**Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie**
**Wydział Biologii i Biotechnologii**

*mgr Edyta Rytelewska*

# Rola chemeryny w jajniku świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)

**ROZPRAWA DOKTORSKA**
składająca się z cyklu artykułów naukowych
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie nauki biologiczne

**Praca doktorska wykonana**
w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt

**Promotor:** *prof. dr hab. Nina Smolińska*
**Promotor pomocniczy:** *dr Marta Kieżun*

*Badania finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki*
*w ramach projektów badawczych OPUS 9 (nr 2015/17/B/NZ9/03595)*
*oraz PRELUDIUM 14 (nr 2017/27/N/NZ9/00638).*

---

Olsztyn 2022

**SPIS TREŚCI**

**STRESZCZENIE** ..... **4**
**SUMMARY** ..... **6**
**WYKAZ PRAC NAUKOWYCH** ..... **8**
**1. Wstęp** ..... **9**
**2. Uzasadnienie wyboru modelu badawczego** ..... **16**
**3. Hipoteza oraz zadania badawcze** ..... **18**
**4. Materiał** ..... **20**
**5. Metody badawcze** ..... **23**
5.1. Przygotowanie materiału badawczego do zadań nr 1–3 ..... 23
5.2. Zadanie nr 1 ..... 24
5.2.1. qRT-PCR ..... 24
5.2.2. Western Blot ..... 26
5.3. Fluorescencyjna immunohistochemia (zadanie nr 2) ..... 28
5.4. ELISA (zadanie nr 3) ..... 29
5.5. Izolacja komórek i hodowle komórkowe *in vitro* do zadań nr 4–6 ..... 29
5.6. RIA (zadanie nr 4) ..... 32
5.7. Przygotowanie prób do zadań nr 5 i 6 ..... 32
5.8. ELISA (zadania nr 5 i 6) ..... 33
5.9. Western Blot (zadanie nr 5) ..... 33
5.8. Analiza statystyczna ..... 35
**6. Wyniki** ..... **36**
6.1. Zadanie nr 1 ..... 36
6.2. Zadanie nr 2 ..... 37
6.3. Zadanie nr 3 ..... 38
6.4. Zadanie nr 4 ..... 38
6.5. Zadanie nr 5 ..... 39
6.6. Zadanie nr 6 ..... 40
**7. Podsumowanie uzyskanych wyników i wnioski** ..... **42**
**PUBLIKACJA 1.** ..... **48**
OŚWIADCZENIA AUTORÓW ..... 49
TREŚĆ PUBLIKACJI ..... 51
**PUBLIKACJA 2.** ..... **75**
OŚWIADCZENIA AUTORÓW ..... 76
TREŚĆ PUBLIKACJI ..... 78
**PUBLIKACJA 3.** ..... **92**
OŚWIADCZENIA AUTORÓW ..... 93
TREŚĆ PUBLIKACJI ..... 95
**BIBLIOGRAFIA** ..... **113**

## STRESZCZENIE

### Rola chemeryny w jajniku świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.)

*mgr Edyta Rytelewska*

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem *prof. dr hab. Niny Smolińskiej* oraz *dr Marty Kieżun* w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Jajniki są jednymi z najbardziej aktywnych i morfologicznie zróżnicowanych narządów. Kluczowymi czynnikami regulującymi funkcjonowanie jajników są gonadotropiny, hormony steroidowe i insulina. Jednakże, na ich prawidłowe funkcjonowanie mogą mieć także wpływ czynniki, które modulują procesy zachodzące w jajnikach w zależności od zasobów energetycznych organizmu lub występowania lokalnej reakcji zapalnej. Dane literaturowe wskazują, że do takich czynników należy **chemeryna**. Hormon ten znany jest przede wszystkim ze swojej roli w modulacji odpowiedzi immunologicznej oraz regulacji homeostazy energetycznej organizmu. Najnowsze badania wykazały również, że chemeryna jest produkowana lokalnie w jajnikach i może być zaangażowana w prawidłowe funkcjonowanie tych struktur. Brak było jednak informacji na temat ekspresji i funkcji chemeryny w jajnikach świni domowej — jednego z najważniejszych gatunków zwierząt gospodarskich, wykorzystywanego także jako organizm modelowy w badaniach biomedycznych. Ponadto, u żadnego gatunku nie przeprowadzono kompleksowych badań dotyczących wpływu chemeryny na regulację funkcjonowania jajników. Na podstawie dostępnych danych literaturowych postawiono hipotezę zakładającą udział chemeryny w regulacji funkcjonowania jajników świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.). **Stąd celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie ekspresji i lokalizacji chemeryny oraz jej receptorów (CMKLR1, GPR1 i CCRL2) w jajnikach świni domowej, a także zbadanie wpływu chemeryny na kluczowe procesy zachodzące w gonadach, tj. na steroidogenezę, angiogenezę i apoptozę**.

Badania przeprowadzono na jajnikach zwierząt niedojrzałych płciowo oraz zwierząt dojrzałych będących w cyklu rujowym i/lub wczesnej ciąży. Do badań wykorzystano pęcherzyki jajnikowe i ciałka żółte świń. W trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej zastosowano następujące metody badawcze: ilościową reakcję łańcuchową polimerazy (qRT-PCR), Western Blot, fluorescencyjną

immunohistochemię, hodowle komórkowe *in vitro*, test radioimmunologiczny (RIA), test immunoenzymatyczny (ELISA) i analizę statystyczną.

Uzyskane wyniki wykazały, że chemeryna jest produkowana lokalnie w jajnikach świń, a hormon ten bezpośrednio wpływa na funkcjonowanie komórek jajników, co także potwierdza obecność receptorów chemeryny we wszystkich badanych strukturach. Zmiany w koncentracji odpowiednich transkryptów i białek wskazują, że ekspresja chemeryny i jej receptorów zależna jest od dojrzałości płciowej świń oraz fazy cyklu rujowego i/lub okresu wczesnej ciąży. Immunolokalizację chemeryny i jej receptorów stwierdzono w pęcherzykach jajnikowych świń na różnych etapach ich wzrostu/dojrzewania oraz w ciałkach żółtych świń w okresie ich formowania, najwyższej aktywności i regresji. Wykazano również, że fizjologiczne stężenie chemeryny w płynie pęcherzykowym świń wynosi od 104,64 ± 5,28 ng/ml do 186,46 ± 5,66 ng/ml (średnie ± błąd standardowy średniej) oraz odnotowano, że stężenie to zmienia się w zależności od stanu fizjologicznego zwierząt. Ponadto stwierdzono, że chemeryna moduluje (pobudza lub hamuje, w zależności od fazy cyklu rujowego i/lub okresu wczesnej ciąży) podstawową (niestymulowaną) oraz stymulowaną hormonem luteotropowym/hormonem folikulotropowym i/lub insuliną sekrecję hormonów steroidowych (progesteronu, androstendionu, testosteronu, estronu i estradiolu) przez komórki jajników świń. Wykazano też, że chemeryna stymuluje sekrecję głównych czynników angiogennych (czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego A — VEGF-A oraz zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów — bFGF) przez komórki lutealne świń oraz zwiększa koncentrację białek receptorów czynników angiogennych (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR1, FGFR2) w tych komórkach. Co więcej stwierdzono, że chemeryna moduluje (zwiększa lub zmniejsza, w zależności od fazy cyklu rujowego) koncentrację białek czynników zewnętrznego (czynnika związanego z apoptozą — Fas i ligandu receptora Fas — FasL) i wewnętrznego (regulatora apoptozy Bcl-2) szlaku aktywacji apoptozy, a także zmniejsza koncentrację głównego czynnika fazy wykonawczej apoptozy (kaspazy-3) w komórkach lutealnych świń. **Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej wykazały, że chemeryna jest ważnym czynnikiem regulującym funkcjonowanie jajników świni domowej.**

*Badania finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki*
*w ramach projektów badawczych OPUS 9 (nr 2015/17/B/NZ9/03595)*
*oraz PRELUDIUM 14 (nr 2017/27/N/NZ9/00638).*

## SUMMARY


### The role of chemerin in the ovary of the domestic pig (*Sus scrofa domestica* L.)

*mgr Edyta Rytelewska*

Doctoral thesis was performed under the supervision of *prof. dr hab. Nina Smolińska* and *dr Marta Kieżun* at the Department of Animal Anatomy and Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn.

The ovaries are among the most active and morphologically diversified organs. The crucial factors regulating the functioning of the ovaries are gonadotrophins, steroid hormones and insulin. Nevertheless, their proper functioning may also be influenced by factors that modulate the processes taking place in the ovaries depending on the energy resources of the body or the occurrence of a local inflammatory reaction. Literature data indicate that **chemerin** is one of these factors. This hormone was primarily known for its role in the modulation of immune response and regulation of energy homeostasis in the body. The latest research also demonstrated that chemerin is locally produced in the ovaries and may be involved in the proper functioning of these structures. However, there was a lack of information on the expression and function of chemerin in the ovaries of the domestic pig — one of the most important livestock species that is also used as a model organism in biomedical research. Moreover, comprehensive studies of the effect of chemerin on the regulation of ovarian functioning have not been conducted in any species. On the basis of the available literature data, it has been hypothesized that chemerin is involved in the regulation of the functioning of pig ovaries. **Hence, the aim of this doctoral thesis was to determine the expression and localization of chemerin and its receptors (CMKLR1, GPR1 and CCRL2) in the ovaries of the domestic pig, as well as to investigate the influence of chemerin on key processes in the gonads, i.e. steroidogenesis, angiogenesis and apoptosis**.

The studies were performed on the ovaries of prepubertal animals and mature pigs during the oestrous cycle and/or early pregnancy. The research material consisted of porcine ovarian follicles and corpora lutea. During the realization of this doctoral thesis, the following research methods were used: quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR), Western Blot, fluorescent immunohistochemistry, *in vitro* cell

cultures, radioimmunoassay (RIA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and statistical analysis.

The obtained results demonstrated that chemerin is produced locally in the ovaries of pigs, and this hormone directly affects ovarian cells functioning, as it was also confirmed by the presence of chemerin receptors in all the examined structures. Changes in the abundance of the relevant transcripts and proteins indicated that the expression of chemerin and its receptors is dependent on the sexual maturity of pigs and the stage of the oestrous cycle or the period of early pregnancy. The immunolocalization of chemerin and its receptors was found in the porcine follicles at various stages of growth/maturation, and in the porcine corpora lutea during the periods of formation, highest activity, and regression. It was also shown that the physiological concentrations of chemerin in the porcine follicular fluid ranged from 104.64 ± 5.28 ng/ml to 186.46 ± 5.66 ng/ml (mean ± standard error of the mean), and it was found that the concentrations of this hormone varied depending on the physiological state of the animals. Moreover, chemerin was shown to modulate (increase or decrease, depending on the phase of the oestrous cycle or stage of early pregnancy) the basal (unstimulated) and luteinizing hormone/follicle-stimulating hormone- and/or insulin-stimulated secretion of steroid hormones (progesterone, androstenedione, testosterone, oestrone and oestradiol) by the porcine ovarian cells. It was also found that chemerin stimulated the secretion of key angiogenic factors (vascular endothelial growth factor A — VEGF-A and basic fibroblast growth factor — bFGF) by the porcine luteal cells and increased the protein abundance of angiogenic factors' receptors (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR1, FGFR2) in these cells. Furthermore, it was reported that chemerin modulated (increased or decreased, depending on the phase of the oestrous cycle) the protein abundance of factors of the extrinsic death receptor pathway (apoptosis-related factor — Fas and Fas receptor ligand — FasL) and the intrinsic mitochondrial pathway (apoptosis regulator Bcl-2) of apoptosis, and it also decreased the protein abundance of crucial factor of the execution pathway of apoptosis (caspase-3) in the porcine luteal cells. **The results obtained in this doctoral dissertation indicated that chemerin is the important factor regulating the functioning of the porcine ovaries.**

*The research was financed from the resources of the National Science Center (Poland) as a part of research projects OPUS 9 (no. 2015/17/B/NZ9/03595) and PRELUDIUM 14 (no. 2017/27/N/NZ9/00638).*

## WYKAZ PRAC NAUKOWYCH
## BĘDĄCYCH PODSTAWĄ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Na rozprawę doktorską składają się **trzy oryginalne prace badawcze** opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych w 2020 r. (jedna praca) i 2021 r. (dwie prace). Prace te przedstawiają wyniki badań dotyczące ekspresji oraz lokalizacji chemeryny i jej receptorów w jajnikach świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.), a także wpływu chemeryny na procesy steroidogenezy, angiogenezy i apoptozy w tych narządach. W skład cyklu wchodzą następujące publikacje:

**PUBLIKACJA 1.**: **RYTELEWSKA E.**, KISIELEWSKA K., KIEŻUN M., DOBRZYŃ K., GUDELSKA M., RAK A., DUPONT J., KAMIŃSKA B., KAMIŃSKI T., SMOLIŃSKA N. 2020. Expression of chemerin and its receptors in the ovaries of prepubertal and mature gilts. Mol Reprod Dev. 87: 739–762.
DOI: https://doi.org/10.1002/mrd.23391
(IF[1] = 2,609; pięcioletni IF[2] = 3,47; pkt. MEiN[3] = 100)

**PUBLIKACJA 2.**: **RYTELEWSKA E.**, KIEŻUN M., KISIELEWSKA K., GUDELSKA M., DOBRZYŃ K., KAMIŃSKA B., KAMIŃSKI T., SMOLIŃSKA N. 2021. Chemerin as a modulator of ovarian steroidogenesis in pigs: an *in vitro* study. Theriogenology. 160: 95–101.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.040
(IF[1] = 2,74; pięcioletni IF[2] = 2,93; pkt. MEiN[3] = 140)

**PUBLIKACJA 3.**: **RYTELEWSKA E.**, KIEŻUN M., ZAOBIDNA E., GUDELSKA M., KISIELEWSKA K., DOBRZYŃ K., KAMIŃSKI T., SMOLIŃSKA N. 2021. **Chemerin as a modulator of angiogenesis and apoptosis processes** in the corpus luteum of pigs: an *in vitro* study. Biol Reprod. 105(4): 1002–1015.
DOI: https://doi.org/10.1093/biolre/ioab126
(IF[1] = 4,285; pięcioletni IF[2] = 4,307; pkt. MEiN[3] = 200)

**Razem:**
IF[1] = 9,364
pięcioletni IF[2] = 10,707
pkt. MEiN[3] = 440

**IF[1]** — wskaźnik cytowań (ang. Impact Factor) czasopisma z roku wydania pracy wg bazy Web of Science
**pięcioletni IF[2]** — wskaźnik cytowani czasopisma z pięciu ostatnich lat wg bazy Web of Science
**pkt. MEiN[3]** — liczba punktów za publikację wg Komunikatu Ministra Edukacji i Nauki w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych z dnia 21 grudnia 2021 r.

