

VI. STRESZCZENIE

Zarówno kisspeptyny (KiSS-1), jak i leptyna odgrywają istotną rolę w procesie dojrzewania płciowego u owiec poprzez aktywację osi podwzgórzowo-przysadkowo-jajnikowej. Hormony osi tyreotropowej także uczestniczą w regulacji procesów reprodukcyjnych u przeżuwaczy. Brak jednak danych dotyczących zależności pomiędzy układem KiSS-1/GPR54 (receptor związany z białkiem G), leptyną, hormonami osi tyreotropowej a czasem rozpoczęcia dojrzałości płciowej. W związku z powyższym, celem pracy była analiza zależności pomiędzy dziennymi przyrostami masy ciała, ekspresją układu KiSS-1/GPR54 w przysadce gruczołowej, osoczym stężeniem leptyny, kisspeptyny-10 (KiSS-10), hormonu tyreotropowego (TSH) oraz wolnej tyroksyny (fT4) a terminem pierwszej owulacji u owiec predysponowanych do opóźnienia dojrzewania płciowego oraz u owiec kontrolnych. Ponadto oceniany był wpływ leptyny na wydzielanie KiSS-10, jak również ekspresję mRNA KiSS-1 i mRNA GPR54 w komórkach przysadki jarek *in vitro*. Analizie w warunkach *in vitro* zostało poddane również oddziaływanie leptyny oraz kisspeptyny-10 na wydzielanie TSH.

Doświadczenie przeprowadzono na owcach wysokoplennej linii SCP: 114 dorosłych maciorkach i 64 jarkach będących ich potomstwem, wyselekcjonowanych ze względu na typ ciąży i masę ciała matek. Nowo narodzone jagnięta zostały podzielone na cztery grupy: IS – jarki pochodzące z ciąży pojedynczej, będące potomstwem owiec o prawidłowej masie ciała (bez predyspozycji do opóźnienia dojrzewania płciowego); IT – jarki pochodzące z ciąży bliźniaczej, będące potomstwem owiec o prawidłowej masie ciała (predysponowane do opóźnienia dojrzewania płciowego wskutek niskiej urodzeniowej masy ciała, wynikającej z ciąży mnogiej); IIS – jarki pochodzące z ciąży pojedynczej, będące potomstwem owiec o wysokiej masie ciała (predysponowane do opóźnienia dojrzewania płciowego wskutek niskiej urodzeniowej masy ciała wynikającej z otyłości matek) i IIT – jarki pochodzące z ciąży bliźniaczej, będące potomstwem owiec o wysokiej masie ciała (predysponowane do opóźnienia dojrzewania płciowego wskutek niskiej urodzeniowej masy ciała wynikającej z ciąży mnogiej i otyłości matek). Jarki były ważone co dwa tygodnie od urodzenia do momentu ukończenia ósmego miesiąca życia. Od czwartego do ósmego miesiąca życia pobierana była krew z żyły szyjnej zewnętrznej. Następnie, obliczano dzienne przyrosty masy ciała oraz analizowano osocze stężenie KiSS-10, leptyny, TSH i fT4 metodą ELISA z użyciem specyficznych gatunkowo przeciwciał. Równocześnie metodą laparoskopową monitorowana była aktywność jajników. W przysadkach gruczołowych izolowanych

od losowo wybranych owiec w wieku sześciu, siedmiu i ośmiu miesięcy, określana była ekspresja mRNA KiSS-1 i receptorów GPR54 metodą Real-Time PCR. Ponadto, przysadki mózgowie zostały pobrane od jarek w celu założenia hodowli pierwotnych *in vitro*. Komórki przysadki gruczołowej były hodowane w podłożu McCoy 5A: 1) bez hormonów (kontrola); 2) z leptyną (10^{-10} - 10^{-5} M); 3) z KiSS-10 (10^{-11} - 10^{-5} M); 4) z peptydem 234 (antagonistą receptora GPR54, 10^{-7} M); 5) z KiSS-10 (10^{-11} - 10^{-5} M) i peptydem 234 (10^{-7} M). Następnie zbierano podłoże w celu oznaczenia stężenia KiSS-10 i TSH metodą ELISA. Równocześnie określany był indeks proliferacji komórek celem obliczenia wydzielania ww. hormonów. Analizowano również poziom ekspresji mRNA KiSS-1 i mRNA GPR54 w komórkach przysadki gruczołowej metodą Real-Time PCR.

