STRESZCZENIE

Wpływ szlaku sygnałowego leptyny na zmiany ekspresji genów i białek inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy

Otyłość wynika z dysproporcji pomiędzy ilością przyjmowanych kalorii a wydatkiem energetycznym. Rozrost białej tkanki tłuszczowej podczas otyłości prowadzi do zwiększenia produkcji leptyny, która reguluje funkcjonowanie jajnika kontrolując steroidogenezę, folikulogenezę lub rozwój ciałka żółtego. Otyłość jest związana z wystąpieniem zwiększonego stanu zapalnego jajników, brakiem owulacji i obniżeniem jakości oocytów. Ponadto matczyna otyłość związana jest także z nieprawidłowym rozwojem zarodka lub zwiększonym ryzykiem śmierci płodu. Zatem lepsze zrozumienie patogenezy stanu zapalnego w jajniku może rozwikłać mechanizmy leżące u podstaw niewydolności jajników i niepłodności podczas rozwoju otyłości. Jednym z czynników, który bierze udział w aktywacji cytokin prozapalnych takich jak interleukina 1β (IL-1β) i IL-18 jest inflamasom NLRP3 (ang. NOD-like receptor protein 3), którego rola w jajniku jest słabo poznana. Ponadto ostatnie badania wykazały powstawanie leptynooporności w jajnikach otyłych myszy. W związku z tym postawiono następującą hipotezę: szlak sygnałowy leptyny pośredniczy w regulacji inflamasomu NLRP3 w jajniku otyłych myszy. Celem pracy było scharakteryzowanie ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka w jajnikach otyłych myszy, a w szczególności oddziaływania ze szlakiem sygnałowym leptyny.

W doświadczeniach wykorzystano następujące modele: otyłości indukowanej dietą (ang. diet-induced obesity – DIO): myszy szczepu C57BL/6J (B6) karmione przez okres 4 tyg. dietą standardową (ang. chow diet, CD, 4 tyg. CD) lub wysokotłuszczową (ang. high fat diet, HFD, 4 tyg. HFD) oraz 16 tyg. CD lub 16 tyg. HFD; model otyłości uwarunkowanej genetycznie: myszy pozbawione genu receptora leptyny (*db/db*) i grupa myszy kontrolnych (*db/+*); myszy pozbawione genu leptyny (*ob/ob*) i grupa myszy kontrolnych (*ob/+*); model farmakologicznej hiperleptynemii: myszy szczepu B6, którym podawano dootrzewnowo 100 μg leptyny przez 16 dni (16L) lub sól fizjologiczną (16K). W celu scharakteryzowania profilu aktywacji inflamasomu NLRP3 w trakcie cyklu płciowego, określono ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 w jajniku myszy w fazach *estrus* i *diestrus*. Zaobserwowano zwiększoną ekspresję NLRP3 i IL-18 na poziomie białka w jajnikach myszy w fazie *diestrus*. Ponadto potwierdzono

