Streszczenie

Owce należą do reproduktorów dnia krótkiego, u których sygnałem do rozpoczęcia rui są warunki skracającego się dnia i wydłużającej się nocy. U tych zwierząt, wydłużanie dni pomiędzy przesileniem zimowym i letnim synchronizuje aktywność rozrodczą do odpowiedniej pory roku. Stosunkowo długie dni w okresie poprzedzającym przesilenie letnie działają hamująco na aktywność reprodukcyjną owiec i uniemożliwiają rozpoczęcie sezonu rozrodczego aż do późnego lata/wczesnej jesieni. Natomiast, skracanie się dnia w okresie pomiędzy przesileniem letnim a równonocą jesienną warunkuje utrzymanie prawidłowej intensywności i czasu trwania zbliżającego się okresu rozrodczego. Taka adaptacja rozrodu tych zwierząt do zmieniających się pór roku zapewnia, że potomstwo urodzi się i będzie odchowywane w okresie wiosenno-letnim, kiedy pokarmu jest najwięcej. Poza sezonowymi zmianami, stwierdzono również dzienną fluktuację aktywności neurohormonalnej osi podwzgórze-przysadka-gonady (HPG) kontrolującej proces reprodukcji. Aczkolwiek wydaje się, że wpływ ten może być odmienny u zwierząt aktywnych w dzień i w nocy. U gatunków nocnych wyrzut hormonu luteinizującego (LH) ma miejsce późnym popołudniem lub wczesnym wieczorem, podczas gdy u zwierząt dziennych zachowanie seksualne i wzrost stężenia LH obserwuje się bardzo wcześnie rano, tuż przed świtem i pojawieniem się sygnału świetlnego. Ponieważ dzienno-nocne zmiany aktywności osi HPG są ważne dla generowania wyrzutu LH w czasie optymalnym dla zwyczajów reprodukcyjnych zwierząt, czynniki zaburzające dobowy wzór wydzielania gonadotropin mogą znacznie zmniejszyć stopień powodzenia ich rozrodu. Postuluje się, że zarówno sezonowe, jak i dobowe zmiany aktywności osi HPG zależą od poziomu i czasu trwania krążącej we krwi melatoniny, hormonu syntetyzowanego głównie przez pinealocyty szyszynki w czasie braku sygnału świetlnego. Jednak mechanizm, przez który melatonina wpływa na proce rozrodu nie został jeszcze w pełni poznany. Chociaż niektóre doniesienia sugerują, że u zwierząt rozmnażających się sezonowo zarówno sezonowe, jak i okołodobowe zmiany w aktywności rozrodczej mogą wynikać z centralnego działania melatoniny, to raczej sądzi się, że melatonina wpływa na proces reprodukcji głównie poprzez oddziaływanie na wydzielanie gonadotropin w guzowatej części przysadki (*Pars Tuberalis*; PT), która jest jedyną częścią przysadki wykazującą ekspresję receptorów melatoninowych. Ponieważ za główną funkcję PT uważa się regulację i wspieranie aktywności wydzielniczej

części dalszej przysadki (*Pars Distalis*; PD), zmiany w wydzielaniu gonadotropin w PT mogą znacząco wpływać na aktywność wydzielniczą przedniego płata przysadki.

Nasze wcześniejsze badania wykazały, że stan zapalny zaburza aktywność osi HPG u owiec, zarówno na poziomie podwzgórza, jak i przysadki. Stwierdzono, że wywołanie odpowiedzi immunologicznej/zapalnej może wpływać na wydzielanie gonadotropin, szczególnie LH, poprzez hamowanie sekrecji hormonu uwalniającego gonadotropinę (GnRH) w podwzgórzu. Zaobserwowano również, że mediatory stanu zapalnego mogą bezpośrednio wpływać na wydzielanie LH w przednim płacie przysadki. Ponadto, wcześniejsze badania wykazały, że w komórkach przysadki występuje ekspresja zarówno cytokin prozapalnych, jak i odpowiadających im receptorów, co pozwala założyć, że zarówno krążące, jak i syntetyzowane lokalnie w komórkach przysadki mediatory zapalne mogą bezpośrednio zaburzać wydzielniczą aktywność tego gruczołu. Oddziałujące na poziomie przysadki mediatory zapalne mogą wpływać na układ hormonalny zaburzając między innymi proces rozrodu. Ze względu na udział PT w fotoperiodycznej kontroli reprodukcji, zbadanie wpływu stanu zapalnego na aktywność wydzielniczą tego obszaru przysadki wydaje się uzasadnione.