Wyniki uzyskane podczas doświadczeń zrealizowanych w warunkach *in vivo* wskazują, że wiek, w którym owce osiągały dojrzałość płciową uzależniony był od typu ciąży, z której pochodziły (pojedyncza/bliźniacza) oraz masy ciała i stężenia leptyny w osoczu krwi matek. Pochodzenie z ciąży mnogiej, jak również wysoka masa ciała i wysokie stężenie leptyny w osoczu krwi matki należały do czynników predysponujących do opóźnienia dojrzewania płciowego. Zaobserwowano, iż wzrost stężenia leptyny w osoczu krwi jarek (do wartości $3,35 \pm 0,26$ - $3,60 \pm 0,19$ ng/mL) był dodatnio skorelowany z podwyższeniem osoczkowego stężenia kisspeptyny-10 (do wartości $31,26 \pm 1,54$ - $32,24 \pm 2,25$ ng/mL) oraz poziomu ekspresji mRNA KiSS-1 w przysadce gruczołowej. Ten status hormonalny związany był z wystąpieniem pierwszej owulacji u owiec. Natomiast poziom ekspresji mRNA GPR54 w przysadce mózgowej jarek obniżał się w czasie pierwszej owulacji. Z kolei brak owulacji w pierwszym sezonie rozplodowym u owiec pochodzących z ciąży mnogiej i będących potomstwem matek o wysokiej masie ciała związany był z niską masą urodzeniową, wysokimi dziennymi przyrostami od 110 do 240 dnia życia, przedwczesnym, ponadfizjologicznym wzrostem stężenia leptyny, utrzymującym się równocześnie niskim poziomem KiSS-10 w osoczu krwi oraz niskim poziomem ekspresji mRNA KiSS-1 w przysadce mózgowej. Również aktywność wydzielnicza tarczycy owiec w okresie dojrzewania płciowego uzależniona była od typu ciąży (pojedyncza/bliźniacza), masy ciała i stężenia leptyny we krwi matek. Wzrost stężenia wolnej tyroksyny połączony z obniżeniem poziomu TSH w osoczu krwi był skorelowany z wystąpieniem pierwszej owulacji.

W efekcie badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* wykazano, że wydzielanie TSH przez komórki przysadki owiec było uzależnione od stężenia leptyny: 10^{-10} - 10^{-6} M leptyny powodowało wzrost sekrecji TSH, podczas gdy najwyższe z zastosowanych stężeń

leptyny (10^{-5} M) obniżało wydzielanie hormonu tyreotropowego w porównaniu do kontroli. Uzyskane wyniki wskazują także, że leptyna w stężeniach 10^{-10} do 10^{-7} M stymulowała ekspresję mRNA KiSS-1, jak również sekrecję KiSS-10 przez komórki przedniego płata przysadki mózgowej jarek. Natomiast, najwyższe z zastosowanych stężeń leptyny (10^{-5} M) powodowało znaczące obniżenie poziomu ekspresji KiSS-1 i wydzielania KiSS-10 w porównaniu do kontroli. Zaobserwowano także, że kisspeptyna-10 nie wywierała bezpośredniego wpływu na wydzielanie TSH *in vitro*, z wyjątkiem krótkotrwałej 2-godzinnej ekspozycji komórek przysadki owiec na działanie KiSS-10. KiSS-10 w stężeniach 10^{-11} – 10^{-8} M znacząco zwiększała w tych warunkach wydzielanie TSH.