewania płciowego. Co więcej, Hu i wsp. (2004) metodą hybrydyzacji *in situ* potwierdzili zróżnicowanie ekspresji MMPs i TIMPs pomiędzy populacjami komórek macicy. MMP-2 i -9 ulegały ekspresji głównie w stromie, natomiast obecność mRNA MMP-7 stwierdzono jedynie w komórkach typu nabłonkowego. Transkrypty inhibitorów TIMP-2 i -3 wykryto w obydwu populacjach komórek, z ich przewagą w stromie/myometrium.

Zmiany w ekspresji i aktywności MMPs w jajowodzie kury podczas dojrzewania mogą świadczyć o ich udziale w procesach zachodzących w trakcie wzrostu i różnicowania tkanek jajowodu. Nieodłącznym elementem morfogenezy tkanek jest przebudowa składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), będąca domeną metaloproteinaz. Według obecnego stanu wiedzy, rola tych enzymów nie ogranicza się jedynie do usuwania zbędnych składników ECM, ale obejmuje także modyfikacje funkcji komórkowych. Tak więc, elementy systemu MMP mogą być niezbędne w prawidłowym rozwoju oraz funkcjonowaniu narządów z kilku względów. Po pierwsze, aby umożliwić migrację komórek poprzez degradację składników ECM, po drugie, w celu zmiany zachowania komórek przez modyfikację ich otoczenia (mikrośrodowiska) i po trzecie w celu modulacji aktywności istotnych z biologicznego punktu widzenia peptydów (cząsteczek). Takie zmiany mogą zachodzić bezpośrednio poprzez proteolityczne cięcie, uwolnienie molekuł z miejsc ich wiązania lub modyfikacje aktywności ich inhibitorów. Każda z metaloproteinaz na kilka sposobów może uczestniczyć w procesach zachodzących w tkankach podczas dojrzewania.

Proliferacja, różnicowanie i apoptoza komórek są niezbędnymi procesami zachodzącymi w trakcie wzrostu i różnicowania jajowodu. Podczas tworzenia tkanki pojedyncze komórki organizują się wewnątrz niej tak, aby ich orientacja pozwalała im na komunikację oraz integrację funkcji. Degradacja i resynteza składników ECM jest konieczna w celu umożliwienia komórkom migracji w trakcie rozwoju jajowodu i formowania nowych struktur, takich jak gruczoły tubularne śluzówki. Właściwości oraz różnorodność substratowa MMPs wskazują na potencjalny udział tych enzymów w morfogenezie tkanek i narządów, w tym tkanek jajowodu ptaków. Wykazano, że zahamowanie aktywności MMP-2 ogranicza migrację adipocytów oraz ich zdolność do organizacji w trójwymiarowe struktury (Brown i wsp., 1997). Brak aktywności MMP-2 uniemożliwia także formowanie wysepek Langerhansa przez komórki nabłonkowe, nie wpływając jednocześnie na ich różnicowanie pod względem endokrynnym (Miralles i wsp., 1998). Tak, więc jednym z aspektów działania MMP-2 podczas rozwoju jajowodu mógłby być jej udział w formowaniu gruczołów tubularnych. Wskazywałaby na to jej lokalizacja w komórkach gruczołowych śluzówki 16-tyg. ptaków. Vaillant i wsp. (2003) obserwowali natomiast, że zablokowanie funkcji MMP-9 przy użyciu specyficznego przeciwciała ogranicza migrację komórek w rozwijającym się mózdzku oraz zmniejsza ich

podatność na apoptozę. Ponadto stwierdzono, że MMP-9 i TIMP-3 są kluczowymi regulatorami degradacji ECM macicy przez embriony mysie podczas implantacji, a zdolność embrionu do degradacji ECM jest dodatnio skorelowana z ilością wydzielonej metaloproteinazy, natomiast znajdujący się w ECM TIMP-3 ogranicza ten proces poprzez zmniejszenie aktywności MMP-9 (Whiteside i wsp. 2001). Wykazano także, że zablokowanie aktywności MMP-9 hamuje rozwój kłębuszków nerkowych, a inhibicja ekspresji TIMP-2 stymuluje ten proces (Lelongt i wsp., 1997; Kanwar i wsp., 1999). Jednak, w niektórych tkankach zahamowanie aktywności MMPs sprzyja tworzeniu rozgałęzionych struktur przez komórki nabłonka. Dzieje się tak w przypadku gruczołów ślinowych, dla których rozkład składników ECM działa destabilizująco na proces morfogenezy, prawdopodobnie ze względu na jej odmienny mechanizm w tej tkance (Fukuda i wsp., 1988). Intensywna reakcja immunohistochemiczna dla MMP-9 obserwowana w sąsiadującej z nabłonkiem warstwie stromy u kurek między 10. a 14 tyg. sugeruje, jednak jej zaangażowanie w degradację ECM i umożliwienie migracji oraz proliferacji komórek, które mają utworzyć śluzówkę. Kolokalizacja MMP-9 z TIMP-2 i -3 może wskazywać na rolę tych inhibitorów w kontroli aktywności MMP-9, a przez to miejsca oraz zakresu remodelingu tkanek. Obserwowany wzrost ekspresji MMP-7 na poziomie białka oraz jej lokalizacja w gruczołach tubularnych u 16- i 17-tyg. ptaków sugeruje natomiast zaangażowanie MMP-7 w regulację proliferacji i różnicowania komórek tworzących gruczoły. Wcześniejsze badania wykazały, że u myszy z niedoborem antygenu CD44, stanowiącego receptor dokujący dla MMP-7 na powierzchni komórek, zdiagnozowano wady rozwojowe gruczołu sutkowego, wynikające z niewłaściwej lokalizacji enzymu. Zamiast wierzchołkowej powierzchni komórek nabłonka MMP-7 dyfunduje do błony podstawnej powodując apoptozę komórek pęcherzykowych. Gruczoły ulegają przedwczesnej involucji, która może być przynajmniej częściowo spowodowana degradacją ECM w wyniku niewłaściwie zlokalizowanej proteolitycznej aktywności MMP-7 (Murphy i Nagase, 2011; Bonnans i wsp., 2014). Przytoczone obserwacje wskazują na duże znaczenie nie tylko odpowiedniego poziomu ekspresji MMPs, ale również ich lokalizacji.

Metaloproteinazy mogą także w znacznym stopniu determinować aktywność biologicznie istotnych cząsteczek, regulując ich biodostępność poprzez odłączenie od białek wiążących lub uwolnienie z miejsc ich magazynowania w ECM i w ten sposób wpływać na rozwój jajowodu. Na przykład, trawienie dekoryny przez MMP-

2 i -7 uwalnia związany z nią TGF β (ang. *tumor growth factor*) (Imai i wsp., 1997; Murphy i Nagase, 2011), który z kolei kontroluje proliferację oraz różnicowanie większości typów komórek (Elliott i Blobel, 2005). Co więcej, TGF β może indukować przejście nabłonkowo-mezenchymalne (EMT), które ma miejsce w trakcie rozwoju jajowodu ptaków. Szlak sygnalizacyjny TGF β za pośrednictwem cząsteczek Smad może również prowadzić do apoptozy komórek (Conery i wsp., 2004) oraz wpływać na proces ich adhezji przez zmniejszenie ekspresji E-kadheryny lub zwiększenie ekspresji integryn związanych z inwazją (Miettinen i wsp., 1994; Elliott i Blobel, 2005). W jajowodzie ptaków stwierdzono obecność kilku izoform TGF β oraz ich receptorów (T β R) (Chowdhury i wsp., 2003 i 2004). Oprócz podstawowej roli jaką TGF β s odgrywają w regulacji wzrostu, różnicowania i morfogenezy komórek, zarówno u ptaków jak i u ssaków, mogą one wykazywać działanie immunosupresyjne (Huang i Huang, 2005; Das i wsp., 2006). Ta ostatnia funkcja wydaje się mieć szczególne znaczenie dla utrzymania długiej żywotności plemników w jajowodzie ptaków, które przechowywane są w tzw. gruczołach przechowujących nasienie (SST) umiejscowionych w lejku oraz w pochwie w części graniczącej z gruczołem skorupowym. Das i wsp. (2006) na podstawie zwiększonej ekspresji TGF β s i T β R w SST na granicy pochwy i gruczołu skorupowego obserwowanej po inseminacji, sugerują ochronne działanie TGF β s dla plemników przez zahamowanie reakcji anty-plemnikowej. Stąd zaangażowanie MMPs w rozwój, różnicowanie i funkcjonowanie jajowodu ptaków może być związane z regulacją dostępności TGF β .

Poprzez uwolnienie od białek wiążących, MMPs mogą także regulować biodostępność czynników wzrostu. Na przykład, białka wiążące insulinopodobne czynniki wzrostu (IGFBPs, ang. *insulin-like growth factor-binding proteins*) wykazują podobne lub większe powinowactwo do insulinopodobnych czynników wzrostu (IGFs) niż ich receptory, tak więc degradacja IGFBPs odgrywa kluczową rolę w regulacji aktywności IGFs (Rajah i wsp., 1995) wpływających na procesy wzrostu tkanek. Stwierdzono, że MMP-2 wykazuje aktywność względem IGFBP-3 i -5 (Fowlkes i wsp., 1994; Thrailkill i wsp., 1995), natomiast obydwie żelatynazy posiadają zdolność proteolitycznej aktywacji TGF β oraz IL-1 β poprzez proteolityczne cięcie w obrębie peptydu utrzymującego te cytokiny w formie latentnej (Yu i Stamenkovic, 2000). Najnowsze badania Yu i wsp., (2015) wykazały,

że IGF-1 stymuluje proliferację mioblastów oraz rozwój mięśni u embrionów kurzych. Kida i wsp. (1994) podczas rozwoju jajowodu przepiórki obserwowali, że wysokiej ekspresji IGF-I towarzyszyła intensyfikacja replikacji DNA. Eksperymenty *in vitro* pokazały także, że IGF-I działa stymulująco na syntezę owoalbuminy w jajowodzie przepiórki (Kida i wsp., 1995). Zatem nie można wykluczyć, że rola MMPs w jajowodzie ptaków jest związana z regulacją aktywności IGFs.

Kolejną istotną obserwacją w obecnej pracy było stwierdzenie zróżnicowanej ekspresji MMPs i ich inhibitorów pomiędzy odcinkami jajowodu. Obecnością największej ilości mRNA badanych genów charakteryzował się lejek, natomiast najmniejszej magnum. Różnice te mogą wynikać ze specyficznej budowy i funkcji pełnionych przez poszczególne segmenty jajowodu. Wysoka ekspresja w lejku jajowodu mogła być związana z dużym udziałem tkanki mięśniowej w tym odcinku, która jak wynika z literatury cechuje się wysokim poziomem transkrypcji elementów systemu MMP (Hu i wsp., 2004; Nuttall i wsp., 2004). Z kolei stosunkowo niska ekspresja mRNA badanych genów w magnum może być wynikiem zdominowania procesu transkrypcji przez geny kodujące proteiny wchodzące w skład białka jaja. We wcześniejszych badaniach Réhault-Godbert i wsp. (2008) również wykazali różnice w poziomie ekspresji mRNA MMP-2, TIMP-2 i TIMP-3 pomiędzy poszczególnymi odcinkami jajowodu kur niosących. Podobnie jak u kury, obecność transkryptów dla MMP-2, MMP-9 i TIMP-2 stwierdzono także w poszczególnych odcinkach jajowodu lamy (Zampini i wsp., 2014).