Dlatego też, celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie czy stan zapalny wywołany iniekcją endotoksyny bakteryjnej wpływa na sekrecję gonadotropin i ekspresję receptora GnRH (GnRHR) w PT owcy oraz czy oddziaływanie to jest zależne od pory doby (dzień/noc) i statusu rozrodczego zwierząt (sezon anestralny/faza pęcherzykowa cyklu rujowego).

Hipoteza badawcza zakładała, że stan zapalny wpływa na sekrecję LH w PT samicy owcy.

W celu weryfikacji hipotezy przeprowadzono trzy eksperymenty na samicach owcy rasy czarnogłówka. Miały one na celu:

- **Doświadczenie I** – określenie wpływu melatoniny na sekrecję LH w eksplantach PT samic owcy pobranych od zwierząt w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego różniących się statusem immunologicznym

– badanie *ex vivo* (***publikacja 1***);

- **Doświadczenie II** – zbadanie wpływu stanu zapalnego na nocną ekspresję genów cytokin prozapalnych: interleukiny (IL)-1β, IL-6 i czynnika martwicy nowotworu (TNF)α oraz ich receptorów w PT owcy, biorąc pod uwagę odmienne warunki fotoperiodyczne (dzień długi/dzień krótki) (***publikacja 2***);
-

- **Doświadczenie III** – określenie wpływu stanu zapalnego na ekspresję LH oraz GnRHR w PT owcy w sezonie anestralnym i fazie pęcherzykowej cyklu rujowego biorąc pod uwagę porę doby (dzień/noc) (***publikacja 3***).

Badania wykazały, że PT jest obszarem przysadki, w którym zachodzą oddziaływania pomiędzy układem rozrodczym a immunologicznym i melatoniną. Doświadczenie *ex vivo* wykazało, że stan zapalny obniża wrażliwość komórek gonadotropowych zlokalizowanych w PT na działanie GnRH, ponieważ eksplanty PT pochodzące od owiec traktowanych LPS charakteryzowały się istotnie niższym uwalnianiem LH pod wpływem stymulacji GnRH niż eksplanty pobrane od zwierząt kontrolnych. Stwierdzono także, że stan zapalny zmniejsza ekspresję genu GnRHR i receptora melatoniny MT1 w PT. Pierwsze doświadczenie *in vivo* wykazało, obecność transkryptu kodującego wszystkie badane prozapalne cytokiny i ich receptory w PT. Ponadto, stwierdzono, że odmienny fotoperiod (dzień długi i dzień krótki) wpływał na ekspresję genów kodujących niektóre badane cytokiny prozapalne i ich receptory w PT. Wykazano również, że PT pobrane od owiec traktowanych LPS w warunkach dnia krótkiego dnia charakteryzowały się wyższą ekspresją genów IL-6, glikoproteiny 130, TNFα i receptorów TNF typu I i II w porównaniu z tkankami pobranymi podczas fotoperiodu dnia długiego. Ponadto, drugie doświadczenie *in vivo* wykazało, że podanie LPS hamowało nocny wzrost ekspresji genu i białka LH w PT owiec w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego. Ponieważ u gatunków o aktywności dziennej nocna akumulacja białka LH w przysadce poprzedza wyrzut LH, zahamowanie nocnej akumulacji tego hormonu może istotnie opóźnić lub zakłócić wyrzut LH. Obniżenie wydzielania LH może wynikać ze zmniejszonej wrażliwości PT na działanie GnRH, ponieważ stan zapalny zmniejszał ekspresję receptora GnRH.

Podsumowując, otrzymane wyniki sugerują, że ogólnoustrojowy stan zapalny wywołany podaniem endotoksyny bakteryjnej zaburza syntezę LH w PT owcy. Jednakże wpływ stanu zapalnego na aktywność sekrecyjną PT zależy od warunków fotoperiodycznych. Występujące w trakcie stanu zapalnego zmiany w aktywności sekrecyjnej PT mogą być, przynajmniej częściowo, cytokiny prozapalne syntetyzowane lokalnie w komórkach PT. Przeprowadzone indukowane przez badania sugerują, że kolejnym mechanizmem, poprzez który stan zapalny wpływa na proces rozrodu zwierząt sezonowych może być zmniejszenie wrażliwości PT na działanie zarówno melatoniny, jak i GnRH prowadzące do zaburzania syntezy LH w tej części przysadki.