

Bezpłodność, zakłócenia procesów owulacji i sekrecji gonadotropin są poważnymi schorzeniami cywilizacyjnymi, stwarzającymi istotne problemy zarówno medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej. Dotychczasowe badania nad rozrodem zwierząt przyczyniły się przede wszystkim do wyjaśnienia neuroendokrynych mechanizmów sekrecji gonadotropin w różnych stanach fizjologicznych zwierzęcia, także w warunkach stresogennych. Brak natomiast było informacji o ekspresji genu receptora GnRH (GnRH-R) w podwzgórzu owcy, oraz jego funkcji w regulacji ekspresji genu gonadoliberyny (GnRH) w różnych stanach fizjologicznych. Wyniki badań przeprowadzonych na gryzoniach laboratoryjnych skłoniły do wysunięcia hipotezy, według której te neurotransmitery i neuromodulatory, które stymulują sekrecję GnRH, stymulują również ekspresję genu tego hormonu. Zgodnie z tym założeniem - te układy neuralne, które hamują uwalnianie gonadoliberyny w wyniosłości pośrodkowej podwzgórza, powinny także hamować powstawanie mRNA dla tego neurohormonu.

Sprawdzając słuszność tej hipotezy, w badaniach stanowiących przedmiot niniejszej rozprawy dokonano kompleksowej analizy poziomów ekspresji genu GnRH oraz genu receptora tego neurohormonu w wybranych strukturach układu podwzgorzowo-przysadkowego owcy w różnych stanach fizjologicznych, także w warunkach stresogennych. Badano również wpływ aktywacji i blokowania układów neuralnych zaangażowanych w kontrolę sekrecji gonadotropin na poziomy mRNA GnRH i GnRH-R. Analizy te uzupełniono badaniem poziomu hormonu luteotropowego (LH) uwalnianego z przedniego płata przysadki mózgowej. Doświadczenia poświęcono więc procesom zaangażowanym w kontrolę aktywności układu gonadotropowego na poziomie molekularnym, a mając na uwadze tylko nieliczne istniejące wyniki badań różnych etapów ekspresji genu GnRH w podwzgórzu u owcy oraz brak informacji o ekspresji genu GnRH-R w tej strukturze, praca ta ma charakter poznawczy.

Szczegółowe cele pracy:

1. Określenie współzależności między poziomami ekspresji genu GnRH i genu receptora GnRH w układzie podwzgorzowo-przysadkowym a uwalnianiem GnRH/LH u owiec anestralnych oraz w fazach pęcherzykowej i ciała żółtego cyklu estralnego.
2. Zbadanie wpływu czynników stresogennych (krótkotrwałych i o przedłużonym działaniu) na poziom mRNA GnRH i mRNA GnRH-R w wybranych strukturach układu podwzgorzowo-przysadkowego owcy w poszczególnych okresach cyklu płciowego.

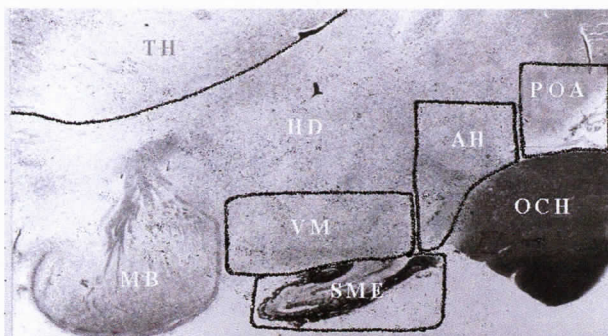
3. Określenie roli układów neuralnych hamujących uwalnianie GnRH/LH (β -endorfinergicznego i CRH-ergicznego) w regulacji ekspresji genu GnRH i genu GnRH-R w układzie podwzgorzowo-przysadkowym owiec estralnych.

Przedstawione doświadczenia przeprowadzono na samicach owiec rasy Merynos Polski, w różnych okresach cyklu płciowego. Wykonano 3 doświadczenia, używając łącznie 72 osobników, a na ich wykonanie uzyskano stosowne zezwolenia Lokalnej Komisji Etycznej.

Zwierzęta były dobrze zaaklimowane do warunków laboratoryjnych. Co najmniej przez miesiąc bezpośrednio poprzedzający rozpoczęcie badań przebywały w oddzielnych boksach, w naturalnym fotoperiodzie, z wolnym dostępem do wody i standardowej paszy dla owiec. W celu uniknięcia stresu izolacji zapewniono owcom stały wzrokowy kontakt z innymi osobnikami tego samego gatunku, utrzymywany także podczas wszelkich procedur doświadczalnych.

Doświadczenie 1 przeprowadzono na 18 owcach. Celem doświadczenia było określenie poziomów ekspresji mRNA dla GnRH i receptora GnRH w układzie podwzgorzowo-przysadkowym owcy w różnych stanach fizjologicznych: w sezonowym okresie anestrалnym oraz w fazach pęcherzykowej i ciała żółtego cyklu estralnego.