## 1. Wstęp

Jajniki są jednymi z najbardziej aktywnych i morfologicznie zróżnicowanych narządów. Ich prawidłowe funkcjonowanie obejmuje procesy takie jak folikulogeneza, owulacja, tworzenie się i aktywność ciałka żółtego, a następnie podtrzymanie funkcji ciałka żółtego w przypadku zapłodnienia, lub luteoliza, gdy zapłodnienie nie nastąpi (PETERS i MCNATTY, 1980). Kluczowymi czynnikami regulującymi funkcjonowanie jajników są gonadotropiny, hormony steroidowe (MADEJ i in., 2005) i insulina (DUPONT i SCARAMUZZI, 2016). Jednakże, na ich prawidłowe funkcjonowanie mogą mieć także wpływ czynniki, które modulują procesy zachodzące w jajnikach w zależności od zasobów energetycznych organizmu lub występowania lokalnej reakcji zapalnej (GARCIA-GARCIA, 2012). Dane literaturowe wskazują, że do czynników takich należy **chemeryna.**

**Chemeryna**, znana również jako białko 2 odpowiadające na receptor kwasu retinowego (ang. *retinoic acid receptor responder protein 2*, RARRES2) lub produkt białkowy genu 2 indukowanego tazarotenem (ang. *tazarotene-induced gene 2 protein*, TIG2), **jest hormonem zaliczanym zarówno do cytokin** (czyli cząsteczek, które oddziałują na aktywność biologiczną komórek i regulują działanie układu odpornościowego), **jak i adipokin** (czyli aktywnych biologicznie cząsteczek, wytwarzanych i wydzielanych przez komórki tkanki tłuszczowej; HELFER i WU, 2018). Jako cytokina chemeryna ma działanie prozapalne lub przeciwzapalne. Początkowo stwierdzono, że chemeryna wykazuje działanie chemotaktyczne w stosunku do komórek odpornościowych (leukocytów, makrofagów i niedojrzałych komórek dendrytycznych), pobudzając migrację tych komórek do miejsc objętych stanem zapalnym (HELFER i WU, 2018). Późniejsze badania wykazały jednak, że chemeryna może również hamować działanie cytokin prozapalnych, takich jak interleukina 6 lub czynnik martwicy nowotworu α (MATTERN i in., 2014). Ponadto zaobserwowano wysoką koncentrację chemeryny w tkankach i płynach ustrojowych pacjentów cierpiących na przewlekłe choroby immunologiczne takie jak łuszczyca, choroba Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, reumatoidalne zapalenie stawów, czy też przewlekła obturacyjna choroba płuc (SU i in., 2021). Jako adipokina chemeryna stymuluje proces różnicowania się i rozwoju komórek tkanki tłuszczowej (adipogenezę), a także wpływa na rozwój stanu zapalnego w tkance tłuszczowej.

Hormon ten reguluje też metabolizm tłuszczów i glukozy oraz moduluje wrażliwość komórek na insulinę (GORALSKI i in., 2007; MATTERN i in., 2014). Wykazano również podwyższony poziom chemeryny we krwi pacjentów z zespołem metabolicznym, otyłością oraz cukrzycą typu 2 (BOZAOGLU i in., 2007; HELFER i WU, 2018).

Chemeryna syntetyzowana jest w formie nieaktywnej jako **preprochemeryna**, która po odcięciu N-końcowej sekwencji sygnałowej wydzielana jest do przestrzeni zewnątrzkomórkowej jako **prochemeryna** o niskiej aktywności biologicznej. Następnie **aktywne formy chemeryny** powstają poprzez kolejne cięcia C-końcowego fragmentu białka przez karboksypeptydazy (głównie proteazy serynowe i cysteinowe). Co ciekawe wykazano, że zróżnicowana aktywność i funkcje biologiczne chemeryny zależne są od miejsca cięcia i rodzaju enzymu zaangażowanego w ten proces (DU i LEUNG, 2009). Jak dotąd odkryto i opisano **trzy receptory chemeryny**:

- receptor chemokinopodobny 1 (ang. *chemokine-like receptor 1*, **CMKLR1**), znany również jako receptor chemeryny 23 (ang. *chemerin receptor 23*, ChemR23),
- receptor 1 sprzężony z białkiem G (ang. *G protein-coupled receptor 1*, **GPR1**),
- receptor chemokinopodobny 2 z motywem C-C (ang. *C-C motif chemokine receptor-like 2*, **CCRL2**).

Wszystkie trzy receptory składają się z siedmiu domen transbłonowych i należą do grupy receptorów sprzężonych z białkami G (MATTERN i in., 2014). Chemeryna wiąże się z receptorami CMKLR1 i GPR1 z podobnie wysokim powinowactwem przez N-koniec białka, a mechanizm transdukcji sygnału opiera się na szlakach sygnałowych MAPK/ERK1/2 i PI3K/Akt (w przypadku receptora CMKLR1), a także szlaku sygnałowym AMPK (w przypadku obu receptorów; MATTERN i in., 2014). Z kolei, jeżeli chodzi o receptor CCRL2, chemeryna wiąże się tym receptorem przez C-koniec białka, a powinowactwo hormonu do CCRL2 jest znacznie niższe niż w przypadku dwóch wyżej wymienionych receptorów. W przeciwieństwie do receptorów CMKLR1 i GPR1, receptor CCRL2 nie jest w stanie przekazywać sygnału, a jedynie wiąże chemerynę koncentrując ją w określonych miejscach i/lub prezentuje hormon sąsiadującym komórkom, na powierzchni których znajdują się receptory CMKLR1 (MATTERN i in., 2014).

W ciągu ostatnich lat pojawiły się nieliczne badania, których wyniki jednoznacznie sugerowały, że poza udokumentowaną rolą chemeryny w modulacji odpowiedzi immunologicznej oraz regulacji homeostazy energetycznej organizmu,

**hormon ten jest również produkowany lokalnie w jajnikach i może być zaangażowany w prawidłowe funkcjonowanie tych narządów**. Obecność transkryptów i białek systemu chemerynowego (chemeryny i jej trzech receptorów: CMKLR1, GPR1 i CCRL2) wykazano w pęcherzykach jajnikowych (a dokładnie w komórkach ziarnistych, komórkach osłonki wewnętrznej i oocytach) oraz ciałkach żółtych bydła (REVERCHON i in., 2014). Obecność transkryptu i białka chemeryny oraz transkryptów receptorów CMKLR1 i GPR1 stwierdzono również w komórkach ziarnistych kobiet (REVERCHON i in., 2012). Dodatkowo, zaobserwowano, że lokalna synteza chemeryny w pęcherzykach jajnikowych zwiększa 2- (REVERCHON i in., 2012) lub nawet 8-krotnie (KIM i in., 2013) koncentrację tego hormonu w płynie pęcherzykowym kobiet w stosunku do koncentracji chemeryny odnotowanej w osoczu. U myszy zróżnicowaną koncentrację transkryptu chemeryny stwierdzono w jajnikach zwierząt w czterech fazach cyklu rujowego, tj. proestrus, estrus, metestrus i anestrus. W badaniu tym potwierdzono również obecność transkryptu i białka receptora GPR1 w pęcherzykach jajnikowych (a dokładnie w komórkach ziarnistych, komórkach osłonki wewnętrznej i oocytach) oraz ciałkach żółtych myszy (YANG i in., 2016). Obecność transkryptu chemeryny odnotowano również w jajnikach pawianów, szympansów (GONZÁLEZ-ALVAREZ i in., 2015) i kur (MELLOUK i in., 2018). Istnieją także przesłanki, które wskazują, że chemeryna może być czynnikiem zaangażowanym w etiopatogenezę zespołu policystycznych jajników (ang. *polycystic ovary syndrome*, PCOS). Obecność transkryptu chemeryny stwierdzono w komórkach ziarnistych jajników szczurów stanowiących zwierzęcy model PCOS, w którym hiperandrogenizm został wywołany 5α-dihydrotestosteronem (WANG i in., 2013). Co więcej, wykazano wyższą koncentrację chemeryny w surowicy pacjentek chorych na PCOS niż u zdrowych kobiet, a te z nich, u których odnotowano wyraźnie podwyższony poziom chemeryny we krwi, miały też znacząco powiększone jajniki (HUANG i in., 2015). Niemniej jednak ekspresja elementów systemu chemerynowego w jajnikach ludzi i zwierząt nie była jak dotąd w pełni poznana, a dostępne wyniki badań dostarczały jedynie fragmentarycznych informacji. Tylko jedno z przytoczonych badań dotyczyło zwierząt gospodarskich (krów). Brakowało też danych na temat ekspresji oraz tkankowej lokalizacji elementów systemu chemerynowego w jajnikach świni domowej oraz koncentracji chemeryny w płynie pęcherzykowym tego gatunku. Pomimo badania które zasugerowało, że poziom koncentracji transkryptu chemeryny może być zależny od fazy cyklu rujowego, jak dotąd nie określono dokładnego wpływu statusu

hormonalnego zwierząt (wynikającego z cyklicznych zmian zachodzących w jajnikach) na ekspresję elementów systemu chemerynowego. Nieznany także pozostawał wpływ dojrzałości płciowej zwierząt na ekspresję elementów systemu chemerynowego w jajnikach. Jest to szczególnie ważne ze względu na fakt, że początek dojrzewania i dalsze prawidłowe funkcjonowanie jajników u osobników dorosłych wymaga znacznego wydatkowania energii, a zaburzenia homeostazy energetycznej mogą osłabiać potencjał reprodukcyjny zwierząt (HUGHES, 1982; PRUNIER i QUESNEL, 2000).

Dostępne dane literaturowe potwierdziły, że **chemeryna może modulować proces steroidogenezy w jajnikach**. Wykazano, że hormon ten zmniejszał podstawową (niestymulowaną) sekrecję progesteronu ($P_4$) i estradiolu ($E_2$) przez komórki ziarniste ludzi i krów (REVERCHON i in., 2012; REVERCHON i in., 2014), a także obniżał podstawową sekrecję $E_2$ przez komórki ziarniste szczurów (WANG i in., 2013). Stwierdzono także, że chemeryna zmniejszała stymulowaną hormonem folikulotropowym (FSH) i insulinopodobnym czynnikiem wzrostu 1 sekrecję $P_4$ i $E_2$ przez komórki ziarniste kobiet i krów (REVERCHON i in., 2012; REVERCHON i in., 2014) oraz obniżała stymulowaną FSH sekrecję $P_4$ i $E_2$ przez komórki ziarniste szczurów (WANG i in., 2013). Zaobserwowano również, że chemeryna zmniejszała sekrecję $P_4$ przez komórki lutealne myszy (YANG i in., 2016) w modelu luteinizacji wywołanej ludzką gonadotropiną kosmówkową oraz w modelu luteolizy wywołanej prostaglandyną $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Ponadto badania potwierdziły **modulujący wpływ chemeryny na ekspresję kluczowych enzymów steroidogenicznych w komórkach jajników**. Odnotowano, że chemeryna zmniejszała koncentrację białkowego regulatora steroidogenezy StAR (ang. *steroidogenic acute regulatory protein*) w komórkach ziarnistych krów (REVERCHON i in., 2014), obniżała koncentrację białka cytochromu P450 odszczepiającego boczny łańcuch cholesterolu (ang. *cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 enzyme*, $P450_{SCC}$) w komórkach ziarnistych szczurów (WANG i in., 2013), a także zmniejszała koncentrację transkryptu i białka aromatazy cytochromu P450 (ang. *cytochrome P450 aromatase*) w komórkach ziarnistych ludzi, krów i szczurów (REVERCHON i in., 2012; WANG i in., 2013; REVERCHON i in., 2014). Chemeryna zmniejszała też ekspresję genów *StAR*, *CYP11A1* (gen kodujący białko $P450_{SCC}$) i *HSD3B1* (gen kodujący dehydrogenazę 3β-hydroksysteroidową) w komórkach lutealnych myszy (YANG i in., 2016). Badania wskazują także, że **chemeryna może modulować proces steroidogenezy w komórkach jajników**

**poprzez ograniczenie dostępności substratów do syntezy hormonów steroidowych**. W komórkach ziarnistych krów (REVERCHON i in., 2014) chemeryna zmniejszała ilość cholesterolu oraz koncentrację białka reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo--koenzymu A (ang. *3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase*) — enzymu regulującego tempo biosyntezy cholesterolu. Wykazano również, że chemeryna może modulować steroidogenezę w jajnikach poprzez zmniejszanie koncentracji kluczowych czynników transkrypcyjnych (NR5a1/2) genów enzymów steroidogenicznych (WANG i in., 2013). Ponadto, w komórkach ziarnistych szczurów chemeryna zwiększała koncentrację białka prohibiny (ang. *prohibitin*), która hamuje proces steroidogenezy (WANG i in., 2013). Pomimo powyższego, nieznany pozostawał wpływ chemeryny na steroidogenezę w komórkach jajników świń. Dostępne badania wskazywały jedynie na wpływ chemeryny na sekrecję $P_4$ i $E_2$, a jak wiadomo, u świń, zarówno komórki ziarniste i komórki osłonki wewnętrznej pęcherzyków, jak też duże i małe komórki lutealne zdolne są do wytwarzania aż pięciu różnych hormonów steroidowych — $P_4$, androstendionu ($A_4$), testosteronu (T), estronu ($E_1$) i $E_2$ (STOKLOSOWA i in., 1982; GREGORASZCZUK, 1996; LEMON i LOIR, 1977; GRZESIAK i in., 2014). Co więcej, aby poznać dokładną rolę chemeryny w regulacji procesu steroidogenezy w jajnikach świń ważne było nie tylko określenie wpływu samej chemeryny na sekrecję hormonów steroidowych, ale także zbadanie wpływu tego hormonu w warunkach, które są możliwie najbardziej zbliżone do warunków fizjologicznych, czyli w obecności kluczowych czynników regulujących funkcjonowanie jajników, takich jak FSH, hormon luteinizujący (LH) oraz insulina.

Podstawową funkcją ciałek żółtych jest wydzielanie $P_4$, który jest niezbędny do ustanowienia i utrzymania ciąży (BOWEN-SHAUVER i GIBORI, 2003). Dlatego też zaburzenia struktury i czynności ciałek żółtych mogą osłabiać potencjał reprodukcyjny zwierząt (RAO i GIBORI, 1987). Prawidłowe funkcjonowanie ciałek żółtych obejmuje etapy formowania i najwyższej aktywności, a następnie podtrzymania funkcji w przypadku zapłodnienia, lub ich regresja, gdy zapłodnienie nie nastąpi (PETERS i MCNATTY, 1980). Tym dynamicznym zmianom towarzyszą intensywne procesy angiogenezy i apoptozy. **Dostępne dane literaturowe wskazują, że chemeryna może wpływać na oba te procesy**. Wykazano, że chemeryna stymulowała proliferację, różnicowanie i migrację komórek śródbłonka naczyń, a także tworzenie się struktur przypominających naczynia włosowate w badaniach

*in vitro* przeprowadzonych na ludzkich komórkach śródbłonka żyły pępowinowej (ang. *human umbilical vein endothelial cells*; NAKAMURA i in., 2018). W badaniu tym odnotowano również, że chemeryna pobudzała tworzenie się naczyń krwionośnych poprzez aktywację szlaków sygnałowych MAPK/ERK1/2 i PI3K/Akt. Stymulujący wpływ chemeryny na proces angiogenezy stwierdzono także w badaniach na mysim i szczurzym modelu *ex vivo* (NAKAMURA i in., 2018). Ponadto odnotowano, że zwiększona ekspresja chemeryny jest dodatnio skorelowana z ekspresją czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego A (VEGF-A), a dalsze badania wykazały, że chemeryna pośredniczy w tworzeniu naczyń krwionośnych w podobnym stopniu jak VEGF-A (BOZAOGLU i in., 2010). Nieliczne badania potwierdzają również wpływ chemeryny na proces apoptozy. Wykazano, że chemeryna stymulowała ten proces poprzez zmniejszenie fosforylacji Akt oraz zwiększenie aktywności kaspazy-9 w komórkach mięśnia sercowego myszy (RODRÍGUEZ-PENAS i in., 2015). Z kolei, w komórkach nabłonkowych gruczołu mlekowego krów chemeryna stymulowała apoptozę poprzez zwiększenie koncentracji białka X związanego z Bcl-2 (BAX, czynnik proapoptotyczny) w stosunku do koncentracji białka regulatora apoptozy Bcl-2 (czynnik antyapoptotyczny), a także zwiększała aktywność kaspazy-3 (Casp3; HU i in., 2019). Stwierdzono również, że chemeryna stymulowała apoptozę w komórkach ziarnistych myszy poprzez zwiększenie aktywności Casp3, zwiększenie stosunku koncentracji białka BAX do białka Bcl-2, aktywację szlaków sygnałowych czynnika jądrowego (NF)-κB i AMPK oraz zahamowanie szlaku sygnałowego Akt (YAO i in., 2019). W badaniu *in vitro* przeprowadzonym na mysim modelu luteolizy wywołanej $PGF_{2\alpha}$ (YANG i in., 2016), chemeryna stymulowała apoptozę poprzez zwiększenie ekspresji genu *CASP3* (gen kodujący Casp3). Pomimo powyższego, nieznany jak dotąd pozostawał wpływ chemeryny na procesy angiogenezy i apoptozy w ciałkach żółtych świń. Ponadto, tylko jedna z dotychczas opublikowanych prac dotyczyła wpływu tego hormonu na komórki lutealne. Dlatego, aby poznać dokładną rolę chemeryny w regulacji procesu angiogenezy, ważne było określenie wpływu tego hormonu na sekrecję kluczowych czynników angiogennych, takich jak VEGF-A i zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF). Istotne było także poznanie wpływu tego hormonu na koncentrację białek receptorów czynników angiogennych, tj. receptorów 1, 2 i 3 czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3) oraz receptorów 1 i 2 czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR1, FGFR2). Z kolei, aby określić rolę chemeryny w procesie apoptozy i poznać sposób aktywacji

tego procesu przez chemerynę, kluczowe było określenie wpływu tego hormonu na koncentrację głównych czynników zewnętrznego (czynnika związanego z apoptozą Fas i ligandu receptora Fas — FasL) i wewnętrznego (czynników Bcl-2 i BAX) szlaku aktywacji apoptozy. Istotne również było poznanie wpływu tego hormonu na koncentrację najważniejszego czynnika fazy wykonawczej apoptozy — Casp3.