Wykazanie ekspresji badanych elementów systemu MMP w niniejszej pracy świadczy o tym, że jajowód kury jest źródłem zarówno proteinaz, jak i ich specyficznych inhibitorów. Ekspresja i aktywność MMP-2 w poszczególnych odcinkach jajowodu niosących ptaków może wskazywać na udział tego enzymu w prawidłowym funkcjonowaniu jajowodu. Jak wykazała analiza immunohistochemiczna MMP-2 zlokalizowana była głównie w komórkach nabłonka jajowodu. Komórki te mogą być, więc odpowiedzialne za syntezę i wydzielanie MMP-2 do światła jajowodu, która może następnie stać się jednym ze składników jaja. Przypuszczenia te potwierdzają doniesienia o obecności pro-MMP-2 zarówno w płynie jajowodu, jaki i białku jaja kurzego (Réhault-Godbert i wsp., 2008). Autorzy zidentyfikowali pro-MMP-2 występującą w białku oraz żółtku jaja w kompleksie z inhibitorem TIMP-2, jednak fizjologiczna rola tego enzymu jest wciąż niejasna. Kurza MMP-2 wykazuje około 84% podobieństwa z ludzką i mysią

MMP-2 (Aimes i wsp., 1994). Wysoka konserwatywność sekwencji świadczy o znacznym podobieństwie roli jaką odgrywa MMP-2 u różnych gatunków zwierząt. Z dostępnej literatury wynika, że MMP-2 zaangażowana jest przede wszystkim w remodeling tkanek, który zachodzi podczas wielu procesów fizjologicznych. Ekspresja pro-MMP-2 w tkankach embrionów kurzych została udokumentowana (Ha i wsp., 2004). Enzym ten niezbędny jest w transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej zarodka (Duong i Erickson, 2004), angiogenezie (Brooks i wsp., 1998; Ribatti i wsp., 1999) oraz migracji komórek cewy nerwowej (Cai i wsp., 2002; Cantemir i wsp., 2004). Szybka inaktywacja MMP-2 skorelowana ze wzrostem konsumpcji białka jaja przez zarodek w ciągu pierwszych 10 dni embriogenezy w połączeniu z funkcjami opisanymi w literaturze wskazują na lokalne działanie MMP-2 we wczesnych etapach rozwoju embrionalnego. Spośród wszystkich właściwości, które wykazują składniki białka jaja, najlepiej poznane są te antybakteryjne. Niektóre substancje hamują rozwój bakterii ograniczając ich dostęp do metali i witamin, poprzez maskowanie. Do tej grupy związków należą: owotransferyna wiążąca żelazo (Valenti i wsp., 1983) oraz flawoproteina i awidyna posiadające wysokie powinowactwo do ryboflawiny i biotyny (White, 1987; Mann, 2007). Aktywność proteolityczna jest, więc konieczna w celu uwolnienia substancji odżywczych niezbędnych rozwijającemu się zarodkowi. Jedną z funkcji MMP-2 występującej w białku jaja mogłaby być stopniowa degradacja białek wiążących i w ten sposób zapewnienie zarodkowi stałego dostępu dopływu substancji odżywczych. Niewiele jest informacji o ewentualnej antybakteryjnej aktywności MMP-2 u innych gatunków poza doniesieniem, że MMP-2 może pośrednio uczestniczyć w regulacji produkcji antybakteryjnego peptydu w błonie śluzowej skóry suma (Cho i wsp., 2002). Wśród pozostałych MMPs, antybakteryjne działanie opisano jeszcze tylko w przypadku MMP-7, wykazującej zdolność aktywacji defensyn (Cunliffe i Mahida, 2000).

Pomimo, wykazania bardzo słabej reakcji immunohistochemicznej dla TIMP-2 i -3 w ścianie jajowodu kury nie można wykluczyć, że aktywność MMPs regulowana jest przez inne inhibitory. Jednym z nich może być α 2-makroglobulina. Potwierdzeniem tych przypuszczeń są obserwacje Lim i wsp. (2011), którzy stwierdzili wysoką, zależną od estrogenów, ekspresję α 2-makroglobuliny w jajowodzie kury, szczególnie w gruczołach tubularnych oraz nabłonku, podczas gdy była nieobecna w innych badanych narządach takich jak: mózg, serce, wątroba,

nerki, jelita, żołądek, jajniki, czy jądra. U ludzi α 2-makroglobulina syntetyzowana jest przede wszystkim w wątrobie (Munck Petersen i wsp., 1988; de Sain-van der Velden i wsp., 1998), a jako główne białko osocza stanowi w przybliżeniu 8-10% wszystkich białek ludzkiej krwi (Anderson i Anderson, 2002; Schaller i wsp., 2008). U kury, natomiast α 2-makroglobulina (nazywana także owomakroglobuliną lub owostatyną) syntetyzowana jest w jajowodzie i stanowi składnik białka jaja kurzego (Nagase i Harris, 1983; Saxena i Tayyab, 1997; Mann, 2007). Spośród odcinków jajowodu, największą ekspresję tego nieswoistego inhibitora proteaz obserwowano w magnum, natomiast w mniejszym stopniu w cieśni i gruczole skorupowym. Wysoki poziom ekspresji α 2-makroglobuliny może wskazywać na jej istotny udział w kontrolowaniu aktywności proteolitycznej w tych odcinkach jajowodu.

Wzrost i aktywność jajowodu kontrolowane są przede wszystkim przez produkowane w jajniku hormony steroidowe. W obecnej pracy podczas dojrzewania masa jajowodu zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia steroidów we krwi ptaków. Estradiol, jako kluczowy hormon regulujący rozwój jajowodu stymuluje proliferację i różnicowanie jego komórek, jak również syntezę składników białka jaja (Dougherty i Sanders, 2005). Procesom zachodzącym podczas wzrostu i rozwoju jajowodu towarzyszą, także zmiany w ekspresji receptorów steroidowych (Hrabia i wsp., 2013a; Jung i wsp. 2011). Wcześniejsze badania na pęcherzykach jajnikowych kury wykazały, że zmiany ekspresji mRNA MMP-2 są skorelowane z ekspresją receptorów estrogenowych w poszczególnych strukturach jajnika (Hrabia i wsp., 2008; Leśniak i Hrabia, 2012). Ponadto, Seo i wsp. (2009) obserwowali zmiany w ilości transkryptów dla MMP-2 i -9 w tkankach jajowodu niedojrzałych kurek pod wpływem diethylstilbestrolu (DES). DES jest niesteroidowym syntetycznym estrogenem, który silnie wiążąc się z receptorami dla estrogenów (ERs), wywołuje efekt podobny do naturalnego estrogenu: 17β -estradiolu. Stwierdzono, iż DES przyspiesza rozwój jajowodu stymulując formowanie gruczołów tubularnych oraz różnicowanie komórek nabłonka (Dougherty i Sanders, 2005). Wśród wyłonionej przez badaczy grupy genów związanych z rozwojem układu rozrodczego i endokrynnego, których ekspresja zmieniała się istotnie po podaniu DES znajdowały się te kodujące MMP-2 i MMP-9. U kur traktowanych syntetycznym agonistą estrogenów wykazano obniżony poziom transkryptu dla MMP-2 w porównaniu do kur kontrolnych, u których jajowód nie był zróżnicowany. Odwrotny efekt obserwowano w przypadku MMP-9, jej ekspresja zwiększyła się po podaniu DES,

ale tylko u ptaków o częściowo zróżnicowanym jajowodzie. W obecnej pracy poziom mRNA MMP-2 i MMP-9 obniżył się znacznie we wszystkich odcinkach jajowodu między 10. a 14. tyg., natomiast w magnum i gruczole skorupowym ekspresja MMP-9 zwiększyła się w momencie rozpoczęcia nieśności, tj. w 17. tyg. Wpływ DES na poziom transkryptów sugeruje udział estrogenów w regulacji ekspresji badanych metaloproteinaz, a odpowiedź jajowodu na stymulację hormonalną może zależeć od stopnia zróżnicowania jego tkanek. Biorąc pod uwagę dane literaturowe dotyczące regulacji ekspresji MMPs i TIMPs w układzie rozrodczym, obserwowane w niniejszej pracy zmniejszenie ekspresji badanych elementów systemu MMP mogło mieć bezpośredni związek ze wzrastającym stężeniem hormonów steroidowych we krwi kurek podczas dojrzewania płciowego.

Wykazane zmiany w ekspresji i aktywności badanych elementów systemu MMP w jajowodzie kury oraz towarzyszące im zmiany w morfologii tego narządu, sugerują zaangażowanie MMPs i TIMPs w prawidłowy rozwój i funkcjonowanie jajowodu ptaków. Wyjaśnienie mechanizmów regulujących ekspresję i aktywność tych enzymów w poszczególnych odcinkach jajowodu wymaga dalszych badań.

Ponieważ podczas dojrzewania płciowego wykazano zmiany w ekspresji i aktywności elementów systemu MMP podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy MMPs mogą być włączone w procesy zachodzące w jajowodzie podczas przerwy w nieśności. W tym celu określono ekspresję, aktywność i lokalizację wybranych elementów systemu MMP w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności wywołanej głodem. Przerwa w nieśności (przepieranie) jest częścią cyklu reprodukcyjnego kury, który charakteryzuje się wymianą piór i regresją układu rozrodczego (Johnson, 1986). Jednak duża zmienność osobnicza sprawia, że pierzenie się ptaków w stadzie nie zachodzi jednocześnie. Zastosowanie sztucznych metod zatrzymania nieśności pozwala na synchronizację procesu pierzenia (Proszkowiec i Rząsa 2001; Paczoska-Eliasiewicz i wsp., 2003). Po jego zakończeniu następuje poprawa funkcji rozrodczych będąca wynikiem odnowy układu rozrodczego. Teoria ta znalazła swoje potwierdzenie w obserwacjach dokonanych przez Heryanto i wsp. (1997a i b). Autorzy badając zmiany występujące w jajowodzie podczas wymuszonej przerwy w nieśności wykazali, że usunięcie starych tkanek ma miejsce podczas regresji, po której następuje odbudowa związana z proliferacją i różnicowaniem się nowo powstałych komórek. Regresja jajowodu,

występująca podczas naturalnej i wymuszonej przerwy w nieśności związana jest z apoptozą komórek jajowodu spowodowaną obniżonym stężeniem hormonów steroidowych (Monroe i wsp., 2002; Jeong i wsp., 2013; Hrabia i wsp., 2014).