Poziom ekspresji badanych genów analizowano w wybranych strukturach obszaru przedwzrokowo-podwzgorzowego, pokazanych na Rys.1: POA - okolica przedwzrokowa, AH - przednie podwzgorze, VM - brzuszno-przyśrodkowe podwzgorze, SME - szypuła/wyniosłości pośrodkowej oraz w przednim płacie przysadki mózgowej (AP).



Rys. 1. Przekrój przez mózg owcy. Czarnymi liniami zakreślono pobierane struktury.

Doświadczenie 2 przeprowadzono na 24 owcach. Celem doświadczenia było zbadanie wpływu czynników stresogennych na poziom mRNA GnRH i mRNA GnRH-R w układzie podwzgórzowo-przysadkowym anestralnych owiec i samic w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego. Czynnikiem stresogennym były łagodne impulsy prądu elektrycznego ($I=3\text{mA}$) przekazywane na przednie kończyny zwierzęcia przez 3 godziny podczas jednego dnia (stres krótki), lub 5 godzin dziennie przez cztery kolejne dni (stres o przedłużonym działaniu).

Doświadczenie 3 przeprowadzono na 30 owcach. Celem tego doświadczenia było określenie funkcji układów: CRH-ergicznego i β -endorfinergicznego w regulacji ekspresji GnRH i GnRH-R u samic w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego. W zależności od grupy doświadczalnej zwierzętom infundowano domózgowo odpowiednio roztwory: CRH, antagonisty CRH, β -endorfiny lub naloksonu w dawce $20\mu\text{g/ml}$ płynu Ringera. Owce kontrolne otrzymywały analogiczne infuzje płynu Ringera.

Infuzje do III komory mózgu przeprowadzano w sposób pulsacyjny przy użyciu pompy mikroiniekcyjnej zaopatrzonej w jednocentymetrową strzykawkę, w odstępach 40-minutowych przez 5 godzin dziennie podczas 3 kolejnych dni, począwszy od 14 dnia cyklu. Owce otrzymywały po $2\mu\text{l}$ infundowanego roztworu w ciągu minuty, a dzienna dawka wynosiła $4\mu\text{g}$ odpowiedniego związku na jednego osobnika.

Podczas doświadczeń od wszystkich zwierząt pobierano próbki krwi, o objętości 4ml każda. Krew pobierano w odstępach 10-minutowych przez pięć kolejnych godzin, po czym przygotowywano surowice, w których oznaczano poziom LH standardową metodą radioimmunologiczną z użyciem podwójnych przeciwciał. Parametry pulsacyjnej sekrecji hormonu (częstotliwość i amplitudę pulsów) określano dla każdego osobnika stosując program komputerowy PC-PULSAR.

Po zakończeniu doświadczeń zwierzęta dekapitowano i *post mortem* pobierano odpowiednie struktury podwzgórza oraz przysadkę. Poziom ekspresji genów GnRH i GnRH-R w wyizolowanych tkankach określano przy użyciu techniki RT-PCR lub RT-PCR w czasie rzeczywistym (Real time RT-PCR) i wyrażano względem bydlęcego genu referencyjnego - dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH).

W przedstawionych badaniach własnych wykazano po raz pierwszy obecność mRNA GnRH-R w podwzgórzu owcy oraz określono współzależności między poziomami ekspresji genów GnRH i GnRH-R a uwalnianiem LH w układzie podwzgórzowo-przysadkowym u tego

gatunku. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują również, że w komórkach gonadotropowych może zachodzić ekspresja drugiej formy GnRH. Na taką możliwość wskazuje obecność dłuższego produktu reakcji PCR w tkance pochodzącej z gruczołu przysadki, oraz jego powielanie przez parę starterów zastosowaną w niniejszym układzie doświadczalnym do amplifikacji pierwszej formy neurohormonu.

Uzyskane wyniki można zreassumować następująco:

1. Wykazano, że ekspresja GnRH i GnRH-R w układzie podwzgórzowo-przysadkowym owcy jest zróżnicowana w poszczególnych okresach cyklu płciowego. Poziomy transkryptów obydwu badanych genów oraz stężenie LH w surowicy krwi u owiec w cyklu estralnym są wyższe niż u zwierząt w sezonie anestrалnym.
2. Poddanie owiec anestrалnych czynnikom stresogennym, zarówno krótkotrwałym, jak i o przedłużonym działaniu, spowodowało wzrost poziomów ekspresji genu GnRH oraz genu GnRH-R w okolicy przedwzrokowej, przednim- i brzuszno-przyśrodkowym podwzgórzem, oraz wzrost poziomów mRNA GnRH-R w wyniosłości pośrodkowej i w przednim płacie przysadki mózgowej. Zwiększoną sekrecję LH wykazano tylko u anestrалnych samic poddanych krótkotrwałej stymulacji. Podobny efekt do obserwowanego u anestrалnych owiec stwierdzono u samic w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego, poddanych czynnikom stresogennym o krótkotrwałym działaniu. Poziomy mRNA GnRH w podwzgórzem i mRNA GnRH-R w tej strukturze oraz w przysadce były istotnie wyższe w porównaniu z poziomami wykazanymi u zwierząt w grupie kontrolnej (nie poddanych działaniu czynników stresogennych). Ponadto krótkotrwała stymulacja indukowała wzrost sekrecji LH, podczas gdy przedłużone stosowanie stresora obniżało poziomy mRNA GnRH i mRNA GnRH-R w strukturach podwzgórzem (z wyjątkiem POA), a także uwalnianie LH z przedniego płata przysadki.
3. Infuzje CRH, β -endorfiny i ich antagonistów spowodowały odpowiednio obniżenie lub wzrost poziomów mRNA GnRH w podwzgórzem oraz sekrecji LH, i w różny sposób wpłynęły na ekspresję genu receptorowego w poszczególnych strukturach układu podwzgórzowo-przysadkowego. Aktywacja receptorów CRH wywołała wzrost ekspresji genu GnRH-R w okolicy przedwzrokowej i obniżyła wartość tego wskaźnika w podwzgórzem i przednim płacie przysadki mózgowej. Zablokowanie tych receptorów wywołało efekt przeciwny w porównaniu z odnotowanym po ich aktywacji. Aktywacja receptorów μ -opiodowych spowodowała wzrost poziomu mRNA GnRH-R

w okolicy przedwzrokowej i jego obniżenie w brzuszno-przyśrodkowym podwzgórzu, szypule/wyniosłości pośrodkowej oraz przysadce.

Przeprowadzone badania pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Wykazana po raz pierwszy w podwzgórzu owcy obecność transkryptu dla receptora GnRH może sugerować, że mRNA GnRH-R jest zaangażowany w kontrolę biosyntezy GnRH w neuronach podwzgórza i/lub uwalniania neurohormonu na zakończeniach nerwowych tych komórek.
2. Receptory GnRH mogą być zlokalizowane w różnych układach neuralnych podwzgórza, a ich wpływ na ekspresję genu GnRH i/lub uwalnianie gonadoliberyny zachodzi prawdopodobnie poprzez różnorodne mechanizmy.
3. Poziomy ekspresji genów GnRH i receptora GnRH w podwzgórzu oraz genu receptora GnRH w przednim płacie przysadki mózgowej zmieniają się w poszczególnych stanach fizjologicznych owiec.
4. Stres w specyficzny sposób moduluje ekspresję genów GnRH i GnRH-R; wpływ stresu zależy od stanu fizjologicznego zwierzęcia oraz czasu oddziaływania bodźca stresogennego. Istnienie pozytywnej zależności między zmianami ekspresji genów GnRH i GnRH-R a zmianami stężeń LH u owiec poddanych działaniu czynnika stresogennego w sezonie estralnym wskazuje, że zakłócenia sekrecji gonadotropin i procesów owulacyjnych w warunkach stresogennych mogą być następstwem nie tylko zmian w pulsacyjnym sposobie uwalniania GnRH, lecz także w biosyntezie tego hormonu i aktywnych form jego receptora.
5. Obecność drugiej formy GnRH (GnRH-II) w przysadce owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego poddanych działaniu ostrego stresu może wskazywać na udział tej drugiej formy neurohormonu w reakcji stresowej u cyklicznych samic. Być może działając auto- i/lub parakrynowo GnRH-II moduluje aktywność sekrecyjną komórek gonadotropowych przysadki.
6. Układy neuralne, które hamują uwalnianie GnRH/LH w cyklu estralnym: CRH-ergiczny i β -endorfinergiczny, obniżają poziom mRNA genu GnRH w podwzgórzu i wpływają na

ekspresję genu GnRH-R w tej strukturze a także w przednim płacie przysadki mózgowej. Istnienie pozytywnej zależności między zmianami ekspresji genu GnRH w podwzgórzu i GnRH-R w przysadce a zmianami stężeń LH, po aktywacji receptorów CRH i μ -opiodowych sugeruje, że regulacja sekrecji GnRH/LH przez CRH i β -endorfinę może zachodzić na poziomie molekularnym.

7. Zróżnicowane poziomy mRNA zarówno GnRH jak i GnRH-R, obserwowane w poszczególnych strukturach podwzgórza badanych owiec mogą być rezultatem różnic na wielu poziomach regulacyjnych: aktywność transkrypcyjna tych genów, stabilność /degradacja transkryptów, poziom biosyntezy GnRH i aktywnych form jego receptora. Dokładna analiza procesów postranskrypcyjnych powinna być przedmiotem kolejnych etapów tych badań, gdyż może przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów kontrolujących uwalnianie GnRH z podwzgórza i sekrecję gonadotropin z przedniego płata przysadki mózgowej.