Podsumowując, przesłanką do przeprowadzenia niniejszych badań była nieznana jak dotąd rola chemeryny w regulacji funkcjonowania jajników świni domowej. Dostępne dane literaturowe dostarczyły jedynie fragmentarycznych danych na temat ekspresji i lokalizacji elementów systemu chemerynowego w jajnikach ludzi i zwierząt, a badania dotyczące wpływu chemeryny na proces steroidogenezy odnosiły się głównie do ludzi, bydła i gryzoni oraz skupiały się przede wszystkim na komórkach ziarnistych pęcherzyków jajnikowych. Ponadto, brakowało informacji na temat roli chemeryny w regulacji procesu angiogenezy w ciałkach żółtych ludzi i zwierząt, a informacje na temat wpływu chemeryny na proces apoptozy w ciałkach żółtych zwierząt ograniczały się do jednego badania, które zostało przeprowadzone na myszach. Co więcej, u żadnego gatunku nie przeprowadzono kompleksowych badań dotyczących wpływu chemeryny a regulację funkcjonowania jajników. **Dlatego też celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie ekspresji i lokalizacji chemeryny i jej receptorów w jajnikach świni domowej, a także zbadanie wpływu chemeryny na kluczowe procesy zachodzące w jajnikach, tj. na steroidogenezę, angiogenezę i apoptozę.**

## 2. Uzasadnienie wyboru modelu badawczego

**Świnie** są jednym z najważniejszych gatunków zwierząt gospodarskich, z prawie 500 różnymi rasami występującymi na całym świecie (PUKITE, 1999). Trzoda chlewna to też bez wątpienia najważniejszy kierunek produkcji zwierzęcej w Polsce[2]. Aby zoptymalizować rozród świń konieczne jest lepsze zrozumienie procesów biologicznych związanych z regulacją funkcjonowania układu rozrodczego tego gatunku. Dlatego też podjęte badania mogą stanowić podstawę do lepszego zrozumienia fizjologii jednego z kluczowych elementów tego układu — jajników, a tym samym, w przyszłości, przyczynić się do wypracowania skuteczniejszych sposobów ingerencji w procesy rozrodcze świń, co może przełożyć się na zwiększenie efektywności w produkcji trzody chlewnej. Ponadto, chociaż świnia nie jest uważana za oczywisty model badawczy, gatunek ten zyskał również dużą aprobatę i uznanie ze względu na znaczące podobieństwo do człowieka. Ze względu na ograniczenia etyczne dotyczące eksperymentów prowadzonych na ludziach, dostęp do jajników kobiet, zwłaszcza w podstawowych stanach fizjologicznych (bez obecności stanów patologicznych), jest niezwykle ograniczony. Co prawda jest możliwość pobierania tkanek (głównie pęcherzyków) od kobiet, które poddały się procedurze zapłodnienia *in vitro*, jednak badania wykorzystujące tkanki i komórki pozyskane w ten sposób są kwestionowane ze względu na ekspozycję jajników na wysokie stężenia hormonów steroidowych i gonadotropin, które powszechnie stosowane są w procedurach wspomaganego rozrodu (CAMPBELL i in., 2003). Dlatego też modele zwierzęce, które dobrze odzwierciedlają fizjologię człowieka i które można wykorzystać do pozyskania określonych komórek lub tkanek, stanowią cenne i pożądane narzędzie do badań w wielu dziedzinach nauki. Do podobieństw człowieka i świni należą rozmiar ciała, profil metaboliczny, anatomia i fizjologia wielu narządów lub nawet całych układów narządów, a także zbliżony przebieg wielu chorób (KUZMUK i SCHOOK, 2011). Dobrym przykładem wykorzystania świń jako modelu zwierzęcego mogą być badania endokrynologiczne, dzięki którym wyjaśniono budowę, funkcję i działanie kilku hormonów steroidowych i przysadkowych, a także insuliny, która różni się od insuliny ludzkiej tylko jednym aminokwasem i która była z powodzeniem stosowana przez kilka dziesięcioleci w leczeniu cukrzycy u ludzi (ROHRER i in., 2003).

[4] Pogłowie świń według stanu w grudniu 2021 r., Informacje sygnalne GUS 28.01.2022 r. https://stat.gov.pl/files/gfx/portalinformacyjny/pl/defaultaktualnosci/5508/7/14/1/poglowie_swin_wedlug_stanu_w_grudniu_2021_r.pdf; dostęp: 01.02.2022 r.

Co więcej, świnia jest modelem zwierzęcym wielu chorób ludzkich, a także stanowi sprawdzony model określonych mechanizmów i procesów fizjologicznych lub patofizjologicznych (KUZMUK i SCHOOK, 2011). Świnki miniaturowe są też powszechnie wykorzystywane jako model do testowania toksyczności nowych leków (BENDIXEN i in., 2010). Dostępne są także wystandaryzowane narzędzia i bazy danych do analizy transkryptomu i proteomu tego gatunku (BENDIXEN i in., 2010). Świnie są też łatwo dostępne do badań dzięki wielkoskalowej produkcji zwierzęcej na potrzeby przetwórstwa mięsnego. Z kolei wykorzystywanie tkanek od zwierząt przeznaczonych do uboju komercyjnego pozwala na zachowanie równowagi pomiędzy realizacją badań a uniknięciem niepotrzebnego cierpienia zwierząt wykorzystywanych do badań. Podejście to zostało również wykorzystane w niniejszej pracy doktorskiej.

## 3. Hipoteza oraz zadania badawcze

Dostępne dane literaturowe stały się podstawą **hipotezy badawczej** zakładającej udział chemeryny w regulacji funkcjonowania jajników świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.). Dotychczasowe fragmentaryczne badania dotyczące ekspresji i funkcji chemeryny w układzie rozrodczym ludzi i zwierząt pozwoliły na postawienie następujących **hipotez szczegółowych**:

a) w komórkach jajników świń ma miejsce ekspresja elementów systemu chemerynowego (chemeryny i jej receptorów: CMKLR1, GPR1 i CCRL2), a lokalna produkcja tego hormonu w jajnikach wpływa na koncentrację chemeryny w płynie pęcherzykowym;
b) chemeryna wpływa na produkcję i sekrecję hormonów steroidowych przez komórki jajników świń;
c) chemeryna wpływa na procesy angiogenezy i apoptozy zachodzące w komórkach lutealnych świń.

W celu weryfikacji postawionych hipotez zaplanowano następujące **zadania badawcze**:

1. określenie koncentracji transkryptów i białek elementów systemu chemerynowego w pęcherzykach świń niedojrzałych płciowo oraz w komórkach ziarnistych, komórkach osłonki wewnętrznej i ciałkach żółtych świń będących w cyklu rujowym (fazy wczesnolutealna, środkowolutealna, późnolutealna i pęcherzykowa) lub we wczesnej ciąży (okres migracji zarodków w macicy, okres matczynego rozpoznania ciąży, początek implantacji, zakończenie implantacji);
2. określenie tkankowej lokalizacji elementów systemu chemerynowego w jajnikach świń niedojrzałych płciowo oraz będących w cyklu rujowym;
3. oznaczenie koncentracji chemeryny w płynie pęcherzykowym świń niedojrzałych płciowo oraz będących w cyklu rujowym;
4. zbadanie wpływu chemeryny na podstawową oraz stymulowaną LH/FSH i/lub insuliną sekrecję hormonów steroidowych ($P_4$, $A_4$, T, $E_1$ i $E_2$) przez komórki ziarniste, komórki osłonki wewnętrznej pęcherzyka lub komórki lutealne świń będących w cyklu rujowym lub w wybranych okresach wczesnej ciąży (tj. w okresie matczynego rozpoznania ciąży oraz na początku implantacji);

5. zbadanie wpływu chemeryny na sekrecję czynników angiogennych (VEGF-A, bFGF) przez komórki lutealne świń oraz na koncentrację białek receptorów czynników angiogennych (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR1, FGFR2) w tych komórkach w fazach wczesnolutealnej, środkowolutealnej i późnolutealnej;
6. zbadanie wpływu chemeryny na koncentrację białek czynników apoptotycznych (Fas, FasL, Bcl-2, BAX, Casp3) w komórkach lutealnych świń w fazach wczesnolutealnej, środkowolutealnej i późnolutealnej.

## 4. Materiał

*Wszystkie procedury z udziałem zwierząt zostały przeprowadzone zgodnie z Ustawą z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych oraz Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych.*

**Materiał badawczy stanowiły jajniki świń** pobrane od zwierząt przeznaczonych do uboju komercyjnego i przetwórstwa mięsnego. Grupę badawczą stanowiły loszki, mieszańce towarowe (mieszańce ras: wielka biała polska i polska biała zwisłoucha), pochodzące z prywatnych hodowli. **Do badań wykorzystano pęcherzyki jajnikowe i ciałka żółte** wyizolowane z jajników świń w określonych etapach dojrzałości płciowej oraz wybranych fazach cyklu rujowego i/lub okresach wczesnej ciąży. Dlatego też w badaniach wykorzystano zwierzęta niedojrzałe w wieku 4–6 miesięcy o średniej wadze 100–110 kg (zadania nr 1–3) oraz zwierzęta dojrzałe w wieku 7–9 miesięcy, o średniej wadze 120–140 kg i grubości słoniny na grzbiecie wynoszącej 18–20 mm (zadania nr 1–6).

**Pęcherzyki jajnikowe** o określonej średnicy pobierano od zwierząt niedojrzałych płciowo (zadania nr 1–3) oraz dojrzałych w wybranych fazach cyklu rujowego (zadania nr 1–4). Od zwierząt niedojrzałych płciowo pobierano małe (średnica 3–4 mm) oraz średnie (średnica 4–5 mm) pęcherzyki. Natomiast od zwierząt w cyklu rujowym pęcherzyki jajnikowe pobierano w dniach:

- 4.–6. — faza wczesnolutealna (okres formowania się ciałek żółtych), w której występują liczne małe pęcherzyki o średnicy 2–4 mm,
- 10.–12. — faza środkowolutealna (okres, w którym występują w pełni rozwinięte ciałka żółte, a ich aktywność jest najwyższa w cyklu i podobna do tej odnotowywanej podczas ciąży), w której widoczne są liczne średnie pęcherzyki o średnicy 4–6 mm,
- 17.–19. — faza pęcherzykowa, w której występują duże dojrzałe pęcherzyki przedowulacyjne o średnicy 8–12 mm.

W badaniach wykorzystano pęcherzyki bez widocznych oznak atrezji.

**Ciałka żółte** pobierano od zwierząt dojrzałych płciowo w określonych fazach cyklu rujowego związanych z fizjologią ciałek żółtych (tj. w etapach formowania, najwyższej aktywności i regresji; zadania nr 1, 2, 4–6) oraz w wybranych okresach wczesnej ciąży (zadanie nr 1 i 4).

W czasie cyklu rujowego ciałka żółte pobierano od zwierząt w dniach:

- 2.–3. — faza wczesnolutealna (okres luteinizacji, charakteryzujący się obecnością ciałek krwotocznych),
- 10.–12. — faza środkowolutealna,
- 14.–16. — faza późnolutealna (okres lutelizy).

W czasie wczesnej ciąży ciałka żółte pobierano od zwierząt w dniach:

- 10.–11. — okres migracji zarodków w macicy,
- 12.–13. — okres matczynego rozpoznania ciąży,
- 15.–16. — początek implantacji,
- 27.–28. — zakończenie implantacji.

W przypadku świń ciężarnych początek rui został określony poprzez obserwację zachowania loszek w obecności knura, a dzień, w którym potwierdzono wystąpienie rui, został oznaczony jako dzień „0” cyklu rujowego. Inseminację naturalną przeprowadzono przez dwa kolejne dni, zaczynając od dnia potwierdzenia pierwszych objawów rui. Pierwszy dzień po ostatniej inseminacji został oznaczony jako pierwszy dzień ciąży. Uboju świń ciężarnych dokonywano w określonym dniu ciąży, zaplanowanym w doświadczeniu.

W ciągu kilku minut od uboju jajniki pobrano od świń niedojrzałych płciowo oraz dojrzałych będących w cyklu rujowym. Stopień dojrzałości płciowej lub faza cyklu rujowego zostały potwierdzone na podstawie morfologii jajników zgodnie z charakterystyką opisaną przez AKINSA i MORRISSETTE'A (1968). Dodatkowo klasyfikacji pęcherzyków dokonano zgodnie z charakterystyką opisaną przez GREGORASZCZUK i SKAŁKĘ (1996). Od świń ciężarnych pobrano jajniki wraz z macicą. Odpowiednie okresy wczesnej ciąży zostały potwierdzone na podstawie obecności, wielkości i morfologii zarodków w obu rogach macicy zgodnie z charakterystyką opisaną przez ANDERSONA (1978), przepłukując rogi macicy sterylnym roztworem soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS; 0,1 M; pH = 7,4).

Jajniki przeznaczone do realizacji zadania nr 2 tuż po pobraniu zostały zanurzone w 4% buforowanym paraformaldehydzie (pH = 7,4). Natomiast tkanki przeznaczone do pozostałych zadań (zadania nr 1, 3–6) zostały umieszczone w sterylnym schłodzonym buforze PBS (0,1 M; pH = 7,4; 4°C) uzupełnionym mieszaniną antybiotyków (Antibiotic-Antimycotic Solution; Sigma-Aldrich, USA) w taki sposób, aby końcowe stężenia antybiotyków w roztworze wynosiły odpowiednio: 100 U/ml penicyliny, 0,1 mg/ml streptomycyny i 0,025 mg/ml amfoterycyny B. Pobrany materiał badawczy przetransportowano do laboratorium na lodzie w ciągu 1–1,5 h.

## 5. Metody badawcze

W trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano następujące metody:

- ilościową reakcję łańcuchową polimerazy (qRT-PCR; zadanie nr 1),
- Western Blot (zadania nr 1 i 5),
- fluorescencyjną immunohistochemię (zadanie nr 2),
- hodowle komórkowe *in vitro* (zadania nr 4–5),
- test radioimmunologiczny (RIA; zadanie nr 4),
- test immunoenzymatyczny (ELISA; zadania nr 3, 5 i 6),
- analizę statystyczną (zadania nr 1, 3–6).

