

STRESZCZENIE

Cysty jajnikowe (CJ) są przyczyną 15-30% przypadków okresowej lub trwałej niepłodności u krów. Pierwotną ich formą są cysty pęcherzykowe. Etiologia cyst pęcherzykowych jest złożona, wieloczynnikowa i heterogenna, a patogeneza wielokierunkowa i wciąż nie do końca wyjaśniona. Rozwój cyst może być spowodowany m.in. szeregiem uwarunkowań hormonalnych, metabolicznych, środowiskowych i dziedzicznych.

Celem pracy było określenie znaczenia zmian stężenia kisspeptyn we krwi i płynie pęcherzykowym oraz ekspresji mRNA *kiss-1* i *kiss-1r* w komórkach jajników w patogenezie torbieli pęcherzykowych u krów.

W pierwszym etapie badań (*in vivo*) wykorzystano materiał kliniczny pochodzący od krów zdrowych cyklicznych (grupa I, n=12), krów zakwalifikowanych w pierwszym badaniu po porodzie jako zdrowe cykliczne, u których po pierwotnym pobraniu próbek krwi w kolejnym cyklu nie doszło do owulacji i stwierdzono torbiele pęcherzykowe (grupa II, n=12) oraz od krów z cystami pęcherzykowymi stwierdzonymi podczas diagnozowania ciąży min. 120 dni po porodzie (grupa III, n=10). Drugi etap badań, w warunkach *in vitro*, przeprowadzono z wykorzystaniem jajników wyizolowanych od krów zdrowych podczas uboju. W warunkach *in vivo* porównano stężenie kisspeptyny-10 w osoczu krwi i płynie pęcherzykowym pobranym od krów z cystami pęcherzykowymi i krów cyklicznych oraz podjęto próbę ustalenia markerowych wartości stężenia kisspeptyny-10 wskazujących na obecność cysty pęcherzykowej na jajniku. W celu ustalenia prognostycznych, w odniesieniu do ryzyka rozwoju cyst, wartości stężeń kisspeptyny-10, poddano analizie poziom tego neurohormonu w osoczu krwi krów w późnej fazie pęcherzykowej cyklu rujowego poprzedzającej powstanie cysty. Porównano także ekspresję mRNA kisspeptyn i ich receptorów KiSS1R w komórkach ziarnistych i komórkach osłonki wewnętrznej wyizolowanych z pęcherzyków jajnikowych oraz z cyst pęcherzykowych. Z kolei w warunkach *in vitro* analizie poddano wpływ leptyny na wydzielanie KiSS-10 przez komórki ziarniste pęcherzyka jajnikowego, a następnie określono wpływ KiSS-10 na wydzielanie 17 β -estradiolu przez komórki ziarniste pęcherzyków jajnikowych krów. Zbadano również oddziaływanie leptyny na ekspresję mRNA receptora leptyny (OB-Rb), mRNA KiSS-1, mRNA receptora KiSS1R w komórkach ziarnistych *in vitro*.

W efekcie przeprowadzonych badań stwierdzono, że stężenie KiSS-10 w osoczu krwi krów w okresie od 18 do 21 dnia cyklu rujowego poprzedzającego powstanie cysty pęcherzykowej jest ponad dwukrotnie niższe (12,65 +/- 3,60 ng/ml; zakres: 9,07 – 17,49 ng/ml), niż u krów zdrowych (28,78 +/- 2,61 ng/ml; zakres: 25,26-31,56 ng/ml). Wartości stężenia KiSS-10 w zakresie 9,00 – 17,50 ng/ml w 18-21 dniu cyklu rujowego można zatem wstępnie uznać za prognostyczne – wskazujące na zwiększone ryzyko anowulacji i powstania cysty pęcherzykowej w kolejnym cyklu. Natomiast, stężenie KiSS-10 w osoczu krwi krów ze zdiagnozowanymi cystami pęcherzykowymi w okresie 1-4 dni przed punkcją jest ponad dwukrotnie wyższe (64,03 +/- 3,86 ng/ml, zakres 59,97-68,56 ng/ml), niż u krów zdrowych (28,78 +/- 2,61 ng/ml; zakres: 25,26-31,56 ng/ml). Wartości stężenia KiSS-10 w zakresie 60,00-68,50 ng/ml można zatem wstępnie uznać za markerowe – wskazujące na obecność cysty pęcherzykowej na jajniku. W przypadku krów zdrowych cyklicznych średnie stężenie KiSS-10 wynosiło 28,78 +/- 2,61 ng/ml (zakres: 25,26-31,56 ng/ml). Wartości stężenia KiSS-10 w tym zakresie można zatem wstępnie uznać za prognostyczne – wskazujące na wystąpienie owulacji w danym cyklu rujowym. Ustalono także, że stężenie KiSS-10 w płynie pochodzącym z cyst pęcherzykowych jest około 1,6 razy wyższe, niż w płynie pęcherzykowym pochodzącym

