



**INSTYTUT FIZJOLOGII I ŻYWIENIA ZWIERZĄT**  
*im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk w Jabłonie*

**mgr KAROLINA HAZIAK**

**LIPOPOLISACHARYD JAKO BEZPOŚREDNI MODULATOR  
AKTYWNOŚCI UKŁADU  
PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWO-GONADOTROPOWEGO  
U OWCY – BADANIA *IN VIVO* ORAZ *IN VITRO***

Lipopolysaccharide as a direct modulator  
of hypothalamic-pituitary-gonadotropic system  
in ewe – *in vivo* and *in vitro* study

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**doctoral thesis**

**Promotor pracy:** **dr hab. Dorota Tomaszewska-Zaremba, prof. nadzw. IFiŻZ**  
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt  
*im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie*

**Promotor pomocniczy:** **dr Andrzej Przemysław Herman**  
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt  
*im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie*

**Recenzenci:** **prof. dr hab. Elżbieta Wasilewska-Dziubińska**  
Centrum Medyczne Kształcenia  
Podyplomowego Lekarzy w Warszawie

**prof. dr hab. Stanisław Okrasa**  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Jabłonna 2014

## 9. STRESZCZENIE

Stan zapalny, wywołany przez infekcje bakteryjne i wirusowe, wpływa na układ rozrodczy samicy, powodując zaburzenia w sekrecji osi podwzgórze-przysadka-gonady (HPG). W układach doświadczalnych do wywoływania stresu immunologicznego powszechnie stosuje się endotoksynę bakteryjną (lipopolisacharyd, LPS). LPS jest integralnym składnikiem ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, a na komórki docelowe działa przez Toll-podobny receptor 4 (TLR4). Wyniki wcześniejszych badań, wykazujących obecność TLR4 w podwzgórze, mogą wskazywać na zaangażowanie endotoksyny w hamowanie procesów rozrodczych już na poziomie ośrodkowego układu nerwowego (OUN).

Celem pracy doktorskiej było zweryfikowanie hipotezy badawczej zakładającej, że LPS podany dożylnie działa bezpośrednio poprzez receptory TLR4 na poziomie podwzgórza i przysadki, hamując aktywność osi HPG u dorosłych maciorek owcy.

Doświadczenie *in vitro* przeprowadzono na eksplantach przysadek pobranych od 12 owiec rasy czarnogłówka w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego. W doświadczeniu tym badano wpływ LPS na sekrecję hormonu luteinizującego (LH) z eksplantów przednich przysadek pobranych od owiec kontrolnych oraz od owiec wprowadzonych w stres immunologiczny przez dożylne podanie endotoksyny. Eksplanty przednich przysadek inkubowano w odpowiednich mediach hodowlanych (kontrolnym; z dodatkiem gonadoliberyny – GnRH; z dodatkiem GnRH i LPS; z dodatkiem GnRH, LPS i białka wiążącego LPS – LBP). Po zakończonej inkubacji w eksplantach przednich przysadek oznaczono ekspresję genów podjednostki  $\beta$  hormonu luteinizującego (LH- $\beta$ ), receptora dla GnRH (GnRH-R) oraz receptora TLR4 metodą real-time PCR. W zebranych próbkach mediów hodowlanych oznaczono poziom LH metodą radioimmunologiczną (RIA).

W eksplantach inkubowanych w mediach z dodatkiem samego LPS, jak i w mediach z dodatkiem LPS wraz z LBP stwierdzono zmniejszone uwalnianie LH zarówno w grupie owiec kontrolnych, jak i owiec wprowadzonych w stres immunologiczny w porównaniu z eksplantami inkubowanymi w medium z GnRH. Dodanie samego LPS (bez LBP) do mediów, w których inkubowano przysadki pobrane od zwierząt kontrolnych, nie wpłynęło na ekspresję genu LH- $\beta$  w eksplantach, natomiast dodatek LBP okazał się niezbędny do obniżenia poziomu mRNA dla LH- $\beta$  w tych eksplantach. W eksplantach od owiec, którym dożylnie podano endotoksynę, odpowiedź na LPS była niezależna od obecności LBP w medium.



## STRESZCZENIE

Doświadczenie *in vivo* przeprowadzono na 20 maciorkach owcy rasy polska długowłnista w okresie fizjologicznego anestrus. Zwierzęta podzielono na cztery grupy badawcze, owcom z grupy kontrolnej i z grupy LPS podano dokomorowo płyn Ringera-Locke'a, z grupy anti-LPS przeciwciała anti-LPS, zaś z grupy anti-TLR4 przeciwciała wiążące komponenty receptora TLR4 (przeciwciała anti-LBP i anti-MD-2) w celu zablokowania tego receptora. Następnie owcom kontrolnym podano dożylnie sól fizjologiczną, a zwierzętom z pozostałych grup LPS. Pobierano próbki krwi, w których oznaczono poziom LH i kortyzolu metodą RIA. Pobrano struktury podwzgórza (pole przedwzrokowe – POA, przednie podwzgórze – AHA, brzuszno-przyśrodkowe podwzgórze – MBH, wyniosłość przyśrodkowa – ME) oraz w przedniej przysadce (AP), w których oznaczono poziom mRNA dla genów, GnRH, GnRH-R, LH $\beta$  oraz TLR4, stosując metodę real-time PCR.

Podanie LPS spowodowało spadek poziomu ekspresji genu GnRH zarówno w POA, jak i w ME. Centralne podanie przeciwciała anti-LPS do III komory mózgu, jak również zablokowanie komponentów receptora TLR4 istotnie zwiększyło, obniżoną po podaniu endotoksyny, ekspresję genu GnRH tylko w ME. Ponadto, zablokowanie receptora TLR4 (w grupie anti-TLR4) przywróciło do poziomu kontrolnego obniżoną, wskutek działania stresu immunologicznego, transkrypcję genu LH $\beta$  w AP. Podobnego efektu nie stwierdzono w przypadku obwodowego stężenia LH.

Podsumowując, wyniki prezentowanych badań wskazują, że endotoksyna bakteryjna może bezpośrednio modulować aktywność osi HPG u owcy na poziomie OUN. Wpływ LPS na sekrecję LH z przysadki może być zależny od stanu fizjologicznego/statusu immunologicznego zwierzęcia. Receptor TLR4, przynajmniej częściowo, uczestniczy w mechanizmie hamowania sekrecji GnRH/LH w czasie stresu immunologicznego na poziomie OUN.