Poniżej przedstawiono szczegóły wykorzystanych metod, wskazując na informacje, które były kluczowe dla prawidłowego wykonania odpowiednich zadań badawczych.

### 5.1. Przygotowanie materiału badawczego do zadań nr 1–3

Pęcherzyki jajnikowe oraz ciałka żółte przeznaczone do realizacji zadań nr 1 i 3 wycięto z jajników świń niedojrzałych płciowo oraz świń dojrzałych w wybranych fazach cyklu rujowego i/lub okresach wczesnej ciąży. **Płyn pęcherzykowy** zebrano za pomocą igły i strzykawki, przeniesiono do probówek typu Eppendorf, a następnie przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych analiz (zadanie nr 3). **Całe pęcherzyki jajnikowe** po usunięciu płynu pęcherzykowego oraz wycięte **ciałka żółte** zamrożono w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz (zadanie nr 1). Dodatkowo duże dojrzałe (przedowulacyjne) pęcherzyki jajnikowe o średnicy > 8 mm posłużyły do **izolacji komórek ziarnistych i komórek osłonki wewnętrznej**. Procedurę izolacji przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną przez MALESZKĘ i in. (2014). Wyizolowane komórki odwirowano (300 × g, 10 min, 4°C) i natychmiast zawieszono w odpowiednich buforach (szczegóły w podrozdziale 4.2. Publikacji 1., s. 69) w celu izolacji RNA i białka (zadanie nr 1). Z kolei, **całe jajniki,** przeznaczone do realizacji zadania nr 2, utrwalono przez zanurzenie tkanek w 4% roztworze paraformaldehydu w buforze PBS (0,1 M; pH = 7,4; 4°C) na 24 h. Następnie, jajniki odwodniono i zabezpieczono przed obkurczaniem oraz zniekształcaniem się badanych struktur poprzez wysycenie tkanek sacharozą, która pełniła funkcję krioprotektanta. Janiki inkubowano najpierw w 19%, a potem 30% roztworze sacharozy w buforze PBS (0,1 M; pH = 7,4; 4°C)

przez kilka dni (ok. 3–4 dni w każdym z roztworów sacharozy), aż do momentu pełnego wysycenia tkanek cukrem. Jajniki przecięto na dwie równe części i zatopiono w medium do zatapiania tkanek (Killik O.C.T. compound; Bio-Optica Milano Spa, Włochy) uzyskując bloczki, które następnie przechowywano w temperaturze -80°C. Dzień przed cięciem tkanek bloczki przeniesiono do temperatury -20°C, w której przetrzymywano tkanki przez 24 h, a następnie bloczki cięto na skrawki o grubości 10 µm w temperaturze -25°C w kriostacie Microm HM 525 (Thermo Fisher Scientific, USA). Bezpośrednio po cięciu skrawki przyklejano na szkiełka podstawowe pokryte poli-L-lizyną (Menzel--Glaser, Braunschweig, Niemcy). Tak przygotowane preparaty przechowywano w -80°C (szczegóły w podrozdziale 4.7. Publikacji 1., s. 71).

## 5.2. Zadanie nr 1

Zadanie to zostało wykonane przy współpracy trzech laboratoriów. Analizę ekspresji genów elementów systemu chemerynowego w pęcherzykach świń niedojrzałych oraz dojrzałych płciowo metodą qRT-PCR wykonano w laboratorium Unité Physiologie de la Reproduction et des Comportements de l'Institut National de la Recherche Agronomique w Nouzilly (Francja), natomiast analizę koncentracji białek w pęcherzykach świń niedojrzałych oraz dojrzałych płciowo metodą Western Blot przeprowadzono w laboratorium Zakładu Fizjologii i Toksykologii Rozrodu Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Z kolei analizy ekspresji genów i białek elementów systemu chemerynowego w komórkach ziarnistych i komórkach osłonki wewnętrznej dużych pęcherzyków jajnikowych oraz w ciałkach żółtych świń przeprowadzono w laboratorium Katedry Anatomii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Dokładna metodyka zadania nr 1 opisania jest w podrozdziałach 4.3.–4.6. Publikacji 1. (ss. 69–71). Poniżej opisano najważniejsze informacje dotyczące poszczególnych etapów metod.

### 5.2.1. qRT-PCR

**Izolację RNA** przeprowadzono metodą fenolowo-chloroformową opisaną przez CHOMCZYŃSKIEGO i SACCHI (1987) z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych odczynników, a całą procedurę izolacji wykonano zgodnie z wytycznymi producentów

odczynników (użyte odczynniki podano w podrozdziale 4.3. Publikacji 1., s. 69). Ilość oraz czystość uzyskanego RNA określono metodą spektrofotometryczną. Do badań wykorzystano próby, których wartość współczynnika czystości RNA (wyliczonego na podstawie ilorazu wartości gęstości optycznej przy długościach fal 260 i 280 nm) mieściła się w zakresie 1,8–2,0. Dodatkowo, aby potwierdzić integralność uzyskanego RNA, wykonano elektroforezę losowo wybranych prób w 1% żelu agarozowym.

Uzyskane RNA stanowiło matrycę do **reakcji odwrotnej transkrypcji (RT)**. Do poszczególnych reakcji użyto 1 µg RNA z każdej próby. Podobnie jak w przypadku izolacji RNA, mieszaniny reakcyjne przygotowano z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych odczynników zgodnie z wytycznymi producentów (dokładny skład mieszanin oraz użyte odczynniki podano w podrozdziale 4.3. Publikacji 1., s. 69). Reakcje RT przeprowadzono poprzez inkubację przygotowanych mieszanin w temperaturze 37°C przez 1 h, a następnie w temperaturze 93°C przez 5 min, aby inaktywować odwrotną transkryptazę. Negatywne kontrole reakcji stanowiły próby, w których RNA zastąpiono wodą wolną od nukleaz. Uzyskane podczas reakcji cDNA rozcieńczono wodą wolną od nukleaz i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz.

Zsyntetyzowane cDNA (w ilości 10 ng) **amplifikowano w obecności starterów** specyficznych dla genów badanych (*RARRES2, CMKLR1, GPR1, CCRL2*) oraz genów referencyjnych. Dokładny skład mieszanin reakcyjnych, specyfikację użytych starterów, warunki reakcji oraz wykorzystany sprzęt opisano w podrozdziale 4.4. Publikacji 1., s. 69). Jako geny referencyjne do analizy ekspresji badanych genów w całych pęcherzykach posłużyły geny cyklofiliny A (*PPIA*) i rybosomalnego białka L19 (*RPL19*). Natomiast do analizy ekspresji badanych genów w komórkach ziarnistych, komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyka i ciałkach żółtych, jako geny referencyjne użyto gen ubikwityny C (*UBC*) oraz sekwencję kodującą RNA małej podjednostki rybosomu — 18S rRNA (*RNA18S*). Startery dla genów badanych oraz genów *PPIA* i *RPL19* zaprojektowano na podstawie znanych sekwencji nukleotydowych genów zdeponowanych w bazie GenBank (numery dostępowe wykorzystanych sekwencji podano w Tabeli 1. Publikacji 1., s. 70). Startery dla genów *UBC* i *RNA18S* zostały wybrane na podstawie publikacji, odpowiednio, MARTYNIAKA i in. (2018) oraz MARTYNIAKA i in. (2017). Na etapie walidacji

metody potwierdzono konstytutywną ekspresję wszystkich wskazanych genów referencyjnych w odpowiednich grupach badawczych (potwierdzone analizą statystyczną — jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA oraz testem *post hoc* Tukeya przy granicznym poziomie istotności $p > 0{,}05$). Reakcje amplifikacji dla każdej z prób wykonano w dwóch powtórzeniach. Kontrole negatywne reakcji (ang. *no template control*, NTC) stanowiły mieszaniny reakcyjne, w których matrycę zastąpiono wodą wolną od nukleaz. Względne poziomy ekspresji badanych genów w całych pęcherzykach obliczono metodą PFAFFLA (2001), a specyficzność uzyskanych amplikonów potwierdzono przez sekwencjonowanie uzyskanych produktów. Z kolei względne poziomy ekspresji badanych genów w komórkach ziarnistych, komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyka i ciałkach żółtych obliczono metodą komparatywną ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) LIVAKA i SCHMITTGENA (2001), której kalibratorem w każdym układzie porównawczym była grupa o najniższej ekspresji badanego genu. Specyficzność uzyskanych amplikonów potwierdzono przez wygenerowanie i ocenę krzywej topnienia dla poszczególnych genów oraz elektroforezę losowo wybranych prób w 1,5% żelu agarozowym z wykorzystaniem barwnika Midori Green DNA Stain (ABO, Polska). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

### 5.2.2. Western Blot

**Izolację białka** przeprowadzono poprzez dwu- lub trzykrotną (trwającą każdorazowo 15 s) homogenizację tkanek/komórek w buforze litycznym (składy zastosowanych buforów podano w podrozdziale 4.5. Publikacji 1., ss. 69–70). Całą procedurę homogenizacji przeprowadzono na lodzie, a po ostatniej homogenizacji próby inkubowano na lodzie przez 30 min. Po tym czasie homogenaty odwirowywano (warunki wirowań podano w podrozdziale 4.5. Publikacji 1., ss. 69–70), zebrano supernatanty stanowiące izolaty białkowe prób, przeniesiono je do probówek typu Eppendorf, a następnie przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz. Koncentracje białka w próbach określono za pomocą metody Bradforda na podstawie krzywej standardowej o zakresie od 0,156 mg/ml do 1 mg/ml.

Analizę **Western Blot** przeprowadzono na podstawie metodyki opisanej przez SMOLIŃSKĄ i in. (2019), wprowadzając modyfikacje wynikające z optymalizacji metody. Do prób zawierających 30 µg białka dodano bufor obciążający, a następnie

poddano je denaturacji w temperaturze 95°C przez 3 min. Tak przygotowane próby naniesiono na odpowiednio przygotowane żele poliakrylamidowe i poddano elektroforezie w warunkach denaturujących (SDS-PAGE, ang. *SDS poliacrylamide gel electrophoresis*). Rozdział elektroforetyczny w 4% żelu zagęszczającym prowadzono przez 30 min przy natężeniu prądu elektrycznego 15 mA na jeden aparat elektroforetyczny. Następnie, gdy białka przeszły z żelu zagęszczającego do żelu rozdzielającego o stężeniu 10%, 12% lub 12,5% (w zależności od wielkości badanego białka), elektroforezę prowadzono przez kolejne 2–3 h przy natężeniu prądu elektrycznego 30 mA na jeden aparat elektroforetyczny. Frakcje białkowe, które zostały rozdzielone podczas elektroforezy, przenoszono na membranę nitrocelulozową (Whatmann, UK) lub membranę wykonaną z polifluorku winylidenu o porowatości 0,22 µm (PVDF 0,22 µm; Merck Millipore, Niemcy) za pomocą transferu półsuchego (ang. *semi-dry*). Transfer trwał 90 min przy natężeniu prądu 0,8 mA/cm$^2$ żelu lub 30 min przy natężeniu prądu 2,4 mA/cm$^2$ żelu. Aby potwierdzić efektywność transferu białek, żele po transferze barwiono błękitem brylantowym Coomassie (Sigma-Aldrich, USA), a membrany barwiono za pomocą czerwieni Ponceau S (Merck Millipore, USA). Blokowanie miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał na membranach wykonano poprzez inkubację membran przez 1 h w temperaturze pokojowej w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w proszku (Sigma-Aldrich, USA) lub 5% roztworze surowiczej albuminy bydlęcej (BSA, ang. *bovine serum albumin*; Sigma-Aldrich, USA) w buforze TBST, czyli soli fizjologicznej buforowanej tris(hydroksymetylo)aminometem i zawierającej 0,1% Tween® 20. W dalszej kolejności membrany inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami I-rzędowymi (przez noc, w temperaturze 4°C) oraz II-rzędowymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową lub fosfatazą alkaliczną (1,5 h, w temperaturze pokojowej). Dokładna specyfikacja i koncentracje zastosowanych przeciwciał znajdują się w Tabelach 2. i 3. Publikacji 1. (s. 71). Powstałe immunokompleksy wizualizowano przy użyciu komercyjnych zestawów odczynników (zgodnie z wytycznymi producentów) metodą chemiluminescencji — za pomocą zestawów bazujących na luminolu (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology, USA oraz Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Sigma-Aldrich, USA) lub metodą kolorymetryczną — wykorzystując roztwór błękitu nitrotetrazoliowego i fosforanu 5-bromo-4-chloro-3-indolilu (NBT/BCIP

Stock Solution; Roche, Niemcy). Immunokompleksy o odpowiedniej wielkości były lokalizowane na membranie na podstawie oceny masy molekularnej widocznych frakcji białek względem komercyjnego markera białkowego (PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Thermo Fisher Scientific, USA). Efekt wizualizacji immunokompleksów rejestrowano i archiwizowano za pomocą odpowiednich urządzeń i oprogramowań do cyfrowego obrazowania, tj. G:Box EF Gel Documentation System (Syngene, Wielka Brytania) lub ChemiDoc-It Imaging System (UVP, LLC; Wielka Brytania). Zawartość odpowiednich białek w próbach badanych określano ilościowo za pomocą analizy densytometrycznej z wykorzystaniem oprogramowania Image Studio Lite v. 5.2 (LI-COR Biosciences, USA) oraz ImageJ (National Institutes of Health, USA). Aby określić względną koncentrację badanych białek, jako białko referencyjne zastosowano β-aktynę. Na etapie walidacji metody potwierdzono, że koncentracja β-aktyny w badanych tkankach/komórkach w analizowanych grupach badawczych utrzymywała się na podobnym poziomie (potwierdzone analizą statystyczną — jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA oraz testem *post hoc* Tukeya przy granicznym poziomie istotności $p > 0,05$). **Względną koncentrację badanych białek** obliczono poprzez dzielenie wyników analizy densytometrycznej białek chemeryny i jej receptorów przez wyniki analizy densytometrycznej białka β-aktyny dla każdej próby badanej. Uzyskane wartości poddano analizie statystycznej.

### 5.3. Fluorescencyjna immunohistochemia (zadanie nr 2)

Tkankową lokalizację białek chemeryny i jej receptorów w jajnikach świń określono z wykorzystaniem metody fluorescencyjnej immunohistochemii. Dokładna metodyka zadania nr 2 opisania jest w podrozdziale 4.8. Publikacji 1. (ss. 71–72). Poniżej opisano najważniejsze informacje dotyczące poszczególnych etapów metody.

Preparaty tkankowe suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej przez 30 min. Następnie, wszystkie kolejne etapy metody wykonywano w komorze wilgotnej. W celu zablokowania miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał, skrawki inkubowano z buforem blokującym (skład buforu podano w podrozdziale 4.8. Publikacji 1., ss. 71–72) w temperaturze pokojowej przez 1 h. Tkankową lokalizację białek chemeryny i jej receptorów określono z wykorzystaniem **pośredniej techniki immunohistochemii fluorescencyjnej**. Specyfikację i koncentracje zastosowanych

przeciwciał I- i II-rzędowych zawarto w Tabeli 4. Publikacji 1. (s. 72). Negatywne kontrole barwień stanowiły preparaty, w których przeciwciała I-rzędowe zastąpiono buforem PBS (0,1 M; pH = 7,4). Skrawki odwodniono przez suszenie preparatów na powietrzu w temperaturze pokojowej przez 15 min. Preparaty zamykano z użyciem medium do mikroskopii fluorescencyjnej (Fluoroshield™ with DAPI; Sigma-Aldrich, USA), które w swoim składzie zawiera dodatkowo DAPI do kontrastowego barwienia jąder komórkowych. Preparaty analizowano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego Olympus BX51 (Olympus, Japonia) wyposażonego w lampę EXFO x-Cite Series 120Q (Excelitas Technologies Corp., USA). Wynik barwień wizualizowano przy użyciu odpowiedniego zestawu filtrów optycznych dla barwników fluorescencyjnych DAPI i Alexa Fluor® 488. Obrazy rejestrowano i archiwizowano z wykorzystaniem światłoczułej kamery CCD Olympus DP72 i oprogramowania Cell$^F$ (Olympus, Japonia).