z pęcherzyków preowulacyjnych. Ponadto, wykazano, że poziom ekspresji mRNA kisspeptyn jest znacząco wyższy ($p \leq 0,05$) w komórkach ziarnistych pochodzących z cyst pęcherzykowych w porównaniu do komórek wyizolowanych z pęcherzyków preowulacyjnych. Analiza poziomu ekspresji mRNA receptorów kisspeptyn wykazała odwrotną zależność. W efekcie badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* stwierdzono, że leptyna oddziałuje na wydzielanie kisspeptyn przez komórki ziarniste pęcherzyków jajnikowych krów w sposób zależny od czasu ekspozycji i stężenia. Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy ekspozycją komórek na leptynę w stężeniach 10^{-10} - 10^{-9} M a wydzielaniem KiSS-10. Równocześnie wykazano ujemną zależność pomiędzy leptyną w zakresie stężeń 10^{-8} - 10^{-5} M a sekrecją KiSS-10 z komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego. Ustalono również, że kisspeptyna-10 oddziałuje na wydzielanie 17β -estradiolu przez komórki ziarniste pęcherzyków jajnikowych krów w sposób zależny od czasu ekspozycji i stężenia. Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy ekspozycją komórek na kisspeptynę-10 w stężeniach 10^{-10} - 10^{-9} M a wydzielaniem 17β -estradiolu. Równocześnie wykazano ujemną zależność pomiędzy kisspeptyną-10 w zakresie stężeń 10^{-9} - 10^{-5} M a sekrecją 17β -estradiolu z komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego. Ponadto, ustalono, że ekspozycja komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego na leptynę w stężeniach 10^{-10} - 10^{-7} M powoduje w warunkach *in vitro* wzrost ekspresji mRNA *kiss1* w stosunku do kontroli. Natomiast leptyna w najwyższych z zastosowanych stężeń (10^{-6} - 10^{-5} M) znacząco ($p \leq 0,05$) obniża poziom mRNA *kiss1*. Analiza poziomu ekspresji mRNA receptorów kisspeptyn pod wpływem leptyny wykazała odwrotną zależność.

Uzyskane wyniki wskazują, że układ KiSS1/ KiSS1R może być istotnym elementem patogenezy cyst pęcherzykowych u krów nie tylko na poziomie podwzgórza i przysadki mózgowej, ale również na poziomie jajników. Znacząco ($p \leq 0,05$) niższe, niż u krów zdrowych, stężenie KiSS-10 w osoczu krwi w okresie od 18 do 21 dnia cyklu rujowego poprzedzającego powstanie cysty pęcherzykowej, na skutek niewystarczającego sygnału pobudzającego wydzielanie 17β -estradiolu z komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego, może być przyczyną braku prawidłowego przedowulacyjnego wyrzutu 17β -estradiolu warunkującego owulację i tym samym, powodować powstawanie cysty pęcherzykowej. Z kolei, istotnie ($p \leq 0,05$) wyższe, niż u krów zdrowych, stężenie KiSS-10 w osoczu krwi i płynie pochodzącym z cyst oraz znacząco wyższy poziom ekspresji mRNA kisspeptyn w komórkach ziarnistych pochodzących z cyst pęcherzykowych w porównaniu do komórek wyizolowanych z pęcherzyków preowulacyjnych, poprzez obniżenie poziomu ekspresji receptorów kisspeptyn w komórkach ziarnistych, może powodować podobny efekt związany z brakiem prawidłowego przedowulacyjnego wyrzutu 17β -estradiolu warunkującego owulację i, tym samym, zachować status hormonalny odpowiedzialny za utrzymanie cysty i brak owulacji w kolejnych cyklach rujowych. Precyzyjne ustalenie udziału układu KiSS1/ KiSS1R w patogenezie cyst pęcherzykowych u krów wymaga jednak dalszych badań w warunkach *in vivo*, z uwzględnieniem nie tylko materiału klinicznego i pochodzącego z ubojni, ale również próbek o charakterze doświadczalnym, pozyskanym od krów poddanych działaniu różnych dawek KiSS-10 w celu oceny ich oddziaływania na aktywność jajników.