W przeprowadzonym doświadczeniu, przerwa w nieśności wystąpiła między 6. a 13. dniem eksperymentu, natomiast między 17. a 20. dniem obserwowano powrót do nieśności u wszystkich kur. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi badaniami, w których stosowano identyczny lub podobny program przepierzania (Hrabia i wsp., 2001; Proszkowiec i Rząsa 2001; Paczoska-Eliasiewicz i wsp., 2003). Podczas przerwy w nieśności istotny spadek masy jajowodu obserwowano w 6. dniu eksperymentu, a jej stopniowy wzrost między 13. a 20. dniem doświadczenia. Zmianom masy jajowodu towarzyszyły zmiany stężenia hormonów steroidowych w osoczu krwi ptaków. Stężenie P_4 , T i E_2 obniżyło się podczas regresji jajowodu, a następnie wzrosło w okresie jego odnowy.

Badania histologiczne tkanek potwierdziły, przebudowę jajowodu kury w trakcie przerwy w nieśności obejmującą: inwolucję gruczołów tubularnych, degenerację nabłonka oraz zmniejszenie ilości substancji wydzielanej przez gruczoły tubularne, a następnie stopniową odbudowę tych struktur podczas odnowy jajowodu. Jeong i wsp. (2013), oprócz potwierdzenia intensyfikacji procesów apoptozy, a następnie proliferacji podczas przebudowy jajowodu kury, dokonali immunohistochemicznej analizy markerów transferu nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT) podczas pierzenia kur wywołanego dodatkiem cynku do paszy. Barwienie o największej intensywności dla cytokeratyny, będącej markerem komórek typu nabłonkowego obserwowano podczas odbudowy jajowodu w komórkach nabłonka i gruczołów tubularnych, natomiast wimentyna występująca w cytoszkielecie komórek mezenchymalnych obecna była w stromie i naczyniach krwionośnych. EMT w komórkach pobudzają takie białka sygnałowe jak EGF, PDGF, HGF, TGF β , β katenuina oraz składniki ECM, które mogą stymulować proliferację i migrację komórek. EMT zwiększa, więc ruchliwość i inwazyjność komórek co sprawia, że odgrywa on istotną rolę podczas rozwoju i różnicowania tkanek. Metaloproteinazy degradując ECM i uwalniając jej składniki mogą uczestniczyć zarówno w regresji, jak i odbudowie tkanek jajowodu.

W prezentowanej rozprawie wykazano, że procesom morfologicznym zachodzącym podczas przebudowy jajowodu towarzyszyły zmiany w ekspresji i aktywności badanych elementów systemu MMP. Podczas regresji jajowodu

obserwowano wzrost poziomu mRNA MMP-2, MMP-7 i -9 w większości jego odcinków, a zwiększoną ekspresję inhibitorów TIMP-2 i -3 odnotowano w lejku i pochwie. Mimo, iż ekspresja MMPs i TIMPs na poziomie proteomu nie zmieniła się, poza wzrostem ekspresji MMP-9 w cieśni, to aktywność MMP-2 i -9 zwiększyła się w większości odcinków jajowodu. Rozbieżności te mogą być spowodowane mechanizmami regulacyjnymi na poziomie translacji oraz aktywacji enzymu, jak również odmienną czułością każdej z metod. Wzrost aktywności MMP-2 i -9 może świadczyć o zaangażowaniu tych enzymów w procesy zachodzące w trakcie regresji jajowodu. W dostępnej literaturze informacje na temat udziału MMPs i TIMPs w remodeling tkanek układu rozrodczego ptaków są nieliczne. Ha i wsp. (2004) obserwowali wzrost ekspresji mRNA MMP-2 podczas regresji prawego przewodu Müllera u żeńskich embrionów kurzych. Zwiększoną ekspresję mRNA MMP-2 i -9 odnotowano także w ulegających regresji pęcherzykach poowulacyjnych niosących kur (Leśniak i Hrabia, 2012; Zhu i wsp., 2014). Dość dobrze udokumentowane zostały natomiast profile transkrypcyjne MMPs i TIMPs w narządach rozrodczych ssaków, u których podlegają powtarzalnym zmianom związanym z cyklem płciowym (Curry i Osteen, 2003; Jabbour i wsp., 2006). Badania przeprowadzone u kobiet wskazują na konstytutywną ekspresję MMP-2 i TIMP-2 w macicy podczas cyklu płciowego i jej nieznaczny wzrost w trakcie menstruacji. Transkrypcja MMP-9 zachodzi natomiast wyłącznie w fazie menstruacyjnej w komórkach stromy, podczas gdy obecność białka stwierdzono w każdym stadium cyklu w nabłonku oraz komórkach zapalnych endometrium (Jeziorska i wsp., 1996; Goffin i wsp., 2003; Cornet i wsp., 2005). Liczba transkryptów dla MMP-7 również wzrasta podczas menstruacji. Metaloproteinaza ta występuje głównie w komórkach nabłonkowych, ale podczas menstruacji można ją zlokalizować także w stromie (Rodgers i wsp., 1993; Henriot i wsp., 2002; Goffin i wsp., 2003). Podobna lokalizacja jak i zmiany w ekspresji zależne od stadium cyklu reprodukcyjnego w jajowodzie ptaków i macicy kobiet wskazują na podobną regulację oraz rolę jaką MMPs mogą odgrywać podczas przebudowy tych narządów. Jednym z zadań MMP-2 i -9 jest prawdopodobnie degradacja składników ECM oraz połączeń międzykomórkowych, natomiast lokalizacja MMP-7 wskazuje na jej rolę w apoptozie komórek podczas regresji jajowodu. Przypuszczenia te zdają się potwierdzać wcześniejsze badania, z których wynika, że MMP-7 wykazuje aktywność proteolityczną względem

receptora śmierci Fas wpływając na podatność komórek na apoptozę (Mitsiades i wsp., 2001; Strand i wsp., 2004).

Podczas odnowy jajowodu obserwowano zwiększoną ekspresję mRNA MMP-2 i TIMP-3 prawie we wszystkich odcinkach jajowodu, a dla TIMP-2 w magnum oraz pochwie. W lejku, magnum i gruczole skorupowym zwiększyła się także aktywność MMP-2. Podobnie Shahed i Young (2008) obserwowali wzrost aktywności MMP-2, przy bardzo niskiej ekspresji białka TIMP-2, podczas odnowy macicy chomika syberyjskiego. Jak wcześniej wspomniano MMP-2 niezbędna jest w transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej (Duong i Erickson, 2004), która ma miejsce podczas odnowy jajowodu (Jeong i wp., 2013), dlatego też zwiększona ekspresja MMP-2 na tym etapie przebudowy jajowodu jest najprawdopodobniej związana z tym procesem. Zwiększona ekspresja TIMP-3 może mieć związek z ograniczeniem dalszej degradacji ECM tkanek jajowodu, sprzyjając w ten sposób jego odbudowie. Jak wskazują wcześniejsze badania, TIMP-3 jest kluczowym regulatorem ECM macicy u myszy (Whiteside i wsp., 2001). TIMPs są jednak molekułami wielofunkcyjnymi. Oprócz utrzymywania równowagi między syntezą a degradacją struktur ECM mogą pełnić w jajowodzie także inne funkcje biologiczne. Z dotychczasowych doniesień wiadomo, że TIMPs między innymi biorą udział w regulacji apoptotycznej śmierci komórek (Ahonenm i wsp., 2003; Liu i wsp., 2004), jak również posiadają aktywność czynników pobudzających wzrost różnego typu komórek, co wydaje się być istotne podczas odbudowy tkanek (Nagase i wsp., 2006). Podobną rolę mogłyby odgrywać podczas procesu odbudowy jajowodu u ptaków.

Co ciekawe, podczas przebudowy jajowodu kury, odnotowano wzrost aktywności MMP-9 w lejku, magnum i gruczole skorupowym, pomimo braku istotnych zmian w jej ekspresji na poziomie mRNA i białka w większości odcinków jajowodu. Zatem, aktywność zlokalizowanej w tkance łącznej MMP-9 może być związana z remodelingiem macierzy wokół regenerujących się gruczołów tubularnych. Ekspresja MMP-7, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka nie zmieniła się w większości odcinków jajowodu podczas jego odnowy w porównaniu do grupy kontrolnej. Poziom mRNA MMP-7 wyraźnie zwiększył się u ptaków, które powróciły do nieśności (grupa G-3), nie obserwowano natomiast żadnych zmian na poziomie białka. Lokalizacja badanych elementów systemu MMP nie zmieniła się podczas przerwy w nieśności.

Podsumowując, największy wzrost ekspresji MMPs obserwowano podczas regresji jajowodu, natomiast transkrypcja inhibitorów, szczególnie TIMP-3 zwiększyła się w trakcie jego odbudowy. Uzyskane wyniki mogą sugerować udział badanych elementów systemu MMP w procesie przebudowy jajowodu ptaków, a zachowanie odpowiedniej równowagi pomiędzy MMPs i ich tkankowymi inhibitorami wydaje się być niezbędne do kontroli miejsca oraz zakresu przebudowy tkanki.

Podczas dojrzewania płciowego jak i przerwy w nieśności zmianom w ekspresji i aktywności MMPs i TIMPs w jajowodzie kury towarzyszyły zmiany w stężeniu hormonów steroidowych w osoczu krwi ptaków, co może wskazywać na udział steroidów w regulacji badanych elementów systemu MMP. Głównymi hormonami kontrolującymi rozwój i funkcjonowanie jajowodu są estrogeny promujące proliferację, migrację i przeżywalność komórek. Biologiczne działanie estrogenów zależy od ich związania się z receptorami estrogenowymi (ERs), które wpływają na regulację procesów transkrypcyjnych. Dlatego też, w kolejnym doświadczeniu podjęto próbę określenia udziału estrogenów w regulacji ekspresji i aktywności elementów systemu MMP. W tym celu niosącym kurom podawano tamoksyfen, związek należący do selektywnych modulatorów receptorów estrogenowych. Jego działanie polega na kompetycyjnym wiązaniu się z receptorami estrogenowymi i hamowaniu indukowanej estrogenami transkrypcji genów (Arao i wsp., 1996; Jensen i Jordan, 2003). U ludzi tamoksyfen może wykazywać, zarówno antagonistyczne, jak i agonistyczne właściwości. Na przykład, w gruczole mlekowym przejawia aktywność antyestrogenną, natomiast w macicy działa jak agonista. Niemniej jednak u ptaków wykazano jedynie antagonistyczne działanie tamoksyfenu (Sutherland, 1981; Lazier, 1987), dlatego też związek ten był jak dotąd wielokrotnie stosowany w badaniach dotyczących fizjologicznej roli estrogenów (Jaccoby i wsp., 1992; Lisowski i Bednarczyk, 2005; Rząsa i wsp., 2009).