### 5.4. ELISA (zadanie nr 3)

**Koncentrację chemeryny w płynie pęcherzykowym** świń określono przy użyciu komercyjnie dostępnego testu ELISA (nr kat. EP0169; FineTest, Chiny) przeznaczonego do detekcji białek świni. Test wykonano zgodnie z wytycznymi producenta. Przed wykonaniem właściwej analizy wykonano wstępny eksperyment, w którym ustalono właściwe rozcieńczenia prób do wykonania testu. Najważniejsze informacje dotyczące testu, przygotowania prób, zakres krzywej standardowej, czułość testu, sposoby wykonania pomiarów absorbancji, wykreślenia krzywej i wykonania przeliczeń, a także błąd wewnątrzseryjny testu podano w podrozdziale 4.9. Publikacji 1. (s. 72). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

### 5.5. Izolacja komórek i hodowle komórkowe *in vitro* do zadań nr 4–6

**Izolację komórek** przeprowadzono wykorzystując pęcherzyki przedowulacyjne, bez oznak atrezji, o średnicy 8–12 mm (zadanie nr 4), a także ciałka żółte pozyskane od świń w różnych okresach fazy lutealnej (zadania nr 4–6) i/lub wybranych okresach wczesnej ciąży (zadanie nr 4). Pęcherzyki jajnikowe posłużyły do **izolacji komórek ziarnistych i komórek osłonki wewnętrznej**. Z kolei ciałka żółte posłużyły do **izolacji mieszaniny komórek lutealnych**, w skład której wchodziły małe i duże komórki lutealne, komórki śródbłonka, fibroblasty i perycyty w takim stosunku

ilościowym, w jakim naturalnie występują w ciałku żółtym. To podejście miało na celu uzyskanie hodowli komórkowych jak najbardziej zbliżonych do warunków fizjologicznych. Procedurę izolacji komórek przeprowadzono na podstawie metody opisanej przez MALESZKĘ i in. (2014). Komórki izolowano poprzez trawienie enzymatyczne tkanek 0,125% roztworem trypsyny w buforze PBS (Biomed Lublin, Polska; zadanie nr 4) lub 0,1% roztworem kolagenazy typu V (Sigma-Aldrich, USA) w buforze HBSS, czyli zrównoważonym roztworze soli Hanka (zadania nr 5 i 6) w łaźni wodnej w temperaturze 37°C. Różnica w zastosowanych enzymach jest efektem optymalizacji metody hodowli w trakcie realizowanych badań. Dodatkowo podczas izolacji komórek z ciałek żółtych, w celu zminimalizowania zanieczyszczenia komórek erytrocytami, zastosowano bufor do selektywnej lizy krwinek czerwonych (pH = 7,4). Po zakończeniu procedury izolacji komórki zawieszono w odpowiednim medium (dokładny rodzaj zastosowanego medium oraz jego skład podano w podrozdziałach 2.2. Publikacji 2. (ss. 79–80) oraz „*Cell isolation and in vitro cell cultures*" Publikacji 3. (ss. 98, 100), a następnie policzono komórki pod mikroskopem za pomocą hemocytometru (komory Bürkera). Żywotność komórek oszacowano stosując metodę barwienia 0,4% roztworem błękitu trypanu w buforze PBS (Sigma-Aldrich, USA). Dokładne wartości żywotności komórek dla poszczególnych zadań podano w podrozdziałach odpowiednich Publikacji 2. i 3. (ss. 79–80 oraz 98, 100). Komórki zawieszone w medium hodowlanym nanoszono na płytki 24-dołkowe (Sigma-Aldrich, USA) w zagęszczeniu $3 \times 10^5$ żywych komórek/1 ml/dołek (zadanie nr 4) lub na płytki 6-dołkowe (Sigma-Aldrich, USA) w zagęszczeniu $2 \times 10^6$ żywych komórek/2 ml/dołek (zadania nr 5 i 6). Komórki inkubowano wstępnie przez 24 h (komórki ziarniste i komórki osłonki wewnętrznej) lub 48 h (komórki lutealne). Po tym czasie medium zostało zebrane, komórki przepłukano buforem PBS (0,1 M; pH = 7,4) i dodano świeże medium (bez surowic, inne składniki medium bez zmian). Komórki inkubowane wyłącznie w medium hodowlanym bez dodatku czynników doświadczalnych stanowiły **kontrole**. Z kolei, w grupach badawczych komórki inkubowane były w medium zawierającym odpowiednie czynniki w następującym układzie:

- **chemeryna** w stężeniu 100 lub 200 ng/ml (zadania nr 4–6),
- **LH/FSH** i/lub **insulina** (zadanie nr 4),
- **chemeryna** w stężeniu 100 lub 200 ng/ml oraz **LH/FSH** i/lub **insulina** (zadanie nr 4).

W hodowli stosowano chemerynę, która była ludzkim białkiem rekombinowanym (nr kat. 268e10032; RayBiotech, USA), ponieważ w momencie przeprowadzania hodowli białko pochodzące od świni, tym bardziej o potwierdzonej aktywności w hodowlach komórkowych, nie było dostępne w sprzedaży. Jednakże badania wykazały, że sekwencja aminokwasowa chemeryny występującej u ludzi wykazuje 84%-podobieństwo do jej homologu występującego u świni (DU i LEUNG, 2009). Badania wykazały że C-końcowy fragment (YFPGQFAFS) dojrzałego białka, który pełni zasadniczą funkcję dla aktywności biologicznej chemeryny, jest wysoce konserwatywny u wszystkich gatunków ssaków (LUANGSAY i in., 2009). Samodzielnie przeprowadzona analiza sekwencji przy pomocy bazy danych Protein BLAST wykazała, że wskazana sekwencja aminokwasowa C-końcowego fragmentu dojrzałego białka wykazuje identyczność u wszystkich gatunków ssaków na poziomie 89% lub więcej (identyczne 8 lub 9 z 9 aminokwasów). To z kolei oznacza, że wiązanie chemeryny z odpowiednimi receptorami i jej działanie przez te receptory jest podobne u różnych gatunków ssaków. Potwierdzeniem powyższego może być fakt, że ludzkie białko rekombinowane było już z powodzeniem stosowane w podobnych eksperymentach z użyciem komórek izolowanych od krów (REVERCHON i in., 2014). Zastosowane stężenia chemeryny wybrano na podstawie wyników uzyskanych w zadaniu nr 3, w którym wykazano że fizjologiczne stężenie tego hormonu w płynie pęcherzykowym świń wynosi od 104,64 ± 5,28 ng/ml do 186,46 ± 5,66 ng/ml (średnie ± błąd standardowy średniej). Wybrane stężenia chemeryny są również zbliżone do fizjologicznych stężeń tego hormonu w osoczu świń (SMOLIŃSKA i in., 2019). Takie same stężenia hormonu zastosowano również w podobnych doświadczeniach innych zespołów badawczych (REVERCHON i in., 2012, 2014; WANG i in., 2013). Z kolei stężenia LH i FSH wybrano na podstawie pracy autorstwa GREGORASZCZUK i in. (2003), a stężenie insuliny na podstawie pracy autorstwa MALESZKI i in. (2014). Po dodaniu czynników badanych komórki inkubowano przez kolejne 24 h. Hodowlę prowadzono w inkubatorze z systemem nawilżania atmosfery komory wewnętrznej (Binder CB160, DanLab, Polska) w następujących warunkach: 37°C, 95% powietrza i 5% $CO_2$. Wszystkie doświadczenia wykonano w pięciu powtórzeniach biologicznych, a każde z nich w dwóch powtórzeniach technicznych. Żywotność komórek w hodowli oraz toksyczność zastosowanych czynników badawczych określono przy pomocy standardowego testu metabolicznego,

z wykorzystaniem komercyjnego odczynnika Alamar Blue® (AB; Thermo Fisher Scientific, USA), zgodnie z wytycznymi producenta. Wyniki uzyskane w tym teście potwierdziły, że zastosowane stężenia czynników badawczych nie wpłynęły na żywotność hodowanych komórek (dokładne wartości testu podano w podrozdziałach 2.2. Publikacji 2. (ss. 79–80) oraz „*Cell isolation and in vitro cell cultures*" Publikacji 3. (ss. 98, 100).

Po zakończeniu hodowli **media** zebrano i odwirowano (1 100 × g, 10 min, 4°C), supernatanty przeniesiono do probówek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych analiz (zadania nr 4 i 5). Z kolei **komórki**, które były hodowane na płytkach 6-dołkowych, posłużyły do uzyskania ekstraktów białkowych do realizacji zadań nr 5 i 6.

### 5.6. RIA (zadanie nr 4)

**Koncentrację hormonów steroidowych** ($P_4$, $A_4$, T, $E_1$ i $E_2$) określono w medium hodowlanym za pomocą metody RIA. Przed wykonaniem właściwej analizy wykonano eksperyment walidacyjny, w którym ustalono właściwe rozcieńczenia prób do wykonania analizy oraz koncentracje odpowiednich przeciwciał. Informacje dotyczące przebiegu metody, w tym swoistość wykorzystanych przeciwciał, opisano w podrozdziale 2.3 Publikacji 2. (s. 80). Z kolei wydajność ekstrakcji, czułość metody, zakresy krzywych standardowych dla poszczególnych hormonów, a także błędy wewnątrz- i międzyseryjne dla przeprowadzonych analiz przedstawiono w Tabeli 2. Publikacji 2. (s. 80). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

### 5.7. Przygotowanie prób do zadań nr 5 i 6

Aby zminimalizować liczbę zwierząt wykorzystanych w doświadczeniu oraz zmniejszyć koszty hodowli komórkowych, do ekstrakcji białka z komórek wykorzystano komercyjny odczynnik T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (nr kat. 78510; Thermo Fisher Scientific, USA). Odczynnik ten pozwala na ekstrakcję białek cytoplazmatycznych i błonowych z różnych przedziałów komórkowych, uwalniając także białka błonowe (do których należą badane w niniejszym zadaniu receptory czynników angiogennych), a lizaty komórkowe przygotowane za pomocą tego odczynnika mogą być z powodzeniem wykorzystywane we wszystkich

metodach, w których do detekcji białek wykorzystywane są przeciwciała, czyli zarówno w teście ELISA, jak i w metodzie Western Blot. Odczynnik ten pozwala też na określenie stężenia białka w próbach badanych klasycznymi metodami, takimi jak metoda Bradforda.

**Ekstrakcję białek z komórek** przeprowadzono zgodnie z wytycznymi producenta. Przed przystąpieniem do lizy komórek do odczynnika dodano inhibitory proteaz (aprotyninę, leupeptynę, pepstatynę i fluorek fenylometylosulfonylu w stężeniach końcowych, odpowiednio, 2 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 1 mM; Sigma-Aldrich, USA). Całą procedurę izolacji przeprowadzono na lodzie. Po zebraniu medium hodowlanego komórki trzykrotnie przepłukano schłodzonym buforem PBS (0,1 M, pH = 7,4; 4°C). Na każdy dołek płytki naniesiono równomiernie przygotowany bufor do ekstrakcji białek w objętości 200 µl. Następnie płytkę delikatnie wstrząsano przez 5 min. Kolejno, lizaty zebrano i zwirowano (10 000 × g, 5 min, 4°C). Supernatanty, stanowiące wyizolowane ekstrakty białkowe, przeniesiono do probówek typu Eppendorf, a następnie przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz. Koncentrację białka w próbach określono za pomocą metody Bradforda na podstawie krzywej standardowej o zakresie od 0,156 mg/ml do 1 mg/ml. Do realizacji zadania nr 5 wykorzystano dwie metody — test ELISA i Western Blot, z kolei zadanie nr 6 zrealizowano wykorzystując tylko jedną metodę — test ELISA.

### 5.8. ELISA (zadania nr 5 i 6)

**Koncentrację czynników angiogennych w medium hodowlanym** oraz **koncentrację czynników apoptotycznych w ekstraktach białkowych** określono przy użyciu komercyjnie dostępnych testów ELISA, przeznaczonych do detekcji białek świni (specyfikację każdego z użytych testów podano w Tabeli uzupełniającej S2 Publikacji 3.; s. 110). Wszystkie testy wykonano zgodnie z wytycznymi producentów. Przed wykonaniem właściwych analiz wykonano wstępne eksperymenty, w których ustalono właściwe rozcieńczenia prób do wykonania testu. Najważniejsze informacje dotyczące testów, przygotowania prób, zakresu krzywych standardowych, czułości testów, sposobu wykonania pomiarów absorbancji, wykreślenia krzywej i wykonania przeliczeń, a także błędy wewnątrz- i międzyseryjne dla poszczególnych testów podano w podrozdziale „*ELISA*" Publikacji 3. (s. 100) oraz w Tabeli uzupełniającej S2 Publikacji 3. (s. 110). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

### 5.9. Western Blot (zadanie nr 5)

**Koncentrację białek receptorów czynników angiogennych w ekstraktach białkowych** określono metodą Western Blot. Analizę przeprowadzono analogicznie do metodyki przedstawionej w podrozdziale 5.2.2. niniejszego opracowania, wprowadzając modyfikacje wynikające z optymalizacji metody na potrzeby realizacji zadania nr 5. Dokładna metodyka opisana jest w podrozdziale „*Western Blot analysis*" Publikacji 3. (ss. 101–102). Poniżej opisano najważniejsze informacje dotyczące poszczególnych etapów metody.

Do analizy wykorzystano próby zawierające 40 µg białka. Rozdział elektroforetyczny w żelu zagęszczającym prowadzono przez 30 min przy napięciu prądu elektrycznego 80 V na jeden aparat elektroforetyczny. Następnie, gdy białka przeszły z żelu zagęszczającego do żelu rozdzielającego o stężeniu 10% lub 12,5% (w zależności od wielkości badanego białka), elektroforezę prowadzono przez kolejne 2–3 h przy napięciu prądu elektrycznego 200 V na jeden aparat elektroforetyczny. Frakcje białkowe, które zostały rozdzielone podczas elektroforezy, przenoszono na membranę PVDF 0,22 µm (Merck Millipore, Niemcy) za pomocą transferu półsuchego przy napięciu prądu elektrycznego 12 V i natężeniu 5 A przez 12 lub 24 min. Blokowanie miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał na membranach wykonano poprzez inkubację membran w 5% roztworze BSA (Sigma-Aldrich, USA) w buforze TBST. W dalszej kolejności membrany inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami I-rzędowymi oraz II-rzędowymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową. Dokładna specyfikacja i koncentracje zastosowanych przeciwciał znajdują się w Tabeli uzupełniającej S3 Publikacji 3. (s. 111). Powstałe immunokompleksy wizualizowano przy użyciu komercyjnego zestawu Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore, USA). Efekt wizualizacji immunokompleksów rejestrowano i archiwizowano za pomocą systemu G:Box EF Gel Documentation System (Syngene, Wielka Brytania). Zawartość odpowiednich białek w próbach badanych określano ilościowo za pomocą analizy densytometrycznej z wykorzystaniem oprogramowania Image Studio Lite v. 5.2 (LI-COR Biosciences, USA). Aby określić względną koncentrację badanych białek, jako białko referencyjne zastosowano β-aktynę. Na etapie walidacji metody potwierdzono, że koncentracja β-aktyny w badanych grupach utrzymywała się na podobnym poziomie (potwierdzone

analizą statystyczną — jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA oraz testem *post hoc* Tukeya przy granicznym poziomie istotności $p > 0.05$). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

### 5.10. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki analizowano z wykorzystaniem programu Statistica v. 13.0 (StatSoft, USA). Za pomocą testów Shapiro-Wilka i Levene'a potwierdzono, odpowiednio, że rozkład wyników w każdej z analizowanych grup (n = 5) jest zbliżony do rozkładu normalnego, a wariancje w porównywanych grupach są do siebie podobne (potwierdzona homogenność grup). Następnie, różnice pomiędzy grupami w poszczególnych układach doświadczalnych określono za pomocą **jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA)** oraz **testu *post-hoc* Tukeya** (w przypadku zadań nr 1 i 3) lub **Dunnetta** (w przypadku zadań nr 4–6). Za istotne statystycznie różnice uznano te, dla których wartość $p \leq 0{,}05$. Szczegóły analiz statystycznych dla poszczególnych układów doświadczalnych opisano w podrozdziałach 4.10. Publikacji 1. (ss. 72–73; zadnia nr 1 i 3), 2.4. Publikacji 2. (s. 80; zadanie nr 4) oraz „*Statistical analysis*" Publikacji 3. (s. 102; zadania nr 5 i 6).