immunolokalizację NLRP3 w komórkach ziarnistych (ang. granulosa cells – GCs), komórkach osłonki (ang. theca cells - TCs) i oocytach. Następnie badano oddziaływanie między szlakiem sygnałowym leptyny a aktywacją inflamasomu NLRP3 w jajnikach otyłych myszy z wykorzystaniem mysiego modelu DIO, otyłości uwarunkowanej genetycznie i farmakologicznej hiperleptynemii. U myszy DIO ekspresja elementów szlaku inflammasomu NLRP3 (NLRP3, IL-18 p24) na poziomie białka była zwiększona w grupie 4 tyg. HFD, ale obniżona w grupie 16 tyg. HFD. U myszy *db/db* nie stwierdzono różnic w ekspresji elementów szlaku inflamasomu NLRP3, z wyjątkiem zmniejszonej ekspresji *Il-1β* na poziomie mRNA. Ponadto u myszy *ob/ob* ekspresja NLRP3 na poziomie białka i stężenie IL-1β były znacznie obniżone. Ta obserwacja różniła się od wyników przeprowadzonych na myszy z hiperleptynemią, u których stwierdzono zwiększoną ekspresję elementów szlaku inflammasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka oraz stężenie IL-1β w jajnikach myszy 16L. W kolejnym eksperymencie przeprowadzono analizę transkryptomiczną GCs pobranych z jajników myszy *db/db* i myszy *ob/ob*. Pomimo podobieństw masy ciała u otyłych myszy homozygotycznych (średnia masa ciała 40 gramów, podczas gdy myszy kontrolne *db/+* i *ob/+* ważyły około 20 gramów), globalny profil ekspresji genów różnił się między myszami *db/db* i *ob/ob*, jak również w obrębie konkretnych genów zaangażowanych w rozwój pęcherzyków i owulację. W GC myszy *db/db* stwierdzono obniżoną ekspresję genów regulujących steroidogenezę i związanych z działaniem prostaglandyn, podczas gdy u myszy *ob/ob* wykazano podwyższoną ekspresję genów regulujących steroidogenezę i metabolizm lipidów. Ponadto w modelu wczesnej fazy otyłości (4 tyg. HFD) i 16L określono wpływ leptyny na ekspresję genów inflamasomu NLRP3 w komórkach wzgórka jajonośnego (ang. cumulus cells - CCs). Analiza transkryptomiczna CCs myszy 4 tyg. HFD i 16L wykazała występowanie wspólnych genów modulujących aktywność inflamasomu NLRP3. Poza tym leptyna zwiększyła ekspresję genów inflamasomu NLRP3 w CCs myszy 16L. W ostatnim eksperymencie wpływ leptyny na ekspresję inflammasomu NLRP3 na poziomie mRNA i białka w wątrobie otyłych myszy był częściowo odmienny niż w jajnikach. Zaobserwowano zwiększoną ekspresję elementów szlaku inflamasomu NLRP3 na poziomie białka w wątrobie tylko u myszy 16 tyg. HFD, podczas gdy u myszy *ob/ob* pozostała obniżona, co potwierdza związek ze szlakiem sygnałowym leptyny.

Podsumowując, wykazano zwiększoną aktywność inflamasomu NLRP3 w jajniku myszy podczas fazy *diestrus*. Potwierdzona lokalizacja NLRP3 w GCs, TCs i oocytach,

sugeruje potencjalną rolę inflamasomu NLRP3 w rozwoju pęcherzyków oraz funkcjonowaniu ciałka żółtego. Ponadto wykazano, że aktywny szlak sygnałowy leptyny reguluje aktywność inflamasomu NLRP3 w jajnikach myszy we wczesnej otyłości. Natomiast po ustanowieniu leptynooporności w jajniku myszy w późnej otyłości, aktywność inflamasomu NLRP3 ulega zmniejszeniu. To wskazuje, że leptyna reguluje inflammasom NLRP3 w jajnikach otyłych myszy. Analiza transkryptomiczna GCs myszy *db/db* i *ob/ob* wykazała, że zaburzenia szlaku sygnałowego leptyny przyczyniają się do zmiany ekspresji genów kluczowych dla rozwoju pęcherzyków jajnikowych myszy. Oba szczepy myszy *db/db* i *ob/ob* mają różne wzorce działania leptyny i różne odpowiedzi. Na przykład niekanoniczne działanie leptyny u myszy *db/db*, pozbawionych receptora leptyny, skutkuje upośledzeniem steroidogenezy i aktywności prostaglandyn, co może również wpływać na proces owulacji i prawdopodobny udział inflamasomu NLRP3, podczas gdy całkowity brak leptyny u myszy *ob/ob* dodatkowo wpływa na metabolizm lipidów, który jest kluczowy dla rozwoju oocytów. To pokazuje, że dynamiczne zmiany w szlaku sygnałowym leptyny podczas otyłości mogą w różny sposób wpływać na funkcjonowanie jajników. Analiza transkryptomiczna CCs myszy 4 tyg. HFD i 16L potwierdziła występowanie wspólnych genów regulujących aktywność inflamasomu NLRP3. Co więcej, aktywacja inflamasomu NLRP3 w jajnikach myszy we wczesnej otyłości była odmienna od jego aktywacji w wątrobie myszy wyłącznie podczas późnej otyłości. Uzyskane wyniki wskazują nowe możliwości leczenia niepłodności u otyłych samic, szczególnie w zakresie technik wspomaganego rozrodu u ludzi i zwierząt.