W prezentowanej pracy podawanie tamoksyfenu spowodowało zatrzymanie nieśności oraz zmniejszenie masy jajowodu ptaków, co pozostaje w zgodzie z wynikami wcześniejszych badań (Sechman i wsp., 2004; Rząsa i wsp., 2009). Zablockowanie ERs tamoksyfenem skutkowało także obniżeniem stężenia P_4 w osoczu krwi ptaków. Podobny efekt obserwował Rząsa i wsp. (2009) badając wpływ tamoksyfenu na stężenie P_4 w żółtych pęcherzykach przedowulacyjnych,

sugerując wpływ estrogenów na ekspresję enzymów konwertujących pregnenolon do progesteronu w komórkach warstwy ziarnistej pęcherzyków jajnikowych.

Badania histologiczne tkanek wykazały w ścianie jajowodu ptaków traktowanych tamoksyfenem zmniejszoną liczbę komórek tworzących gruczoły tubularne oraz ich dezintegrację. Zmianom strukturalnym towarzyszyło zmniejszenie ilości substancji wydzielanej przez gruczoły tubularne. W grupie eksperymentalnej wyraźnie zmniejszyła się również grubość nabłonka. Obserwowane zmiany świadczą o regresji tkanek jajowodu kur traktowanych tamoksyfenem.

Regresji jajowodu towarzyszyły także zmiany w ekspresji i aktywności badanych elementów systemu MMP. Podczas przerwy w nieśności wywołanej tamoksyfenem obserwowano wzrost ekspresji mRNA MMP-7 i -9. Tamoksyfen nie spowodował istotnych różnic w transkrypcji MMP-2 oraz inhibitorów TIMP-2 i -3, zwiększył natomiast ekspresję MMP-2 na poziomie białka oraz jej aktywność. Podobnych obserwacji dokonali Russo i wsp. (2009) badając wpływ estrogenów na ekspresję MMPs w macicy szczurów i stwierdzając brak zmian w transkrypcji MMP-2 oraz wzrost jej ekspresji na poziomie białka. Ha i wsp. (2004) stwierdzili natomiast hamujący wpływ DES na ekspresję MMP-2 w przewodzie Müllera u embrionów kurzych. Obserwacje te mogą sugerować bezpośredni lub pośredni udział estrogenów w regulacji ekspresji na poziomie transkrypcji, translacji oraz aktywności badanych elementów systemu MMP w jajowodzie.

Zarówno badania *in vivo*, jak i *in vitro* wskazują na udział steroidów w regulacji ekspresji MMPs i TIMPs w macicy ludzi i ssaków. E₂ (sam i w połączeniu z P₄) silnie hamuje proces transkrypcji MMP-2, -7 i -9 (Rudolph-Owen i wsp., 1998; Helvering i wsp., 2005; Vassilev i wsp., 2005; Bruner-Tran i wsp., 2006; Gorodeski, 2007; Zhang i wsp., 2007; Zhang i Nothnick, 2012). Jednakże w obrębie promotorów wymienionych genów nie stwierdzono obecności sekwencji odpowiedzialnych za przyłączenie receptorów estrogenowych, dlatego też bezpośrednie oddziaływanie E₂ na transkrypcję tych genów wydają się być mało prawdopodobne (Clark i wsp., 2008). Co więcej, nie tłumaczyłoby ono lokalnej ekspresji MMPs w poszczególnych strukturach endometrium. Przeciwnie, obserwacje te sugerują pośrednie działanie steroidów, na przykład przez lokalnie produkowane, uwalniane lub aktywowane cytokiny i czynniki wzrostu.

Wcześniejsze badania dowiodły, że regulacja MMPs na poziomie transkrypcji zachodzi z udziałem wielu czynników. Ekspresję metaloproteinaz stymulują m.in.

czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α) (Lee i wsp., 2007), śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) (Lee i wsp., 2006) interleukina-1 (IL-1) (Mengshol i wsp., 2001) prostaglandyny: PGE₂ (Zahner i wsp., 1997), PGF₂ α (Ricke i wsp., 2002) oraz onkogeny. Wpływają one na ekspresję genów *fas* i *jun*, produkty których stanowią czynniki transkrypcyjne AP-1. Czynniki te łączą się z określoną sekwencją DNA w rejonie promotorowym stymulując transkrypcję genu kodującego metaloproteinazę (Radwanowicz i wsp., 1994; Singer i wsp., 1999). Inhibitorami wydzielania MMPs na poziomie transkrypcji jest natomiast TGF β oraz pośrednio, wcześniej wspomniane hormony steroidowe (Bruner-Tran i wsp., 2002; Russo i wsp., 2009). Niektóre komórki (w tym nowotworowe) wydzielają również czynnik indukujący metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (EMMPRIN - *extracellular matrix metalloproteinase inducer*) stymulujący fibroblasty do wydzielania MMPs (Mishra i wsp., 2012; Hahn i Yong, 2015). Noguchi i wsp., (2003) wykazali, że progesteron zwiększa ekspresję i glikozylację EMMPRIN w endometrium podczas cyklu, a ten z kolei w kompleksie z MMP-1 może być zaangażowany w degradację połączeń komórka-ECM. Singer i wsp. (1999) badając wpływ cytokin na proces transkrypcji elementów systemu MMP potwierdzili konstytutywną ekspresję MMP-2 oraz TIMP-2 i -3, która nie zmieniła się istotnie pod wpływem żadnej z sześciu badanych cytokin. Poziom mRNA MMP-9 został natomiast zwiększony przez IGF-II, nabłonkowy czynnik wzrostu (EGF) i płytkowy czynnik wzrostu (PDGF), a także TNF- α , potwierdzając przypuszczenia o zdolności cytokin do selektywnego indukowania ekspresji MMPs i czyniąc je potencjalnymi regulatorami lokalnej przebudowy tkanek. Przypuszczenia, iż regulacja ekspresji MMPs i TIMPs w jajowodzie kury mogłaby zachodzić za pośrednictwem cytokin potwierdzają doniesienia Sundaresan i wsp. (2007), którzy obserwowali korelację pomiędzy obniżonym stężeniem steroidów a zwiększoną ekspresją cytokin w jajowodzie kury podczas przerwy w nieśności. Kolejnym mechanizmem, przez który estrogeny mogłyby oddziaływać na syntezę MMPs w jajowodzie kury jest regulacja ekspresji mi-RNAs. U myszy wykazano, że indukowany estradiolem wzrost ekspresji *miR-705* hamuje translację MMP-9 w macicy (Hong i wsp., 2008; Nothnick i wsp., 2012). Podsumowując, wyniki przeprowadzonego doświadczenia mogą wskazywać na udział estrogenów w regulacji transkrypcji, translacji i aktywności wybranych elementów systemu MMP.

Wykazana obecność oraz zmiany w ekspresji i aktywności wybranych elementów systemu MMP w jajowodzie kury podczas dojrzewania i przerwy w nieśności, sugerują ich udział w rozwoju, przebudowie oraz czynności tego narządu. U ssaków stwierdzono, że MMPs uczestniczą w remodelingu ECM oraz w regulacji zachowania komórek w układzie rozrodczym. Zatem jest możliwe, że MMPs i TIMPs odgrywają podobną, istotną rolę także w procesach zachodzących w jajowodzie ptaków wpływając na migrację, proliferację, różnicowanie czy apoptozę komórek. Szczegółowe mechanizmy działania metaloproteinaz w jajowodzie ptaków wymagają dalszych wyjaśnień. Dlatego też, w kolejnych eksperymentach należałoby między innymi: (1) określić wpływ poszczególnych elementów systemu MMP na wyżej wymienione procesy w odmiennych stadiach cyklu reprodukcyjnego ptaków, (2) zbadać udział steroidów, gonadotropin i cytokin w regulacji ekspresji i aktywności MMPs oraz (3) zidentyfikować mi-RNAs regulujące translację MMPs.

Dalsze badania nad systemem MMP pozwolą lepiej zrozumieć mechanizmy determinujące optymalny rozwój, aktywność sekrecyjną oraz prawidłową przebudowę jajowodu ptaków. Mogą również wskazywać na nowe możliwości wydłużenia okresu produkcyjnego u kur, skutkujące lepszymi wynikami ekonomicznymi. Co więcej, MMPs i TIMPs są markerami niektórych nowotworów i zaburzeń funkcjonowania macicy, stąd uzyskane wyniki z wykorzystaniem jajowodu kury, jako unikatowego modelu badawczego, mogą być pomocne w opracowaniu metod stosowanych w terapii nowotworów u ludzi. Badania dotyczące MMPs i TIMPs w jajowodzie kury mogą także przyczynić się do rozwoju metod biotechnologicznych wykorzystujących jajowód ptaków jako bioreaktor do produkcji ludzkich białek terapeutycznych.

6. Podsumowanie:

- 1) Podczas dojrzewania płciowego we wszystkich badanych odcinkach jajowodu kury tj. lejku, magnum, cieśni i gruczole skorupowym wykazano ekspresję MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-2 i TIMP-3, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka.
- 2) Względna ekspresja mRNA badanych genów obniżała się w poszczególnych odcinkach jajowodu podczas dojrzewania.
- 3) Ekspresja MMP-9 na poziomie białka zmniejszała się, podczas gdy MMP-7 i TIMP-3 wzrastała w trakcie rozwoju jajowodu. Poziom MMP-2 i TIMP-2 był względnie stały, z niewielkim wzrostem ekspresji odnotowanym dla MMP-2 tuż przed osiągnięciem dojrzałości płciowej.
- 4) Aktywność MMP-2 i -9 w jajowodzie, była znacznie wyższa u niedojrzałych kurek, niż u niosących ptaków.
- 5) W ścianie jajowodu obserwowano komórkowo- i tkankowo-specyficzną lokalizację MMPs i TIMPs. Intensywność reakcji immunopozytywnej była zależna od wieku ptaków.
- 6) Podczas przerwy w nieśności wywołanej głodzeniem zachodziła ekspresja badanych elementów systemu MMP na poziomie mRNA i białka we wszystkich odcinkach jajowodu: lejku, magnum, cieśni, gruczole skorupowym i pochwie.
- 7) Regresji jajowodu towarzyszył wzrost ekspresji mRNA MMP-2, -7 i -9 oraz TIMP-2 i -3. W trakcie odbudowy tego narządu w większości odcinków stwierdzono zwiększoną ekspresję MMP-2 oraz inhibitora TIMP-3.
- 8) Ekspresja na poziomie białka oraz lokalizacja MMPs i TIMPs nie zmieniała się znacząco w większości odcinków jajowodu podczas przerwy w nieśności wywołanej głodzeniem.
- 9) Zarówno podczas regresji, jak i odbudowy jajowodu obserwowano wzrost aktywności MMP-2 i-9.
- 10) Podawanie tamoksyfenu zwiększyło ekspresję genu MMP-7 i -9, natomiast nie wpłynęło na poziom mRNA MMP-2, TIMP-2 i -3.
- 11) U kur traktowanych tamoksyfenem stwierdzono większą ekspresję na poziomie białka i aktywność MMP-2 w lejku i gruczole skorupowym oraz obserwowano zwiększoną immunoreaktywność dla inhibitora TIMP-3 w gruczolach tubularnych magnum.