# 6. Wyniki

W niniejszym rozdziale zawarto jedynie najważniejsze wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej.

## 6.1. Zadanie nr 1

Wyniki uzyskane w tym zadaniu potwierdziły obecność transkryptów oraz białek chemeryny i jej receptorów w pęcherzykach świń niedojrzałych oraz dojrzałych płciowo, a także w ciałkach żółtych świń będących w cyklu rujowym lub wczesnej ciąży. Ponadto wykazano, że koncentracja transkryptów i białek elementów systemu chemerynowego zależna jest od etapu wzrostu/dojrzewania pęcherzyków jajnikowych lub fazy cyklu rujowego/etapu wczesnej ciąży w przypadku ciałek żółtych.

Stwierdzono, że poziom koncentracji transkryptów oraz białek chemeryny i receptora CMKLR1 jest odwrotnie proporcjonalny do wielkości pęcherzyków, zarówno u świń niedojrzałych jak i dojrzałych płciowo. Stwierdzono również, że koncentracja białka chemeryny w małych i średnich pęcherzykach świń dojrzałych jest wyższa niż w odpowiadających im pęcherzykach świń niedojrzałych płciowo. Zaobserwowano też, że u świń niedojrzałych płciowo koncentracja białek receptorów GPR1 i CCRL2 w małych pęcherzykach jest wyższa niż w pęcherzykach średnich. Z kolei u świń dojrzałych płciowo, poziom białek receptorów GPR1 i CCRL2 był wprost proporcjonalny do wielkości pęcherzyków. Natomiast koncentracja białek receptorów GPR1 i CCRL2 w małych pęcherzykach świń niedojrzałych była wyższa niż koncentracja tych białek w odpowiadających im pęcherzykach świń dojrzałych płciowo.

Porównując koncentrację białek elementów systemu chemerynowego w komórkach ziarnistych, komórkach osłonki wewnętrznej oraz ciałkach żółtych izolowanych w poszczególnych fazach cyklu rujowego odnotowano statystycznie podwyższony poziom białka chemeryny w komórkach osłonki wewnętrznej, a także białka receptora CCRL2 w komórkach ziarnistych i komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyków jajnikowych. Z kolei, istotnie niższą ekspresję białek chemeryny i receptora CCRL2 oraz wyższą koncentrację białek receptorów CMKLR1 i GPR1 stwierdzono w ciałkach żółtych świń w fazie środkowolutealnej

w porównaniu z ciałkami żółtymi izolowanymi w fazach wczesnolutealnej i późnolutealnej oraz komórkami ziarnistymi i osłonki wewnętrznej izolowanymi w fazie pęcherzykowej.

Porównując koncentrację białek elementów systemu chemerynowego w ciałkach żółtych świń w fazie środkowolutealnej cyklu rujowego oraz świń w różnych etapach wczesnej ciąży wykazano, że koncentracja białek chemeryny i receptora CCRL2 była wyższa w ciałkach żółtych świń ciężarnych niż w ciałkach żółtych świń w fazie środkowolutealnej. Odwrotną zależność zaobserwowano w przypadku białek receptorów CMKLR1 i GPR1, których koncentracja w ciałkach żółtych świń w fazie środkowolutealnej była wyższa niż w ciałkach żółtych świń ciężarnych. Analizując koncentrację białek elementów systemu chemerynowego tylko w ciałkach żółtych świń ciężarnych wykazano wysoką koncentrację białka chemeryny w ciałkach żółtych świń w okresie migracji zarodków w macicy, a znacznie niższą w ciałkach żółtych świń w okresie matczynego rozpoznania ciąży oraz na końcu implantacji. Zaobserwowano też wysoką koncentrację białka receptora CMKLR1 w ciałkach żółtych świń w okresach migracji zarodków w macicy oraz matczynego rozpoznania ciąży, natomiast wysoką koncentrację białka receptora GPR1 odnotowano w ciałkach żółtych świń na początku implantacji. Ponadto, wysoki poziom białka receptora CCRL2 wykazano w ciałkach żółtych świń w fazie migracji zarodków w macicy oraz na końcu implantacji.

Szczegółowy opis uzyskanych wyników zawarto w podrozdziałach 2.1.1.–2.1.8. Publikacji 1. (ss. 53, 54, 56, 58), natomiast Ryciny nr 1–8 Publikacji 1. (ss. 53, 55–61) przedstawiają wyniki w formie wykresów (metody qRT-PCR oraz Western Blot, wyniki przedstawione jako średnie ± błąd standardowy średniej) oraz zdjęć (efekty wizualizacji immunokompleksów w metodzie Western Blot).

### 6.2. Zadanie nr 2

Lokalizację chemeryny i jej receptorów (CMKLR1, GPR1, CCRL2) stwierdzono w pęcherzykach pierwotnych, pierwszorzędowych, drugorzędowych i antralnych, a także w dużych pęcherzykach przedowulacyjnych. W przypadku tych ostatnich, lokalizację elementów sytemu chemerynowego odnotowano w komórkach ziarnistych, komórkach osłonek wewnętrznej i zewnętrznej pęcherzyka, oocytach,

a także komórkach wzgórka jajonośnego. Immunolokalizację elementów sytemu chemerynowego zaobserwowano również w komórkach pęcherzyków atretycznych. Lokalizację chemeryny i jej receptorów wykazano również w ciałkach żółtych w okresie ich formowania, najwyższej aktywności i regresji. Wynik immunohistochemii fluorescencyjnej przedstawiono na Rycinach nr 9–12 Publikacji 1. (ss. 62–65).

### 6.3. Zadanie nr 3

Wyniki badań uzyskane w niniejszym zadaniu wykazały, że fizjologiczne stężenie chemeryny w płynie pęcherzykowym świń wynosi od 104,64 ± 5,28 ng/ml do 186,46 ± 5,66 ng/ml (średnie ± błąd standardowy średniej). Najniższa odnotowana wartość wynosiła 92,84 ng/ml, natomiast najwyższa — 199,12 ng/ml. Wykazano, że u świń niedojrzałych płciowo stężenie chemeryny w płynie pęcherzykowym wynosi od 104,64 ± 5,28 ng/ml do 127,62 ± 6,43 ng/ml (średnie ± błąd standardowy średniej), natomiast u świń dojrzałych płciowo, stężenie tego hormonu waha się w zakresie od 148,58 ± 5,59 ng/ml do 186,46 ± 5,66 ng/ml (średnie ± błąd standardowy średniej). Szczegółowy opis uzyskanych wyników zawarto w podrozdziale 2.3. Publikacji 1. (ss. 58, 60), natomiast Rycina nr 13 Publikacji 1. (s. 66) przedstawia wyniki w formie wykresów (średnie ± błąd standardowy średniej).

### 6.4. Zadanie nr 4

Wyniki uzyskane w niniejszym zadaniu wykazały zmiany w koncentracji hormonów steroidowych w medium hodowlanym pochodzącym z hodowli *in vitro* komórek jajników świń, w których komórki ziarniste i komórki osłonki wewnętrznej pęcherzyków jajnikowych oraz komórki lutealne świń inkubowane były w obecności chemeryny (w dwóch stężeniach) oraz czynników stymulujących (LH/FSH i/lub insuliny). Biorąc pod uwagę fakt, że hormony steroidowe wydzielane są z komórek niezwłocznie po ich syntezie, a magazynowanie hormonów steroidowych w komórkach jest znikome, o ile w ogóle występuje (STRAUSS i FITZGERALD, 2019), uzyskane wyniki wskazują na wpływ chemeryny a podstawową oraz stymulowaną LH/FSH i/lub insuliną sekrecję hormonów steroidowych i tym samym świadczą o wpływie chemeryny na syntezę *de novo* tych hormonów w komórkach jajników świń.

Wykazano, że chemeryna zwiększała podstawową i stymulowaną FSH i/lub insuliną sekrecję $P_4$ oraz zmniejszała podstawową i stymulowaną FSH i/lub insuliną sekrecję $E_2$ przez komórki ziarniste pęcherzyków jajnikowych. Chemeryna modulowała również (pobudzała lub hamowała) podstawową i stymulowaną LH/FSH i/lub insuliną sekrecję T przez komórki ziarniste i komórki osłonki wewnętrznej pęcherzyka. W przypadku komórek lutealnych, chemeryna pobudzała podstawową i stymulowaną LH i/lub insuliną sekrecję $P_4$ oraz hamowała podstawową i stymulowaną LH i/lub insuliną sekrecję $E_2$ przez komórki izolowane w fazie lutealnej oraz w okresie matczynego rozpoznania ciąży. Chemeryna powodowała również wzrost podstawowej i stymulowanej LH i/lub insuliną sekrecji $A_4$, T i $E_1$ przez komórki lutealne świń w okresie matczynego rozpoznania ciąży. Zaobserwowano także, że chemeryna pobudzała stymulowaną LH i/lub insuliną sekrecję $P_4$ przez komórki lutealne na początku implantacji.

Szczegółowy opis uzyskanych wyników zawarto w rozdziale 3. Publikacji 2. (ss. 80–82), natomiast Pliki Uzupełniające nr 1–7 Publikacji 2. (ss. 85–91) przedstawiają wyniki w formie wykresów (średnie ± błąd standardowy średniej). Dodatkowo podsumowanie uzyskanych wyników przedstawiono w Tabeli 3. Publikacji 2. (s. 81).

### 6.5. Zadanie nr 5

Wyniki uzyskane w niniejszym zadaniu wykazały zmiany w koncentracji czynników angiogennych w medium hodowlanym oraz zmiany w poziomie białek receptorów czynników angiogennych w ekstraktach białkowych pochodzących hodowli *in vitro* komórek lutealnych świń poddanych działaniu chemeryny w dwóch stężeniach. Dlatego też uzyskane wyniki wskazują na wpływ chemeryny na proces angiogenezy w ciałkach żółtych świń, o czym świadczy modulujący wpływ tego hormonu na koncentrację badanych białek.

Wykazano, że chemeryna (w obu badanych stężeniach) stymulowała sekrecję VEGF-A przez komórki lutealne świń w fazach środkowolutealnej i późnolutealnej. Stwierdzono również, że chemeryna (w obu badanych stężeniach) zwiększała koncentrację białek receptorów VEGFR1 i VEGFR2 w komórkach lutealnych świń we wszystkich badanych fazach cyklu rujowego. Zaobserwowano też, że chemeryna (w obu badanych stężeniach) zwiększała koncentrację białka receptora VEGFR3

w komórkach lutealnych świń w fazach wczesnolutealnej i środkowolutealnej. W przypadku rodziny białek czynnika wzrostu fibroblastów wykazano, że chemeryna (w obu badanych stężeniach) stymulowała sekrecję bFGF przez komórki lutealne świń w fazach wczesnolutealnej i środkowolutealnej. Stwierdzono również, że chemeryna (w obu badanych stężeniach) zwiększała koncentrację białka receptora FGFR1 w komórkach lutealnych świń w fazie wczesnolutealnej oraz zwiększała koncentrację białka FGFR2 w komórkach lutealnych świń w fazach wczesnolutealnej i późnolutealnej.

Szczegółowy opis uzyskanych wyników zawarto w podrozdziale „*The* in vitro *effect of chemerin on the angiogenesis process in the porcine CL*" Publikacji 3. (ss. 102–103), natomiast wyniki przedstawiono w dwóch formach: w formie wykresów prezentujących dokładną koncentrację czynników VEGF-A i bFGF oraz względną koncentrację białek receptorów VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR1 i FGFR2 w poszczególnych grupach (średnie ± błąd standardowy średniej) — jako Ryciny nr 1–4 Publikacji 3. (ss. 98–101) oraz w formie tabeli, w której podano krotność zmian koncentracji badanych białek oraz dokładne wartości *p* dla każdego układu eksperymentalnego — Tabela uzupełniająca S4 Publikacji 3. (s. 112). Dodatkowo podsumowanie uzyskanych wyników przedstawiono na Rycinie nr 8 Publikacji 3. (s. 105).

### 6.6. Zadanie nr 6

Wyniki uzyskane w niniejszym zadaniu wykazały zmiany w koncentracji białek czynników apoptotycznych w ekstraktach białkowych pochodzących z hodowli *in vitro* komórek lutealnych świń inkubowanych w obecności chemeryny w dwóch stężeniach. Dlatego też uzyskane wyniki wskazują na wpływ chemeryny na proces apoptozy w ciałkach żółtych świń, o czym świadczy modulujący wpływ tego hormonu na koncentrację badanych białek.

W komórkach lutealnych świń z fazy wczesnolutealnej chemeryna w wyższym stężeniu zwiększała koncentrację czynnika Fas, podczas gdy w obu badanych stężeniach zmniejszała koncentrację czynnika FasL. W komórkach lutealnych świń z fazy środkowolutealnej chemeryna (w obu badanych stężeniach) zmniejszała koncentrację czynników Fas i FasL oraz zwiększała koncentrację czynnika Bcl-2. Natomiast w komórkach lutealnych świń z fazy późnolutealnej chemeryna (w obu

badanych stężeniach) zwiększała koncentrację czynników Fas i FasL oraz zmniejszała koncentrację czynników Bcl-2 i Casp3. Wykazano również, że chemeryna (w obu badanych stężeniach) nie wpływała na koncentrację czynnika BAX w komórkach lutealnych świń we wszystkich badanych fazach cyklu rujowego.

Szczegółowy opis uzyskanych wyników zawarto w podrozdziale „*The* in vitro *effect of chemerin on the apoptosis process in the porcine CL*" Publikacji 3. (s. 104), natomiast wyniki przedstawiono w dwóch formach: w formie wykresów prezentujących dokładną koncentrację czynników Fas, FasL, Bcl-2, BAX i Casp3 w poszczególnych grupach (średnie ± błąd standardowy średniej) — jako Rynicy nr 5–7 Publikacji 3. (ss. 102, 103) oraz w formie tabeli, w której podano krotność zmian koncentracji badanych białek oraz dokładne wartości *p* dla każdego układu eksperymentalnego — Tabela uzupełniająca S4 Publikacji 3. (s. 112). Dodatkowo podsumowanie uzyskanych wyników przedstawiono na Rycinie nr 8 Publikacji 3. (s. 105).