7. Wnioski:

- 1) Wykazana obecność mRNA i białka MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-2 i TIMP-3 we wszystkich odcinkach jajowodu kury wskazuje, że narząd ten jest miejscem syntezy badanych elementów systemu MMP.
- 2) Ekspresja i aktywność MMPs i TIMPs jest zależna od odcinka jajowodu i stadium cyklu reprodukcyjnego.
- 3) Komórkowo- i tkankowo-specyficzna lokalizacja MMPs i TIMPs w ścianie jajowodu kury sugeruje odmienne funkcje poszczególnych elementów systemu MMP w tym narządzie.
- 4) Obserwowane zmiany w ekspresji i aktywności badanych elementów systemu MMP podczas dojrzewania płciowego oraz przerwy w nieśności sugerują, że MMPs i TIMPs mogą być lokalnymi regulatorami rozwoju, przebudowy i czynności jajowodu kury.
- 5) Zmiany w ekspresji i aktywności wybranych MMPs po podaniu tamoksyfenu, wskazują na udział estrogenów w ich regulacji.

8. LITERATURA

- 1) **Ahonenm M., Poukkula M., Baker A.H., Kashiwagi M., Nagase H., Eriksson J.E., Kähäri V.M. (2003).** Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors. *Oncogene*. 22: 2121–2134.
- 2) **Aimes R.T., French D. L., Quigley J. P., (1994).** Cloning of a 72 kDa matrix metalloproteinase (gelatinase) from chicken embryo fibroblasts using gene family PCR: Expression of the gelatinase increases upon malignant transformation. *Biochem. J.* 300(3): 729–736.
- 3) **Aitken R.N.C. (1971).** The oviduct. [In]: *The Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. (D.J. Bell i B.M. Freeman, Eds) Academic Press, London/New York. 3: 1237-1289.
- 4) **Allard S., Adin P., Gouédard L., di Clemente N., Josso N., Orgebin-Crist M.C., Picard J.Y., Xavier F. (2000).** Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of beta-catenin. *Development*. 127: 3349-3360.
- 5) **Anderson N.L., Anderson N.G. (2002).** The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics*. 1(11): 845-867.
- 6) **Arao Y., Yamamoto E., Miyatake N., Umehara T., Kawashima H., Masushige S., Hasegawa T., Kato S. (1996).** Asynthetic oestrogen antagonist, tamoxifen, inhibits oestrogen-induced transcriptional, but not, post-transcriptional, regulation of gene expression. *Biochem. J.* 313: 269-274.
- 7) **Ariyadi B., Isobe N., Yoshimura Y. (2013).** Expression of tight junction molecule "claudins" in the lower oviductal segments and their changes with egg-laying phase and gonadal steroid stimulation in hens. *Theriogenology*. 79(2): 211-218.
- 8) **Arjamaa O., Talo A. (1983).** Smooth muscle of the quail oviduct functions as a stretch receptor during ovum transport. *Biol. Reprod.* 29: 472-478.
- 9) **Asem E.K., Stingley-Salazar S.R., Robinson J.P., Turek J.J. (2000).** Identification of some components of basal lamina of avian ovarian follicle. *Poult. Sci.* 79(4): 589-601.
- 10) **Bai S.X., Wang Y.L., Qin L., Xiao Z.J., Herva R., Piao Y.S. (2005).** Dynamic expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, -9 and -14) and the tissue inhibitors of MMPs (TIMP-1, -2 and -3) at the implantation site during tubal pregnancy. *Reproduction*. 129(1): 103-113.
- 11) **Bednarczyk M., Łakota P., Wawrzyńska M. (2006).** Jajowód transgeniczných ptakův - zdrojém bíalek terapeutycznych? *Biotechnologia*, 3(74): 134-144.
- 12) **Berry W., Doernte A., Conner M., Barnes M, Oates S. (2006).** Spontaneously occurring fibroid tumors of the laying hen oviduct. *Poult. Sci.* 85(11): 1969-1974.
- 13) **Berry W.D. (2003).** The physiology of induced molting. *Poult. Sci.* 82: 971–980.
- 14) **Blom L. (1973).** Rigde pattern and surface ultrastructure of the oviductal mucosa of the hen (*Gallus domesticus*). *K. Danske Vidensk. Selsk. København. Skr.* 20: 1.
- 15) **Bonnans C., Chou J., Werb Z. (2014).** Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15(12): 786-801.

- 16) **Boogaard C.L., Finnegan C.V. (1976).** The effects of estradiol and progesterone on the growth and differentiation of the quail oviduct. *Can. J. Zool.* 54: 324-335.
- 17) **Borkakoti N. (2000).** Structural studies of matrix metalloproteinases. *J. Mol. Med.* 78: 261-268.
- 18) **Breen P.C., DeBruyn P.P.H. (1969).** The fine structure of the secretory cells of the uterus (shell gland) of the chicken. *J. Morphol.* 128: 35-65.
- 19) **Brooks P.C., Silletti S., von Schalscha T.L., Friedlander M., Cheresch D. A., (1998).** Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell.* 92: 391-400.
- 20) **Brown L.M., Fox H.L., Hazen S.A., LaNoue K.F., Rannels S.R., Lynch C.J. (1997).** Role of the matrixin MMP-2 in multicellular organization of adipocytes cultured in basement membrane components. *Am. J. Physiol.* 272: C937-C949.
- 21) **Bruner-Tran K.L., Eisenberg E., Yeaman G.R., Anderson T.A., McBean J., Osteen K.G. (2002).** Steroid and cytokine regulation of matrix metalloproteinase expression in endometriosis and the establishment of experimental endometriosis in nude mice. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 4782-4791.
- 22) **Bruner-Tran K.L., Zhang Z., Eisenberg E., Winneker R.C., Osteen K.G. (2006).** Down-regulation of endometrial matrix metalloproteinase-3 and -7 expression in vitro and therapeutic regression of experimental endometriosis in vivo by a novel nonsteroidal progesterone receptor agonist, tanaproget. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91(4): 1554-1560.
- 23) **Cai D.H., Brauer P.R., (2002).** Synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases early cardiac neural crest migration in chicken embryos. *Dev. Dyn.* 224: 441-449.
- 24) **Candlish, J.K. (1972).** The role of the shell membranes in the functional integrity of the egg. [In]: *Egg Formation and Production.* (B.M. Freeman and P.E. Lake, Eds) Br. Poult. Sci., Edinburg.
- 25) **Cantemir V., Cai D.H., Reedy M.V., Brauer P.R. (2004).** Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression during cardiac neural crest cell migration and its role in proMMP-2 activation. *Dev. Dyn.* 231: 709-719.
- 26) **Carletti M.Z., Christenson L.K. (2009).** MicroRNA in the ovary and female reproductive tract. *J. Anim. Sci.* 87: 29-38.
- 27) **Chen K.C., Wang Y.S., Hu C.Y., Chang W.C., Liao Y.C., Dai C.Y., Hank Juo S.H. (2011).** OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases. *FASEB J.* 25: 1718-1728.
- 28) **Chevronnay H.P.G., Selvais C., Emonard H., Galant C., Marbaix E., Henriet P. (2012).** Regulation of matrix metalloproteinases activity studied in human endometrium as a paradigm of cyclic tissue breakdown and regeneration. *Biochim. Biophys. Acta.* 1824(1): 146-156.
- 29) **Cho J.H., Park I.Y., Kim M.S., Kim S.C., (2002).** Matrix metalloproteinase 2 is involved in the regulation of the antimicrobial peptide parasin I production in catfish skin mucosa. *FEBS Lett.* 531: 459-463.
- 30) **Chousalkar K.K., Roberts J.R. (2008).** Ultrastructural changes in the oviduct of the laying hen during the laying cycle. *Cell Tissue Res.* 332(2): 349-358.

- 31) **Chowdhury V.S., Nishibori M., Yoshimura Y. (2003).** Changes in the expression of TGF- β -isoforms in the anterior pituitary during withdrawal and resumption of feeding in hens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133: 1–7.
- 32) **Chowdhury V.S., Nishibori M., Yoshimura Y. (2004).** Changes in the mRNA expression of TGF- β receptor types II and III in the anterior pituitary during induced molting in hens. *J. Poult. Sci.* 41: 140–146.
- 33) **Clark I.M., Swingler T.E., Sampieri C.L., Edwards D.R. (2008).** The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40: 1362–1378.
- 34) **Conery A.R., Cao Y., Thompson E.A., Townsend C.M.Jr., Ko T.C., Luo K. (2004).** Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 6: 366–372.
- 35) **Cornet P.B., Galant C., Eeckhout Y., Courtoy P.J., Marbaix E., Henriët P. (2005).** Regulation of matrix metalloproteinase-9/gelatinase B expression and activation by ovarian steroids and LEFTY-A/endometrial bleeding-associated factor in the human endometrium, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 1001–1011.
- 36) **Cunliffe R.N., Mahida Y.R., (2000).** Antimicrobial peptides in innate intestinal host defence. *Gut.*, 47: 16–17.
- 37) **Curry T.E. Jr, Osteen K.G. (2003).** The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr. Rev.* 24(4): 428-465.
- 38) **Das S.C., Isobe N., Nishibori M., Yoshimura Y. (2006).** Expression of transforming growth factor- β . isoforms and their receptors in utero-vaginal junction of hen oviduct in presence or absence of resident sperm with reference to sperm storage. *Reproduction.* 132: 781–790.
- 39) **de Sain-van der Velden M.G., Rabelink T.J., Reijngoud D.J., Gadellaa M.M., Voorbij H.A., Stellaard F., Kaysen G.A. (1998).** Plasma alpha 2 macroglobulin is increased in nephrotic patients as a result of increased synthesis alone. *Kidney Int.* 54(2):530-535.
- 40) **Diaz P.S., Solar P.A., Juica N.E., Orihuela P.A., Cardenas H., Christodoulides M., Vargas R., Velasquez L.A. (2012).** Differential expression of extracellular matrix components in the Fallopian tubes throughout the menstrual cycle. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10: 56.
- 41) **Donoghue D.J., Campbell R.M., Scanes C.G. (1990).** Effect of biosynthetic chicken growth hormone on egg production in White Leghorn hens. *Poult. Sci.* 69: 1818-1821.
- 42) **Dougherty D.C., Sanders M.M. (2005).** Estrogen action: revitalization of the chick oviduct model. *Trends Endocrinol. Metab.* 16: 414–419.
- 43) **Dunn I.C., Sharp P.J., Hocking P.M., (1990).** Effects of interactions between photostimulation, dietary restriction and dietary maize oil dilution on plasma-LH and ovarian and oviduct weights in broiler breeder females during rearing. *Br. Poult. Sci.* 31: 415–427.
- 44) **Dunn I.C., Wilson P.W., Lu Z., Bain M.M., Crossan C.L., Talbot R.T., Waddington D. (2009).** New hypotheses on the function of the avian shell gland derived from microarray analysis comparing tissue from juvenile and sexually mature hens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 163(1-2): 225-232.

- 45) **Duong T. D.; Erickson C. A. (2004).** MMP-2 plays an essential role in producing epithelial-mesenchymal transformations in the avian embryo. *Dev. Dyn.* 229: 42–53.
- 46) **Egeblad M., Werb Z. (2002).** New functions for matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev.* 2: 161–173.
- 47) **Elliott R.L., Blobe G.C. (2005).** Role of transforming growth factor b in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 23: 2078–2093.
- 48) **Emara M., Woźniak M. (1999).** Role of metalloproteinases in cancer cell invasiveness. *Diagn. Lab.* 35: 381-397.
- 49) **Etches R.J., Petite J.N., Anderson-Langmuir C.E. (1984).** Interrelationships between the hypothalamus, pituitary gland, ovary, adrenal gland, and the open period for LH release in the hen (*Gallus domesticus*). *J. Exp. Zool.* 232(3): 501-511.
- 50) **Fingleton B. (2003).** Matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy: the current situation and future prospects. *Expert Opin. Ther. Targets.* 7(3): 385-397.
- 51) **Fowlkes, J.L., Enghild J.J., Suzuki K., Nagase, H. (1994).** Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J. Biol. Chem.* 269: 25742–25746.
- 52) **Freitas S., Meduri G., Le Nestour E., Bausero P., Perrot-Appianat M. (1999).** Expression of metalloproteinases and their inhibitors in blood vessels in human endometrium, *Biol. Reprod.* 61: 1070–1082.
- 53) **Fukuda Y., Masuda Y., Kishi J., et al. (1988).** The role of interstitialcollagens in cleft formation of mouse embryonic submandibulargland during initial branching. *Development.* 103: 259–267.
- 54) **Gabler C., Killian G.J., Einspanier R., (2001).** Differential expression of extracellular matrix components in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction.* 122: 121–130.
- 55) **Gacko M. (2001).** Mechanizmy aktywacji, znaczenie biologiczne i inhibitory metalloproteaz macierzy międzykomórkowej. *Post. Hig. Med. Do.* 2: 303-318.
- 56) **Gilbert A.B. (1979).** Female genital organs. [In]: *Form and Function in Birds.* (A.S. King and J. McLelland, Eds) Academic Press, London and New York. 1: 237-360.
- 57) **Goffin F., Munaut C., Frankenne F., Perrier D'Hauterive S., Beliard A., Fridman V., Nervo P., Colige A., Foidart J.M. (2003).** Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cycling human endometrium, *Biol. Reprod.* 69: 976–984.
- 58) **Gonzalez G., Behringer R.R. (2009).** Dicer is required for female reproductive tract development and fertility in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 76: 678–688.
- 59) **Gorodeski G.I. (2007).** Estrogen decrease in tight junctional resistance involves matrix-metalloproteinase-7-mediated remodeling of occludin. *Endocrinology.* 148(1): 218-231.
- 60) **Ha Y., Tsukada A., Saito N., Shimada K. (2004).** Changes in mRNA expression of MMP-2 in the Müllerian duct of chicken embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 139: 131–136.
- 61) **Hahn J.N., Yong V.W. (2015).** EMMPRIN, an upstream regulator of MMPs, in CNS biology. *Matrix Biol.* pii: S0945-053X(15)00032-3.
- 62) **Hampton A.L., Salamonsen L.A. (1994).** Expression of messenger ribonucleic acid encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors is related to menstruation, *J. Endocrinol.* 141: R1–R3.

- 63) **Harris K.S., Zhang Z., McManus M.T., Harfe B.D., Sun X. (2006).** Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *PNAS*. 103: 2208–2213.
- 64) **Helvering L.M., Adrian M.D., Geiser A.G., Estrem S.T., Wei T., Huang S., Chen P., Dow E.R., Calley J.N., Dodge J.A., Grese T.A., Jones S.A., Halladay D.L., Miles R.R., Onyia J.E., Ma Y.L., Sato M., Bryant H.U. (2005).** Differential effects of estrogen and raloxifene on messenger RNA and matrix metalloproteinase 2 activity in the rat uterus. *Biol. Reprod.* 72(4): 830–841.
- 65) **Henriet P., Cornet P.B., Lemoine P., Galant C., Singer C.F., Courtoy P.J., Eeckhout Y., Marbaix E. (2002).** Circulating ovarian steroids and endometrial matrix metalloproteinases (MMPs), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 955: 119–138.
- 66) **Heryanto B., Yoshimura Y., Tamura T. (1997a).** Cell proliferation in the process of oviducal tissue remodeling during induced molting in hens. *Poult. Sci.* 76: 1580–1586.
- 67) **Heryanto B., Yoshimura Y., Tamura T., Okamoto T. (1997b).** Involvement of apoptosis and lysosomal hydrolase activity in the oviductal regression during induced molting in chickens: a cytochemical study for end labeling of fragmented DNA and acid phosphatase. *Poult. Sci.* 76: 67–72.
- 68) **Hincke M.T., Nys Y., Gautron J., Mann K., Rodriguez-Navarro A.B., McKee M.D. (2012).** The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front Biosci.* 1(17): 1266–1280.
- 69) **Hoffer A.P. (1971).** The ultrastructure and cytochemistry of the shell membrane-secreting region of the Japanese quail oviduct. *Am. J. Anat.* 131: 253–287.
- 70) **Hong X., Luense L.J., McGinnis L.K., Nothnick W.B., Christenson L.K. (2008).** Dicer1 is essential for female fertility and normal development of the female reproductive system. *Endocrinology.* 149: 6207–6212.
- 71) **Hoover G.N., Smith A.H. (1952).** Secretion of fluid by the shell gland of the laying hen. *Poult. Sci.* 37: 467–471.
- 72) **Hrabia A., Leśniak A., Sechman A. (2013a).** Changes of plasma estradiol concentration and expression of estrogen receptors in the oviduct of growing chicken. International Conference „New trends of research in animal sciences”. Kraków, p. 133.
- 73) **Hrabia A., Leśniak A., Sechman A. (2013b).** In vitro effects of TCDD, PCB126 and PCB153 on estrogen receptors, caspases and metalloproteinase-2 mRNA expression in the chicken shell gland. *Folia Biol. (Krakow).* 61(3-4): 277–282.
- 74) **Hrabia A., Leśniak-Walentyn A., Sechman A., Gertler A. (2014).** Chicken oviduct-the target tissue for growth hormone action: effect on cell proliferation and apoptosis and on the gene expression of some oviduct-specific proteins. *Cell Tissue Res.* 357(1): 363–372.
- 75) **Hrabia A., Paczoska-Eliasiewicz H., Rząsa J. (2001).** Rola histaminy w czynności jajowodu ptaków. *Rocz. Nauk. Zoot., Supl., z. 12:* 19–25.
- 76) **Hrabia A., Rząsa J., Paczoska-Eliasiewicz H., Słomczynska M. (2001).** Presence of histamine and mast cells in chicken oviduct. *Folia Biol. (Krakow).* 49(3-4): 265–271.
- 77) **Hrabia A., Wilk M., Rząsa J. (2008).** Expression of α and β estrogen receptors in the chicken ovary. *Folia Biol. (Kraków).* 56: 187–191.

- 78) **Hu J., Zhang X., Nothnick W.B., Spencer T.E. (2004).** Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the developing neonatal mouse uterus. *Biol. Reprod.* 71(5): 1598-1604.
- 79) **Hua H., Li M., Luo T., Yin Y. (2011).** Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 3853–3868.
- 80) **Huang S.S., Huang J.S. (2005).** TGF- β control of cell proliferation. *J. Cell. Biochem.* 96: 447–462.
- 81) **Huh M.I., Jung J.C. (2013).** Expression of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) in the testes of growing and adult chicken. *Acta Histochem.* 115(5): 475-480.
- 82) **Hutvagner G., Simard M.J. (2008).** Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 22–32.
- 83) **Imai K., Hiramatsu A., Fukushima D., Pierschbacher M.D., Okada Y. (1997).** Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: Identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Bio-chem. J.* 322: 809–814.
- 84) **Itoh Y., Ito N., Nagase H., Seiki M. (2008).** The second dimer interface of MT1-MMP, the transmembrane domain, is essential for prommp-2 activation on the cell surface. *J. Biol. Chem.* 283: 13053–13062.
- 85) **Ivarie R. (2006).** Competitive bioreactor hens on the horizon. *Trends Biotechnol.* 24(3): 99-101.
- 86) **Jabbour H.N., Kelly R.W., Fraser H.M., Critchley H.O. (2006).** Endocrine regulation of menstruation. *Endocr. Rev.* 27: 17–46.
- 87) **Jacoby S., Snapir N., Rozenboim I., Arnon E., Meidan R., Robinzon B. (1992).** Tamoxifen advances puberty in the White Leghorn hen. *Br. Poult. Sci.* 33: 101-111.
- 88) **Jensen E.V., Jordan V.C. (2003).** The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin. Cancer Res.* 9: 1980-1989.
- 89) **Jeong W., Kim J., Ahn S.E., Lee S.I., Bazer F.W., Han J.Y., Song G., (2012).** AHCYL1 is mediated by estrogen-induced ERK1/2 MAPK cell signaling and microRNA regulation to effect functional aspects of the avian oviduct. *PLoS ONE.* 7(11): e49204.
- 90) **Jeong W., Lim W., Ahn S.E., Lim C.H., Lee J.Y., Bae S.M., Kim J., Bazer F.W., Song G. (2013).** Recrudescence mechanisms and gene expression profile of the reproductive tracts from chickens during the molting period. *PLoS One.* 8(10): e76784.
- 91) **Jeziorska M., Nagase H., Salamonsen L.A., Woolley D.E. (1996).** Immunolocalization of the matrix metalloproteinases gelatinase B and stromelysin 1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J. Reprod. Fertil.* 107: 43–51.
- 92) **Johnson A.L. (2000).** Reproduction in the female. [In]: *Avian Physiology* (P.D. Sturkie, Eds), Fifth Edition, Academic Press, London, 22: 569-595.
- 93) **Jull M.A. (1952).** Physiology of reproduction. [In]: *Poultry breeding*. Ed. M.A. Jull, 3rd ed. New York: Wiley. 17-48.
- 94) **Jung J.G., Lim W., Park T.S., Kim J.N., Han B.K., Song G., Han J.Y. (2011).** Structural and histological characterization of oviductal magnum and lectin-binding patterns in *Gallus domesticus*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9: 62.
- 95) **Jung J.G., Lim W., Park T.S., Kim J.N., Han B.K., Song G., Han J.Y. (2011).** Structural and histological characterization of oviductal magnum and lectin-binding patterns in *Gallus domesticus*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9: 62.