## 7. Podsumowanie uzyskanych wyników i wnioski

W niniejszej pracy doktorskiej, po raz pierwszy, w sposób kompleksowy określono rolę chemeryny w jajnikach świni domowej. Uzyskane wyniki potwierdziły, że chemeryna jest produkowana lokalnie i bezpośrednio wpływa na funkcjonowanie komórek jajników, co także potwierdza obecność receptorów chemeryny (CMKLR1, GPR1, CCRL2) we wszystkich badanych strukturach tych narządów. Ponadto wykazano, że chemeryna wpływa (stymulująco lub hamująco, w zależności od typu badanych komórek, fazy cyklu rujowego i/lub okresu wczesnej ciąży) na procesy steroidogenezy, angiogenezy i apoptozy w jajnikach świni domowej.

Analizując obecność transkryptów i białek elementów systemu chemerynowego w tkankach/komórkach jajników świń można zauważyć, że ekspresja chemeryny i jej receptorów jest zależna od dojrzałości płciowej świń oraz statusu hormonalnego zwierząt wynikającego z fazy cyklu rujowego lub okresu wczesnej ciąży. W przypadku pęcherzyków jajnikowych zaobserwowano pewien wzór ekspresji elementów systemu chemerynowego w zależności od etapu wzrostu/dojrzewania pęcherzyków. Dlatego nie można wykluczyć, że obserwowane zmiany w ekspresji chemeryny i jej receptorów w pęcherzykach jajnikowych świń wynikają ze zmian w poziomie hormonów steroidowych w płynie pęcherzykowym lub stosunku stężeń tych hormonów na różnych etapach wzrostu/dojrzewania pęcherzyków. GRUPEN i in. (2003) wykazali, że stężenia $P_4$ i $A_4$ w płynie pęcherzykowym świń dojrzałych jest wyższe niż w płynie pęcherzykowym zwierząt niedojrzałych płciowo. Podobnie, BAGG i in. (2007) odnotowali, że stężenie $P_4$ w płynie pęcherzykowym świń dojrzałych jest nawet 11-krotnie wyższe niż w płynie pęcherzykowym zwierząt niedojrzałych, a poziom $P_4$ w płynie pęcherzykowym świń niedojrzałych jest wprost proporcjonalny do wielkości pęcherzyków jajnikowych. Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez RAK-MARDYŁĘ i GREGORASZCZUK (2012) stwierdzono, że zarówno u zwierząt niedojrzałych jak i dojrzałych płciowo, poziom $E_2$ w płynie pęcherzykowym świń jest wprost proporcjonalny do wielkości pęcherzyków jajnikowych. Również w przypadku ekspresji elementów systemu chemerynowego w tkankach/komórkach jajników świń będących w różnych fazach cyklu rujowego oraz określonych etapach wczesnej ciąży, poziom ekspresji chemeryny i jej receptorów może być zależny od koncentracji hormonów steroidowych we krwi samicy. W niniejszej pracy doktorskiej, w fazie pęcherzykowej, czyli w okresie charakteryzującym się

wysokim stężeniem $E_2$ we krwi loszek (KA i in., 2018), wykazano wysoką koncentrację białka chemeryny w komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyków, a także wysoką koncentrację białka receptora CCRL2 zarówno w komórkach ziarnistych, jak i komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyków jajnikowych. Z kolei w fazie środkowolutealnej, czyli okresie charakteryzującym się wysokim stężeniem $P_4$ we krwi loszek (KA i in., 2018), stwierdzono wyraźnie niski poziom białek chemeryny i receptora CCRL2 oraz wysoką koncentrację białek receptorów CMKLR1 i GPR1. Jednakże, aby potwierdzić te zależności, konieczne są dalsze badania, w których zostanie określony dokładny wpływ poszczególnych hormonów na ekspresję elementów systemu chemerynowego w jajniku świni domowej.

W niniejszej pracy doktorskiej wykazano obecność transkryptów i białek chemeryny i jej receptorów w pęcherzykach zwierząt niedojrzałych płciowo, wskazując, że hormon ten może brać udział w regulacji procesów związanych z wczesnym rozwojem gonad, wpływając tym samym na wzrost i rozwój pęcherzyków jajnikowych zwierząt jeszcze przed osiągnieciem dojrzałości płciowej. Ponadto, u zwierząt dojrzałych, stwierdzono wysoką koncentrację białka chemeryny w komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyków oraz wysoką zawartość białka receptora CCRL2 (który nie jest w stanie przekazywać sygnału, a jedynie wiąże chemerynę koncentrując ją w określonych miejscach) w komórkach ziarnistych i komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyków przedowulacyjnych. W fazie pęcherzykowej cyklu rujowego odnotowano też, że chemeryna pobudzała podstawową i stymulowaną FSH i/lub insuliną sekrecję $P_4$ oraz hamowała podstawową i stymulowaną FSH i/lub insuliną sekrecję $E_2$ przez komórki ziarniste pęcherzyków jajnikowych, a także modulowała (pobudzała lub hamowała) podstawową i stymulowaną LH/FSH i/lub insuliną sekrecję T przez komórki ziarniste i komórki osłonki wewnętrznej pęcherzyków. Dostępne dane literaturowe wskazują, że chemeryna wpływa na wzrost i rozwój pęcherzyków jajnikowych u ludzi, szczurów i krów (REVERCHON i in., 2012; WANG i in., 2013; REVERCHON i in., 2014), a także hamuje dojrzewanie oocytów u krów (REVERCHON i in., 2014). Dlatego nie można wykluczyć, że także u świń chemeryna reguluje wzrost i dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych, jednakże potrzebne są dalsze badania, aby określić jaką dokładnie funkcję pełni chemeryna w tym procesie.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej wskazują, że podobnie jak w przypadku jajników kobiet (REVERCHON i in., 2012; KIM i in., 2013), lokalna synteza chemeryny w pęcherzykach jajnikowych zwiększa koncentrację tego hormonu w płynie pęcherzykowym świń w stosunku do koncentracji chemeryny w osoczu. W pracy doktorskiej wykazano, że stężenie chemeryny w płynie pęcherzykowym świń w fazie środkowolutealnej (kiedy aktywność ciałek żółtych jest najwyższa w cyklu rujowym) wynosi 186,46 ± 5,66 ng/ml, natomiast w fazie pęcherzykowej (kiedy występują duże pęcherzyki przedowulacyjne) stężenie tego hormonu w płynie pęcherzykowym świń wynosi 148,58 ± 5,59 ng/ml. Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez SMOLIŃSKĄ i in. (2019) odnotowano, że stężenie chemeryny w osoczu świń we wskazanych fazach cyklu rujowego wynosi odpowiednio 78,76 ± 15,10 ng/ml i 96,43 ± 17,13 ng/ml. To z kolei oznacza, że stężenie chemeryny w płynie pęcherzykowym świń jest prawie 2,5-krotnie wyższe w fazie środkowolutealnej i ponad 1,5-krotnie wyższe w fazie pęcherzykowej w stosunku do koncentracji chemeryny odnotowanej w tych fazach cyklu w osoczu świń. Zaobserwowano też, że stężenie chemeryny w płynie pęcherzykowym świń odpowiada koncentracji białka chemeryny w pęcherzykach w określonych etapach wzrostu/dojrzewania. Co więcej, w badaniach przeprowadzonych przez SMOLIŃSKĄ i in. (2019) stwierdzono zupełnie inny wzorzec zmian w koncentracji chemeryny w osoczu świń w cyklu rujowym, niż ten odnotowany w płynie pęcherzykowym. To z kolei wskazuje, że głównym źródłem chemeryny w płynie pęcherzykowym są komórki ziarniste i komórki osłonki wewnętrznej, a działanie chemeryny na komórki pęcherzyka ma, co najmniej w części, działanie autoktynne lub parakrynne.

Faza wczesnolutealna jest okresem intensywnych przemian, w którym pęcherzyki jajnikowe przekształcają się w ciałka żółte w procesie luteinizacji, a faza ta charakteryzuje się stopniowym wzrostem stężenia $P_4$ i gwałtownym spadkiem stężenia $E_2$ we krwi samic. W badaniach przeprowadzonych przez SMOLIŃSKĄ i in. (2019) w fazie wczesnolutealnej odnotowano najwyższe stężenie chemeryny w osoczu świń w cyklu rujowym, a stężenie to było prawie 2-krotnie wyższe niż w pozostałych fazach cyklu rujowego. W niniejszej pracy doktorskiej w fazie wczesnolutealnej wykazano, że chemeryna pobudzała podstawową sekrecję $P_4$ i hamowała stymulowaną LH i/lub insuliną sekrecję $E_2$ przez komórki lutealne świń.

Stwierdzono też, że chemeryna znacząco stymulowała sekrecję bFGF przez komórki lutealne oraz zwiększała koncentrację białek receptorów VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR1 i FGFR2 w tych komórkach, wskazując na stymulację procesu angiogenezy w tej fazie. Ponadto odnotowano, że chemeryna zmniejszała koncentrację czynnika FasL w komórkach lutealnych świń oraz zwiększała koncentrację czynnika Fas, który jak wskazują dane literaturowe, poza pełnieniem funkcji receptora zewnętrznego szlaku aktywacji apoptozy, stanowi także czynnik regulujący odpowiedź immunologiczną oraz może wykazywać działanie nieapoptotyczne lub nawet stymulować proliferację komórek (PETER i in., 2007). Dlatego też uzyskane wyniki wskazują, że chemeryna może wzmacniać sygnał luteotropowy i przyczyniać się do prawidłowego tworzenia ciałek żółtych w fazie wczesnolutealnej poprzez stymulację angiogenezy, promowanie funkcji endokrynnej ciałek żółtych, a także regulację odpowiedzi immunologicznej we wczesnym stadium formowania się ciałek żółtych.

Faza środkowolutealna charakteryzuje się występowaniem w pełni rozwiniętych ciałek żółtych, których aktywność sekrecyjna jest najwyższa w cyklu rujowym i podobna do tej odnotowywanej w czasie ciąży. W niniejszej pracy doktorskiej, w ciałkach żółtych izolowanych w fazie środkowolutealnej, wykazano najwyższą w cyklu rujowym koncentrację białek receptorów CMKLR1 i GPR1 (czyli receptorów zdolnych do przekazywania sygnału), co wskazuje na zwiększoną wrażliwość komórek na działanie chemeryny w tej fazie cyklu. W fazie środkowolutealnej stwierdzono również najwyższe stężenie chemeryny w płynie pęcherzykowym świń w cyklu rujowym. Odnotowano również, że w tej fazie chemeryna pobudzała podstawową oraz stymulowaną LH i/lub insuliną sekrecję $P_4$ przez komórki lutealne świń. W fazie środkowolutealnej, chemeryna stymulowała sekrecję czynników VEGF-A i bFGF przez komórki lutealne oraz powodowała wzrost koncentracji białek receptorów VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 i FGFR2 w tych komórkach, wskazując na stymulację procesu angiogenezy w ciałkach żółtych świń. Stwierdzono także, że w fazie środkowolutealnej chemeryna obniżała koncentrację białek Fas i FasL (czynników zewnętrznego szlaku aktywacji apoptozy), a także zwiększała koncentrację białka Bcl-2 (czynnika antyapoptotycznego) bez wpływu na koncentrację białka BAX (czynnik proapoptotyczny) w komórkach lutealnych. Przedstawione wyniki wyraźnie wskazują, że chemeryna, działając bezpośrednio i/lub pośrednio, może wpływać

na utrzymanie produkcji i sekrecji $P_4$ przez komórki lutealne świń w fazie środkowolutealnej. Ponadto, chemeryna promuje przepuszczalność, stabilizację i integralność naczyń krwionośnych w ciałkach żółtych, a także wydaje się chronić komórki lutealne przed apoptozą w fazie najwyższej aktywności ciałek żółtych u świń.

Faza późnolutealna obejmuje przede wszystkim funkcjonalną i strukturalną luteolizę ciałek żółtych oraz charakteryzuje się spadkiem stężenia $P_4$ i stopniowym wzrostem stężenia $E_2$ we krwi samic. W niniejszej pracy doktorskiej wykazano, że koncentracja białek chemeryny i receptora CCRL2 była istotnie wyższa w ciałkach żółtych świń w fazie późnolutealnej niż w fazie środkowolutealnej. Stwierdzono także, że w fazie późnolutealnej chemeryna pobudzała podstawową i stymulowaną LH lub insuliną sekrecję $P_4$, a także hamowała stymulowaną LH i/lub insuliną sekrecję $E_2$ przez komórki lutealne. Odnotowano też, że w fazie późnolutealnej chemeryna stymulowała sekrecję czynnika VEGF-A przez komórki lutealne oraz zwiększała koncentrację białek receptorów VEGFR1 i VEGFR2 w tych komórkach, wskazując na stymulację procesu angiogenezy. Wykazano również, że mimo iż chemeryna zwiększała koncentrację białka Casp3 (najważniejszego czynnika fazy wykonawczej apoptozy), to również obniżała koncentrację białek Fas i FasL oraz zwiększała koncentrację białka Bcl-2. Dlatego też uzyskane wyniki wskazują, że chemeryna może przedłużać endokrynną funkcję ciałek żółtych w fazie późnolutealnej, promując proces angiogenezy w ciałkach żółtych oraz podtrzymując produkcję i sekrecję $P_4$ przez komórki lutealne świń.

Uzyskane wyniki wskazują również, że chemeryna może regulować funkcjonowanie jajników świń w czasie wczesnej ciąży. W niniejszej pracy doktorskiej wykazano wysoką koncentrację białka chemeryny w ciałkach żółtych świń w okresie migracji zarodków w macicy. Zaobserwowano też wysoką koncentrację białka receptora CMKLR1 w ciałkach żółtych świń w okresach migracji zarodków w macicy oraz matczynego rozpoznania ciąży, natomiast wysoką koncentrację białka receptora GPR1 odnotowano w ciałkach żółtych świń na początku implantacji. W badaniach przeprowadzonych przez SMOLIŃSKĄ i in. (2019) odnotowano bardzo wysokie stężenie chemeryny w osoczu świń na początku implantacji. Z kolei, w niniejszej pracy doktorskiej stwierdzono wysoką koncentrację białka receptora CCRL2 w ciałkach żółtych świń w fazie migracji zarodków w macicy oraz na końcu implantacji. Chemeryna pobudzała też stymulowaną LH i/lub insuliną sekrecję $P_4$, $A_4$,

T i $E_1$ oraz hamowała stymulowaną LH i/lub insuliną sekrecję $E_2$ przez komórki lutealne świń w okresie matczynego rozpoznania ciąży. Zaobserwowano także, że chemeryna pobudzała stymulowaną LH i/lub insuliną sekrecję $P_4$ i $A_4$ przez komórki jajników świń na początku implantacji. Uzyskane wyniki wskazują więc, że chemeryna stymuluje sekrecję $P_4$ przez komórki lutealne świń, promując funkcje endokrynne ciałek żółtych we wczesnej ciąży, co z kolei może przyczyniać się do ustanowienia i utrzymania ciąży u świń. Nie wykluczone też, że chemeryna pobudzając sekrecję androgenów przez komórki lutealne świń dostarcza substratów do embrionalnej syntezy estrogenów w macicy. Jednakże, potrzebne są dalsze badania, aby potwierdzić te spostrzeżenia.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej wskazują, że chemeryna może regulować wzrost i dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych, wzmacniać sygnał luteotropowy przyczyniając się do prawidłowego formowania i funkcjonowania ciałek żółtych, stymulować proces angiogenezy oraz chronić przed apoptozą. Wobec tego **chemeryna — hormon znany przede wszystkim z roli w modulacji odpowiedzi immunologicznej oraz regulacji homeostazy energetycznej organizmu, jest również ważnym czynnikiem regulującym funkcjonowanie jajników świń**.

*Szczegółową dyskusję dotyczącą uzyskanych wyników*
*oraz ich interpretację w kontekście dostępnych danych literaturowych*
*opisano w rozdziałach „Dyskusja” Publikacji 1. (ss. 60, 62–68),*
*Publikacji 2. (ss. 82, 83) oraz Publikacji 3. (ss. 104, 106).*

## BIBLIOGRAFIA

AKINS E.L., MORRISSETTE M.C. 1968. Gross ovarian changes during estrous cycle of swine. Am. J. Vet. Res. 29(10): 1953–1957.