- 96) **Kang T., Yi J., Guo A., Wang X., Overall C.M., Jiang W., Elde R., Borregaard N., Pei D. (2001).** Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/ MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J. Biol. Chem.* 276: 21960–21968.
- 97) **Kanwar Y.S., Ota K., Yang Q., Wada J., Kashihara N., Tian Y., Wallner E.I. Kaushik D.K. (1999).** Role of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT-1-MMP), MMP-2, and its inhibitor in nephrogenesis. *Am. J. Physiol.* 277: 34-47.
- 98) **Kida S., Iwaki M., Nakamura A., Miura Y., Takenaka A., Takahashi S., Noguchi T. (1994).** Insulin-like growth factor-I messenger RNA content in the oviduct of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*): changes during growth and development or after estrogen administration. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 109(2): 191-204.
- 99) **Kida S., Miura Y., Takenaka A., Takahashi S., Noguchi T. (1995).** Effects of insulin-like growth factor-I, estrogen, glucocorticoid, and transferrin on the mRNA contents of ovalbumin and conalbumin in primary cultures of quail (*Coturnix coturnix japonica*) oviduct cells. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 110(2): 157-164.
- 100) **Korostoff J.M., Wang J.F., Sarment D.P., Stewart J.C., Feldman R.S., Billings P.C. (2000).** Analysis of in situ protease activity in chronic adult periodontitis patients: expression of activated MMP-2 and a 40 kDa serine protease. *J. Periodontol.* 71(3): 353-360.
- 101) **Kwan J.A., Schulze C.J., Wang W., Leon H., Sariahmetoglu M., Sung M., Sawicka J., Sims D.E., Sawicki G., Schulz R. (2004).** Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *FASEB J.* 18: 690–692.
- 102) **Lazier C.B. (1987).** Interactions of tamoxifen in the chicken. *J. Steroid Biochem.* 27: 877-882.
- 103) **Leco K.J., Khokha R., Pavloff N., Hawkes S.P., Edwards D.R. (1994).** Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J. Biol. Chem.* 269(12): 9352-9360.
- 104) **Lee C., Lin C., Lin W., Liang K., Luo S., Wu C., Wang S., Yang C. (2007).** TNF- α induces MMP-9 expression via activation of Src/EGFR, PDGFR/PI3K/Akt cascade and promotion of NF- κ B/p300 binding in human tracheal smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292: 799–812.
- 105) **Lee K.S., Min K.H., Kim S.R., Park S.J., Park H.S., Jin G.Y., Lee Y.C. (2006).** Vascular endothelial growth factor modulates matrix metalloproteinase-9 expression in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 174: 161–170.
- 106) **Lelongt B., Trugnan G., Murphy G., Ronco P.M. (1997).** Matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 are produced in early stages of kidney morphogenesis but only MMP9 is required for renalorganogenesis in vitro. *J. Cell. Biol.* 136: 1363–1373.
- 107) **Leśniak A., Hrabia A. (2012).** Expression of matrix metalloproteinase-2 mRNA in the chicken ovary in relation to follicle remodelling. *Folia Biol (Krakow).* 60(3-4): 219-225.
- 108) **Lim W., Jeong W., Kim J.H., Lee J.Y., Kim J., Bazer F.W., Han J.Y., Song G. (2011).** Differential expression of alpha 2 macroglobulin in response to

- diethylstilbestrol and in ovarian carcinomas in chickens. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9: 137.
- 109) **Limb G.A., Matter K., Murphy G., Cambrey A.D., Bishop P.N., Morris G.E., Khaw P.T. (2005).** Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis. *Am. J. Pathol.* 166: 1555–1563.
 - 110) **Lisowski M., Bednarczyk M. (2005).** Effects of tamoxifen dose and nutrition scheme during growth on stimulation of the reproductive system in Cornish breed cocks. *Folia Biol. (Kraków)* 53: 1-6.
 - 111) **Liu C.J., Huang Y.L., Ju J.P., Lu C.L., Chiu A.W. (2004).** Altered transcripts expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in tenon capsule of patients with glaucoma. *J. Glaucoma.* 13: 486–491.
 - 112) **Liu X.X., Li X.J., Zhang B., Liang Y.J., Zhou C.X., Cao D.X., He M., Chen G.Q., He J.R., Zhao Q. (2011).** MicroRNA-26b is underexpressed in human breast cancer and induces cell apoptosis by targeting SLC7A11. *FEBS Lett.* 585: 1363–1367.
 - 113) **Lofts B., Murton R.K. (1973).** Reproduction in Birds. [In]: *Avian Biology* (D.S. Farner and J.R. Kings, Eds) Academic Press, London/New York. 3: 1-107.
 - 114) **Mann K. (2007).** The chicken egg white proteome. *Proteomics.* 7(19): 3558-3568.
 - 115) **Mengshol J.A., Vincenti M.P., Brinckerhoff C.E. (2001).** IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways. *Nucl. Acids Res.* 29: 4361–4372.
 - 116) **Miettinen P.J., Ebner R., Lopez A.R., Derynck R. (1994).** TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J. Cell. Biol.* 127: 2021–2036.
 - 117) **Miralles F., Battelino T., Czernichow P., Scharfmann R. (1998).** TGF-beta plays a key role in morphogenesis of the pancreatic islets of Langerhans by controlling the activity of the matrix metalloproteinase MMP-2. *J. Cell. Biol.* 143: 827–836.
 - 118) **Mishra B., Kizaki K., Sato T., Ito A., Hashizume K. (2012).** The role of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) in the regulation of bovine endometrial cell functions. *Biol. Reprod.* 87(6): 149.
 - 119) **Mitsiades N., Yu W.H., Poulaki V., Tsokos M., Stamenkovic I. (2001).** Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumour cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res.* 61: 577–581.
 - 120) **Monroe D.G., Berger R.R., Sanders M.M. (2002).** Tissue-protective effects of estrogen involve regulation of caspase gene expression. *Mol. Endocrinol.* 16: 1322–1331.
 - 121) **Munck Petersen C., Christiansen B.S., Heickendorff L., Ingerslev J. (1988).** Synthesis and secretion of alpha 2-macroglobulin by human hepatocytes in culture. *Eur. J. Clin. Invest.* 18(5): 543-548.
 - 122) **Murphy G. (2011).** Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol.* 12(11): 233.
 - 123) **Murphy G., Nagase H. (2008).** Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol. Aspects Med.* 29(5): 290-308.
 - 124) **Murphy G., Nagase H. (2011).** Localizing matrix metalloproteinase activities in the pericellular environment. *FEBS J.* 278(1): 2-15.

- 125) **Nagaraja A.K., Andreu-Vieyra C., Franco H.L., Ma L., Chen R.H., Han D.Y., Zhu H.F., Agno J.E., Gunaratne P.H., DeMayo F.J. et al. (2008).** Deletion of Dicer in somatic cells of the female reproductive tract causes sterility. *Mol. Endocrinol.* 22: 2336–2352.
- 126) **Nagase H., Harris E.D. (1983).** Ovostatin: a novel proteinase inhibitor from chicken egg white. II. Mechanism of inhibition studied with collagenase and thermolysin. *J. Biol. Chem.* 258(12): 7490-7498.
- 127) **Nagase H., Visse R., Murphy G. (2006).** Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 69: 562–573.
- 128) **Nagase H., Woessner J.F. (1999).** Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274: 21491-21494.
- 129) **Noguchi Y., Sato T., Hirata M., Hara T., Ohama K., Ito A. (2003).** Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during the menstrual cycle in vivo and in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88(12): 6063-6072.
- 130) **Nothnick W.B. (2012).** The role of micro-RNAs in the female reproductive tract. *Reproduction.* 143(5): 559-576.
- 131) **Nothnick W.B., Healy C. (2010).** Estrogen induces distinct patterns of microRNA expression within the mouse uterus. *Reprod. Sci.* 17: 987–994.
- 132) **Nuttall R.K., Sampieri C.L., Pennington C.J., Gill S.E., Schultz G.A., Edwards D.R. (2004).** Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. *FEBS Lett.* 9563(1-3): 129-134.
- 133) **O'Rourke J.R., Georges S.A., Seay H.R., Tapscott S.J., McManus M.T., Goldhamer D.J., Swanson M.S., Harfe B.D. (2007).** Essential role for Dicer during skeletal muscle development. *Dev. Biol.* 311: 359–368.
- 134) **Otsuka M., Zheng M., Hayashi M., Lee J.D., Yoshino O., Lin S., Han J. (2008).** Impaired microRNAs processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. *J. Clin. Invest.* 118: 1944–1954.
- 135) **Paczoska-Eliasiewicz H., Gertler A., Proszkowiec M., Proudman J., Hrabia A., Sechman A., Mika M., Jacek T., Cassy S., Raver N., Rząsa J. (2003).** Attenuation by leptin of the effects of fasting on ovarian functions in hens (*Gallus domesticus*). *Reproduction.* 126: 739-751.
- 136) **Page-McCaw A., Ewald A.J., Werb Z. (2007).** Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 221-233.
- 137) **Persons A.H. (1982).** Structure of the egg shell. *Poult. Sci.* 61: 2013.
- 138) **Proszkowiec M., Rząsa J. (2001).** Variation in the ovarian and plasma progesterone and estradiol levels of the domestic hen during a pause in laying. *Folia Biol. (Kraków).* 49: 285-289.
- 139) **Rajah R., Katz L., Nunn S., Solberg P., Beers T., Cohen P. (1995).** Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteases: Functional regulators of cell growth. *Prog. Growth Factor Res.* 6: 273–284.
- 140) **Rawdanowicz T.J., Hampton A.L., Nagase H., Woolley D.E., Salamonsen L.A. (1994).** Matrix metalloproteinase production by cultured human endometrial stromal cells: identification of interstitial collagenase, gelatinase-A, gelatinase-B, and stromelysin-1 and their differential regulation by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79: 530–536.
- 141) **Ray J.M., Stetler-Stevenson W.G. (1994).** The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur. Respir. J.* 7: 2062–2072.

- 142) **Réhault-Godbert S., Gautron J., Labas V., Belghazi M., Nys Y. (2008).** Identification and characterization of the precursor of chicken matrix metalloprotease 2 (pro-MMP-2) in hen egg. *J. Agric. Food Chem.* 156(15): 6294-6303.
- 143) **Ribatti D., Nico B.; Vacca A.; Iurlaro M.; Roncali L. (1999).** Temporal expression of the matrix metalloproteinase MMP-2 correlates with fibronectin immunoreactivity during the development of the vascular system in the chick embryo chorioallantoic membrane. *J. Anat.* 195 (Pt 1): 39–44.
- 144) **Ricke W.A., Smith G.W., Smith M.F. (2002).** Matrix metalloproteinase expression and activity following prostaglandin F2a-induced luteolysis. *Biol. Reprod.* 66: 685–691.
- 145) **Rodgers W.H., Osteen K.G., Matrisian L.M., Navre M., Giudice L.C., Gorstein F. (1993).** Expression and localization of matrilysin, a matrix metalloproteinase, in human endometrium during the reproductive cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 168: 253–260.
- 146) **Romanoff A.L., Romanoff A.J. (1949).** *The Avian Egg.* John Wiley and Sons, New York.
- 147) **Rose-Martel M., Smiley S., Hincke M.T. (2015).** Novel identification of matrix proteins involved in calcitic biomineralization. *J. Proteomics.* 116: 81-96.
- 148) **Roychoudhury S., Kasperczyk K., Łakota P., Bulla J., Bednarczyk M. (2010).** The oviduct of transgenic birds as a source of therapeutic proteins. *Assam University Journal of Science and Technology.* 5: 134-146.
- 149) **Rudolph-Owen L.A., Slayden O.D., Matrisian L.M., Brenner R.M., (1998).** Matrix metallo- proteinase expression in *Macaca mulatta* endometrium: evidence for zone-specific regulatory tissue gradients. *Biol. Reprod.* 59: 1349–1359.
- 150) **Russo L.A., Peano B.J., Trivedi S.P., Cavalcanto T.D., Olenchock B.A., Caruso J.A., Smolock A.R., Vishnevsky O., Gardner R.M. (2009).** Regulated expression of matrix metalloproteinases, inflammatory mediators, and endometrial matrix remodeling by 17beta-estradiol in the immature rat uterus. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7: 124.
- 151) **Rzasa J. (1984).** The effect of arginine vasitocin on prostaglandin production of the hen uterus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 53: 260-263.
- 152) **Rzasa J., Paczoska-Eliasiewicz H. (1989).** Effect of indometacin and vasotocin on oviposition in the hen (*Gallus domesticus*). *Acta. Physiol. Pol.* 40: 111-115.
- 153) **Rzasa J., Sechman A., Paczoska-Eliasiewicz H., Hrabia A. (2009).** Effect of tamoxifen on sex steroid concentrations in chicken ovarian follicles. *Acta Vet. Hung.* 57(1): 85-97.
- 154) **Salevsky E., Leach R.M. (1980).** Studies on the organic components of shell gland fluid and the hens eggshell. *Poult. Sci.* 59: 438-443.
- 155) **Saxena I., Tayyab S. (1997).** Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. *Cell. Mol. Life Sci.* 53(1): 13-23.
- 156) **Schaller J., Gerber S., Kaempfer U., Trachsel C. (2008).** *Human Blood Plasma Proteins, Structure and Function.* Wiley. 845-867.
- 157) **Sechman A., Hrabia A., Paczoska-Eliasiewicz H., Rzasa J. (2004).** Tamoxifen decreases level of immunoglobulins in blood of the hen (*Gallus domesticus*) without alteration in non-immunoglobular fractions of plasma proteins. *J. Vet. Med. A* 51: 273-276.

- 158) **Seo H.W., Park J.Y., Lee H.C., Kim D., Song Y.S., Lim J.M., Song G., Han J.Y. (2009).** Physiological effects of diethylstilbestrol exposure on the development of the chicken oviduct. *J. Anim. Sci. Technol.* 51: 485–492.
- 159) **Shahed A., Young K.A. (2008).** Differential activity of matrix metalloproteinases (MMPs) during photoperiod induced uterine regression and recrudescence in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Mol. Reprod. Dev.* 75(9): 1433-1440.
- 160) **Simkiss K., Taylor T.G. (1971).** Shell formation. [In]: *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*. (D.J. Bell i B.M. Freeman, Eds), Academic Press, London. 3: 1331-1344.
- 161) **Singer C.F., Marbaix E., Lemoine P., Courtoy P.J., Eeckhout Y. (1999).** Local cytokines induce differential expression of matrix metalloproteinases but not their tissue inhibitors in human endometrial fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* 259: 40–45.
- 162) **Solomon S.E. (1975).** Studies on the isthmus region of the domestic fowl. *Br. Poult. Sci.* 16: 255-258.
- 163) **Song G., Seo H.W., Choi J.W., Rengaraj D., Kim T.M., Lee B.R., Kim Y.M., Yun T.W., Jeong J.W., Han J.Y. (2011).** Discovery of candidate genes and pathways regulating oviduct development in chickens. *Biol. Reprod.* 85(2): 306-314.
- 164) **Stearns M.E., Rhim J., Wang M. (1999).** Interleukin 10 (IL-10) inhibition of primary human prostate cell-induced angiogenesis: IL-10 stimulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and inhibition of matrix metalloproteinase (MMP)-2/MMP-9 secretion. *Clin. Cancer Res.* 5(1): 189-196.
- 165) **Sternlicht M.D., Werb Z. (2001).** How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 463–516.
- 166) **Strand S., Vollmer P., van de Abeelen L., Gottfried D., Alla V., Heid H., Kuball J., Theobald M., Galle P.R., Strand D. (2004).** Cleavage of CD95 by matrix metalloproteinase-7 induces apoptosis resistance in tumor cells. *Oncogene.* 23: 3732–3736.
- 167) **Sundaresan N.R., Anish D., Sastry K.V., Saxena V.K., Mohan J., Ahmed K.A. (2007).** Cytokines in reproductive remodeling of molting White Leghorn hens. *J. Reprod. Immunol.* 73(1): 39-50.
- 168) **Sutherland R.L. (1981).** Estrogen antagonists in chick oviduct: antagonist activity of eight synthetic triphenylethylene derivatives and their interactions with interactions with cytoplasmic and nuclear estrogen receptors. *Endocrinology* 109: 2061-2068.
- 169) **Thrailkill K.M., Quarles L.D., Nagase H., Suzuki K., Serra D.M., Fowlkes, J.L. (1995).** Characterization of insulin- like growth factor-binding protein 5-degrading proteases produced throughout murine osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 136: 3527–3533.
- 170) **Vaillant C., Meissirel C., Mutin M., Belin M.F., Lund L.R., Thomasset N. (2003).** MMP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migration, and apoptosis in the developing cerebellum. *Mol. Cell. Neurosci.* 24(2): 395-408.
- 171) **Valenti P., Antonini G., Von Hunolstein C., Visca P., Orsi N., Antonini E. (1983).** Studies of the antimicrobial activity of ovotransferrin. *Int. J. Tissue React.* 5: 97–105.
- 172) **van Beurden H.E., Snoek P.A., Von den Hoff J.W., Torensma R., Maltha J.C., Kuijpers-Jagtman A.M. (2005).** Dynamic protein expression patterns during intraoral wound healing in the rat. *Eur. J. Oral Sci.* 113(2): 153-158.

- 173) **Vandenbroucke R.E., Libert C. (2014).** Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat. Rev. Drug Discov.* 13(12): 904-927.
- 174) **Vassilev V., Pretto C.M., Cornet P.B., Delvaux D., Eeckhout Y., Courtoy P.J., Marbaix E., Henriët P. (2005).** Response of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases messenger ribonucleic acids to ovarian steroids in human endometrial explants mimics their gene- and phase-specific differential control in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 5848–5857.
- 175) **Vassilev V., Pretto C.M., Cornet P.B., Delvaux D., Eeckhout Y., Courtoy P.J., Marbaix E., Henriët P. (2005).** Response of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases messenger ribonucleic acids to ovarian steroids in human endometrial explants mimics their gene- and phase-specific differential control in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90(10): 5848-5857.
- 176) **Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.A. (2007).** Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 318: 1931–1934.
- 177) **Vu T.H., Werb Z. (2000).** Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 14(17): 2123-2133.
- 178) **Wang Z., Juttermann R., Soloway P.D. (2000).** TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo. *J. Biol. Chem.* 275: 26411–26415.
- 179) **Warren D.C., Conrad R.M. (1942).** Time of pigment deposition in brown-shelled hen eggs and in turkey eggs in the domestic fowl. *Poult. Sci.* 21: 515.
- 180) **Webster A.B. (2003).** Physiology and behavior of the hen during induced molt. *Poult. Sci.* 82: 992–1002.
- 181) **Werb Z. (1997).** ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell.* 91: 439–442.
- 182) **White H.B., (1987).** III. Vitamin-binding proteins in the nutrition of the avian embryo. *J. Exp. Zool. Suppl.* 1: 53–63.
- 183) **Whiteside E.J., Jackson M.M., Herington A.C., Edwards D.R., Harvey M.B. (2001).** Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are key regulators of extracellular matrix degradation by mouse embryos. *Biol. Reprod.* 64(5): 1331-1337.
- 184) **Wyburn G.M., Johnston H.S., Draper M.H., Davidson M.F. (1970).** The fine structure of the infundibulum and magnum of the oviduct of *Gallus domesticus*. *Quart. Exp. Physiol.*, 55: 213-232.
- 185) **Wyburn G.M., Johnston H.S., Draper M.H., Davidson M.F. (1973).** The ultrastructure of the shell forming region of the oviduct and the development of the shell of *Gallus domesticus*. *Quart. Exp. Physiol.*, 58: 143-151.
- 186) **Yamamoto K., Murphy G., Troeberg L. (2015).** Extracellular regulation of metalloproteinases. *Matrix Biol.* (in press).
- 187) **Yang Y., Rosenberg G.A. (2015).** Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke. *Brain Res.* (in press).
- 188) **Yu M., Wang H., Xu Y., Yu D., Li D., Liu X., Du W. (2015).** Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) promotes myoblast proliferation and skeletal muscle growth of embryonic chickens via the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell. Biol. Int.* doi: (in press).
- 189) **Yu Q., Stamenkovic I. (2000).** Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14: 163–176.
- 190) **Yu, J. Y-L., Marquardt R.R. (1973).** Development, cellular growth and function of the avian oviduct: I. *Biol. Reprod.* 8: 283-298.

- 191) **Zahner G., Harendza S., Müller E., Wolf G., Thaiss F., Stahl R. (1997).** Prostaglandin E2 stimulates expression of matrix metalloproteinase 2 in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int.* 51: 1116–1123.
- 192) **Zampini R., Argañaraz M.E., Miceli D.C., Apichela S.A. (2014).** Detection of the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2 in llama (*Lama glama*) oviduct. *Reprod. Domest. Anim.* 49(3): 492-498.
- 193) **Zhang X., Christenson L.K., Nothnick W.B. (2007).** Regulation of MMP-9 expression and activity in the mouse uterus by estrogen. *Mol. Reprod. Dev.* 74(3): 321-331.
- 194) **Zhang X., Healy C., Nothnick W.B. (2012).** Estrogen suppresses expression of the matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) within the mouse uterus. *Endocrine.* 42(1): 97-106.
- 195) **Zhao H., Bernardo M.M., Osenkowski P., Sohail A., Pei D., Nagase H., Kashiwagi M., Soloway P.D., DeClerck Y.A., Fridman R. (2004).** Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *J. Biol. Chem.* 279: 8592–8601.
- 196) **Zhu G., Kang L., Wei Q., Cui X., Wang S., Chen Y., Jiang Y. (2014).** Expression and regulation of MMP1, MMP3, and MMP9 in the chicken ovary in response to gonadotropins, sex hormones, and TGFB1. *Biol. Reprod.* 90(3): 57.