ANDERSON L.L. 1978. Growth, protein content and distribution of early pig embryos. Anat. Rec. 190(1): 143–153.
https://doi.org/10.1002/ar.1091900112

BAGG M.A., NOTTLE M.B., ARMSTRONG D.T., GRUPEN C.G. 2007. Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. Reprod. Fertil. Dev. 19(7): 797–803.
https://doi.org/10.1071/rd07018

BENDIXEN E., DANIELSEN M., LARSEN K., BENDIXEN C. 2010. Advances in porcine genomics and proteomics — a toolbox for developing the pig as a model organism for molecular biomedical research. Brief. Funct. Genomics. 9(3): 208–219.
https://doi.org/10.1093/bfgp/elq004

BOWEN-SHAUVER J. M., GIBORI G. 2003. The corpus luteum of pregnancy. W: LEUNG P.C.K., ADASHI E.Y. (red.). The ovary: second edition. Elsevier Academic Press: 201–230.
https://doi.org/10.1016/B978-012444562-8/50013-6

BOZAOGLU K., BOLTON K., MCMILLAN J., ZIMMET P., JOWETT J., COLLIER G., WALDER K., SEGAL D. 2007. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. Endocrinology. 148(10): 4687–4694.
https://doi.org/10.1210/en.2007-0175

BOZAOGLU K., CURRAN J.E., STOCKER C.J., ZAIBI M.S., SEGAL D., KONSTANTOPOULOS N., MORRISON S., CARLESS M., DYER T.D., COLE S.A., GORING H.H., MOSES E.K., WALDER K., CAWTHORNE M.A., BLANGERO J., JOWETT J.B. 2010. Chemerin, a novel adipokine in the regulation of angiogenesis. J. Clin. Endocrinol. Metab. 95(5): 2476–2485.
https://doi.org/10.1210/jc.2010-0042

CAMPBELL B.K., SOUZA C., GONG J., WEBB R., KENDALL N., MARSTERS P., ROBINSON G., MITCHELL A., TELFER E.E., BAIRD D.T. 2003. Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. Reprod. Suppl. 61: 429–443.

CHOMCZYŃSKI P., SACCHI N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162(1): 156–159.
https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999

DU X.Y., LEUNG L.L. 2009. Proteolytic regulatory mechanism of chemerin bioactivity. Acta Biochim. Biophys. Sin. 41(12): 973–979.
https://doi.org/10.1093/abbs/gmp091

DUPONT J., SCARAMUZZI R.J. 2016. Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle. Biochem. J. 473(11): 1483–1501. https://doi.org/10.1042/BCJ20160124

GARCIA-GARCIA R.M. 2012. Integrative control of energy balance and reproduction in females. ISRN Vet. Sci. 2012(121389): 1–13. https://doi.org/10.5402/2012/121389

GONZÁLEZ-ALVAREZ R., GARZA-RODRÍGUEZ MDE L., DELGADO-ENCISO I., TREVIÑO--ALVARADO V.M., CANALES-DEL-CASTILLO R., MARTÍNEZ-DE-VILLARREAL L.E., LUGO--TRAMPE Á., TEJERO M.E., SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH N.E., ROCHA-PIZAÑA MDEL R., COLE S.A., RESÉNDEZ-PÉREZ D., MOISES-ALVAREZ M., COMUZZIE A.G., BARRERA-SALDAÑA H.A., GARZA-GUAJARDO R., BARBOZA-QUINTANA O., RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ I.P. 2015. Molecular evolution and expression profile of the chemerine encoding gene RARRES2 in baboon and chimpanzee. Biol. Res. 48(1): 1–7. https://doi.org/10.1186/s40659-015-0020-0

GORALSKI K.B., MCCARTHY T.C., HANNIMAN E.A., ZABEL B.A., BUTCHER E.C., PARLEE S.D., MURUGANANDAN S., SINAL C.J. 2007. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. J. Biol. Chem. 282(38): 28175–28188. https://doi.org/10.1074/jbc.M700793200

GREGORASZCZUK E.L. 1996. Large and small cells of the porcine corpus luteum: differential capacity to secrete estradiol and aromatize exogenous androgen during mid- and late-luteal phase. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. 104(3): 278–283. https://doi.org/10.1055/s-0029-1211454

GREGORASZCZUK E.L., SKAŁKA M. 1996. Thyroid hormone as a regulator of basal and human chorionic gonadotrophin-stimulated steroidogenesis by cultured porcine theca and granulosa cells isolated at different stages of the follicular phase. Reprod. Fertil. Dev. 8(6): 961–967. https://doi.org/10.1016/10.1071/rd9960961

GREGORASZCZUK E.Ł., WÓJTOWICZ A.K., PTAK A., NOWAK K. 2003. In vitro effect of leptin on steroids' secretion by FSH- and LH-treated porcine small, medium and large preovulatory follicles. Reprod. Biol. 3(3): 227–239.

GRUPEN C.G., MCILFATRICK S.M., ASHMAN R.J., BOQUEST A.C., ARMSTRONG D.T., NOTTLE M.B. 2003. Relationship between donor animal age, follicular fluid steroid content and oocyte developmental competence in the pig. Reprod. Fertil. Dev. 15(1–2): 81–87. https://doi.org/10.1071/rd02086

GRZESIAK M., KNAPCZYK-STWORA K., CIERESZKO R.E., WIECIECH I., SLOMCZYNSKA M. 2014. Alterations in luteal production of androstenedione, testosterone, and estrone, but not estradiol, during mid- and late pregnancy in pigs: effects of androgen deficiency. Theriogenology. 82(5): 720–733. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.06.005

HELFER G., WU Q.F. 2018. Chemerin: a multifaceted adipokine involved in metabolic disorders. J. Endocrinol. 238(2): R79–R94. https://doi.org/10.1530/JOE-18-0174

HU B., SONG W., TANG Y., SHI M., LI H., YU D. 2019. Induction of chemerin on autophagy and apoptosis in dairy cow mammary epithelial cells. Animals (Basel). 9(10): 1–13. https://doi.org/10.3390/ani9100848

HUANG R., YUE J., SUN Y., ZHENG J., TAO T., LI S., LIU W. 2015. Increased serum chemerin concentrations in patients with polycystic ovary syndrome: Relationship between insulin resistance and ovarian volume. Clin. Chim. Acta. 450: 366-369. https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.09.015

HUGHES P.E. 1982. Factors affecting natural attainment of puberty in the gilt. W: COLE D.J.A., FOXCROFT G.R. (red.). Control of pig reproduction. Butterworths Scientific: 161–177.

KA H., SEO H., CHOI Y., YOO I., HAN J. 2018. Endometrial response to conceptus-derived estrogen and interleukin-1β at the time of implantation in pigs. J. Anim. Sci. Biotechnol. 9(44): 1–17. https://doi.org/10.1186/s40104-018-0259-8

KIM J.Y., XUE K., CAO M., WANG Q., LIU J.Y., LEADER A., HAN J.Y., TSANG B.K. 2013. Chemerin suppresses ovarian follicular development and its potential involvement in follicular arrest in rats treated chronically with dihydrotestosterone. Endocrinology. 154(8): 2912–2923. https://doi.org/10.1210/en.2013-1001

KUZMUK K.N., SCHOOK L.B. 2011. Pigs as a model for biomedical sciences. W: ROTHSCHILD M.F., RUVINSKY A. (red.). The genetics of the pig: second edition. CABI Publishing: 426–444.

LEMON M., LOIR M. 1977. Steroid release in vitro by two luteal cell types in the corpus luteum of the pregnant sow. J. Endocrinol. 72(3): 351–359. https://doi.org/10.1677/joe.0.0720351

LI J.J., BICKEL P.J., BIGGIN M.D. 2014. System wide analyses have underestimated protein abundances and the importance of transcription in mammals. PeerJ. 2(e270): 1–27. https://doi.org/10.7717/peerj.270

LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(t)) method. Methods. 25(4): 402–408. https://doi.org/1006/meth.2001.1262

LUANGSAY S., WITTAMER V., BONDUE B., DE HENAU O., ROUGER L., BRAIT M., FRANSSEN J.D., DE NADAI P., HUAUX F., PARMENTIER M. 2009. Mouse ChemR23 is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model. J. Immunol. 183(10): 6489–6499. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901037

MADEJ A., LANG A., BRANDT Y., KINDAHL H., MADSEN M.T., EINARSSON S. 2005. Factors regulating ovarian function in pigs. Domest. Anim. Endocrinol. 29(2): 347–361. https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.02.030

MALESZKA A., SMOLIŃSKA N., NITKIEWICZ A., KIEŻUN M., CHOJNOWSKA K., DOBRZYŃ K., SZWACZEK H., KAMIŃSKI T. 2014. Adiponectin expression in the porcine ovary during the oestrous cycle and its effect on ovarian steroidogenesis. Int. J. Endocrinol. 2014(95707): 1–10.
https://doi.org/10.1155/2014/957076

MARTYNIAK M., FRANCZAK A., KOTWICA G. 2017. Interleukin-1β system in the oviducts of pigs during the oestrous cycle and early pregnancy. Theriogenology. 96: 31–41.
https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.023

MARTYNIAK M., FRANCZAK A., KOTWICA G. 2018. Synthesis of steroid hormones in the porcine oviduct during early pregnancy. Reprod. Biol. 18(2): 143–150.
https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.02.002

MATTERN A., ZELLMANN T., BECK-SICKINGER A.G. 2014. Processing, signaling, and physiological function of chemerin. IUBMB Life. 66(1): 19–26.
https://doi.org/10.1002/iub.1242

MELLOUK N., RAMÉ C., BARBE A., GRANDHAYE J., FROMENT P., DUPONT J. 2018. Chicken is a useful model to investigate the role of adipokines in metabolic and reproductive diseases. Int. J. Endocrinol. 2018(4579734): 1–19.

NAKAMURA N., NARUSE K., KOBAYASHI Y., MIYABE M., SAIKI T., ENOMOTO A., TAKAHASHI M., MATSUBARA T. 2018. Chemerin promotes angiogenesis in vivo. Physiol. Rep. 6(24): 1–13.
https://doi.org/10.14814/phy2.13962

PETER M.E., BUDD R.C., DESBARATS J., HEDRICK S.M., HUEBER A.O., NEWELL M.K., OWEN L.B., POPE R.M., TSCHOPP J., WAJANT H., WALLACH D., WILTROUT R.H., ZÖRNIG M., LYNCH D.H. 2007. The CD95 receptor: apoptosis revisited. 129(3): 447–450.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.031

PETERS H., MCNATTY K.P. (red.). 1980. The ovary. University of California Press, Oakland, 175ss.

PFAFFL M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29(9): 1–6.
https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45

PRUNIER A., QUESNEL H. 2000. Influence of the nutritional status on ovarian development in female pigs. Anim. Reprod. Sci. 60–61: 185–197.
https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00093-2

PUKITE J. (red.). 1999. A field guide to pigs. Falcon Publishing, Helena, 126ss.

RAK-MARDYŁA A., GREGORASZCZUK E.L. 2012. Expression of ghrelin and its receptor in porcine ovarian follicles collected from prepubertal and estrous cycle animals. J. Physiol. Pharmacol. 63(2): 195–199.

RAO M.C., GIBORI G. 1987. Corpus luteum: animal models of possible relevance to reproductive toxicology. Reprod. Toxicol. 1(1): 61–69.
https://doi.org/10.1016/0890-6238(87)90073-6

REVERCHON M., BERTOLDO M.J., RAMÉ C., FROMENT P., DUPONT J. 2014. Chemerin (RARRES2) decreases in vitro granulosa cell steroidogenesis and blocks oocyte meiotic progression in bovine species. Biol. Reprod. 90(5): 1–15. https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.117044

REVERCHON M., CORNUAU M., RAMÉ C., GUERIF F., ROYÈRE D., DUPONT J. 2012. Chemerin inhibits IGF-1-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. Hum. Reprod. 27(6): 1790–1800. https://doi.org/10.1093/humrep/des089

RHRISSORRAKRAI K., BELCASTRO V., BILAL E., NOREL R., POUSSIN C., MATHIS C., DULIZE R.H., IVANOV N.V., ALEXOPOULOS L., RICE J.J., PEITSCH M.C., STOLOVITZKY G., MEYER P., HOENG J. 2015. Understanding the limits of animal models as predictors of human biology: lessons learned from the sbv improver species translation challenge. Bioinformatics. 31(4): 471–483. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu611

RODRÍGUEZ-PENAS D., FEIJÓO-BANDÍN S., GARCÍA-RÚA V., MOSQUERA-LEAL A., DURÁN D., VARELA A., PORTOLÉS M., ROSELLÓ-LLETÍ E., RIVERA M., DIÉGUEZ C., GUALILLO O., GONZÁLEZ-JUANATEY J.R., LAGO F. 2015. The adipokine chemerin induces apoptosis in cardiomyocytes. Cell. Physiol. Biochem. 37(1): 176–192. https://doi.org/10.1159/000430343

ROHRER G., BEEVER J.E., ROTHSCHILD M.F., SCHOOK L., GIBBS R., WEINSTOCK G. 2003. Porcine Genomic Sequencing Initiative. Soc. Reprod. Fertil. Suppl. 62: 293–301.

SCHWANHÄUSSER B., BUSSE D., LI N., DITTMAR G., SCHUCHHARDT J., WOLF J., CHEN W., SELBACH M. 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. 473(7347): 337–342. https://doi.org/10.1038/nature10098

SMOLIŃSKA N., KIEŻUN M., DOBRZYŃ K., RYTELEWSKA E., KISIELEWSKA K., GUDELSKA M., ZAOBIDNA E., BOGUS-NOWAKOWSKA K., WYRĘBEK J., BORS K., KOPIJ G., KAMIŃSKA B., KAMIŃSKI T. 2019. Expression of chemerin and its receptors in the porcine hypothalamus and plasma chemerin levels during the oestrous cycle and early pregnancy. Int. J. Mol. Sci. 20(16): 1–27. https://doi.org/10.3390/ijms20163887

STOKŁOSOWA S., GREGORASZCZUK E., CHANNING C.P.1982. Estrogen and progesterone secretion by isolated cultured porcine thecal and granulosa cells. Biol. Reprod. 26(5): 943–952. https://doi.org/10.1095/biolreprod26.5.943

STRAUSS J.F., FITZGERALD G.A. 2019. Steroid hormones and other lipid molecules involved in human reproduction. W: STRAUSS J.F., BARBIERI R.L. (red.). Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology. Elsevier: 75–114. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00004-4

SU X., CHENG Y., ZHANG G., WANG B. 2021. Chemerin in inflammatory diseases. Clin. Chim. Acta. 517: 41–47. https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.02.010

WANG Q., LEADER A., TSANG B.K. 2013. Inhibitory roles of prohibitin and chemerin in FSH-induced rat granulosa cell steroidogenesis. Endocrinology. 154(2): 956–967. https://doi.org/10.1210/en.2012-1836

YANG Y.L., REN L.R., SUN L.F., HUANG C., XIAO T.X., WANG B.B., CHEN J., ZABEL B.A., REN P., ZHANG J.V. 2016. The role of GPR1 signaling in mice corpus luteum. J. Endocrinol. 230(1): 55–65.
https://doi.org/10.1530/JOE-15-0521

YAO J., LI Z., FU Y., WU R., WANG Y., LIU C., YANG L., ZHANG H. 2019. Involvement of obesity-associated upregulation of chemerin/chemokine-like receptor 1 in oxidative stress and apoptosis in ovaries and granulosa cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 510(3): 449–455.
https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.125